

Molekulare Analyse der kompatiblen Interaktion von
Piriformospora indica
mit Gerste (*Hordeum vulgare* L.)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
(Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Justus-Liebig-Universität Gießen

durchgeführt am
Institut für Phytopathologie
und Angewandte Zoologie

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Stefanie Pfiffi
Gießen, Oktober 2009

Dekan: Prof. Dr. Ingrid-Ute Leonhäuser
1. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Wissemann

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schäfer, P.*, Pfiffi, S.*, Voll, L.M., Zajic, D., Chandler, P.M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kogel, K.H. (2009)
Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *Plant J*, 59(3):461-74.

* contributed equally

Schäfer, P., Pfiffi, S., Voll, L.M., Zajic, D., Chandler, P.M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kogel, K.H. (2009)
Phytohormones in plant root-*Piriformospora indica* mutualism. *Plant Signal Behav*, 4: 669-671.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Mutualistische Interaktionen	1
1.2 <i>Piriformospora indica</i>	2
1.2.1 Taxonomische Zuordnung	2
1.2.2 Wurzelbesiedlung durch <i>P. indica</i>	3
1.3 Pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Pathogene	4
1.3.1 Das pflanzliche Immunsystem	4
1.4 Die Rolle der Phytohormone in der Pathogenabwehr	6
1.5 Gibberellinsäure (GA)	8
1.5.1 Die GA-Biosynthese in Pflanzen	8
1.5.2 Der Mechanismus des GA-Signalweges	12
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Organismen	16
2.2 Kultivierung der verwendeten Organismen	16
2.2.1 <i>Hordeum vulgare</i> L.	16
2.2.2 <i>Piriformospora indica</i>	17
2.2.3 Kultivierung von <i>Rhizoctonia solani</i>	19
2.3 Behandlung der Pflanzen	19
2.3.1 Inokulieren von Gerstenwurzeln mit <i>P. indica</i>	19
2.3.2 GA ₃ -Zugabe	20
2.3.3 Ernte der Wurzeln	20
2.4 Molekularbiologische Methoden	20
2.4.1 RNA-Extraktion	20
2.4.1.1 RNA-Proben für Affymetrix-Microarray-Experimente	20
2.4.1.2 RNA Extraktion mit TRIzol	21
2.4.2 cDNA-Synthese	22
2.4.3 Extraktion genomischer DNA aus Wurzeln	22
2.4.4 Gelelektrophorese	23
2.4.4.1 TBE-Gele	23
2.4.4.2 Denaturierende MOPS-Gele	23

2.4.4.3 Bioanalyser	24
2.4.5 PCR, qPCR.....	24
2.4.6 Hybridisierung der Microarrays	25
2.4.6.1 Affymetrix Barley1 GeneChip.....	25
2.4.6.2 Agilent One-Colour Barley Microarray	27
2.5 Proteinbiochemische Methoden	29
2.5.1 Extraktion von Gesamtprotein aus Wurzeln.....	29
2.5.2 Bradford-Assay	29
2.5.3 Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse.	29
2.6 Mikroskopische Analysen besiedelter Gerstenwurzeln	31
2.6.1 Fixierung.....	31
2.6.2 WGA-Färbung.....	31
2.7 Luminol-Assay.....	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Verlauf der Wurzelbesiedlung mit <i>P. indica</i>	33
3.2 Transkriptomanalyse von <i>P. indica</i> besiedelten Wurzeln	34
3.2.1 Affymetrix-Microarrays	34
3.2.2 Agilent-Microarrays	36
3.2.3 Verifizierung der Microarray-Daten mittels quantitativer real-time PCR....	43
3.2.4 <i>P. indica</i> beeinflusst Phytohormonsynthese und –signalgebung	45
3.2.5 Veränderungen des Sekundärmetabolismus während der Wurzelbesiedlung durch <i>P. indica</i>	47
3.3 Der Einfluss von <i>P. indica</i> auf die Besiedlung und Genexpression in GA-Mutanten	49
3.3.1 Besiedlung der GA-Mutanten durch <i>P. indica</i>	50
3.3.2 Expression von Salizylsäure- und Jasmonsäure-responsiven Genen in <i>P. indica</i> -besiedelten GA-Mutanten	53
3.3.3 Genexpressionsuntersuchungen von Komponenten des GA-Signalwegs während der Besiedlung mit <i>P. indica</i>	55
3.4 <i>P. indica</i> -Besiedlung und Genexpression in Himalaya nach GA ₃ -Zugabe	56
3.5 Detektion des SLENDER-Proteins während der Besiedlung mit <i>P. indica</i>	58
3.6 Quantifizierung des <i>oxidative burst</i> in <i>P. indica</i> -besiedelten Gerstenwurzeln .	59

4. Diskussion	62
4.1 Transkriptionsanalyse von <i>P. indica</i> -besiedelten Gerstenwurzeln	62
4.1.1 Analyse der Transkriptomdaten des Affymetrix Barley1 GeneChip	62
4.1.2 Analyse der Transkriptomdaten der Agilent-Microarrays	64
4.1.3 Manipulation der pflanzlichen Abwehrreaktionen durch <i>P. indica</i>	65
4.1.4 Auswirkungen der <i>P. indica</i> -Besiedlung auf Signalgebung und Biosynthese der Phytohormone	68
4.1.5 Die Induktion des MEP-Stoffwechselwegs und der GA-Biosynthese in <i>P. indica</i> -besiedelten Gerstenwurzeln	72
4.2 GA-Biosynthese und –Signalgebung in <i>P. indica</i> -besiedelten Gerstenwurzeln	73
4.3 <i>P. indica</i> unterdrückt die Bildung von H ₂ O ₂ in Gerstenwurzeln	76
5. Zusammenfassung/ Summary	79
5.1 Zusammenfassung	79
5.2 Summary	80
6. Literaturverzeichnis	82
7. Anhang	95

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CM	komplexes (<i>complex</i>) Medium
cRNA	komplementäre (<i>complementary</i>) RNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv.	Sorte, Kultivar (Cultivar)
dai	Tage nach Inokulation (<i>days after inoculation</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET	Ethylen
FC	<i>fold change</i>
f.sp.	forma specialis
GA	Gibberellinsäure
h	Stunden
H ₂ O	dest. destilliertes Wasser
hai	Stunden nach Inokulation (<i>hours after inoculation</i>)
ISR	induzierte systemische Resistenz (<i>induced systemic resistance</i>)
JA	Jasmonsäure (<i>jasmonic acid</i>)
kDa	Kilodalton
LRR	<i>leucin-rich-repeat</i>
MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>
MEP	Methylerythritolphosphat
min	Minute(n)
MOPS	Morpholin-3-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)

NaCl	Natriumchlorid
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PR	<i>pathogenesis-related</i> (Pathogenese-bedingt)
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
qPCR	quantitative real-time PCR
RLU	relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoff Arten (<i>reactive oxygen species</i>)
RT	Raumtemperatur
SA	Salizylsäure
SAR	systemisch ausgelöste Resistenz (<i>systemic acquired resistance</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-HCl + Na ₂ -EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1 Mutualistische Interaktionen

In natürlichen Ökosystemen werden viele Pflanzen von Pathogenen befallen, von denen nicht alle Krankheitssymptome hervorrufen, sondern positive Auswirkungen auf Wachstum, abiotische oder biotische Stresstoleranz haben können, wie im Falle von bestimmten Wurzelendophyten. Wenn bei einer Interaktion von Pflanzen mit Endophyten beide Interaktionspartner Nutzen daraus ziehen, bezeichnet man dies als Mutualismus. Ein prominentes Beispiel für mutualistische Symbionten sind die obligat biotrophen Mykorrhizapilze, die nachweislich schon seit über 400 Millionen Jahren existieren und symbiontisch in Wurzeln ihrer Wirtpflanzen leben (Remy et al., 1994; Dotzler et al., 2006). Brundrett (2004) definiert Mykorrhiza als eine symbiontische Interaktion zwischen dem Pilz und der Wurzel einer Pflanze, wobei die Interaktion für mindestens einen Partner essentiell sein sollte. Mykorrhizapilze werden in Ektomykorrhiza, Endomykorrhiza und Ektendomykorrhiza unterteilt, je nach Lokalisation der pilzlichen Hyphen in, bzw. an den Wirtszellen (Peyronel et al., 1969). Zu den Endomykorrhiza zählt auch die arbuskuläre Mykorrhiza (AM), die in 80% der terrestrischen Pflanzen vorkommen (Wang und Qiu, 2006) und systematisch den Glomeramycota zugeordnet werden (Schüßler et al., 2001). Während der Entwicklung der Symbiose werden bäumchenformige Strukturen, die so genannten Arbuskeln, gebildet, die dem Nährstoffaustausch zwischen Pilz und Pflanze dienen. Dabei erhält der Pilz Kohlenhydrate von der Pflanze und versorgt im Gegenzug über Hyphen und Arbuskeln die Pflanze mit Wasser und Nährstoffen (Finlay, 2008; Bago et al., 2003). Insbesondere in nährstoffarmen Böden hat diese Interaktion wichtige Vorteile für die besiedelte Pflanze. So kommt es zu Wachstumsförderung und Toleranz gegen abiotischen und biotischen Stress, zum Beispiel einer erhöhten Resistenz gegen Wurzelpathogene (Whipps, 2001) aber auch diverse Blattpathogene (Cordier et al., 1998; Pozo et al., 2002).

Außer den arbuskulären Mykorrhizapilzen gibt es auch andere Mutualisten, wie zum Beispiel einige Wurzelendophyten, die ebenfalls symbiontisch mit der Wirtspflanze interagieren, bei denen jedoch im Vergleich zu AM ein Großteil des pilzlichen Myzels in der Pflanze wächst. Zu dieser Gruppe gehört auch der Wurzelendophyt *Piriformospora indica*, dessen Lebensweise im nächsten Kapitel behandelt wird.

1.2 *Piriformospora indica*

1.2.1 Taxonomische Zuordnung

Piriformospora indica ist ein Basidiomycet der Ordnung der *Sebacinales* (Weiss et al., 2004) und wurde 1997 in der indischen Thar-Wüste von der Spore des Mykorrhizapilzes *Glomus mosseae* isoliert (Verma et al., 1998). Phylogenetische Untersuchungen der Sequenz der großen Untereinheit der ribosomalen DNA ermöglichten die Zuordnung von *P. indica* zu den *Sebacinales*, eine Gruppe von verschiedenen Mykorrhizapilzen, die als wachstumsfördernd und Resistenz-induzierend beschrieben werden (Baltruschat et al., 2008; Deshmukh et al., 2006; Weiss et al., 2004), jedoch konnte bisher noch keine teleomorphe Form des Basidiomyceten gefunden werden. *P. indica* zeigt viele Eigenschaften von AM: Es werden zwar keine Arbuskel ausgebildet, jedoch kommt es in *Arabidopsis* und Gerste, aber auch in einer Orchideenart (*Dactylorhiza* spp.) zur Bildung von intrazellulären Hyphenstrukturen, die an spezielle intrazelluläre Strukturen der Orchideenmykorrhiza erinnern (Schäfer und Kogel, 2009; Deshmukh et al., 2006; Blechert et al., 1999). Der Pilz hat ein breites Wirtsspektrum, welches verschiedene mono- und dikotyledone Pflanzen, wie zum Beispiel Mais, Tabak, Petersilie, Gerste und Weizen, umfasst (Serfling et al., 2007; Varma et al., 1999). Eine mutualistische Interaktion etabliert *P. indica* auch an Wurzeln der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Pham et al., 2004), wodurch eine gezielte molekulare Analyse der Interaktion mithilfe der für *Arabidopsis* verfügbaren Mutanten ermöglicht wird.

Im Gegensatz zu AM kann *P. indica* axenisch kultiviert werden. Dies erleichtert zum einen die Handhabung des Pilzes im Labor, zudem ist *P. indica* dadurch zugänglich für revers-genetische Ansätze. Ein System zur stabilen Transformation konnte kürzlich etabliert werden (Zuccaro et al., 2009). Die Genomsequenz des Pilzes wird ebenfalls in naher Zukunft verfügbar sein (A. Zuccaro, unveröffentlicht). Damit wird *P. indica* zu einem sehr gut zugänglichen Modellorganismus zur Erforschung der Grundlagen von mutualistischen Interaktionen.

1.2.2 Wurzelbesiedlung durch *P. indica*

Da die Besiedlung der Wurzeln von verschiedenen Pflanzen mit *P. indica* zu einer Steigerung des Wachstums und der Toleranz gegen abiotischen und biotischen Stress führt (Varma et al., 1999; Waller et al., 2005), besteht ein verstärktes wissenschaftliches Interesse an der Aufklärung dieser Prozesse, die auch von ökonomischer Relevanz für die praktische Landwirtschaft sein können. Außerdem kann der Pilz nicht nur lokal in der Wurzel Resistenz gegen Wurzelpathogene wie *Fusarium graminearum* bewirken (Deshmukh und Kogel, 2007), sondern auch systemisch in den Blättern gegen den Erreger des echten Mehltaus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Waller et al., 2005). *P. indica* kolonisiert hauptsächlich älteres Gewebe, darum findet man in der Differenzierungszone und in der Wurzelhaarzone die meisten Pilzhyphen, während das jüngere Gewebe der meristematischen Zone fast völlig unbesiedelt ist. Dies unterscheidet *P. indica* von Arbuskulären Mykorrhiza, welche die metabolische Aktivität der jüngeren Gewebe zum effizienten Nährstoffaustausch benötigen (Karandashov und Bucher, 2005). Durch zytologische Untersuchungen konnten einige Details des Besiedlungsschemas aufgeklärt werden. Die Chlamydosporen keimen an der Oberfläche der Wurzel aus und bilden ein dichtes Netzwerk aus Hyphen, die sich sowohl inter- als auch intrazellulär ausbreiten können, dabei beschränkt sich die Besiedlung jedoch ausschließlich auf die Rhizodermis und die äußeren Schichten des Wurzelkortex (Deshmukh et al., 2006). Nach einigen Tagen bildet der Pilz in Wurzelzellen, Wurzelhaarzellen aber auch auf der Oberfläche der Wurzel neue Chlamydosporen. Es konnte gezeigt werden, dass die Besiedlung von Gerstenwurzelzellen von einer Zelltodreaktion abhängen. Während der Besiedlung mit *P. indica* ist der negative Zelltod-Regulator *Bax-Inhibitor1* stark reprimiert und Gerstenpflanzen, die *Bax-Inhibitor1* konstitutiv überexprimieren, werden schlechter besiedelt (Deshmukh et al., 2006). Unklar ist noch, ob der Pilz diesen programmierten Zelltod in besiedelten Wurzelzellen aktiv auslöst oder durch die Pflanze mit diesem Zelltod konfrontiert wird. Die vorläufigen Ergebnisse elektronenmikroskopischer Studien in Arabidopsis deuten daraufhin, dass es zu Beginn der Kolonisation eine biotrophe Phase gibt, die dann nach einiger Zeit in eine zelltod-abhängige Besiedlungsphase übergeht (Schäfer und Zechmann, unveröffentlicht).

1.3 Pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Pathogene

Da sich Pflanzen als sessile Organismen nicht durch Fortbewegung einem Angriff von potentiellen Krankheitserregern entziehen können, haben sie zahlreiche Abwehrmechanismen entwickelt. Zunächst müssen Pathogene die so genannten präformierten Barrieren überwinden, die schon vor dem Kontakt mit dem Pathogen vorhanden sind. Diese können biochemischer oder physikalischer Natur sein, wie zum Beispiel die Cuticula auf den Blättern. Um diese Barrieren zu umgehen, dringen viele Pathogene durch natürliche Öffnungen wie Stomata oder auch durch Verwundungen in die Wirtspflanze ein (Buchanan et al., 2000). Mikroorganismen, welche Cuticula und Zellwand mittels sekretierter Enzyme oder mechanischem Druck überwinden, werden mit einer zweiten Linie post-invasiver Abwehrreaktionen konfrontiert.

Pathogene werden aufgrund ihres Lebensstils in drei Kategorien eingeteilt: Biotrophe Mikroorganismen besiedeln lebende Wirtszellen, von denen Sie für Ihre Ernährung angewiesen sind. Nekrotrophe Mikroorganismen töten erfolgreich infiziertes Wirtsgewebe ab und nutzen die freigesetzten Bestandteile der toten Zellen als Nährstoffquelle. Eine Zwischenform stellen so genannte hemibiotrophe Pathogene dar, die nach einer initialen biotrophen Phase ihren Wirt abtöten, um ihren Infektionszyklus zu vollenden (Buchanan et al., 2000).

1.3.1 Das pflanzliche Immunsystem

Die zellwand-assoziierten bzw. präformierten Abwehrmechanismen sind für die basale Abwehr der Pflanze wichtig, die auch als *PAMP-triggered immunity* (PTI) bezeichnet wird (Jones und Dangl, 2006) und Parallelen zur angeborenen Immunität in Tieren aufweist (Ausubel, 2005). Diese erste Linie der pflanzlichen Immunabwehr besteht aus Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), welche pathogene Moleküle erkennen, die so genannten *microbial-associated molecular patterns* (MAMPs) bzw. *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) (Zipfel und Felix, 2005; Boller und Felix, 2009). Infolge dieser Erkennung werden primäre Abwehrreaktionen wie Calloseablagerungen und die Akkumulation von Chitinasen, Glucanasen und Proteasen induziert, wodurch die Penetration eines Pathogens verhindert werden kann (van Loon et al., 2006). In Arabidopsis wird ein 22 Aminosäuren langes Peptid des bakteriellen Flagellins (flg22) von dem Rezeptor

FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) als MAMP erkannt (Felix et al., 1999; Chinchilla et al., 2006). FLS2 ist eine Rezeptorkinase mit einer extrazellulären Leucin-reichen Domäne (LRR) und einer zytoplasmatischen Serin/Threonin-Kinase-Domäne (Gómez-Gómez und Boller, 2000). Die Erkennung von flg22 induziert eine Signalkaskade, bei der über ein MAP-Kinase-Modul die Expression von WRKY-Transkriptionsfaktoren, PR-Proteinen, Defensinen und Calloseauflagerungen auf der Zellwand sowie vermutlich die Produktion von ROS aktiviert werden (Asai et al., 2002; van Loon et al., 2006). Da die PTI entscheidend in der Abwehr kompatibler Pathogene beteiligt ist, konnte ebenfalls gezeigt werden. Die Behandlung von Arabidopsis mit flg22 führt zu verminderter Anfälligkeit gegen das pathogene Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), während die Mutante *fls2*, die einen Defekt im Rezeptor FLS2 hat, eine erhöhte Anfälligkeit gegen *Pst* DC3000 aufweist (Zipfel et al., 2004). Kann das Pathogen diese induzierten Abwehrmechanismen der PTI nicht überwinden, ist der Angriff gestoppt und die Pflanze zeigt dabei nur geringe Krankheitssymptome (Goehre und Robatzek, 2008). Um die PTI zu umgehen, haben Pathogene koevolutiv so genannte Effektorproteine entwickelt, die spezifisch mit Komponenten des PTI-Apparates interagieren und diese unterdrücken. Wird durch Sekretion eines Effektors die Besiedlung einer Wirtszelle ermöglicht, bezeichnet man dies als *effector-triggered susceptibility* (ETS) (Jones und Dangl, 2006). Die sekretierten Effektoren wiederum können jedoch auch der Pflanze als Signal dienen, um die Abwehr zu verstärken. Dabei erkennen sogenannte R (Resistenz) Proteine die Effektoren direkt oder auch indirekt über deren Wirkung, was zur Induktion einer hypersensitiven Reaktion (HR) führt, die sich in schnellem programmiertem Zelltod und lokalen Läsionen ausdrückt (Boller und Felix, 2009). Dieser Mechanismus wird auch als *effector-triggered immunity* (ETI) bezeichnet und wird als Zig-Zag-Modell dargestellt (Jones und Dangl, 2006). Klassische R Proteine besitzen meist eine Nukleotid-Bindestelle (nucleotide binding site, NBS) und eine Leucin-reiche Domäne (LRR) (Meyers et al., 2003; Caplan et al., 2008). Neben Flagellin sind auch Fragmente von Chitin als klassische MAMPs in Pflanzen bekannt (Felix et al., 1993). In Arabidopsis ist das plasmamembrangebundenes Protein CERK1 an Chitin-induzierter Abwehr beteiligt, wenngleich Bindungsstudien CERK1 als Chitinrezeptor ausschließen (Miya et al., 2007; Wan et al., 2008), CERK1 besteht aus drei extrazellulären LysM-Domänen und einer intrazellulären Serin/Threonin-kinase-Domäne. Die entsprechende Deletionsmutante

ist nicht mehr in der Lage, auf Chitin als Elizitor zu reagieren, wodurch es nicht mehr zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade, Produktion von ROS oder der Expression von Abwehrgenen kommt. Auch ist die Resistenz der *cerk1*-Mutante gegen das inkompatible Pathogen *Alternaria brassicicola* zum Teil beeinträchtigt, was auf eine wichtige Rolle des CERK1-Rezeptors bei der Erkennung pilzlicher MAMPs hindeutet (Miya et al., 2007).

1.4 Die Rolle der Phytohormone in der Pathogenabwehr

Pflanzen produzieren eine Vielzahl von Phytohormonen, die essentielle regulatorische Funktionen für das Wachstum und die Entwicklung, aber auch bei verschiedenen Reaktionen auf abiotischen und biotischen Stress innehaben. Als klassische Phytohormone bekannt sind Abscisinsäure (ABA), Auxin (Indol-3-Essigsäure, IAA), Gibberelline (GA), Brassinosteroide (BR), Ethylen (ET), Jasmonsäure (JA), Cytokinine sowie Salizylsäure (SA). Die Infektion von Pflanzen mit verschiedenen Pathogenen kann zur Veränderung der Hormongehalte in der Pflanze führen. Zur Aufklärung dieser komplexen Vorgänge trugen Analysen mit Mutanten bei, welche Defekte in den Biosynthesewegen, der Erkennung und der Signaltransduktion von Hormonen besitzen (Bari und Jones, 2009). Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die Phytohormone SA, ET, JA, Auxin und ABA geben. So spielen insbesondere die Hormone SA, JA und ET eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Abwehr gegen verschiedene Pathogene, aber auch bei abiotischem Stress wie z.B. Verwundung (Glazebrook, 2005). SA-abhängige Reaktionen sind an der Abwehr biotropher Pathogene beteiligt, dabei werden so genannte *PR (pathogenesis-related)*-Gene induziert (Grant und Lamb, 2006; Pieterse et al., 2009). Dagegen werden JA-/ET-abhängige Abwehrreaktionen bei Interaktionen mit nekrotrophen Pathogenen oder durch Verwundungen von pflanzenpathogenen Insekten induziert (Glazebrook, 2005). Daraus wird deutlich, dass die hormonellen Antworten und damit die Modulation der entsprechenden Abwehrreaktionen der Pflanze in Abhängigkeit vom Lebensstil des Pathogens induziert werden. Ein weiteres wichtiges Merkmal pflanzlicher Abwehr ist, dass sich eine einmal induzierte Abwehrreaktion oft nicht nur lokal auswirkt, sondern zu einer systemischen Aktivierung verschiedener Abwehrmechanismen in Teilen oder gar der gesamten Pflanze führt. Dieser Vorgang wird als systemisch erworbene Resistenz

(*systemic acquired resistance*, SAR) bezeichnet und kann nach einer Erkennung des Pathogens über PTI oder ETI ausgelöst werden (Tsuda et al., 2008, Pieterse et al., 2009). Dabei werden sowohl lokal als auch in systemischen Geweben, erhöhte SA-Gehalte gemessen, zusätzlich wurde gezeigt, dass SA unerlässlich für das Zustandekommen der SAR ist (Gaffney et al., 1993).

Auch nicht-pathogene Wurzelbakterien, wie z.B. *Pseudomonas fluorescens* sind in der Lage systemische Resistenz zu induzieren. Dies wird als Rhizobakterienvermittelte induzierte systemische Resistenz (ISR) bezeichnet (van Loon et al., 1998). Pieterse et al. (1998) konnten eine Beteiligung von Ethylen sowie von JA bei der Aktivierung der ISR nachweisen. Die Signaltransduktion bei der ISR ist unabhängig von der SA-abhängigen Abwehr und der Induktion von PR-Genen (van Wees et al., 1997, Pieterse et al., 2009) und nutzt daher einen von SAR völlig verschiedenen Signalweg.

Das virulente Bakterium *P. syringae* DC3000 nutzt die antagonistische Wirkung von SA- und JA/ET-Signalwegen für seine eigene Pathogenese: Es produziert das Toxin Coronatin, welches die Wirkung von JA imitiert (Feys et al., 1994, Melotto et al., 2006). Nähere Untersuchungen mit Arabidopsismutanten und Coronatin-defizienten *P. syringae*-Stämmen zeigten, dass bakterielles Coronatin in erster Linie dazu dient, SA-Signalwege und somit die Ausbildung einer SAR zu unterdrücken (Brooks et al., 2005; Block et al., 2005). Eine weitere Funktion des Coronatins ist die Unterdrückung der ABA-vermittelten Schließung der Stomata (Melotto et al., 2006). Durch diesen Mechanismus wird es den Bakterien ermöglicht, durch die geöffneten Stomata in die Pflanze einzudringen.

Auxin ist an vielen Entwicklungsprozessen in der Pflanze beteiligt, so fördert das Hormon z.B. das Streckungswachstum, die Zellteilung und Wurzelbildung. Es gibt viele Hinweise, dass Pathogene entweder selbst Auxin produzieren, wie z.B. verschiedene Bakterien, oder aber direkt in die Auxin-Biosynthese der Wirtspflanze eingreifen (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Neuere experimentelle Daten weisen daraufhin, dass Auxin die pflanzliche Abwehr schwächt, wohingegen die Hemmung der Auxinsignale die Resistenz erhöht und folglich die Erkennung von Pathogenen oftmals mit einer Suppression von Auxin-Signalwegen einhergeht. Demgemäß wurde gezeigt, dass durch *flg22* einige Auxinsignalkomponenten unterdrückt werden, was die Ausbreitung von *P. syringae* aufgrund erhöhter Resistenz der Pflanze vermindert (Navarro et al., 2006). Eine direkt antagonistische Regulation von Auxin und SA-

Signalweiterleitung konnte zudem in *A. thaliana* beobachtet werden, wo es durch SA zur Supprimierung von Auxin-responsiven Genen kommt, was essentiell für die SA-abhängige Pathogenabwehr ist (Wang et al., 2007).

ABA ist an der Regulation der Samenkeimung, der Seitenwurzelentwicklung, von Alterungsprozessen, des Blatt- und Fruchtabfalls (Abscission) sowie der Reaktion auf abiotischen Stress, z.B. Trockenstress, aber auch biotischen Stress beteiligt (Asselbergh et al., 2008). Der Einfluss von ABA auf Pflanze-Pathogen-Interaktionen ist oft abhängig vom Lebensstil des Pathogens. Es wird vermutet, dass ABA eine Rolle während der frühen biotrophen Phase spielt, bevor Pathogene in die nekrotrophe Phase übergehen (Grant und Jones, 2009). So sind ABA-defiziente Arabidopsismutanten resistent gegen *Botrytis cinerea*, zeigen jedoch eine erhöhte Suszeptibilität gegen hemibiotrophe Pathogene (Kaliff et al., 2007; Audenaert et al., 2002). ABA beeinflusst unter anderem die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Calloseablagerungen und die Regulation der Expression von Abwehrgenen in der Pflanze (Flors et al., 2008). Zudem ist bekannt, dass ABA auf GA- aber auch auf SA-Signalwege antagonistische Effekte hat (Yasuda et al., 2008; Mohr und Cahill, 2007).

Eine weitere bedeutende Komponente für die Regulation Pathogen-induzierter Abwehrmechanismen spielt die Gibberellinsäure (GA). Eine detaillierte Abhandlung der mit GA zusammenhängenden regulatorischen Vorgänge befindet sich im folgenden Abschnitt (Kapitel 1.5.2).

1.5 Gibberellinsäure (GA)

1.5.1 Die GA-Biosynthese in Pflanzen

Gibberelline sind eine Gruppe von sekundären Metaboliten und wirken als Wachstumsregulatoren in verschiedenen Prozessen wie der Sprossverlängerung, in der Stimulation der Samenreife, der Blütenentwicklung und dem Übergang vom vegetativen Wachstum zur Blüte. Mehr als 130 verschiedene Gibberelline wurden in Pflanzen, Pilzen und Bakterien identifiziert (MacMillan, 2002), jedoch sind nur einige davon biologisch aktiv, wie z.B. GA₁, GA₃, GA₄ und GA₇. Chemisch gesehen sind Gibberelline tetrazyklische Diterpenoide, deren Biosynthese sich von Isoprenoiden ableitet. Isoprenoide können in Pflanzen über zwei verschiedene Wege synthetisiert werden: über den zytosolischen Acetat-Mevalonat-Weg, der generell Sesquiterpene

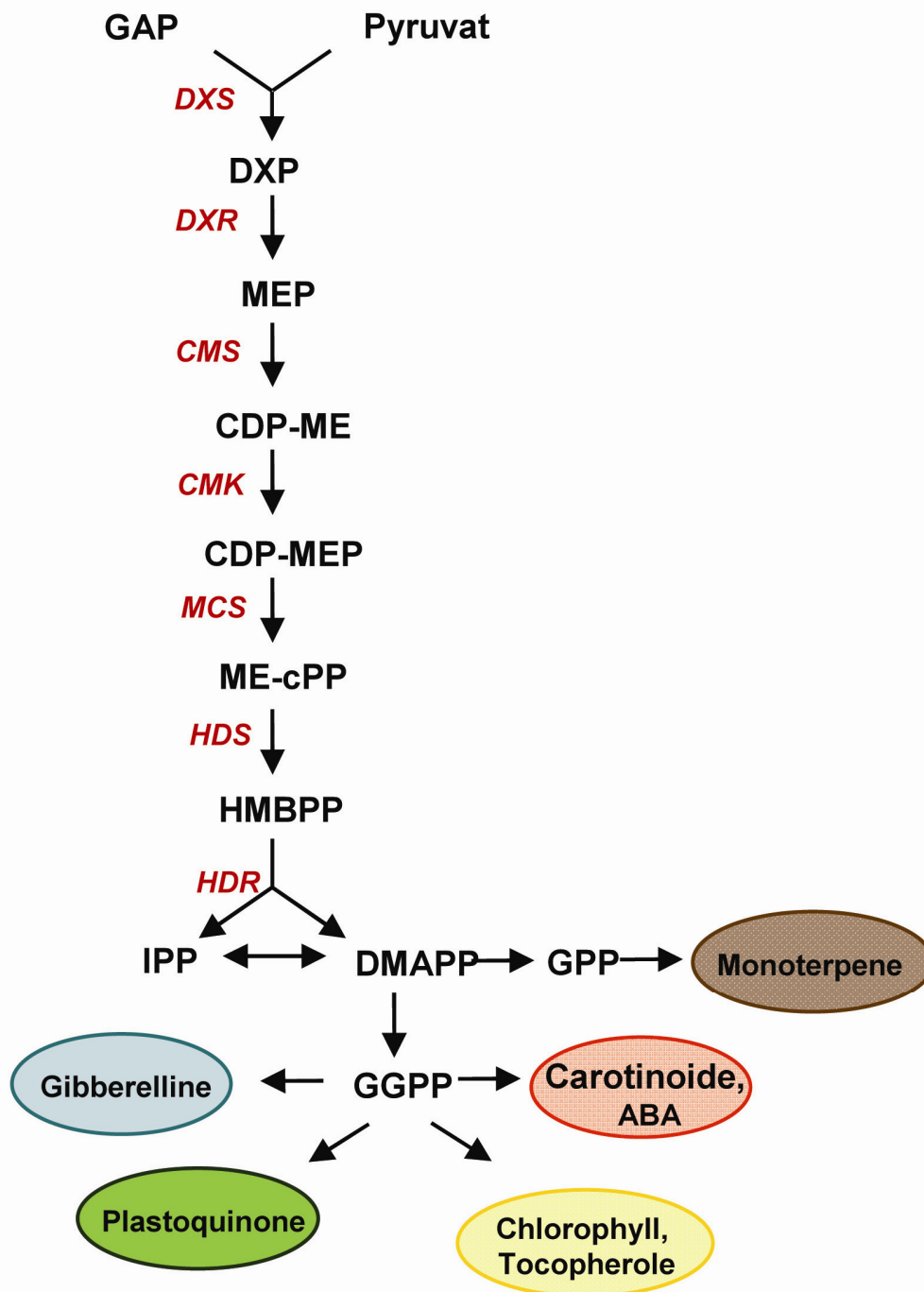


Abb. 1.1: 2C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Weg und die Biosynthese der Isoprenoide in Pflanzen. Schematische Darstellung des Biosynthesewegs der Monoterpene, Carotinoide, Abscisinsäure, Chlorophylle, Tocopherole, Plastoquinone und Gibberelline.

Abkürzungen: ABA, Abscisinsäure; CDP-ME, 4-(Cytidindiphospho)-2-C-methyl-D-Erythritol; CDP-MEP, 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-Erythritol-4-Phosphat; DMAPP, Dimethylallyldiphosphat; DXP, 1-Deoxy-d-Xylulose-5-Phosphat; GAP, Glyceraldehyd-3-phosphat; GGPP, Geranylgeranyldiphosphat; GPP, Geranyldiphosphat; HMBPP, 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat; IPP, Isopentenyl-diphosphat; ME-cPP, 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-cyclodiphosphat; MEP, 2C-Methylerythritol-4-Phosphat.

Enzyme: CMK, 4-(Cytidindiphospho)-2-C-methyl-D-Erythritolkinase; CMS, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-Erythritol-4-Phosphatsynthase; DXR, 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reductoisomerase; DXS, 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphatsynthase; HDR, 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat-reduktase; HDS, 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphatsynthase; MCS, 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-cyclodiphosphatsynthase (modifiziert nach Ganjewala et al., 2009).

und Triterpene liefert oder über den plastidären 2C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Weg (MEP-Weg; Rohmer, 1999). Über diesen Syntheseweg werden Monoterpene, Diterpene, Sesquiterpene, Plastoquinone und die Prenylseitenketten von Chlorophyll gebildet (Ganjewala et al., 2009). Isopentenylidiphosphat (IPP) ist der generelle Ausgangsstoff der Isoprenoidbiosynthese und entsteht in Pflanzen überwiegend über den MEP-Weg. Dieser beginnt mit der Bildung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DXP) aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat und wird durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphatsynthase (DXS) katalysiert. Über die Zwischenprodukte 2C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP), 4-(Cytidindiphospho)-2-C-methyl-D-Erythritol (CDP-ME), 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (CDP-MEP) und 2C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat (ME-cPP) entsteht 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enylidiphosphat (HMBPP). Daraus wird schließlich mithilfe der 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enylidiphosphatreduktase (HDR) eine Mischung der beiden Isomere IPP und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) (siehe auch Abb. 1.1; Ganjewala et al., 2009).

Die Geranylgeranylidiphosphatsynthase (GGPS) katalysiert die Umsetzung von IPP zu Geranylgeranylidiphosphat, dem Ausgangsprodukt der Synthese der Gibberelline, Plastoquinone, Carotinoide, Chlorophylle und Tocopherole. An der Synthese von aktiven Gibberellinen in Pflanzen sind, ausgehend von GGDP, drei verschiedene Enzymklassen beteiligt: Terpensynthasen, Cytochrom-P450-Monooxygenasen und 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen (Sacchettini und Poulter, 1997; Yamaguchi, 2008). Die Synthese findet in verschiedenen Zellkompartimenten statt. Zu Beginn wird aus GGDP *ent*-Copalyldiphosphat (CDP) mithilfe der Terpensynthase *ent*-Copalyldiphosphatsynthase (CPS) gebildet, welches von der *ent*-Kaurensynthase (KS) in *ent*-Kauren umgewandelt wird. Aus diesem entsteht über mehrere Schritte *ent*-Kaurensäure (KS), die von der Cytochrom P450 Monooxygease *ent*-Kaurenoxidase (KO) gebildet wird. Aus *ent*-Kaurensäure entsteht mithilfe der Cytochrom P450 Monooxygease *ent*-Kaurensäure-Oxidase (KAO) GA₁₂, das schließlich durch GA 20-Oxidasen und GA 3-Oxidasen in aktive GAs (z.B. GA₁, GA₃ oder GA₄) umgewandelt wird.

Die *ent*-Kaurenoxidase ist wahrscheinlich in der äußeren plastidären Membran lokalisiert, während die *ent*-Kaurensäure-Oxidase im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert werden konnte (Helliwell et al., 2001). GA₁₂ dient auch als Ausgangsstoff für die Bildung des ebenfalls aktiven GA₁, welches durch GA 13-Oxidasen, GA 20-

Oxidasen und einer GA 3-Oxidase gebildet wird. Über Zwischenschritte kann daraus ebenfalls GA₃ entstehen.

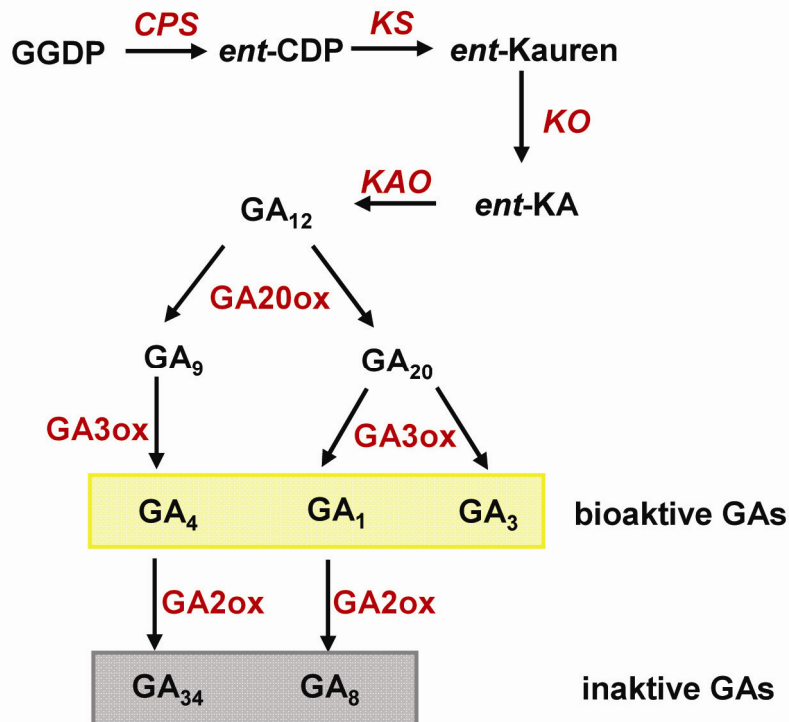


Abb. 1.2: Die Gibberellinbiosynthese in Pflanzen. Der Biosyntheseweg der Gibberelline ausgehend von GGDP. Alle in Pflanzen vorkommenden bioaktiven Gibberelline sind gelb hinterlegt. Abkürzungen: GGDP, Geranylgeranyldiphosphat; CPS, *ent*-Copalyldiphosphatsynthase; *ent*-CDP, *ent*-Copalyldiphosphat; KS, *ent*-Kaurensynthase; KO, *ent*-Kaurenoxidase; KAO, *ent*-Kaurensäure-Oxidase; 2ox, GA 2-Oxidase; 3ox, GA 3-Oxidase; 20ox, GA 20-Oxidase.

Abbildung 1.3 verdeutlicht nochmals die Lokalisation der an der GA-Biosynthese beteiligten verschiedenen Enzyme und die somit in unterschiedlichen Zellkompartimenten ablaufenden Reaktionen.

Außer in der Modellpflanze Arabidopsis konnten viele dieser Enzyme auch in Reis und Gerste identifiziert werden (Spielmeyer et al., 2004; Helliwell et al., 2001). So wurden zum Beispiel die Homologe in Gerste für die Enzyme *ent*-Copalyldiphosphatsynthase, *ent*-Kaurensynthase, *ent*-Kaurenoxidase, GA 20-Oxidase, GA 3-Oxidase sowie eine GA 2-Oxidase identifiziert (Spielmeyer et al., 2004). Auch das Gerstenhomolog der *ent*-Kaurensäure-Oxidase wurde beschrieben (Helliwell et al., 2001).

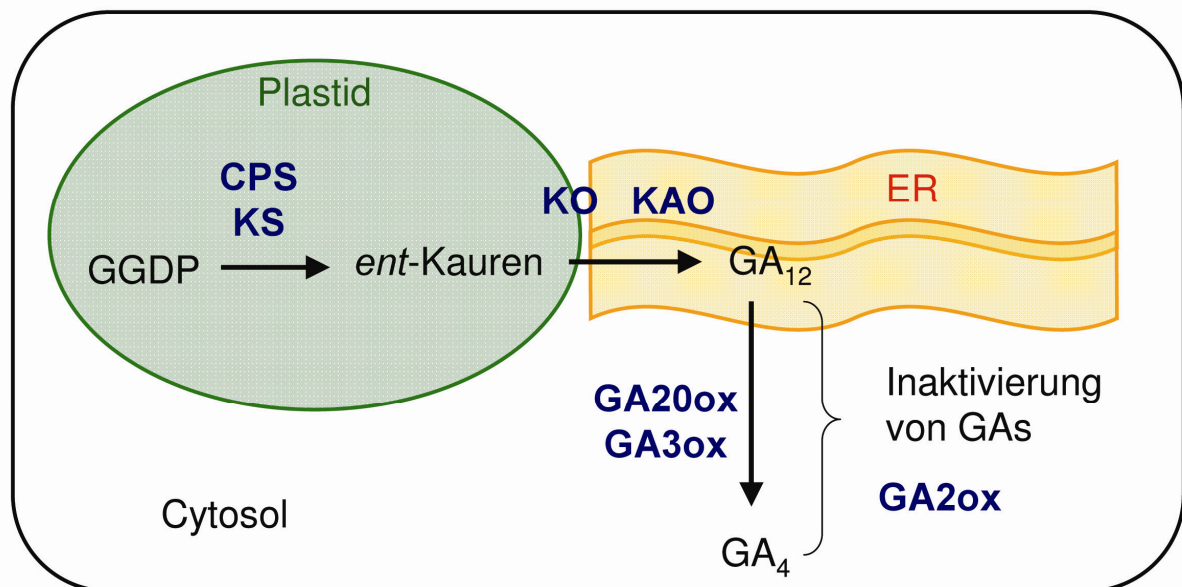


Abb. 1.3: Lokalisation der an der GA-Biosynthese beteiligten Gene. Die ersten Schritte der GA-Biosynthese katalysiert von CPS und KS finden in Plastiden statt, während die KO in der äußeren plastidären Membran, die KAO jedoch im ER lokalisiert wurde. Abkürzungen: ER, Endoplasmatisches Retikulum; GGDP, Geranylgeranyldiphosphat; CPS, *ent*-Copolydiphosphatsynthase; KS, *ent*-Kaurensynthase; KO, *ent*-Kaurenoxidase; KAO, *ent*-Kaurensäure-Oxidase; GA2ox, GA 2-Oxidase; GA3ox, GA 3-Oxidase; GA20ox, GA 20-Oxidase (Modifiziert nach Yamaguchi, 2008).

1.5.2 Der Mechanismus des GA-Signalweges

Die Entdeckung des Gibberellin-Rezeptors GID1 (GA INSENSITIV DWARF1; Ueguchi-Tanaka et al., 2005) sowie der DELLA-Proteine, die als negative Regulatoren wirken (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998), waren ein großer Fortschritt bei der Aufklärung der GA-Signalerkennung und -weiterleitung. Um das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten dieses GA-Signalwegs darzustellen, wurden von Hirano et al. (2008) ein Modell erstellt (siehe auch Abb. 1.4). In Abwesenheit von bioaktiven Gibberellinen wird der GA-Signalweg durch die negative Regulation der DELLA-Proteine unterdrückt. Sobald aktive Gibberelline vom Rezeptor GID1 erkannt werden, interagiert der GA-GID1-Komplex mit der DELLA-Domäne des DELLA-Proteins. Der trimere GA-GID1-DELLA-Komplex wird von einer E3-Ligase, dem SCF^{GID2/SLY1}-Komplex erkannt, der aus einem F-box-Protein GID2 in Reis (GA INSENSITIV DWARF2; Sasaki et al., 2003) bzw. SLY1 in Arabidopsis (AtSLEEPY1; McGinnis et al., 2003) sowie aus den Skp1-, Cullin- und Rbx1-Untereinheiten besteht. Der SCF^{GID2/SLY1}-Komplex hängt eine Polyubiquitinkette an das DELLA-Protein, woraufhin dieses durch das 26S-Proteasom abgebaut und die

Transkription GA-responsiver Gene eingeleitet wird (Gagne et al., 2002). In Arabidopsis sind fünf DELLA-Proteine bekannt: GA INSENSITIV (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) sowie drei RGA-ähnliche Proteine (RGL-1, RGL-2 und RGL-3; Peng et al., 1997; Silverstone et al., 2001; Lee et al., 2002; Wen und Chang, 2002), in Reis und Gerste wurden dagegen jeweils nur ein DELLA-Protein gefunden, SLR1 in Reis und SLN1 in Gerste (Ikeda et al., 2001; Chandler et al., 2002). Das dem GA-Rezeptor GID1 entsprechende Gerstenhomolog wurde von Chandler et al. (2008) auf dem Gse1-Locus identifiziert und charakterisiert.

DELLA-Proteine sind an Reaktionen auf abiotischen und biotischen Stress beteiligt. Zum Beispiel zeigen Pflanzen mit stabilisierten DELLA-Proteinen eine erhöhte Toleranz gegen Salzstress, während eine Arabidopsismutante mit Defekten in allen fünf bekannten Arabidopsis DELLA-Proteinen weniger tolerant gegenüber Salzstress

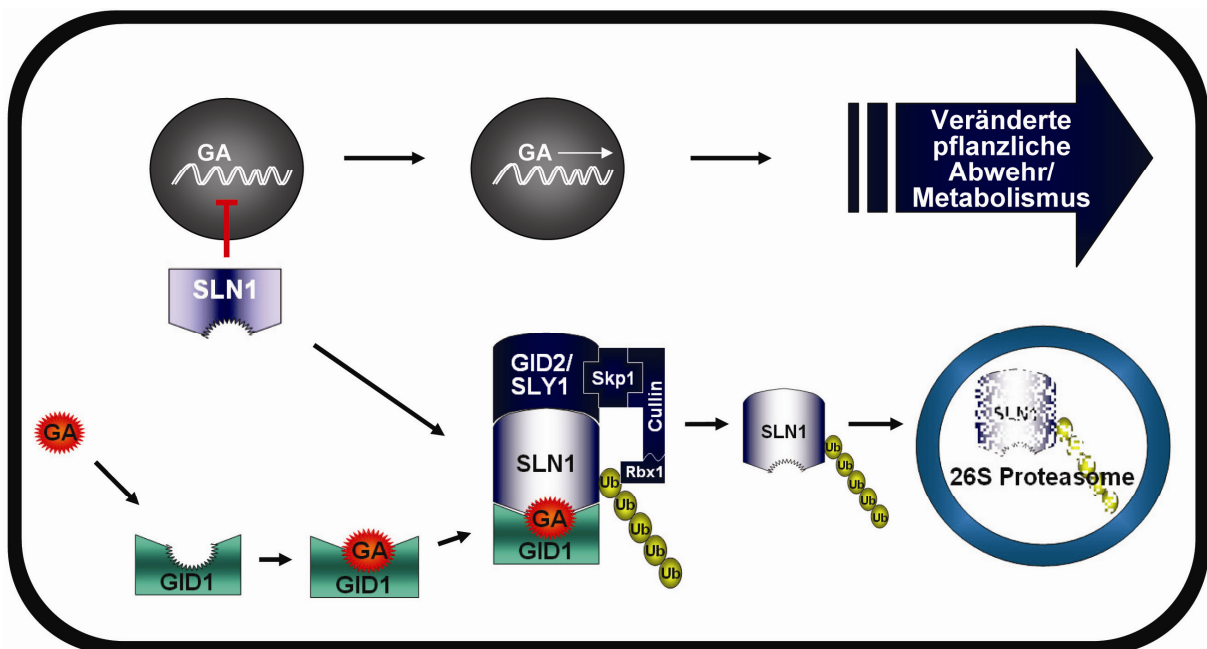


Abb. 1.4: Modell des GA-Signalweges über den Abbau der DELLA-Proteine. In Anwesenheit von GA wird der negative Regulator der GA-Wirkung SLN1 nach Bindung an den GA-GID1-Komplex und dem SCFGID2/SLY1-Komplex über das 26S-Proteasom abgebaut. Nach der Degradation von SLN1 wird die GA-responsive Transkription aktiviert, wodurch Metabolismus und Abwehrreaktionen der Pflanze aktiviert werden. (Abkürzungen siehe Text; Abb. aus Schäfer et al., 2009b).

ist (Achard et al., 2006). Auch Reaktionen der Pflanze auf Kältestress werden abhängig von DELLA-Proteinen reguliert, in dem die Akkumulation der DELLAs zur Kälteresistenz in Pflanzen beitragen (Achard et al., 2008a). Diese stress-induzierte Akkumulation der DELLA-Proteine führt aber auch zu einer Induktion von Enzymen zur Detoxifizierung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie Katalasen oder

Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutasen, die ROS abbauen und dadurch Zelltod verzögern (Achard et al., 2008b). Dadurch werden die Pflanzen wiederum toleranter gegen Stress und aufgrund der verminderten ROS-Akkumulation resistenter gegen Pathogen-induzierten Zelltod.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass eine Arabidopsis-Mutante, der vier von fünf Arabidopsis bekannten DELLA-Proteine fehlen, resistenter gegen *P. syringae*, aber suszeptibler gegen nekrotrophe Pathogene wie *Botrytis cinerea* ist. Dagegen zeigten sich mehrere GA-Biosynthese- bzw. -Signal-Mutanten suszeptibler gegen *P. syringae* und resistenter gegen *B. cinerea* (Navarro et al., 2008). Durch Untersuchungen der Expression von SA-abhängigen und JA/ET-responsiven Genen konnte eine Suppression der SA-Signalweiterleitung und -Biosynthese durch DELLAs bei der Abwehr von biotrophen Pathogenen festgestellt werden. Die Expression von JA/ET-abhängigen Genen konnte hingegen in Mutanten mit stabilisierten DELLA-Proteinen nach Infektion mit *P. syringae* stärker und früher detektiert werden. Das gleiche wurde wiederum in der quadruple-DELLA-Mutante untersucht, und hier entgegengesetzt, eine stärkere und schnellere Induktion der SA-abhängigen Gene sowie eine Verzögerung in der Expression JA/ET-abhängiger Gene. Daraus wurde gefolgert, dass GA-Resistenz gegen biotrophe und Suszeptibilität gegen nekrotrophe Pathogene durch die Degradation der DELLA-Proteine und die Modulation des Gleichgewichts zwischen SA- und JA-Signalwegen verursacht wird (Navarro et al., 2008).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Der mutualistische Wurzelendophyt *P. indica* verursacht in besiedelten Wirtspflanzen verstärktes Spross- und Wurzelwachstum, aber auch lokal in der Wurzel und systemisch in Blättern Resistenz gegen Pathogene. Durch molekulare Analysen mit Hilfe einer auf Microarrays basierenden Transkriptomanalyse sollten die molekularen Grundlagen dieser mutualistischen Interaktion untersucht werden. Mittels der durch die Transkriptomanalyse gewonnenen Informationen, sollten für die Besiedlung der Gerstenwurzeln mit *P. indica* relevante Kompatibilitätsfaktoren identifiziert werden. Mit Hilfe der Analyse sollten durch die Besiedlung mit *P. indica* veränderten Signalwege und Biosynthesewege in der Gerstenwurzel erfasst werden, um ein umfassendes Profil der transkriptionellen und metabolischen Aktivitäten während der

Besiedlung zu erstellen. Anschließend sollten differentiell regulierte Kandidaten ausgewählt werden, um deren Einfluss auf die Besiedlung durch molekulare und zytologische Analysen genauer zu charakterisieren. Untersuchungen mit geeigneten Gerstenmutanten sollten dabei helfen, die Rolle dieser Kandidaten während der Interaktion von *P. indica* mit Gerstenwurzeln aufzuklären.

2. Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Labormaterialien stammten von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Thermo Fisher Scientific (Dreieich), Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (VWR International; Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim) und Sigma Aldrich (München).

2.1 Organismen

Verwendete Organismen und deren Herkunft.

Tab. 2.1: Herkunft der verwendeten Organismen

Organismus	Stamm / Linie	Herkunft
<i>Hordeum vulgare</i> L.	cv. Golden Promise	Washington State University (Diter von Wettstein)
	cv. Himalaya, M117, M121, M488, M574, M640, M770	CSIRO Plant Industry, Canberra (Peter Chandler)
<i>Piriformospora indica</i>	DSM11827	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

2.2 Kultivierung der verwendeten Organismen

2.2.1 *Hordeum vulgare* L.

Die Gerstensamen wurden vor Verwendung immer oberflächensterilisiert, indem das Saatgut für ca. 1 min in 70% Ethanol geschwenkt, kurz mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen und für 1,5 h in 3% Natriumhypochlorit sterilisiert wurde. Anschließend wurden die Samen mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen und in Petrischalen auf feuchtem Filterpapier für 3 Tage im Dunklen vorgekeimt. Für Versuche in Töpfen wurden je 3-4 Keimlinge in ein Gemisch aus zwei Teilen autoklaviertem Seramis (Masterfoods, Verden) und einem Teil Oidri (Damolin, Mettmann) getopft. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte bis zur Ernte in Klimakammern bei 16-18°C, 60% relativer Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16 h (60 mmol s^{-1}

m⁻² photon flux density). Die Pflanzen wurden je nach Bedarf alle 2-3 Tage von unten mit Leitungswasser gegossen.

Für die Experimente auf sterilem 1/10 PNM-Medium wurden Weckgläser (2 l Volumen) durch Backen für 1-2 Stunden bei 200 °C sterilisiert und mit ca. 80-100 ml 1/10 PNM-Medium gefüllt. Pro Glas wurden 5-6 3 Tage alte Gerstenkeimlinge auf dem Medium ausgelegt.

1/10 PNM-Medium:

0,5 ml	1 M Kaliumnitrat
1 ml	KH ₂ PO ₄ -Stocklösung (5 g/100 ml)
1 ml	K ₂ HPO ₄ -Stocklösung (2,5 g/100 ml)
2 ml	1 M Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7H ₂ O)
0,2 ml	1 M Calciumnitrat
2,5 ml	Fe-EDTA *
0,025 g	NaCl
4 g	Gelrite

mit H₂O auf 1 l auffüllen und autoklavieren

* Fe-EDTA:

2,5 g	FeSO ₄ x 7H ₂ O in 400 ml H ₂ O geben
3,6 g	Na ₂ EDTA zufügen

zum Kochen bringen, unter Rühren abkühlen und mit H₂O auf 450 ml auffüllen

2.2.2 *Piriformospora indica*

Die Kultivierung von *P. indica* erfolgte auf CM-Agarplatten. Zunächst wurde eine Masterplatte aus einer als Glycerinstock bei -80 °C gelagerten Sporensuspension für 4-5 Wochen angezogen. Die bewachsene Masterplatte wurde mit sterilem Tween-Wasser (0,05% Tween 20) abgeschwemmt und jeweils 500 µl dieser Suspension aus Myzel und Sporen auf CM-Platten ausplattiert, diese wurden nach 4-5 Wochen Inkubation bei Raumtemperatur für die Herstellung einer Sporensuspension zum Inokulieren von Gerstenwurzeln verwendet.

Für die Sporensuspension wurden die bewachsenen CM-Platten mit sterilem Tween-Wasser und Drigalskispatel in ein 50 ml Falcon-Röhrchen abgeschwemmt, die Suspension aus Myzel und Sporen gevortext, durch Miracloth gefiltert und für 5 min

bei 3500 upm abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und mit Tween-Wasser aufgefüllt. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die Sporenkonzentration wurde nach dem Zählen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer auf 500.000 Sporen/ml eingestellt.

CM-Medium (Complex-Medium):

50 ml	20 x Salzlösung *
20 g	Glukose
2 g	Pepton
1 g	Hefeextrakt
1 g	Casaminosäuren
1 ml	1000 x Mikroelemente *
15 g	Agar-Agar

mit H₂O auf 1 l auffüllen und autoklavieren

20 x Salzlösung:

120 g	Natriumnitrat
10,4 g	Kaliumchlorid
10,4 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
30,4 g	KH ₂ PO ₄

in 1 l H₂O lösen

1000 x Mikroelemente:

6 g	Mangan(II)-Chlorid
1,5 g	Borsäure
2,65 g	Zinksulfat
750 mg	Kaliumiodid
2,4 mg	Natriummolybdän
130 mg	Kupfersulfat

in 1 l H₂O lösen

2.2.3 Kultivierung von *Rhizoctonia solani*

Zur Kultivierung von *Rhizoctonia solani* wurden jeweils Agarstückchen einer bewachsenen SNA-Agarplatte auf frische Platten überimpft. Für die Inokulation von Gerstenwurzeln wurde vor dem Animpfen ein steriles Filterpapier auf die Agaroberfläche der SNA-Agarplatten ausgelegt. Nach ca. 2 Wochen wurden 3 Tage alte vorgekeimte Gerstenpflanzen mit den Wurzeln für 12 h auf das angefeuchtete Stück Filterpapier gelegt und die Wurzeln anschließend wie in Kapitel 2.7 beschrieben, für den Luminol-Assay vorbereitet.

SNA-Agar:

1 g	KH ₂ PO ₄
1 g	KNO ₃
0,5 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
0,5 g	KCl
0,2 g	Glukose
0,2 g	Saccharose
0,6 ml	1 N NaOH
22 g	Agar-Agar
mit H ₂ O dest. auf 1l auffüllen und autoklavieren	
100 mg	Penicillin
10 mg	Chlortetracyclin
50 mg	Streptomycinsulfat

2.3 Behandlung der Pflanzen

2.3.1 Inokulieren von Gerstenwurzeln mit *P. indica*

Zur Inokulation von Gerstenkeimlingen für die Experimente in Seramis/Oildri wurden die Keimlinge für 1,5 h in der Sporensuspension auf einem Schüttler leicht geschwenkt. Die Kontrollpflanzen wurden entsprechend lediglich mit Tween-Wasser behandelt. Anschließend wurden die Pflanzen wie in 2.1.1 beschrieben in das Substrat getopft.

Bei Experimenten auf 1/10 PNM-Medium in sterilen Weckgläsern wurden 1,5 ml Sporensuspension bzw. für die Kontrollpflanzen 1,5 ml Tween-Wasser auf die Keimlinge auf der Agaroberfläche verteilt.

2.3.2 GA₃-Zugabe

Alle Versuche mit Gibberellinsäure (GA₃) wurden in Weckgläsern auf 1/10 PNM-Medium durchgeführt. Zur Herstellung einer 10 mM GA₃-Stammlösung wurde 52 mg Gibberellinsäure in 0,5 ml Ethanol vorgelöst und mit Wasser auf 15 ml aufgefüllt. Die GA₃-Stammlösung wurde auf 2 mM verdünnt, mit 20 mM Kaliumhydroxid tropfenweise auf einen pH-Wert von ca. 5,5 eingestellt (pH-Stäbchen) und sterilfiltriert.

Für die Behandlung der Pflanzen wurde jeweils zum gleichen Zeitpunkt, zu dem auch die Inokulation der Wurzeln mit *P. indica* stattfand, 1 ml der 2 mM GA₃-Lösung direkt in die Weckgläser auf die Agaroberfläche pipettiert und verteilt. Als Kontrollen diente jeweils 1 ml steriles Wasser mit der entsprechenden Menge Ethanol, die auch zum Lösen von GA₃ verwendet wurde.

2.3.3 Ernte der Wurzeln

Zu den Zeitpunkten 1, 3 und 7 dai („days after inoculation“) (soweit nicht anders angegeben) wurden die Pflanzen aus dem Substrat entfernt, zügig in Wasser gewaschen, kurz auf Papier getrocknet und die Wurzeln sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Für alle Versuche auf PNM-Medium sowie für die Affymetrix-Microarray-Experimente wurde die Wurzel kurz unterhalb des Kornes abgeschnitten. Für die Agilent-Microarray-Experimente sowie Kinetiken in Seramis/Oildri wurden ausschließlich die besiedelten, älteren Wurzelabschnitte, d.h. die oberen 4-5 cm (unterhalb des Kornes) geerntet.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Extraktion

Zur RNA-Isolierung wurde das gefrorene Wurzelmaterial in einem Mörser mit einem Pistill und flüssigem Stickstoff fein zermörsert.

2.4.1.1 RNA-Proben für Affymetrix-Microarray-Experimente

Hierzu wurde ca. 200 mg gemörsertes Wurzelmaterial mit 1 ml RNA-Extraktionspuffer gevortext, 200 µl Chloroform zugegeben und nochmals gevortext. Nach 10-minütiger Inkubation auf einem Schüttler wurden die Proben für 15 min bei

14.000 upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 850 µl Chloroform stark gemischt, für 2-3 min bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert. Die RNA wurde aus dem Überstand mit dem gleichen Volumen 5 M Lithiumchlorid über Nacht bei 4°C gefällt und das Pellet nach Zentrifugation für 20 min bei 14.000 upm zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Die RNA wurde in 40 µl RNase-freiem Wasser gelöst und mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden) nach Anleitung aufgereinigt und die genomische DNA durch die Behandlung mit DNaseI entfernt. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Nano-drop Spektrophotometer bei 260/280 nm (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) bestimmt.

RNA-Extraktionspuffer:

38% (v/v)	gesättigtes Phenol
0,8 M	Guanidinthiocyanat
0,4 M	Ammoniumthiocyanat
0,1 M	Natriumacetat, pH 5,0
5% (v/v)	Glyzerin

2.4.1.2 RNA Extraktion mit TRIzol

Da durch die selektive Ernte der oberen Wurzelabschnitte für die Agilent-Microarray-Experimente bei der RNA-Extraktion mit der herkömmlichen Methode (siehe Kapitel 2.4.1.1) die Ausbeute an RNA sehr gering war, wurden alle anderen RNA-Proben dieser Arbeit mit TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe) extrahiert. Dazu wurden ca. 200 mg gemörsertes Material mit 1 ml TRIzol gevortext, 200 µl Chloroform dazugegeben, für 15 sec sehr stark geschüttelt und für 2-3 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 14.000 upm wurde die RNA aus dem Überstand mit 500 µl Isopropanol für 30 min bei RT gefällt. Anschließend folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 30 min bei 4°C und 14.000 upm. Das RNA Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und für 5 min im Heizblock bei 64°C gelöst. Zur vollständigen Entfernung genomischer DNA wurden jeweils 2 µg RNA mit 2 µl 10x DNaseI Buffer, 2 µl DNaseI (Fermentas, St. Leon-Rot) und 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt, für 30 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA die DNaseI für 10 min bei 70°C inaktiviert. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Nano-drop Spektrophotometer (Peqlab Biotechnologie,

Erlangen) bei 260/280 nm bestimmt. Die RNA-Proben, die für Agilent-Microarrays verwendet werden sollten, wurden wie in Abschnitt 2.4.1.1 beschrieben, mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und DNaseI verdaut.

2.4.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta Bioscience, Gaithersburg, USA) verwendet. Dazu wurden je 1 µg DNaseI-behandelte RNA mit 4 µl 5 x qScript Reaktionsmix und 1 µl qScript Reverse Transkriptase in einem Endvolumen von 20 µl gemischt und im PCR-Cycler nach folgendem Programm inkubiert:

22 °C	5 min
42 °C	30 min
80 °C	5 min
4 °C	∞

Im Anschluss an die cDNA Synthese wurden die Proben mit 380 µl Wasser aufgefüllt.

2.4.3 Extraktion genomischer DNA aus Wurzeln

Die Extraktion genomischer DNA aus Gerstenwurzeln erfolgte nach der Methode von Doyle und Doyle (1990). Hierbei wurde ca. 200 mg gemörsertes Material mit 700 µl Doyle & Doyle-Extraktionspuffer vermischt und für 60-90 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 700 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wurden die Proben für 5 min leicht geschüttelt und anschließend bei 13000 upm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Die obere Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 600 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gemischt und die Inkubation und Zentrifugation wiederholt. Anschließend wurde die obere Phase mit 50 µl 10 M Ammoniumacetat, 60 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 500 µl Isopropanol für 20-30 min auf Eis gefällt und 10 min bei 13000 upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol /10 mM Ammoniumacetat gewaschen und nach dem Trocknen in 30-40 µl TE (pH 8,0) gelöst. Direkt im Anschluss daran wurde ein RNaseA Verdau mit 0,5 µl RNaseA (10 mg/ml) bei 37 °C für 30 min durchgeführt. Die Konzentration der DNA wurde mit dem Nano-drop Spektrophotometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) bestimmt.

Doyle & Doyle-Extraktionspuffer:

100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
20 mM	EDTA (pH 8,0)
1,4 M	Natriumchlorid
2%	CTAB
1%	Natriumdisulfid
0,2%	β -Mercaptoethanol

2.4.4 Gelelektrophorese

2.4.4.1 TBE-Gele

Die Auftrennung von DNA erfolgte auf 1,5%-igen Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid ($\sim 1 \mu\text{g/ml}$) versetzt wurden, bei einer angelegten Spannung von 130 V. Als Laufpuffer diente 1 x TBE (Sambrook et al., 1989). Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 10 x DNA-Laufpuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe). Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Transilluminator mit dem Duostore Videoprintgerät (INTAS, Göttingen) dokumentiert.

10 x TBE

900 mM	Tris
900 mM	Borsäure
25 mM	EDTA pH 8,0

10 x DNA-Laufpuffer

0,25% (w/v)	Bromphenolblau
40% (w/v)	Saccharose

2.4.4.2 Denaturierende MOPS-Gele

Jeweils 500 ng RNA wurden 1:1 (v/v) mit 2 x RNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und 5 min bei 70 °C im Heizblock denaturiert. Die Proben wurden in einem 1,2% denaturierenden Agarosegel mit 5% (v/v) Formaldehyd in 1 x MOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt und auf einem UV-Transilluminator fotografiert.

10 x MOPS-Puffer

200 mM	Morpholin-3-propansulfonsäure	
50 mM	Natriumacetat	
10 mM	EDTA (pH 7,0)	
1% (v/v)	DEPC	autoklavieren

2.4.4.3 Bioanalyser

Um die Qualität der RNA-Proben für die Microarray-Hybridisierungen genau zu überprüfen, wurden jeweils 1 µl jeder Probe auf den Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent, Santa Clara, USA) nach Anleitung des Agilent RNA 6000 Nano Kit Manual aufgetragen. Anhand des Elektropherogramms lässt sich erkennen, ob die RNA degradiert ist.

2.4.5 PCR, qPCR

Ein Standard-PCR-Ansatz (25 µl) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

2,5 µl	10 x Taq-Reaktionspuffer
2,5 µl	2 mM dNTPs
1 µl	10 pM Primer 1
1 µl	10 pM Primer 2
0,2 µl	Taq-Polymerase (Genecraft, Münster)
3 µl	cDNA
auf 25 µl mit H ₂ O auffüllen	

Das PCR-Programm für die Standard-PCR wurde folgenderweise gewählt:

Tab. 2.2: Programm für die Standard-PCR

Temperatur	Zeit [min]	Wiederholungen
94 °C	5:00	
94 °C	0:30	28-35x
60 °C	0:30	
72 °C	1:00	
72 °C	5:00	

Die Sequenzen, die Bezeichnungen sowie der Verwendungszweck sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer befinden sich im Anhang (siehe Tabelle 7.4).

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die quantitative real-time PCR (qPCR) wurde zur Quantifizierung der Besiedlung von *P. indica* in Wurzel sowie zur relativen Quantifizierung ausgesuchter Transkripte in cDNA-Proben eingesetzt. Pro Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 10-20 ng cDNA (zur Quantifizierung ausgesuchter Transkripte) bzw. 40 ng genomischer DNA (zur Quantifizierung pilzlicher DNA in Wurzeln) 10 µl SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma Aldrich, München) mit je 0,7 µl der entsprechenden Forward und Reverse Primern eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem Stratagene Mx3000P QPCR System (Stratagene Research, La Jolla, USA). Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 95°C für 7 min folgten 40 Amplifikationszyklen (95°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s) wobei am Ende jedes Zyklus die Fluoreszenz gemessen wurde. Um Verunreinigungen auszuschließen wurde nach jeder PCR eine Dissoziationskurve in 0,5°C-Schritten im Bereich von 60-95°C erstellt. Zudem wurde in jedem qPCR Lauf jede cDNA Probe bzw. DNA Probe und eine entsprechende *non-template control* als Tripletts angesetzt. Die *cycle threshold* (Ct)-Werte wurden von der zu den Instrumenten gehörigen Software (MxPro Mx3000P v3.00) bestimmt und die vergleichenden Expressionswerte ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ für Genexpressionsuntersuchungen und $2^{-\Delta Ct}$ für die Quantifizierung der pilzlichen DNA) relativ zu Ubiquitin nach Livak und Schmittgen (2001) berechnet. In allen Untersuchungen wurde das in Gerste konstitutiv exprimierte Gen für Ubiquitin als Referenzgen benutzt (Deshmukh et al., 2006; Tab. 7.4, Anhang).

2.4.6 Hybridisierung der Microarrays

2.4.6.1 Affymetrix Barley1 GeneChip

Für die Microarray-Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen jeweils ca. 700 Samen Golden Promise oberflächensterilisiert (siehe 2.2.1). 3 Tage nach der Keimung wurde jeweils die Hälfte der Keimlinge, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, mit einer *P. indica* Sporensuspension (500.000/ml) inokuliert während die andere Hälfte der Keimlinge als Kontrollpflanzen mit Tween-Wasser behandelt wurden. Die so behandelten Pflanzen wurden, wie in 2.2.2 beschrieben, in Seramis/Oildri getopft.

Für den frühen Zeitpunkt (1 dai) wurden 60 Pflanzen in je 4 Teile aufgeteilt und die vollständigen Wurzeln, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, geerntet. Für die späteren Zeitpunkte (3 und 7 dai) wurden die Wurzeln von jeweils 40 Pflanzen in 4 Teile aufgeteilt und geerntet. Dabei wurde darauf geachtet, dass bei jeder der drei Wiederholungen die verschiedenen Schritte wie Sterilisieren, die Herstellung der Sporensuspension, die Inokulation und das Ernten jeweils zur gleichen Tageszeit stattfanden.

Ein Teil des geernteten Materials wurde, aufgetrennt in vier Teile je Probe, in der AG Sonnewald an der Friedrich-Alexander Universität in Erlangen zur Metabolom-Analyse verwendet. Für die Microarray-Hybridisierung wurden die 4 Teile jeder Probe vor der RNA-Extraktion vereinigt, um experimentelle Schwankungen während der Pflanzenanzucht und Ernte zu vermindern.

Für die cDNA Erststrang-Synthese wurden 5 µg aufgereinigte Gesamt-RNA (RNA-Extraktion siehe 2.4.1.1) eingesetzt und mit dem One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, Santa Clara, USA) nach Herstellerangaben in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Nach der Aufreinigung mit dem Sample Cleanup Modul wurde mit Hilfe des GeneChip IVT Labeling Kit aus der cDNA biotin-markierte cRNA generiert, die dann anschließend, abweichend vom Affymetrix-Protokoll (One-Cycle Eukaryotic Target Labeling Assay) mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt wurde. Die Konzentration der cRNA wurde mit Hilfe des Nano-drop Spektrophotometers (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) bestimmt und durch Subtraktion der Gesamt-RNA die so genannte angepasste cRNA Menge berechnet. Für die direkt anschließende Fragmentierung wurden 15 µg biotin-markierte cRNA eingesetzt und laut Protokoll fragmentiert. Zur Kontrolle der Qualität der cRNA und Überprüfung der Fragmentierung wurden 1 µl jeder cRNA-Probe vor und nach der Fragmentierung im Bioanalyzer (2.4.4.3) aufgetrennt.

Die Hybridisierung, das Waschen und Färben der Affymetrix GeneChips wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörg Kämper am Max-Planck-Institut in Marburg nach Anleitung des Affymetrix GeneChip Expression Manual mit dem Fluidics Script EukGE-WSv2v5 in einer Fluidics Station 400 durchgeführt. Die GeneChips wurden im Affymetrix GeneChip Scanner 3000 eingescannt und mit der Software Affymetrix Microarray Suite 5.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA) normalisiert und die Expressionswerte kalkuliert. Mit Hilfe der Bioconductor-Software (<http://www.bioconductor.org/>) sowie dem Paket LIMMA (Smyth, 2004) wurde die

weitere Auswertung mit Unterstützung von Dr. Joern Pons-Kühnemann (Institut für Biometrie, Justus-Liebig Universität Gießen) durchgeführt. Im Anschluss daran wurden Gene, die im Vergleich besiedelter gegen nicht-besiedelte Proben mindestens 1,8-fach hoch- oder runterreguliert waren, herausgefiltert. Zusätzlich wurde ein p-Value von $< 0,05$ als Ausschlusskriterium festgelegt.

2.4.6.2 Agilent One-Colour Barley Microarray

Die Pflanzenanzucht für die Agilent-Microarrays wurde genauso durchgeführt wie bereits oben für die Affymetrix-Microarrays beschrieben. Um eine verbesserte Besiedlung zu garantieren, wurden zusätzlich pro Topf 2 ml der Sporensuspension auf die Keimlinge gegeben. Pro Zeitpunkt wurden ca. 90-100 Pflanzen zu 4 Teilen geerntet. Dabei wurden die Wurzeln zum Zeitpunkt 1 dai vollständig geerntet während zum Zeitpunkt 3 und 7 dai nur die oberen besiedelten Abschnitte ca. 4-5 cm unterhalb des Kornes geerntet wurden (siehe 2.3.3).

Nach der RNA-Extraktion mit TRIzol (siehe 2.4.1.2) aus dem gesamten Material der 4 geernteten Teile erfolgte auch hier die Aufreinigung mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Für die cDNA Synthese wurden, den Angaben im One-Colour Microarray-based Gene Expression Analysis Protokoll (Version 5.0.1; Agilent, Santa Clara, USA) folgend, 500 ng RNA eingesetzt. Zur RNA wurden 1,2 μ l T7 Promotor Primer und 5 μ l einer 1:5000 Verdünnung des One-Colour Spike-In Mix gegeben, mit Wasser auf 11,5 μ l aufgefüllt und für 10 min bei 65°C erhitzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden 8,5 μ l des cDNA Mastermix dazugegeben.

Zusammensetzung des cDNA Mastermix:

4 μ l	First Strand Buffer
2 μ l	0,1 M DTT
1 μ l	10 mM dNTP Mix
1 μ l	MMLV Reverse Transcriptase
0,5 μ l	RNase OUT

Die Proben wurden für 2 h bei 40°C inkubiert, anschließend wurde die Reverse Transkriptase bei 65°C für 15 min inaktiviert.

Für die Synthese der Cyanine 3 markierten cRNA wurden zu jeder Probe 2,4 μ l Cyanine 3 Farbstoff und 57,6 μ l des folgenden Mastermix zugegeben:

15,3 µl	Nuclease-freies Wasser
20 µl	Transcription Buffer
6 µl	0,1 M DTT
8 µl	dNTP Mix
6,4 µl	50% PEG
0,5 µl	RNase OUT
0,6 µl	Inorganic Pyrophosphatase
0,8 µl	T7 RNA Polymerase

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 40 °C im Dunkeln.

Für die Aufreinigung der cRNA wurde das Qiagen RNeasy Mini Kit benutzt. Die Quantifizierung und der Einbau des Farbstoffs wurden mit der Microarray Measurement-Funktion des Nano-drop Spektrophotometers bestimmt.

Für die Fragmentierung und die direkt anschließende Hybridisierung der Arrays wurden 1,65 µg der markierten cRNA, mit 11 µl Blocking Agent und 2,2 µl 25 x Fragmentation Buffer in einem Gesamtvolumen von 55 µl eingesetzt und bei 60 °C für 30 min fragmentiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 55 µl 2 x HiUPM Hybridization Buffer gestoppt und 100 µl des Reaktionsansatzes auf den Array geladen. Die Hybridisierung erfolgte in einer Agilent Hybridisation Chamber für 17 Stunden bei 65 °C über Nacht. Die Arrays wurden nach Entnahme aus dem Hybridisierungsofen in Wash Buffer 1 bei RT auseinandergelöst und anschließend unter Rühren zunächst für 1 min in Wash Buffer 1, danach für 1 min in auf 37 °C vorgewärmten Wash Buffer 2 gewaschen. Zum Trocknen wurden die Arrays kurz in Acetonitril getaucht und anschließend im Agilent Microarray Scanner GenePix 4000B eingescannt. Die Expressionsdaten wurden mit Hilfe der Feature Extraction Software mit dem Protokoll GE1-v5_95_Feb07 extrahiert.

Die Auswertung der Daten wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Joern Pons-Kühnemann am Institut für Biometrie an der Justus-Liebig Universität Gießen mit der Software Bioconductor/R durchgeführt (<http://www.bioconductor.org/>). Dabei wurde das LIMMA-Paket (Smyth, 2004) zur Analyse der differentiell regulierten Gene verwendet. Die Daten wurden mit read.maimage eingelesen, nach Flags gefiltert und mit der Quantile Normalisierung normalisiert. Die ermittelte Signifikanz wurde anhand des p-Value überprüft, dazu wurden alle Gene mit einem p-Value < 0,05 als signifikant reguliert definiert. Die Expressionsdaten wurden unter der Accession-

Nummer GSE13756 bei GeneExpressionOmnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) hinterlegt.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Extraktion von Gesamtprotein aus Wurzeln

Für die Extraktion von Gesamtprotein aus Gerstenwurzeln wurde das in flüssigem Stickstoff gemörserte Material in 1 x PBS-Tween suspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4°C und 14.000 upm. Der Überstand wurde in 1 x PBS-Tween resuspendiert und bei -20°C für die weitere Verwendung gelagert.

1 x PBS-Tween

0,2 g	Kaliumchlorid
0,2 g	KH ₂ PO ₄
1,15 g	Na ₂ HPO ₄
	mit H ₂ O dest. auf 1 l auffüllen und auf pH 7,4 einstellen
0,05%	Tween 20

2.5.2 Bradford-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Assay verwendet. Vor der Messung wurde zunächst eine Eichkurve mit BSA als Standard in einem Bereich von 1-10 µg Protein erstellt und im Bio-Rad Photometer (Bio-Rad, München) abgespeichert. Für die Messung des Proteingehaltes wurden 800 µl der entsprechend mit Wasser verdünnten Proteinlösung in eine Küvette pipettiert und mit 200 µl des Bio-Rad Farbstoffkonzentrates (Bio-Rad, München) gemischt. Nach 5 min wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und anhand der Eichkurve der Proteingehalt bestimmt.

2.5.3 Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse

Anhand der Konzentrationsbestimmung der Proteine mit dem Bradford-Assay (2.5.2) wurden je 20 µg pro Probe mit dem gleichen Volumen 20% Trichloressigsäure für 20 min auf Eis gefällt, anschließend 20 min bei 13.000 upm und 4°C zentrifugiert und

das Pellet mit 100% Aceton gewaschen. Die getrockneten Proteinpellets wurden direkt in 20 µl Lane Marker Reducing Sample Buffer (Pierce, Rockford, USA) bei 95°C für 5 min aufgekocht, kurz zentrifugiert und auf ein vorbereitetes Polyacrylamidgel aufgetragen. Das aus Sammelgel und Trenngel bestehende Polyacrylamidgel setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 2.3: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen

Reagenzien	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O dest.	4,9ml	6,6 ml
Acrylamid-Mix (40% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid)	2,5 ml	0,8 ml
Trenngel-Mix (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4% SDS)	2,5 ml	--
Sammelgel-Mix (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,4% SDS)	--	2,5 ml
10% Ammoniumpersulfat (APS)	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Die Elektrophorese wurde in 1x Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS) für 1,5 h bei 100 V in einer Mini Protean II Apparatur (Bio-Rad, München) durchgeführt. Als Größenmarker wurden 10 µl des BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine vom Gel in einer Mini Trans Blot Cell von Bio-Rad in TOWBIN-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA 85; Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel) geblottet (1,5 h, 100V). Die Membran wurde dreimal für 5 min in H₂O dest. gewaschen, danach viermal für 5 min in PBS-Tween (1x PBS pH 7,4 mit 0,05% Tween 20). Geblockt wurde über Nacht bei 4°C in PBS-Tween mit 1% BSA. Nach drei Waschschritten für je 5 min mit PBS-Tween folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper Rabbit Anti-SLENDER1 (1:1000 in PBS-Tween) für 1,5 h. Danach wurde wie beschrieben vier- bis fünfmal mit PBS-Tween gewaschen und für 1,5 h mit dem sekundären Antikörper ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase-Conjugated (Pierce, Rockford, USA; 1:20000 in

PBS-Tween mit 1% BSA) inkubiert. Nach wiederum vier bis fünf Waschschritten mit PBS-Tween folgte die Detektion der Peroxidase mit dem SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat (Thermo Scientific, Dreieich). Dazu wurden die beiden Lösungen Luminol Enhancer Solution und Stable Peroxide Solution zu gleichen Teilen gemischt und auf der Membran verteilt. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die in Plastikfolie eingeschweißte Membran mit einem Röntgenfilm (Kodak, Osterode) für 1 min exponiert und der Film anschließend entwickelt (Kodak X-OMAT).

2.6 Mikroskopische Analysen besiedelter Gerstenwurzeln

Alle mikroskopischen Analysen wurden mit einem Axioplan 2 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt.

2.6.1 Fixierung

Wurzelproben, die zur Kontrolle der *P. indica*-Besiedlung angefärbt werden sollten, wurden in einer Fixierlösung aufbewahrt. Diese Fixierlösung setzte sich wie folgt zusammen:

80% (v/v)	Ethanol
20% (v/v)	Chloroform
1,5 g/l	Trichloressigsäure

2.6.2 WGA-Färbung

Um pilzliche Strukturen in den Wurzelproben anzufärben, wurden die Wurzeln für 2 min bei 80°C in 10% Kaliumhydroxid erhitzt, die Säure durch erneutes Waschen mit H₂O entfernt und nach 1-2 Waschschritten für 10 min mit 1 x PBS pH 7,4 in einer WGA-Propidiumiodid-Färbelösung angefärbt. Damit die Färbelösung besser in die tieferen Wurzelschichten eindringen konnte, wurden die Proben während der Inkubationszeit dreimal für 1 min vakuumfiltriert. Für die Mikroskopie wurden die Proben auf einen Objektträger in 50 % Glycerin überführt.

WGA- Propidiumiodid -Färbelösung:

5 ml	PBS Puffer (pH 7,4)
50 µl	WGA (<i>Wheat germ agglutinin</i>) Alexa Fluor 488 (1 µg/µl) (Invitrogen)
10 µl	Propidiumiodid (10 mg/ml)
0,05%	Silwet

2.7 Luminol-Assay

Zur Messung von H₂O₂ wurde zunächst eine Luminol-Stocklösung hergestellt. Dazu wurden 1,77 mg Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion; Sigma Aldrich, München) in 1 ml 10 mM NaOH gelöst und auf 10 ml mit H₂O aufgefüllt. Für den Reaktionsansatz wurde 1 ml Luminol-Stock und 50 µl Horseradish Peroxidase (1 mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim) in 50 ml H₂O verdünnt.

Für den Luminol-Assay wurden für 3 Tage vorgekeimte Gerstenwurzeln auf PNM-Medium mit *P. indica* inokuliert und nach weiteren 3 Tagen vorsichtig aus dem Medium entfernt und in 1 cm lange Stücke geschnitten. Jeweils 4 Wurzelstückchen wurden über Nacht in einem 5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) in 3-4 ml H₂O bei RT im Dunkeln inkubiert, um die Wundreaktionen zu vermindern. Für die Messung wurde das Wasser entfernt, 292,5 µl der Luminol-Peroxidase-Verdünnung und 7,5 µl 200 mM Phosphatpuffer pH 8,0 zugegeben, gemischt und sofort in einem Berthold Lumat LB 9501 (Berthold, Bad Wildbach) für 10 min die Hintergrundlumineszenz gemessen. Die Messintervalle erfolgten im Minutentakt. Zur Induktion des *oxidative burst* wurden 7,5 µl Flagellin 22 (41 µM) oder 7,5 µl Chitin (1 mg/ml Krabbenchitin, Sigma Aldrich, München) dazugegeben, gut gemischt und danach für weitere 20-30 min gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Verlauf der Wurzelbesiedlung mit *P. indica*

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wurzelbesiedlung durch *P. indica* auf molekularer Ebene. Um den Einfluss dieser mutualistischen Interaktion auf die Genexpression von infiziertem Wirtsgewebe zu untersuchen, sollte eine auf Microarrays basierende Transkriptomanalyse mit *P. indica* infizierten Gerstenwurzeln durchgeführt werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf den frühen Phasen der Interaktion bis zur Etablierung des Pilzes im Wurzelgewebe. Daher sollten vor allem die ersten Tage während der Sporenkeimung, der Penetration und der Etablierung der Symbiose mit Hilfe der Transkriptomanalyse betrachtet werden. Zunächst mussten die Zeitpunkte der Probennahme in Abhängigkeit des Besiedlungsschemas des Pilzes festgelegt werden. Dazu wurde in einem Vorversuch der Verlauf der Besiedlung der Gerstenwurzeln mit *P. indica* mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 1 und 14 dai („days after inoculation“) genau beobachtet. So konnte der genaue zeitliche Verlauf der Besiedlung, wie Sporenkeimung und Penetration aber auch die intra- und interzelluläre Etablierung des Pilzes bestimmt werden. Die Sporenkeimung beginnt demnach 12 Stunden nach Inokulation. 36 Stunden nach Inokulation finden erste Penetrationsereignisse statt und es können erstmals sowohl inter- als auch intrazelluläre Hyphen beobachtet werden. Im Laufe der nächsten Tage bildet der Pilz ein verzweigtes Netz aus Hyphen auf der Wurzeloberfläche, aber auch in Rhizodermis- und Kortezellen aus. Zwei Wochen nach Inokulation beginnt die intrazelluläre Chlamydosporeneubildung (Abb. 3.1). Aufgrund dieser Beobachtungen, wurden die Zeitpunkte der Probennahme für die Microarray-Analysen so festgelegt, dass der früheste Zeitpunkt vor der Penetrationsphase lag (1 dai), ein Zeitpunkt während der Penetrations- und frühen Besiedlungsphase, (3 dai) und schließlich ein späterer Zeitpunkt während der Phase der Etablierung des Pilzes in der Wurzel (7 dai).

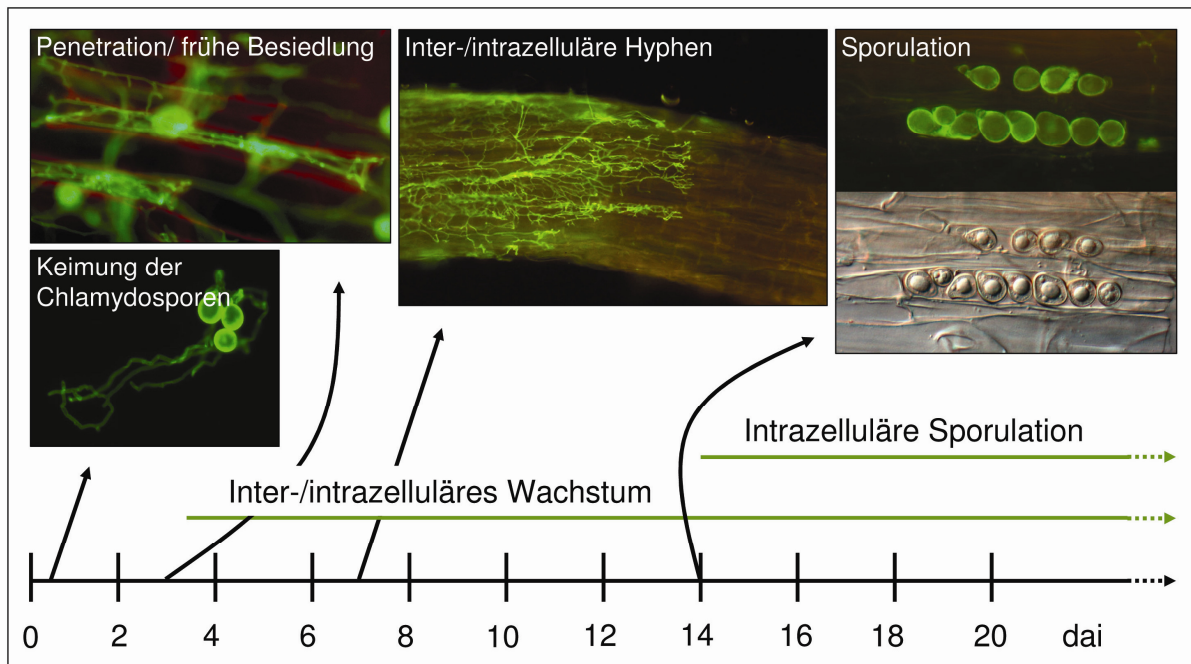


Abb. 3.1: Übersicht der Wurzelbesiedlung mit *P. indica*. Nach ca. 12 dai keimen die Chlamydosporen aus, die Penetration der rhizodermalen Zellen beginnt 36 hai, 3 dai findet man erste intrazelluläre Hyphen. Der Pilz bildet ein Netzwerk aus inter- und intrazellulären Hyphen. Die Neubildung der Chlamydosporen beginnt meist 14 dai. *P. indica* wurde mit WGA-Alexa Fluor 488 angefärbt (grün), Zellwände der Gerstenwurzeln wurden mit Propidiumiodid visualisiert.

3.2 Transkriptomanalyse von *P. indica* besiedelten Wurzeln

3.2.1 Affymetrix-Microarrays

Für die Transkriptomanalyse wurden 3 Tage alte Gerstenkeimlinge entweder mit einer *P. indica*-Sporensuspension inokuliert oder mock-behandelt und in ein Substrat aus Seramis/Oildri getopft. Die kompletten Wurzeln der Pflanzen wurden nach 1, 3 und 7 dai aus dem Substrat geerntet und daraus die RNA extrahiert. Nach der Überprüfung der Qualität der RNA mithilfe des Agilent Bioanalyzers (Daten nicht gezeigt) wurde die DNase-freie RNA mit dem Affymetrix One-Cycle Eukaryotic Target Labeling Protokoll in cRNA umgeschrieben und auf Affymetrix Barley1 GeneChips hybridisiert. Die Normalisierung und vorläufige Auswertung der ersten 6 hybridisierten Proben wurde in Kooperation mit Dr. Joern Pons-Kühnemann (Institut für Biometrie, Justus-Liebig Universität Gießen) durchgeführt. Da zunächst von jedem Zeitpunkt und jeder Behandlung (Mock bzw. *P. indica*) jeweils nur eine von drei biologisch unabhängigen Proben hybridisiert wurde, war keine vollständige

statistische Auswertung möglich. Der Vergleich der Expression der kontrollbehandelten gegen die *P. indica* besiedelten Proben ergab insgesamt 194 mindestens 1,8-fach differentiell regulierte Gene, davon jeweils 56 nach 1 und 3 dai und 82 nach 7 dai (Anhang, Tabellen 7.1-7.3). Dass diese relativ geringe Zahl an differentiell regulierten Genen nur sehr bedingt aussagekräftig ist, zeigt ein vergleichender *Scatterplot* in Abbildung 3.2. Darin werden die detektierten Fluoreszenzsignale zweier Proben gegeneinander aufgetragen, um dann anhand der Streuung der einzelnen Punkte stark regulierte Gene darzustellen. Bei dieser Art von Darstellung liegen alle nicht regulierten Gene auf der Winkelhalbierenden, alle mehr als 1,8-fach regulierten Gene liegen außerhalb der beiden schwarzen Geraden. Die blauen Punkte entsprechen Genen, deren Hybridisierungssignal nicht signifikant über dem Hintergrund liegt. Diese werden daher in der Datenauswertung nicht berücksichtigt.

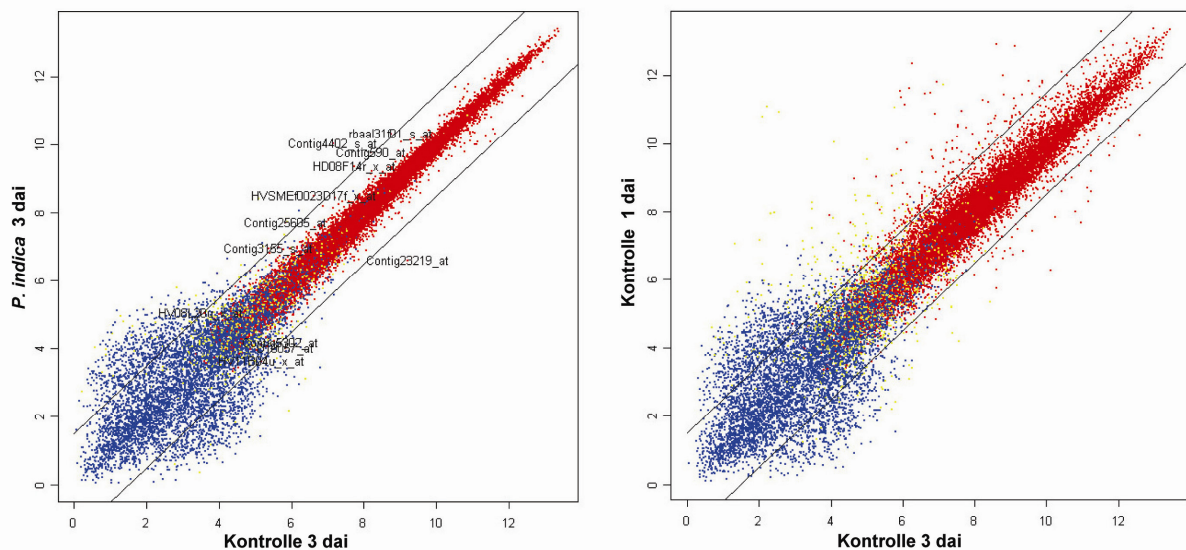


Abb. 3.2: Scatterplot. Normalisierte Hybridisierungssignale zweier Proben sind gegeneinander aufgetragen. Alle Punkte außerhalb der beiden schwarzen Schrägen sind mehr als 1,8-fach reguliert. Der linke Plot zeigt den Vergleich Kontrolle 3 dai gegen *P. indica* 3 dai, der rechte Plot zeigt Kontrolle 1 dai gegen Kontrolle 3 dai.

Die roten Punkte stellen alle Gene dar, deren Signale signifikant über dem Hintergrund liegen. Im linken Diagramm sieht man die Unterschiede zwischen 3 dai Kontrollbehandelten- und *P. indica*-besiedelten Pflanzen. Das rechte Diagramm zeigt zum Vergleich Kontrollpflanzen 1 dai gegen 3 dai. Hierbei erkennt man deutlich, dass die entwicklungsbedingten Unterschiede, d.h. Unterschiede zwischen 1 und 3 Tage alten Kontrollpflanzen größer sind als die durch *P. indica* induzierten Unterschiede in der Genexpression.

3.2.2 Agilent-Microarrays

Im oben beschriebenen Versuchansatz, bei dem jeweils komplette Wurzeln als Probenmaterial verwendet wurden, konnte nur eine geringe Anzahl an differentiell regulierten Genen zwischen *P. indica*-infizierten und kontrollbehandelten Gerstenwurzeln detektiert werden. Dies ist durch die ungleichmäßige Besiedlung des Wurzelgewebes zu erklären. Deshmukh et al. (2006) zeigten, dass der Pilz hauptsächlich die älteren Wurzelabschnitte besiedelt. In den jüngeren Abschnitten des Wurzelmeristems dagegen konnten nur vereinzelt Hyphen detektiert werden. Diese Beobachtung wurde für einen neuen Versuchsansatz genutzt, indem ausschließlich die älteren, stark besiedelten Wurzelabschnitte zu den Zeitpunkten 3 und 7 für die RNA-Extraktion und anschließenden Arrayanalysen geerntet wurden. So sollte eine Anreicherung von *P. indica*-besiedeltem Wurzelgewebe und damit auch eine höhere Sensitivität bezüglich der transkriptionellen Änderungen während der Interaktion erreicht werden. Weiterhin wurde anstelle der bisherigen RNA-Extraktionsmethode (siehe Material und Methoden 2.4.1.1) für die neue Versuchsreihe die RNA mittels TRIZol extrahiert.

Ein weiteres, wichtiges Kontrollexperiment war die Quantifizierung der Besiedlung der Wurzeln mit *P. indica*, bevor die Proben zur Hybridisierung der Microarrays verwendet wurden. So sollte sichergestellt werden, dass die Besiedlung mit *P. indica* zwischen den drei unabhängigen Triplikaten (benannt: Z1, Z2 und Z3) vergleichbar ist. Zur relativen Quantifizierung der pilzlichen DNA wurde mittels quantitativer real-time PCR das Verhältnis von Gersten-DNA zu pilzlicher DNA zu allen Zeitpunkten und für jede der drei unabhängigen Wiederholungen bestimmt. Abbildung 3.3 zeigt die relative Menge des Translationelongationsfaktors EF1 α aus *P. indica* (Bütehorn et al., 2000) bezogen auf Ubiquitin aus Gerste.

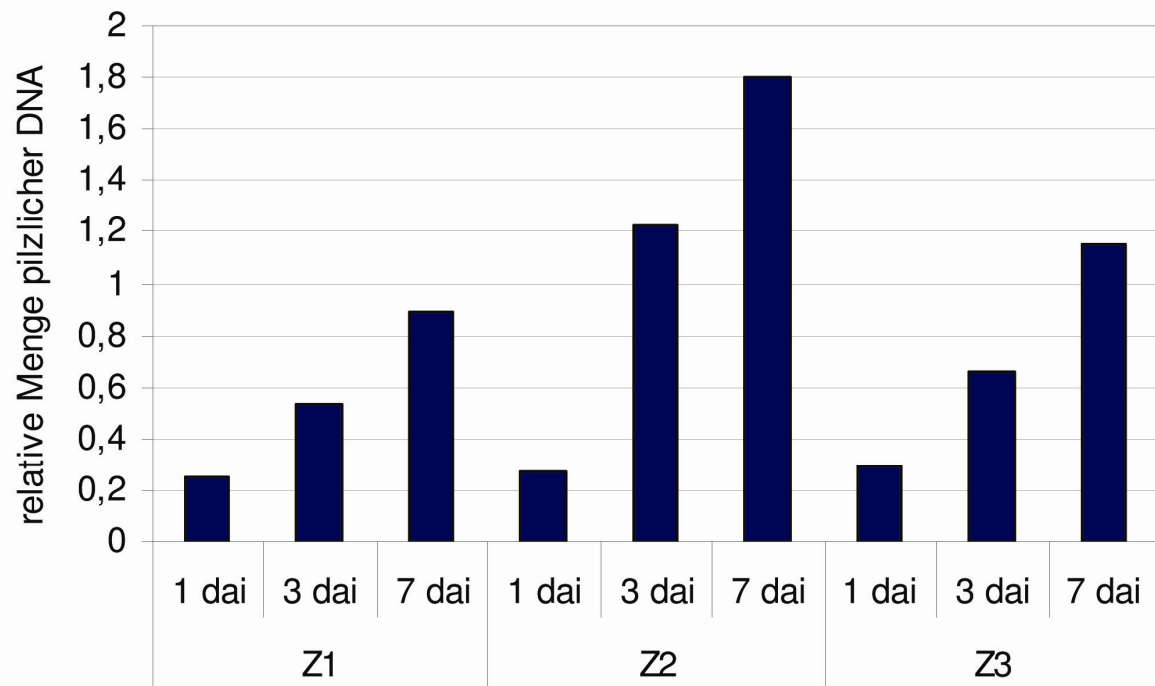


Abb. 3.3: Quantifizierung der pilzlichen DNA in Gerstenwurzeln zur Überprüfung der *P. indica*-Besiedlung. Mit quantitativer real-time PCR wurde die Menge der pilzlichen DNA anhand des Translationselongationsfaktors PiTef relativ zur Menge des pflanzlichen Ubiquitins zu allen drei Zeitpunkten der drei unabhängigen Experimente Z1, Z2 und Z3 bestimmt.

Zusätzlich zur DNA-Quantifizierung wurde die Wurzelbesiedlung mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Durch die WGA-Propidiumiodid-Färbung sind inter- sowie intrazelluläre Pilzhyphen sehr gut erkennbar (Abb. 3.4). Um sicherzustellen, dass bei allen Probenahmen ausschließlich besiedelte Wurzelabschnitte geerntet wurden, wurden jeweils am Tag des Erntezeitpunktes einige Wurzeln mit WGA-Propidiumiodid angefärbt und die Stärke und Ausbreitung der pilzlichen Besiedlung bestimmt.

Für die Transkriptomanalyse der besiedelten Wurzelabschnitte wurde ein Agilent 4*44K Microarray benutzt, der unter Berücksichtigung aller von Gerste bekannten EST-Sequenzen aus der „Harvest“-Datenbank in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Sonnewald an der FAU Erlangen-Nürnberg zusammengestellt wurde.

Für die Arrayexperimente wurden pro Zeitpunkt (1, 3 und 7 Tage nach Behandlung) drei biologische Wiederholungen für jede Behandlung (*P. indica*-Inokulation und Kontrollbehandlung) durchgeführt. Folglich wurden insgesamt 18 Microarrays hybridisiert. Die Vorbereitung des Probenmaterials, die RNA-Extraktion und die

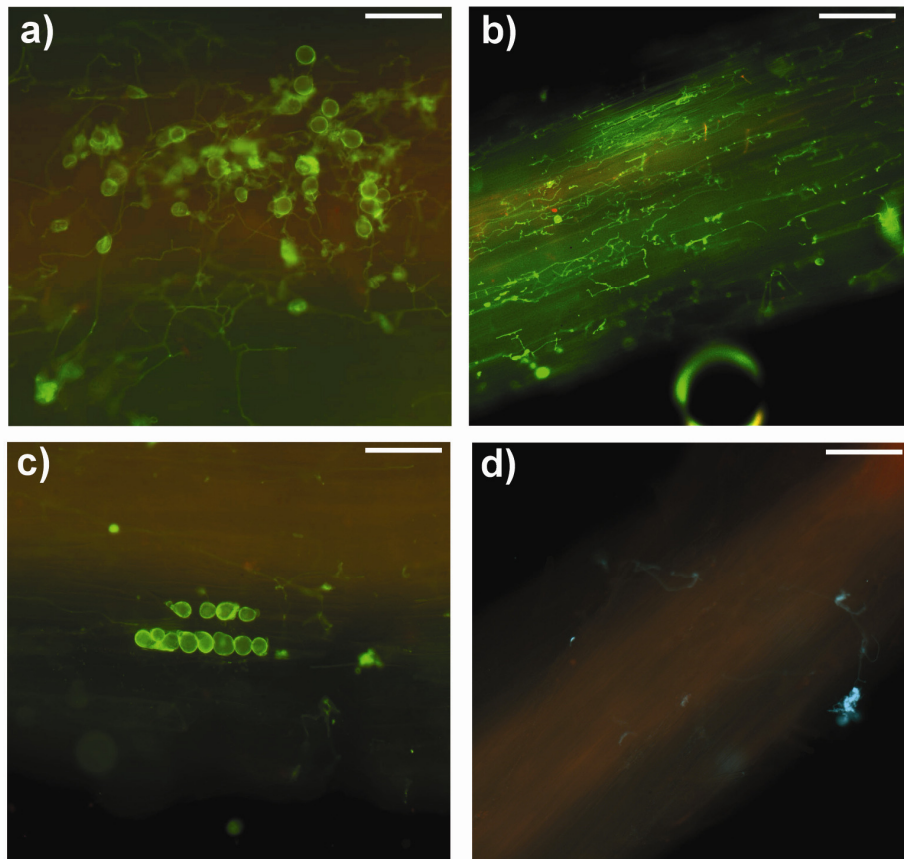


Abb. 3.4: Besiedlung verschiedener Wurzelbereiche von Gerste mit *P. indica*. a) Auskeimende *P. indica* Chlamydosporen 1 dai. b) Intra- und interzelluläre Hyphen 3 dai. c) Erste intrazelluläre Chlamydosporenbildung 7 dai. d) Wenig besiedelte meristematische Zone mit vereinzelt Hyphen. Die Wurzeln wurden mit WGA-Alexa Fluor 488 und Propidiumiodid angefärbt. Größenskalierung: a) und c) 20 μm , b) und d) 100 μm .

Überprüfung der Qualität der isolierten RNA wurde in Gießen durchgeführt. Die Hybridisierung der Proben wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Sonnewald an der FAU Erlangen-Nürnberg durchgeführt, wo eine vollständige Agilent Plattform zur Verfügung steht. Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte in Kooperation mit Dr. Joern Pons-Kühnemann (Institut für Biometrie, Justus-Liebig Universität Gießen). Die Analysen resultierten in der Identifizierung von 1107 Genen, die mindestens zu einem der drei Zeitpunkte signifikant und mehr als 2-fach differentiell reguliert waren. Aufgeteilt auf die 3 Zeitpunkte wurden 1 dai 392 Gene, 3 dai 459 Gene und 7 dai 509 Gene als differentiell reguliert eingestuft (siehe Tabelle 7.5, Anhang). Dabei waren weniger als 10% der nach 1 dai regulierten Gene auch nach 3 oder 7 dai differentiell reguliert, während 40-50% der zu 3 und 7 dai als differentiell reguliert eingestuften Gene identisch waren. Das Verhältnis von induzierten zu reprimierten Genen war zum

frühen Zeitpunkt nahezu ausgeglichen, während zu den späteren Zeitpunkten (3 und 7 dai) ca. 25% der Gene reprimiert waren. Nach Überprüfung der Annotation konnten die Gene in 15 funktionelle Gruppen wie folgt eingeordnet werden (Abb. 3.5 und Anhang, Tab. 7.5): Abwehr-/ Stress-bezogen (151), Signalübertragung (90), Sekundärmetabolismus (58), Transporter/Kanäle (53), Transkription/Proteinbiosynthese (48), Rezeptoren (42), Hormonmetabolismus (38), Lipidmetabolismus (36), Proteindegradation (34), Primärmetabolismus (33), Proteinmetabolismus (33), DNA-Metabolismus/Genomorganisation (23), Zytoskelett (13), Zellwandmetabolismus (14) und Nährstoffspeicherung (13). 414 Gene konnten entweder aufgrund fehlender Annotation (Unbekannt, 380 Gene) bzw. aus anderen Gründen (Sonstige, 34 Gene) nicht in eine der 15 Gruppen eingeordnet werden. Mit 13,6% stellen die Abwehr-/Stress-bezogenen Gene die größte Gruppe dar, direkt gefolgt von an der Signalübertragung beteiligten Gene (8,1%).

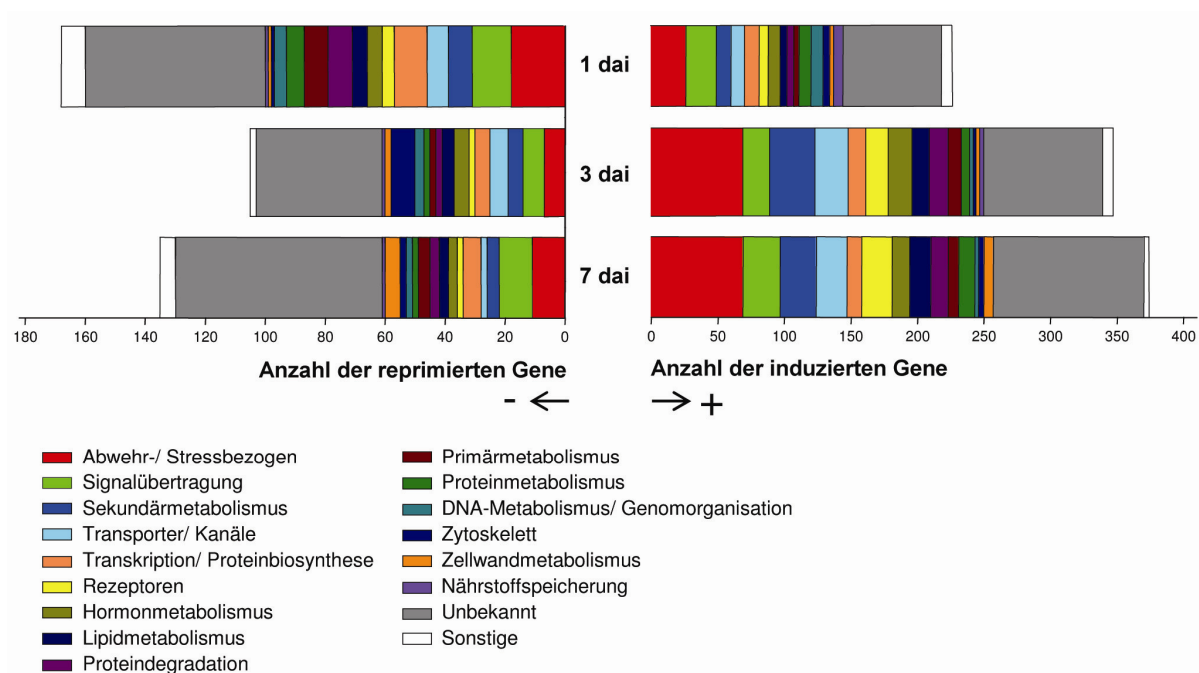


Abb. 3.5: Funktionellen Kategorien der differentiell regulierten Gene pro Zeitpunkt. Die linke Hälfte stellt die Anzahl aller reprimierten Gene sortiert nach Zeitpunkt und Funktion dar, die rechte Hälfte zeigt entsprechend die Anzahl aller induzierten Gene getrennt nach den Zeitpunkten 1, 3 und 7 dai. Die verschiedenen Farben der funktionellen Kategorien sind in der Legende dargestellt.

Durch *P. indica* wurden zahlreiche Stress-responsive Gene (z.B. Laccasen, *late embryogenesis abundant proteins/ dehydrins*) und auch verschiedene Abwehr-bezogenen Gene induziert, wie z.B. PR- und R-Proteine. Insgesamt 11%

(25 induziert/ 18 reprimiert) aller differentiell regulierten Gene konnten 1 dai dieser Kategorie zugeordnet werden während es 3 und 7 dai jeweils 16,8% (69 induziert/ 8 reprimiert) und 15,7% (69 induziert/ 11 reprimiert) waren. Es konnten jedoch nur 5 Gene identifiziert werden, die zu allen drei Zeitpunkten differentiell reguliert waren. Dies waren zwei putative *pathogenesis-related proteins 10*, ein *putative germin A*, eine *putative laccase 18* sowie ein putatives *syringolid-induced protein*. Aufgrund ihrer Expressionsmuster wurden alle 151 Abwehr-/Stress-bezogenen Gene in vier Cluster aufgeteilt. Alle durch *P. indica* reprimierten Gene (35 Gene, 23%) wurden Cluster A zugeordnet (Abb. 3.6). Die 47 Gene, die Cluster B zugeordnet wurden, zeigten alle ein transientes Induktionsmuster zu 1 oder 3 dai. Cluster C beinhaltet solche Gene, die 3 dai transient induziert waren, jedoch 7 dai eine schwächere Induktion aufwiesen (12 Gene). Alle Gene, die konstitutiv 3 und 7 dai (31 Gene) oder nur 7 dai induziert waren, wurden Cluster D zugeordnet. Generell betrachtet, zeigten die Abwehr- und Stress-bezogenen Gene eine moderate Induktion, 70% dieser Transkripte waren weniger als 4-fach induziert. Die höchsten Induktionslevel wurden 1 dai detektiert und somit in der Phase vor der Penetration des Pilzes.

Cluster A	Annotation	Accession	FC 1 dai	FC 3 dai	FC 7 dai
	P_35_24296 putative rust resistance kinase Lr10	BAB17127.1	-2	-	-
	P_35_10019 NBS-LRR disease resistance protein homologue	CAD45029.1	-2,07	-	-
	P_35_26357 Vrga1	AAF19148.1	-2,11	-	-
	P_35_49169 MAK16-like protein (IC)	CAL52146.1	-2,12	-	-
	P_35_13456 Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GIV	Q02437	-2,23	-	-
	P_35_2276 putative protein kinase Xa21	BAD19467.1	-2,27	-	-
	P_35_14157 class III peroxidase 107 precursor	CAH69349.1	-2,31	-	-
	P_35_49240 putative disease resistance protein RPS2	BAD53266.1	-2,36	-	-
	P_35_47347 harpin-induced protein-related-like	BAB85244.1	-2,43	-	-
	P_35_36622 Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein-like	BAD35804.1	-2,68	-	-
	P_35_7483 putative verticillium wilt disease resistance protein	BAD68095.1	-2,76	-	-
	P_35_46704 laccase LAC12	AAN59950.1	-3,56	-	-
	P_35_32330 putative protein kinase Xa21	BAD05503.1	-3,69	-	-
	P_35_49076 putative Erwinia induced protein 1	BAD38015.1	-3,74	-	-
	P_35_14325 basal layer antifungal peptide	NP_001105658.1	-3,82	-	-
	P_35_48916 Harpin-induced protein 1 containing protein, expressed	ABA91314.1	-5,33	-	-
	P_35_19086 putative UVB-resistance protein	BAD33304.1	-8,32	-	-
	P_35_21731 csAtPR5	ABU55301.1	-	-2,32	-
	P_35_1074 metallothionein-like protein type 4	CAD88267.1	-	-2,42	-
	P_35_20358 putative defensin	BAD23741.1	-	-2,53	-
	P_35_23447 HFR-3	ABE77384.1	-	-2,55	-
	P_35_14534 dehydrin 5	AAD02262.1	-	-3	-
	P_35_48451 Catalase-1	Q43206	-	-4,07	-
	P_35_4777 putative stress-responsive protein	BAB92723.1	-	-5,92	-
	P_35_25947 putative protein kinase Xa21	BAD45411.1	-	-	-2,07
	P_35_24828 putative laccase LAC5-6	BAB86452.1	-	-	-2,2
	P_35_14520 pore-forming toxin-like protein Hfr-2	AAW48295.1	-	-	-2,25
	P_35_15776 phytochelatin synthetase	AAO86520.1	-	-	-2,48
	P_35_11632 class III peroxidase 120 precursor	CAH69362.1	-	-	-2,48
	P_35_25690 NB-ARC domain containing protein	ABA92208.1	-	-	-2,7
	P_35_31252 endoglucanase/cellulase, putative	XP_001260445.1	-	-	-2,86
	P_35_12815 HcrVf1 protein-like	BAD53108.1	-	-	-3,23
	P_35_15272 germin-like protein 1a	ABG46232.1	-	-	-3,44
	P_35_23784 putative senescence-associated protein	AAL79714.1	-	-	-5,42
	P_35_9301 Metallothionein-like protein 3A	A2WLS0.1	-	-	-7,21

3. Ergebnisse

Cluster B	Annotation	Accession	FC 1 dai	FC 3 dai	FC 7 dai	
	P_35_14532	dehydrin 4	ABO14397.1	36,35	-	-
	P_35_14533	dehydrin 4	AAF01692.1	32,37	-	-
	P_35_789	LEA protein	BAD22766.1	25,67	-	-
	P_35_20640	LEA protein 12	AAT99310.1	13,52	-4,06	-
	P_35_14544	dehydrin 6	AAF01694.1	12,93	-	-
	P_35_17661	WSI18 protein induced by water stress	BAB44029.1	10,66	-	-
	P_35_18037	LE25	Q00747	9,83	-	-
	P_35_14542	dehydrin 7	AAX14224.1	8,09	-	-
	P_35_31171	LEA1 protein	AAN74637.1	6,85	-	-
	P_35_45168	LEA protein	BAD22766.1	4,6	-	-
	P_35_831	glyoxalase family-like protein	BAC83945.1	4,58	-	-
	P_35_15919	putative beta-1,3-glucanase	BAC84505.1	4,34	-	-
	P_35_1235	hypersensitive-induced reaction protein 3	AAN17464.1	3,5	-	-
	P_35_48111	peroxidase-like protein	BAD82471.1	3,16	-	-
	P_35_17368	tocopherol cyclase	ABE41800.1	3,07	-	-
	P_35_16218	Non-symbiotic hemoglobin (HORvu GLB1)	Q42831.1	2,96	-	-
	P_35_6165	disease resistance protein RPM1, putative	ABA97409.1	2,67	-	-
	P_35_23834	callose synthase 1 catalytic subunit-like protein	BAD87670.1	2,66	-	-
	P_35_40698	putative protein kinase Xa21	BAC10827.1	2,52	-	-
	P_35_48374	putative protein kinase Xa21	BAD19467.1	2,5	-	-
	P_35_3942	putative blue copper binding protein	BAD03004.1	2,15	-	-
	P_35_40410	RGA2	ABS88264.1	-2,33	2,08	-
	P_35_13049	Putative laccase-19 precursor	A2Y9C5	-	12,67	-
	P_35_702	PR-1a pathogenesis related protein (Hv-1a)	CAA52893.1	-	5,69	-
	P_35_704	Pathogenesis-related protein 1 precursor	Q05968	-	5,42	-
	P_35_703	PR-1a pathogenesis related protein (Hv-1a)	CAA52893.1	-	4,34	-
	P_35_25842	predicted protein of CLR family	XP_001699113.1	-	4,07	-
	P_35_15273	Oxalate oxidase 2 precursor	P45851	-	3,77	-
	P_35_19415	NBS-LRR disease resistance protein homologue	CAD45027.1	-	3,54	-
	P_35_23548	putative protein kinase Xa21	BAD68717.1	-	3,52	-
	P_35_14156	class III peroxidase 107 precursor	CAH69349.1	-	3,48	-
	P_35_13184	syringolide-induced protein 1-3-1B-like protein	BAD73836.1	-	3,44	-
	P_35_28599	putative antifungal zeamatin-like protein	AAS07338.1	-	3,4	-
	P_35_946	glutathione S-transferase	ABU56005.1	-	3,22	-
	P_35_50221	putative peroxidase	BAC45201.1	-	2,93	-
	P_35_23184	glutathione S-transferase GSTU6	AAM12330.1	-	2,92	-
	P_35_31622	class III peroxidase 106 precursor	CAH69348.1	-	2,86	-
	P_35_7685	peroxidase 1 precursor-like protein	BAC84009.1	-	2,72	-
	P_35_20300	Mlo3	AAS93431.1	-	2,69	-
	P_35_40770	WRKY1	AAD32677.1	-	2,52	-
	P_35_15274	oxalate oxidase	CAA74595.1	-	2,35	-
	P_35_39396	putative immediate-early fungal elicitor protein	BAD45713.1	-	2,35	-
	P_35_5960	putative immunophilin / FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans	BAD03102.1	-	2,22	-
	P_35_35337	putative protein kinase Xa21	BAD19465.1	-	2,22	-
	P_35_22561	putative protein kinase Xa21	BAD17688.1	-	2,21	-
	P_35_27956	putative peroxidase	BAD15723.1	-	2,03	-
	P_35_30934	lycogenin glucosyltransferase (glycogenin)-like protein	BAD15458.1	-	2,03	-

Cluster C	Annotation	Accession	FC 1 dai	FC 3 dai	FC 7 dai	
	P_35_10620	Putative laccase-18 precursor	A2XCN6	2,11	4,61	2,01
	P_35_6898	pathogenesis-related protein	CAA71773.1	-	9,47	6,38
	P_35_17800	Elicitor-responsive protein 1	Q0JHU5.1	-	7,43	3,07
	P_35_3653	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	ZP_02297561.1	-	6,95	2,78
	P_35_16427	putative blue copper binding protein	BAD03003.1	-	6,3	3,62
	P_35_43197	germin-like protein 4c	ABG46235.1	-	6,16	3,93
	P_35_43501	Putative laccase-19 precursor	A2Y9C5	-	4,59	2,51
	P_35_15287	blue copper-binding protein	ABU56004.1	-	4,19	2,83
	P_35_17890	disease resistance response protein/dirigent protein, putative	AAX96314.1	-	3,95	2,26
	P_35_15620	chitinase IV precursor	AAD28733.1	-	3,58	2,12
	P_35_15289	blue copper-binding protein	ABU56004.1	-	3,53	2,42
	P_35_945	glutathione S-transferase	ABU56005.1	-	3,48	2,33

Cluster D	Annotation	Accession	FC 1 dai	FC 3 dai	FC 7 dai	
	P_35_15828	pathogenesis-related protein 10	AAP04429.1	3,03	7,12	6,21
	P_35_6811	putative syringolide-induced protein B13-1-1	BAD33459.1	2,59	13,87	11,81
	P_35_21911	putative germin A	BAD05737.1	2,4	13,45	10,9
	P_35_15826	pathogenesis-related protein 10	AAP04429.1	2,19	5,12	4,86
	P_35_33564	germin-like protein 4d	ABG46236.1	-	12,73	11,68
	P_35_13229	putative germin A	BAD05742.1	-	10,57	10,9
	P_35_14954	germin-like protein 4c	ABG46235.1	-	8,76	10,38
	P_35_14951	germin A	AAG00425.1	-	8,32	13,26
	P_35_14950	germin-like protein 4c	ABG46235.1	-	6,91	7,67
	P_35_14955	oxalate oxidase-like protein or germin-like protein	CAA63659.1	-	6,85	5,96
	P_35_18546	Elicitor-responsive protein 1	Q0JHU5.1	-	5,79	5,33
	P_35_20557	HcrVf1 protein-like	BAB89968.1	-	5,15	7,66
	P_35_6982	putative immediate-early fungal elicitor protein CMPG1	BAD16037.1	-	3,98	4,31
	P_35_8949	putative blue copper binding protein	BAD03003.1	-	3,68	7,4
	P_35_14552	pathogenesis-related protein	CAA71773.1	-	3,43	6,44
	P_35_15708	thaumatin-like protein TLP8	AAK55326.1	-	3,13	3,48
	P_35_31317	Dirigent-like protein	ABA91734.1	-	3,08	2,34
	P_35_15288	blue copper binding protein	CAE51320.1	-	2,96	2,81
	P_35_7374	blue copper-binding protein	AAU84431.1	-	2,88	4,16
	P_35_5923	class III chitinase RCB4	AAK26395.1	-	2,83	3,17
	P_35_39680	putative rust resistance kinase Lr10	BAD52487.1	-	2,8	2,69
	P_35_43352	blue copper-binding protein	AAU84431.1	-	2,65	2,48
	P_35_20558	putative Cf2/Cf5 disease resistance protein	BAC65975.1	-	2,56	5,27
	P_35_21934	glutathione-S-transferase	AAL47688.1	-	2,38	3,14
	P_35_32917	putative LZ-NBS-LRR class RGA	BAD23250.1	-	2,33	2,04
	P_35_11996	putative Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 141	BAD33805.1	-	2,21	2,22
	P_35_4430	putative blue copper binding protein	BAD03004.1	-	2,16	2,12
	P_35_487	WIR1A	Q01482.1	-	2,1	3,38
	P_35_21876	HcrVf1 protein-like	BAB89968.1	-	2,1	2,12
	P_35_20965	putative class IV chitinase	BAD19330.1	-	2,08	2,46
	P_35_249	PR17c precursor	ABV22582.1	-	2,03	4,8
	P_35_25017	Jacalin-like lectin domain containing protein	ABA94732.1	-	-	7,9
	P_35_33638	putative laccase	NP_001105875.1	-	-	5,56
	P_35_34098	NB-ARC domain, putative	AAAX95465.1	-	-	3,87
	P_35_5984	WIR1B	Q01481.1	-	-	3,56
	P_35_17716	WIR1A	Q01482.1	-	-	2,98
	P_35_20826	immunophilin, putative / FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans	NP_187617.1	-	-	2,98
	P_35_36507	thionin-like peptide	AAAX19516.1	-	-	2,9
	P_35_3742	NBS-LRR type resistance protein	AAB96976.1	-	-	2,89
	P_35_22352	putative immediate-early fungal elicitor protein CMPG1	BAD16037.1	-	-	2,75
	P_35_11723	putative Cf2/Cf5 disease resistance protein homolog	BAC65975.1	-	-	2,66
	P_35_1898	putative CPRD2	BAD53702.1	-	-	2,56
	P_35_29677	Endo-1,4-beta glucanase 15	Q6L4I2	-	-	2,55
	P_35_8682	ascorbate oxidase	AAY47050.1	-	-	2,46
	P_35_37619	putative rust resistance kinase Lr10	BAB17127.1	-	-	2,41
	P_35_38976	Pathogenesis-related protein 1A/1B precursor	P32937	-	-	2,39
	P_35_15377	Pathogenesis-related protein 1C precursor	P32938	-	-	2,35
	P_35_157	PR17c precursor	ABV22582.1	-	-	2,26
	P_35_147	oxalate oxidase	AAF34811.1	-	-	2,21
	P_35_40564	putative Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein	BAD16491.1	-	-	2,15
	P_35_6939	glutathione S-transferase GST 24	NP_001104988.1	-	-	2,11
	P_35_509	Thionin BTH7 precursor	Q42838	-	-	2,11
	P_35_7561	putative Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 264	BAD38072.1	-	-	2,09
	P_35_5554	putative disease resistance protein RPM1	BAD05298.1	-	-	2,09
	P_35_22685	NBS-LRR disease resistance protein-like	BAB03441.1	-	-	2,08
	P_35_15891	putative glutathione transferase	BAD28950.1	-	-	2,05
	P_35_37792	putative glutathione S-transferase OsGSTF5	AAG32475.1	-	-	2,01

Abb. 3.6: Clusteranalyse der Abwehr-/Stress-bezogenen Gene. Alle 151 an Abwehr- bzw. Stressreaktionen beteiligten, in *P. indica*-besiedelten Wurzeln regulierte Gene wurden unter Berücksichtigung ihrer Expressionsmuster in 4 Gruppen (Cluster A, B, C und D) aufgeteilt. Die Farben zeigen den Expressionswert (engl.: *fold change*, *FC*) an, wobei rot für induzierte und blau für reprimierte Gene steht. Die linke Spalte zeigt außerdem die jeweilige Gen-Identifikationsnummer, die dritte Spalte zeigt die Accessionnummer. Cluster A zeigt alle durch *P. indica* reprimierten Gene, Cluster B zeigt alle 1 oder 3 dai transient induzierten Gene, Cluster C zeigt Gene, die 3 dai transient induziert waren und Cluster D beinhaltet Gene, die 3 und 7 dai, bzw. nur 7 dai konstitutiv induziert waren.

3.2.3 Verifizierung der Microarray-Daten mittels quantitativer real-time PCR

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus den Microarray-Daten wurde die Expression einiger regulierter Gene mittels quantitativer real-time PCR überprüft. Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde dazu dasselbe Probenmaterial verwendet, welches zuvor für die Microarray-Analyse verwendet wurde. Zusätzlich wurde die Expression ausgewählter Kandidatengene auch mit Wurzelmaterial aus einer unabhängigen Kinetik überprüft. Diese Kinetik wurde unter gleichen Bedingungen angezogen umfasste jedoch zusätzliche Zeitpunkte nach Behandlung. So konnten die Expressionswerte von *Terpensynthase 7 (TPS)*, *pathogenesis-related 1b (PR1b)*, *pathogenesis-related 10 (PR10)* und *syn-Copalylidiphosphat-synthase (syn-CPS)* aus den Microarray-Daten mit den Expressionswerten der real-time PCR aber auch mit denen der unabhängigen Kinetik verglichen werden (Abb. 3.7). Generell stimmten die Ergebnisse der real-time PCR mit denen der Microarray-Daten sehr gut überein. In der unabhängigen Kinetik (Abb. 3.7 b, d, f, h) stimmten die Werte für *TPS7* 1 und 3 dai mit den Daten der übrigen Expressionswerte (Microarray und real-time PCR) gut überein. Allerdings lag das Maximum der Induktion der *TPS7* bei 5 dai. Es wurden aber auch nach wie vor sehr hohe Expressionslevel 7 dai detektiert, was sich nicht vollständig mit der verminderten Induktion 7 dai in den Microarrays deckt. Das gleiche Bild ergab sich auch für *PR1b*, hier konnten die Expressionswerte der Microarrays 1 und 3 dai sehr genau verifiziert werden, die verminderte Transkriptmenge 7 dai war in der Kinetik wiederum nicht deutlich reproduzierbar. Die Expression von *PR10* und *syn-CPS* war im unabhängigen Material im Vergleich zu der Expression im Material der Microarrays, abgesehen von den Expressionslevel für die *syn-CPS* 3 und 7 dai, annähernd gleich. Insgesamt konnten die real-time PCR Ergebnisse die Analyse der Agilent-Microarrays deutlich verifizieren. Dies zeigt, dass die gewonnenen Transkriptomdaten robust sind und damit eine gute Basis für biologische Aussagen darstellen.

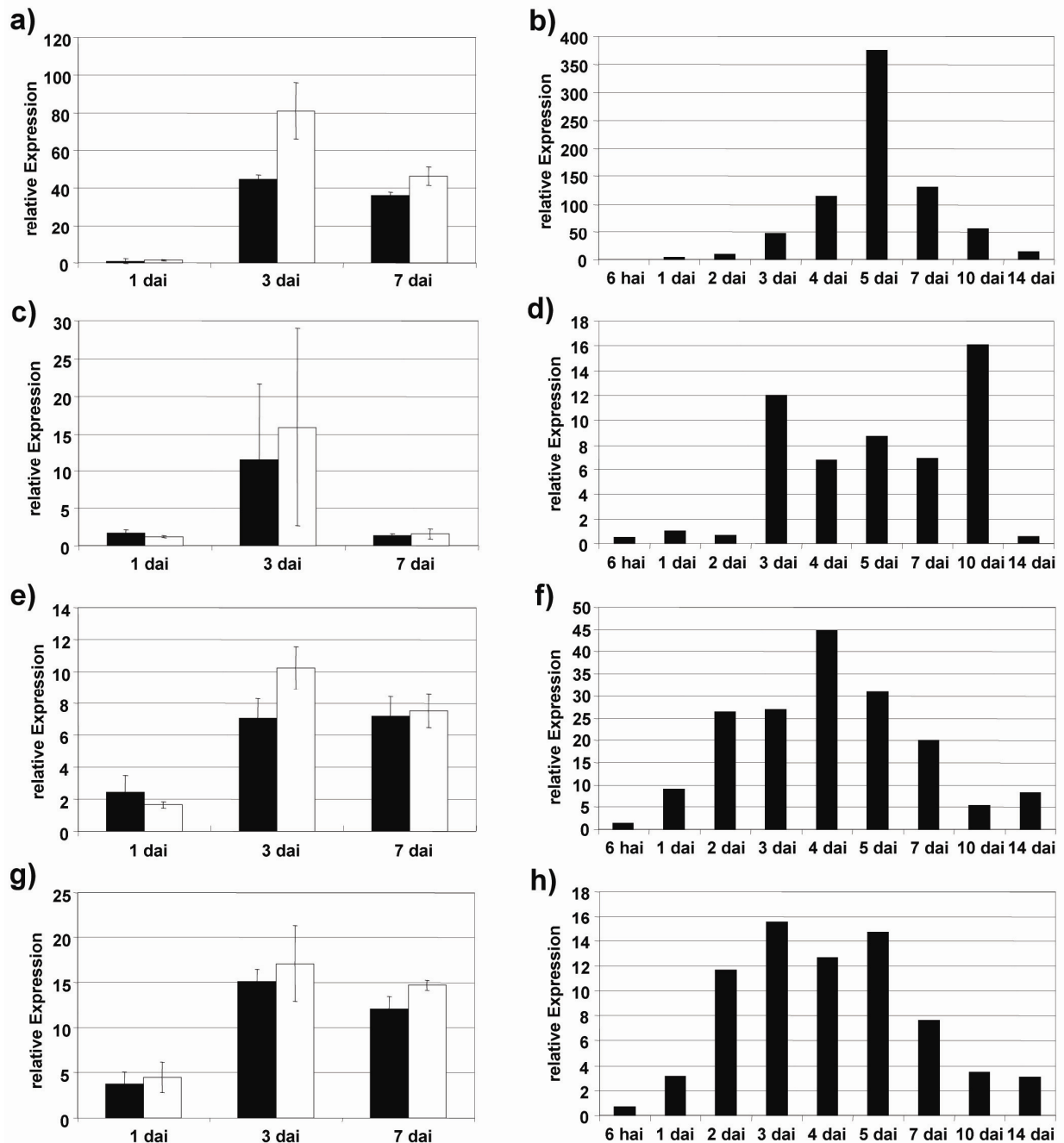


Abb. 3.7: Verifizierung der Agilent-Microarray-Daten mittels quantitativer real-time PCR.

a-b) *TPS7*, c-d) *PR1B*, e-f) *PR10*, g-h) *syn-CPS*. Die Expressionslevel wurden durch quantitative real-time PCR mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001).

Linke Seite: Verifizierung der Expressionsprofile ausgewählter Kandidatengene mit cDNA aus dem Material der Microarray-Experimente. Vergleich zwischen Microarray-Daten (schwarze Balken) und quantitativer real-time-PCR (weiße Balken). (Mittelwerte der drei Experimente, Fehlerbalken: Standardfehler). Rechte Seite: Verifizierung der ausgewählten Kandidaten mit cDNA aus einer unabhängigen Kinetik. Verlauf der Genexpression von *TPS*, *PR1b*, *PR10* und *syn-CPS* zwischen 6 Stunden und 14 Tagen nach Inokulation der Wurzeln mit *P. indica*.

3.2.4 *P. indica* beeinflusst Phytohormonsynthese und –signalgebung

Die Wurzelbesiedlung durch *P. indica* beeinflusste verschiedene an der Phytohormonbiosynthese und deren Signalwirkung beteiligte Gene (Abb. 3.8). So waren in den Microarray-Analysen beispielsweise zwei putativ an der Biosynthese von Gibberellinen (GA) beteiligte *ent-Kaurensynthasen* 3 und 7 dai stark induziert während eine an der Inaktivierung von aktivem GA beteiligte *Gibberellin-2-Oxidase* 3 dai etwa 2-fach reprimiert war. Die Rolle der GA-Biosynthese während der Wurzelbesiedlung mit *P. indica* wird an anderer Stelle in Kapitel 3.2.5 ausführlicher behandelt.

Abscisinsäure (ABA) ist an der Reaktion auf abiotischen und biotischen Stress beteiligt und wirkt oft antagonistisch zu anderen Phytohormonen (z.B. Ethylen, Jasmonsäure oder Salizylsäure; Asselbergh et al., 2008; Yasuda et al., 2008; Mohr und Cahill, 2007). Insgesamt wurden vier verschiedene *ABA-induced proteins* 1 dai (Prä-Penetrationsphase) durch *P. indica* sehr stark induziert. Drei dieser Proteine wurden zu 3 und 7 dai nicht mehr differentiell reguliert während das vierte *ABA-induced protein* nach 3 Tagen etwa 12-fach reprimiert war. Hundertmark und Hinch (2008) haben herausgefunden, dass viele der so genannten *late embryogenesis abundant proteins/ dehydrins (LEA)* durch ABA reguliert werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine Akkumulation von ABA während der Penetrationsphase des Pilzes sein, da viele putative *LEAs* 1 dai induziert sind (Tabelle 7.5, Anhang).

Verschiedene Gene des Lipidstoffwechsels und der Jasmonsäurebiosynthese sind ebenfalls während der Wurzelbesiedlung mit *P. indica* differentiell reguliert (siehe Tabelle 7.5, Anhang; Abb. 3.8). Eine an der Jasmonsäuresynthese beteiligte *S-Adenosyl-L-methionin-Jasmonsäure-carboxyl-methyltransferase* wurde durch *P. indica* 3 und 7 dai sehr stark induziert, während ein *23 kDa jasmonic acid induced protein (JIP23)* nach 3 Tagen etwa 3-fach reprimiert war. Ebenfalls waren verschiedene *Lipoxygenasen* teilweise 1 dai reprimiert, bzw. 3 dai induziert. Eine an der Salizylsäurebiosynthese beteiligte putative *S-adenosyl-L-methionin:salicylic acid carboxyl methyl transferase* war 7 Tage nach Inokulation induziert. Auf eine Beteiligung der Brassinosteroide deutet die starke Induktion einer *Cycloartenolsynthase* sowie von *BLE2*, welches für ein Brassinosteroid-responsives Transmembranprotein kodiert, 1 Tag nach Inokulation hin. Zusätzlich zeigten sich zwei *BAK1*-Transkripte (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1*) zu den späten Zeitpunkten stark induziert 3 und 7 dai war die Expression

zweier *Tryptophan-decarboxylasen* hochreguliert, die in die Synthese von L-Tryptophan involviert sind und als Ausgangsprodukt für die Auxinbiosynthese gelten (Ljung et al., 2005). Außerdem deutet die Induktion eines *auxin-induced proteins* und einer *flavin-containing monooxygenase (YUCCA3)* auf die Aktivierung

Phytohormon	ID	Annotation	Accession	FC 1 dai	FC 3 dai	FC 7 dai
Abscisic acid	P_35_12635	FUSCA3	CAL91173.1	-2,24	-	-2,09
	P_35_15689	ABA induced plasma membrane protein PM 19	AAB38504.1	8,61	-	-
	P_35_22394	Putative abscisic acid-induced protein	AAN06848.1	6,85	-12,66	-
	P_35_791	ABA-inducible protein PHV A1	P14928	6,8	-	-
	P_35_15687	ABA induced plasma membrane protein PM 19	AAB38504.1	6,19	-	-
	P_35_16444	putative Mtn3	BAB90353.1	3,4	-	-
P_35_15465	putative Lignostilbene- α,β -dioxygenase and related enzymes	BAD03492.1	-	2,15	2,8	
Brassinosteroid	P_35_26517	BLE2 protein	BAC20065.2	4,43	-	-
	P_35_15508	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1	ABA93885.1	-	9,64	5,07
	P_35_15510	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1	ABA93885.1	-	4,9	10,69
	P_35_43995	Cycloartenol synthase	ABA92749.2	5,24	-	-
Ethylene	P_35_38590	ethylene-responsive element binding protein	ABO93372.1	4,32	-	-
	P_35_29736	ethylene insensitive 3-like 2	AAV68140.1	-3,12	-	-
	P_35_15346	AP2 domain transcription factor EREBP	AAP56251.1	-	2,02	-
	P_35_11393	Similar to probable RAV2-like DNA binding protein	AAX92718.1	-	-2,24	-
	P_35_39060	ethylene-responsive factor	ABQ52686.1	-	-2,58	-
	P_35_15343	ethylene-binding protein-like	BAD38371.1	-	-	-3,26
	P_35_572	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	ABM74187.1	-2,28	-	-
	P_35_42938	putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase	BAB84460.1	-	4,31	-
	P_35_574	putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	AAU44031.1	-	2,63	2,75
Gibberellic acid	P_35_31003	ent-kaurene synthase 1A	AAQ72559.1	6,09	12,42	10,74
	P_35_40511	ent-kaurene synthase like-4	AAQ72563.1	-	14,24	17,29
	P_35_22565	O _s GA2ox1	BAB40934.1	-	-2,31	-
Auxin	P_35_19592	putative auxin induced protein	BAD46464.1	-	2,97	-
	P_35_5729	YUCCA3, putative flavin-containing monooxygenase	BAA88198.1	-	2,33	2,76
	P_35_18641	auxin efflux carrier family protein	NP_201399.1	-	2,06	-
	P_35_18504	putative indole-3-glycerol phosphate synthase	BAD23563.1	-	13,84	6,83
	P_35_18460	tryptophan decarboxylase	BAD11769.1	-	4,15	2,92
	P_35_11803	tryptophan decarboxylase	BAD11769.1	-	2,22	-
	P_35_28245	putative anthranilate phosphoribosyltransferase	BAC16176.1	-	2,02	-
Jasmonate	P_35_11274	Lipoxygenase 2.2	Q8GSM3	-2,39	-	-
	P_35_15174	jasmonate induced protein	CAA58110.1	-3,81	-	-
	P_35_19375	putative SAM:jasmonic acid carboxyl methyltransferase	BAD33074.1	-	14,46	17,74
	P_35_27132	lipoxygenase-2	ABU55901.1	-	5,05	2,87
	P_35_14643	Lipoxygenase 2.1	P93184	-	2,62	2,32
P_35_14314	23 kDa jasmonate-induced protein	P32024	-	-3,18	-	

Abb. 3.8: Expressionprofil von Genen verschiedener Phytohormon-Signalwege und der Phytohormonsynthese während der Besiedlung mit *P. indica*. Gene, die am Phytohormonmetabolismus oder deren Signalgebung beteiligt sind und zu mindestens einem Zeitpunkt differentiell exprimiert waren. Die Farben zeigen den Expressionswert (engl.: *fold change*, *FC*) an, wobei rot für induzierte und blau für reprimierte Gene steht. Die linke Spalte zeigt außerdem die jeweilige Gen-Identifikationsnummer, die dritte Spalte zeigt die Accessionnummer.

der Auxinbiosynthese während der Besiedlung mit *P. indica* hin. Die Transkriptomanalyse zeigte auch Veränderungen in der Expression von an der Ethylensynthese und an Ethylen-gesteuerten Signalwegen beteiligten Genen. So waren zum Beispiel zwei *aminocyclopropan-carboxylate oxidases (ACC-Oxidases)* 3 bzw. 3 und 7 Tage nach Inokulation induziert, eine weitere *ACC-Oxidase* war 1 dai reprimiert. Bis auf zwei Transkriptionsfaktoren (*ethylen-responsive element binding*

protein, RAV2-like DNA binding protein) waren alle weiteren mit Ethylen in Verbindung stehende Transkripte reprimiert (Abb. 3.7).

3.2.5 Veränderungen des Sekundärmetabolismus während der Wurzelbesiedlung durch *P. indica*

Um den Einfluss von *P. indica* auf den Primär- bzw. Sekundärmetabolismus in den besiedelten Wurzeln zu untersuchen, wurde nach dem Eingruppieren der Gene in verschiedene funktionelle Kategorien nach durch *P. indica* beeinflussten Stoffwechselwegen in der KEGG-Datenbank (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) gesucht. Dabei fiel auf, dass eine große Anzahl von Enzymen, die an der Isoprenoidbiosynthese beteiligt sind, in *P. indica*-besiedelten Pflanzen zu beiden späten Zeitpunkten (3 und 7 dai) stark induziert waren. Pflanzen sind in der Lage über zwei verschiedene Biosynthesewege Isoprenoide zu bilden: den zytosolischen Acetat-Mevalonat-Stoffwechselweg und den Methyl-erythritol-4-phosphat-Syntheseweg (MEP). Der MEP-Stoffwechselweg führt zur Bildung von Isoprenoiden, Monoterpenen, Carotinoiden, Abscisinsäure, Gibberellinsäure (GA), Tocopherol, Plastoquinon und den Seitenketten von Chlorophyll (Ganjewala et al., 2009; Einleitung, Kapitel 1.5.1). Abbildung 3.9 zeigt alle an der Dipterpen- und Gibberellinsäuresynthese beteiligten, differentiell regulierten Gene. So war beispielsweise eine *DXP-Synthase (DXS)* 3 und 7 dai sehr stark induziert (11,3 und 14-fach), zwei *CDP-ME-Kinasen (CMK)* waren 3 und 7 dai etwa 2-fach induziert, eine *Geranylgeranyldiphosphatsynthase (GGPS)* 3 dai 2,5-fach und 7 dai 3,2-fach induziert. Diese Vielzahl an differentiell regulierten Enzymen deutet auf eine erhöhte Aktivität des MEP-Stoffwechselwegs in *P. indica*-besiedelten Wurzeln hin.

Da der MEP-Stoffwechselweg über GGDP zur GA-Biosynthese führt, wurde die Expression der Gene unterhalb von GGDP betrachtet. Dabei wurden zwei *ent-Kaurensynthasen* entdeckt (siehe auch Abb. 3.8, Phytohormone), die 3 und 7 dai mehr als 10-fach induziert waren und von welchen eine bereits zum frühen Zeitpunkt (1 dai) etwa 6-fach induziert war. Das einzige Gen, dessen Transkription nicht induziert sondern reprimiert war, ist eine *Gibberellin-2-Oxidase*, die nach 3 Tagen etwas mehr als 2-fach reprimiert war. Dieses Enzym reguliert die Inaktivierung von bioaktiven GAs (Yamaguchi, 2008), was als weiterer Hinweis auf eine durch *P. indica* induzierte Aktivierung des GA-Metabolismus bewertet werden kann.

3.3 Der Einfluss von *P. indica* auf die Besiedlung und Genexpression in GA-Mutanten

Um die Rolle der Gibberellinsäuresynthese und der GA-Signalwirkung in *P. indica*-besiedelten Gerstenwurzeln näher zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kooperation mit Dr. Peter Chandler am CSIRO Institut in Canberra (Australien) begonnen, der diverse Gerstenlinien mit Defekten im GA-Syntheseweg bzw. im GA-Signalweg zu Verfügung stellte. Diese mit Natriumazid mutagenisierten Linien basieren auf der Gerstensorte cv. Himalaya als Wildtyp. Die folgende Tabelle 3.1 zeigt einen Überblick über die verwendeten Mutanten sowie den jeweiligen Defekt.

Tab. 3.1: Beschreibung der verwendeten Gerstenmutanten

M117	<i>grd1</i>	<i>GGPS</i> (<i>Geranylgeranyldiphosphatsynthase</i>) oder <i>CPS</i> (<i>ent-Copalyldiphosphatsynthase</i>)	GA-sensitiv, niedriger endogener GA-Gehalt (Chandler und Robertson, 1999)
M121	<i>gse1e</i>	GA-Rezeptor <i>GID1</i>	GA-insensitiv (Chandler und Robertson, 1999)
M488	<i>gse1a</i>	GA-Rezeptor <i>GID1</i>	GA-insensitiv (Chandler und Robertson, 1999)
M574	<i>grd5</i>	<i>KAO1</i> (<i>ent-Kaurensäure-Oxidase</i>)	Akkumuliert Kaurensäure (Helliwell et al., 2001)
M640	<i>Sln1d</i>	<i>SLENDER1</i>	GA-insensitiv (Chandler et al., 2002)

Unter den verwendeten Mutanten befanden sich sowohl Mutanten mit Defekten im GA-Biosyntheseweg (M117, M574) als auch Mutanten mit Defekten in der GA-Signalleitung (M121, M488, M640). Die Biosynthese-Mutante M117, zeigte, wie alle anderen GA-Mutanten, gegenüber dem Wildtyp Himalaya ein deutlich verringertes Wachstum sowie dunklere Blätter. M117 zeigte zudem eine starke Reaktion auf GA₃-Zugabe und hat niedrigere endogene GA-Gehalte als der Wildtyp (Chandler und

Robertson, 1999). Dieser Phänotyp ist sehr wahrscheinlich, durch einen Defekt in der Geranylgeranyldiphosphatsynthase (GGPS) bzw. der *ent*-Copalyldiphosphatsynthase (CPS) zu erklären (Zwar und Chandler, 1995; Chandler und Robertson, 1999). Die zweite Biosynthese-Mutante, M574, akkumuliert Kaurensäure, da aufgrund der mutierten *ent*-Kaurensäure-Oxidase (KAO) die Oxidation von *ent*-Kaurensäure zu GA₁₂ nicht mehr stattfinden kann (Helliwell et al., 2001). Von den drei GA-Signal-Mutanten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, haben zwei Linien Mutationen im GA-Rezeptor GID1. Dies sind die Linien M121 (*gse1e*) und M488 (*gse1a*; Chandler und Robertson, 1999; Chandler et al., 2008). Beide Linien zeigen eine verminderte Sensitivität gegenüber GA₃, was sich durch eine im Vergleich mit dem Wildtyp Himalaya verminderte Wachstumssteigerung auch bei hohen GA₃-Gaben widerspiegelt. Die Linie M640 ist eine weitere GA-Signal-Mutante mit einer Aminosäure-Substitution in der DELLA-Region des SLENDER-Proteins SLN1, was zur Unterdrückung der GA-Signalweiterleitung führt (Chandler et al., 2002). Der mRNA-Gehalt des *SLN1*-Transkripts sowie die Konzentration des SLN1-Proteins sind in dieser Linie geringer als im Wildtyp Himalaya.

Alle Experimente mit Gerstenmutanten wurden unabhängig und in dreifachen Wiederholungen in Weckgläsern auf 1/10 PNM-Medium durchgeführt. Ausschlaggebendes Kriterium für diese Anzuchtmethodik waren Faktoren wie gleichmäßigere Besiedlung, geringerer Verbrauch von Saatgut sowie die höhere Reproduzierbarkeit der Experimente. Pro Zeitpunkt (3 und 7 dai) wurden jeweils 10-20 Pflanzen mit *P. indica* inokuliert oder mock-behandelt. Die Ernte erfolgte randomisiert aus verschiedenen Gläsern.

3.3.1 Besiedlung der GA-Mutanten durch *P. indica*

Zunächst wurde die Besiedlung mit *P. indica* im Himalaya-Wildtyp überprüft. Die Quantifizierung der pilzlichen DNA aus besiedelten Wurzeln sowie die zytologische Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Besiedlung waren vergleichbar zu dem für die Microarrays verwendeten Kultivar Golden Promise.

Die Quantifizierung der pilzlichen DNA mittels real-time PCR in den verschiedenen Mutanten 3 und 7 Tage nach Inokulation mit *P. indica* sollte zeigen, ob die Entwicklung des Pilzes durch das Fehlen von Komponenten des GA-Signal- bzw. des Biosynthesewegs beeinflusst wird. 3 Tage nach Inokulation ließen sich keine Unterschiede in den Besiedlungsstärken zwischen Mutanten und Wildtyp Himalaya

erkennen (Abb. 3.10). 7 Tage nach Inokulation mit *P. indica* konnte man eine reduzierte Menge an pilzlicher DNA in einer Mutante (M117), die einen Defekt im Biosyntheseweg von GA hat (Tab. 3.1), und somit reduzierte endogene GA-Gehalte aufweist (Chandler und Robertson, 1999). Ebenso geringer besiedelt wurden die GA-Rezeptormutante M121 sowie die Linie M640, welche infolge eines Defekts im SLENDER-Protein GA-insensitiv ist (Chandler et al., 2002).

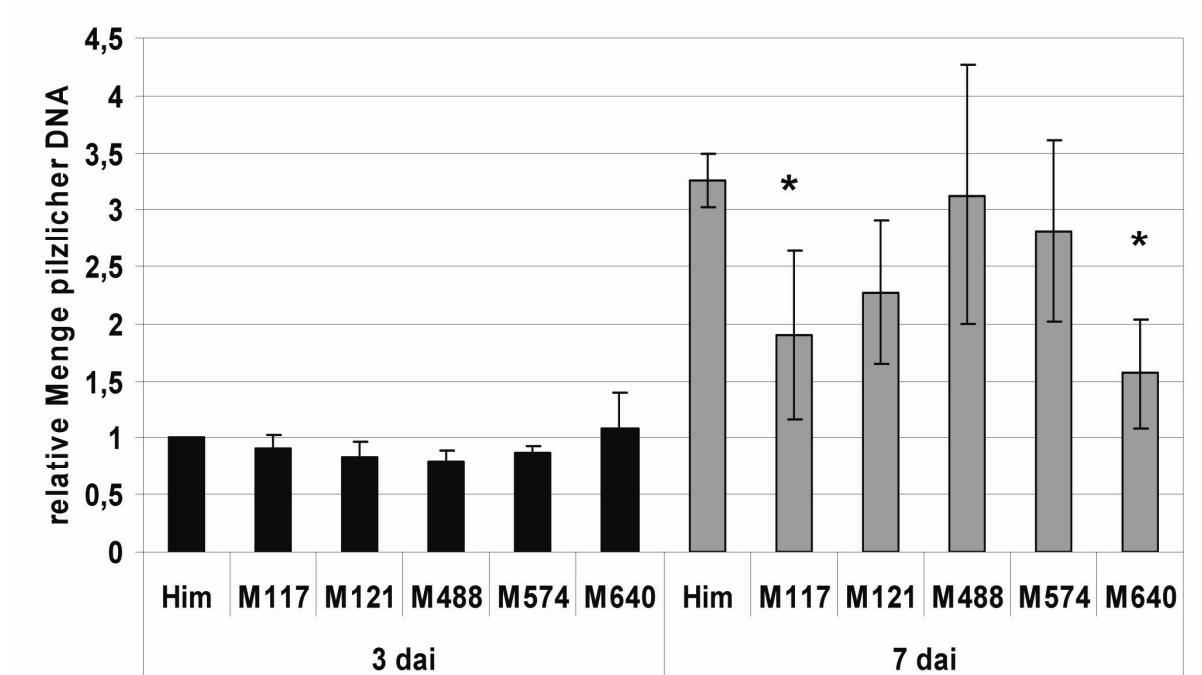


Abb. 3.10: Besiedlung verschiedener Gerstenlinien mit gestörter GA-Biosynthese oder -Signalweiterleitung. Bestimmung der relativen Menge an pilzlicher DNA mit quantitativer real-time PCR über das Verhältnis von PiTef zu pflanzlichem Ubiquitin. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten zu 3 (schwarz) und 7 Tage (grau) nach Inokulation (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken: Standardfehler).

Die Linie M121 wurde parallel mit dem Wildtyp Himalaya mit *P. indica* inokuliert und für 21 Tage in Seramis/Oildri angezogen, um die Proliferation des Pilzes genauer zu beobachten. Nach der Färbung der Wurzeln mit WGA-Propidiumiodid ließen sich die durch die Färbung grün fluoreszierenden Pilzhyphen sehr gut im Fluoreszenzmikroskop erkennen. Im Wildtyp Himalaya erkennt man sehr deutlich die inter- und intrazellulären Hyphen, aber auch sehr viele Chlamydosporen, die der Pilz in Rhizodermiszellen gebildet hat (Abb. 3.11, a-b). Im Gegensatz dazu können 21 dai auf Wurzeln der Mutante M121 nur die inter- und intrazellulären Hyphen, jedoch keine Chlamydosporen beobachtet werden (Abb. 3.11, c-d). Der Pilz scheint diese

GA-Rezeptormutante auch zu diesem späten Zeitpunkt 21 dai schlechter zu besiedeln als den Wildtyp Himalaya. Bei weiteren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von angefärbten Wurzeln zum früheren Zeitpunkt 3 dai wurden noch keine Unterschiede bemerkt. Dies war auch bei der Quantifizierung der pilzlichen DNA mit real-time PCR erkennbar, da Himalaya und M121 eine vergleichbare Besiedlung zu 3 dai zeigten (Abb. 3.10). Dies könnte aber darin begründet sein, dass man mit der Methode der Quantifizierung 3 dai vornehmlich extrazelluläre Besiedlung quantifiziert.

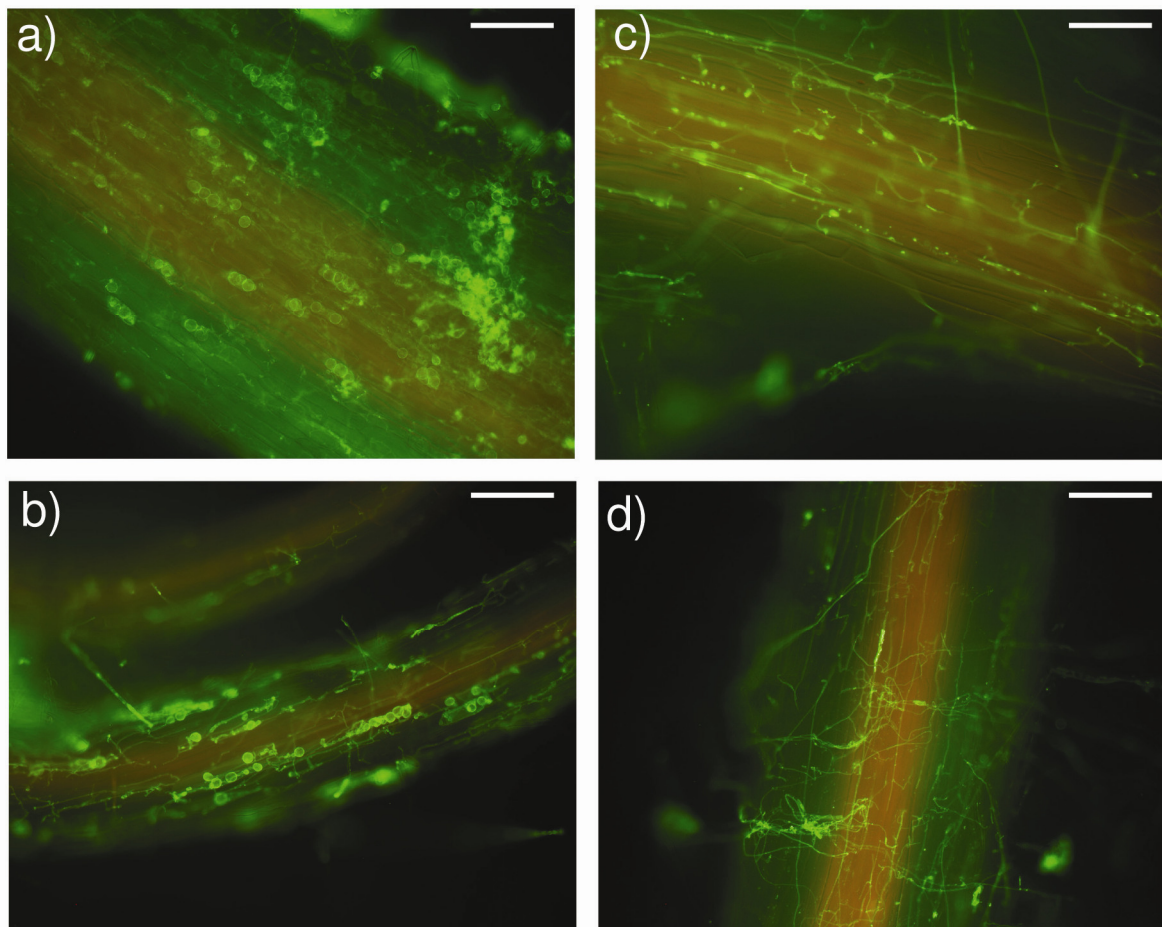


Abb. 3.11: Proliferation von *P. indica* 21 dai. *P. indica* inokulierte Wurzeln von Himalaya und M121 wurden in Seramis/Oildri angezogen und 21 Tage nach Inokulation geerntet, fixiert und mit WGA-Propidiumiodid angefärbt. In Wurzeln von Himalaya erkennt man deutlich die intra- und interzelluläre Chlamydosporenbildung (a-b), während in M121 nur Hyphen, aber keine Sporen zu sehen sind (c-d). Größenskalierung: a) 100 μm , b), c) und d) 150 μm .

3.3.2 Expression von Salizylsäure- und Jasmonsäure-responsiven Genen in *P. indica*-besiedelten GA-Mutanten

Um die Frage zu klären, ob die durch Salizylsäure (SA) und Jasmonsäuren (JA) regulierten, abwehrbezogenen Signalwege in den *P. indica*-besiedelten Gerstenlinien beeinflusst werden, wurde die Expression einiger SA-responsiver *PR Gene* (*PR1b*, *PR10* und *PR5*) sowie des JA-responsiven *23 kDa jasmonic acid induced protein* (*JIP23*) mit quantitativer real-time PCR untersucht. Abbildung 3.12 zeigt die jeweilige relative Expression der verschiedenen Gene 3 und 7 dai. In fast allen GA-Mutanten war die Expression der SA-abhängigen Gene *PR1b*, *PR10* und *PR5* 3 dai deutlich erhöht, während 7 dai fast keine Unterschiede im Vergleich zur Expression im Wildtyp erkennbar waren. Eine Ausnahme war die Linie M640, hier scheinen 7 dai die untersuchten *PR Gene* etwas reprimiert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.12, a-c). Die Expression des JA-abhängigen *JIP23* war dagegen 3 dai nur in der Linie M640 im Vergleich zu Himalaya etwas reduziert, in allen anderen Linien ließ sich zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied erkennen. Nach 7 dai war die *JIP23*-Expression tendenziell in M121, M488 und M640 leicht erhöht, in M117 jedoch reprimiert (Abb. 3.12, d).

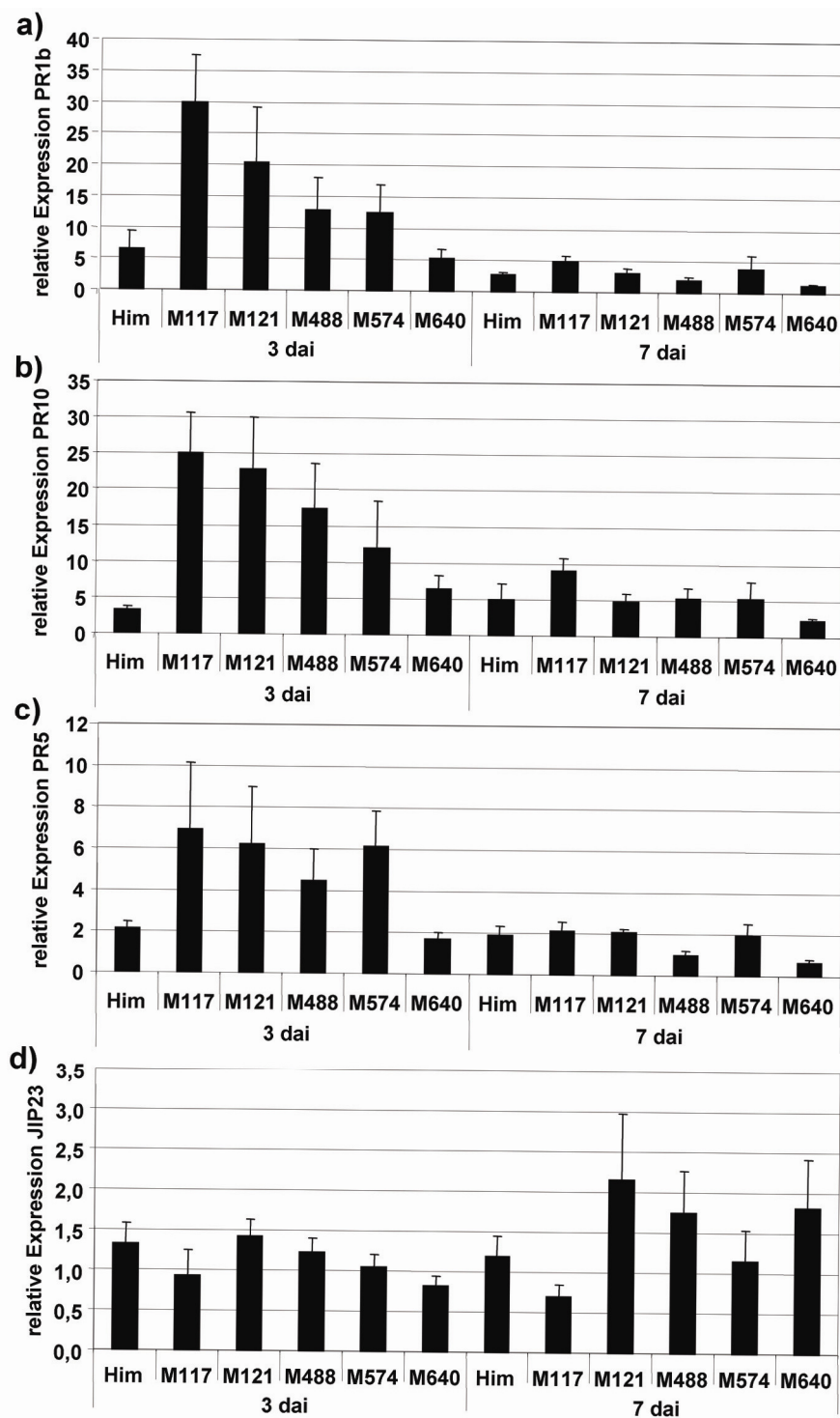


Abb. 3.12: Expression von SA- und JA-responsiven Genen in *P. indica*-besiedelten Wurzeln verschiedener Gerstenmutanten. Relative Expression von *PR1b* (a), *PR10* (b), *PR5* (c) und *JIP23* (d) in Wurzeln verschiedener Gerstenmutanten 3 und 7 Tage nach Inokulation mit *P. indica*. Das Expressionsniveau wurden durch quantitative real-time PCR bestimmt und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001). Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

3.3.3 Genexpressionsuntersuchungen von Komponenten des GA-Signalwegs während der Besiedlung mit *P. indica*

Aufgrund der real-time PCR-Ergebnisse, die für die GA-Signalmutanten M121 und M640 eine geringere Besiedlung durch *P. indica* sowie eine Induktion von *JIP23* 7 dai zeigten, wurden in einem weiteren Versuchsansatz die Expression von verschiedenen Genen des GA-Signalweges in *P. indica*-besiedelten Wurzeln von cv. Himalaya untersucht. Dazu wurde mittels real-time PCR die Expression der Transkripte von *Slender1* (*SLN1*), *GA-insensitive dwarf 1* (*GID1*), *SLEEPY1* (*SLY1*) sowie *GA-insensitive dwarf 2* (*GID2*) 3 und 7 Tage nach Inokulation mit *P. indica* bestimmt. Abbildung 3.13 zeigt die relative Expression der vier verschiedenen Gene. Es zeigte sich, dass alle vier Komponenten des GA-Signalweges in den besiedelten Wurzeln leicht, aber nicht signifikant reprimiert sind.

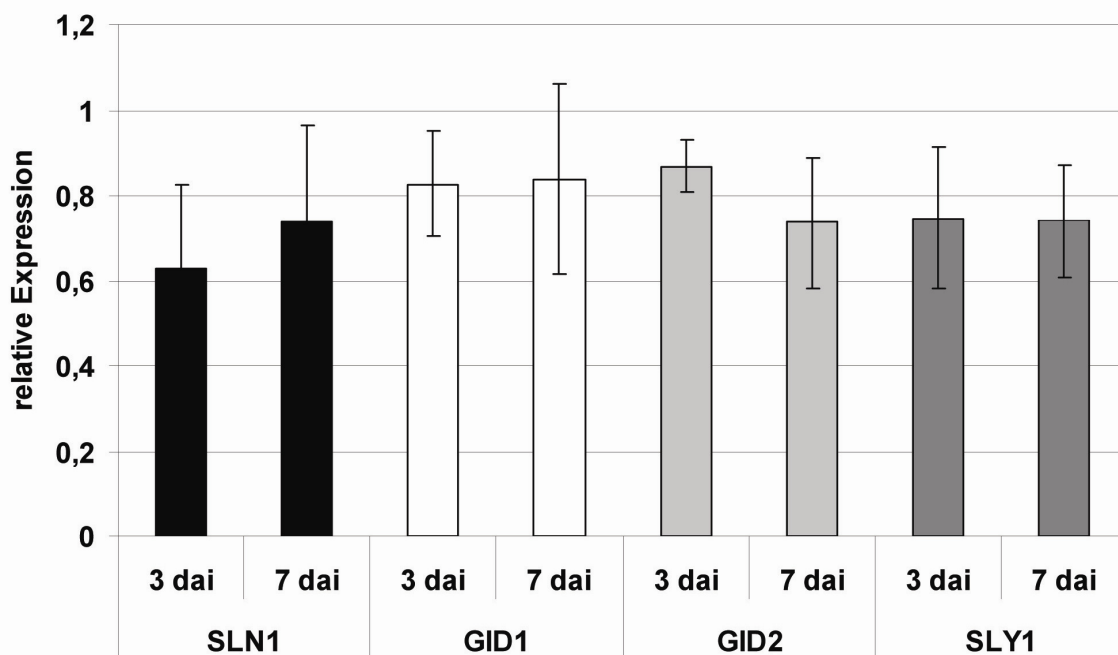


Abb. 3.13: Expression von Komponenten des GA-Signalweges in cv. Himalaya. Relative Expression von *Slender1* (*SLN1*), dem GA-Rezeptor *GID1* sowie den Transkripten für die putativen F-Box-Proteine *GID2* und *SLY1* in Wurzeln von Himalaya 3 und 7 Tage nach Inokulation mit *P. indica*. Die Expressionsniveaus wurden durch quantitative real-time PCR bestimmt und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001). Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

3.4 *P. indica*-Besiedlung und Genexpression in Himalaya nach GA₃-Zugabe

Da die Besiedlung der Gerstenmutanten auf eine Beteiligung von GA im Laufe der Wurzelbesiedlung mit *P. indica* hindeuten, sollte durch pharmakologische Experimente auch die Besiedlung und Genexpression nach GA₃-Applikation untersucht werden. Der Versuchsaufbau war ähnlich den Versuchen mit den Mutanten. Abbildung 3.14 zeigt die Besiedlung von cv. Himalaya mit *P. indica* in Abhängigkeit von der GA-Behandlung 3 und 7 dai.

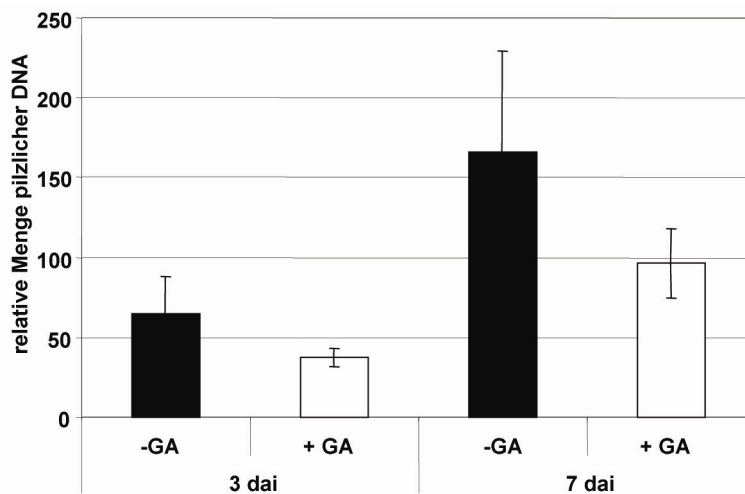


Abb. 3.14: Wurzelbesiedlung von cv. Himalaya durch *P. indica* nach GA₃-Behandlung 3 und 7 Tage nach Inokulation. Die relative Menge an pilzlicher DNA wurde mit quantitativer real-time PCR über das Verhältnis von PiTef zu pflanzlichem Ubiquitin bestimmt. Die Pflanzen wurden mit 2 mM GA₃ behandelt. Schwarze Balken zeigen die Besiedlung der unbehandelten, mit *P. indica* inokulierten Pflanzen (-GA). Weiße Balken zeigen die Besiedlung nach GA₃-Behandlung (+GA). (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken: Standardfehler).

Es war eine deutliche Reduktion der Menge an pilzlicher DNA nach GA₃-Behandlung zu beiden Zeitpunkten, 3 und 7 dai, zu erkennen. Somit beeinflusst die Applikation von GA₃ die Besiedlung von Himalaya Wurzeln mit *P. indica* negativ.

Auch in Himalaya wurde die Expression der an SA-abhängiger Abwehr beteiligten Gene *PR1b*, *PR10* und *PR5* sowie des JA-responsiven *JIP23* 3 und 7 Tage nach *P. indica*-Inokulation untersucht. Leider waren die Daten der drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente sehr inkonsistent, so dass die Daten aufgrund der starken Abweichungen nur bedingt aussagekräftig sind.

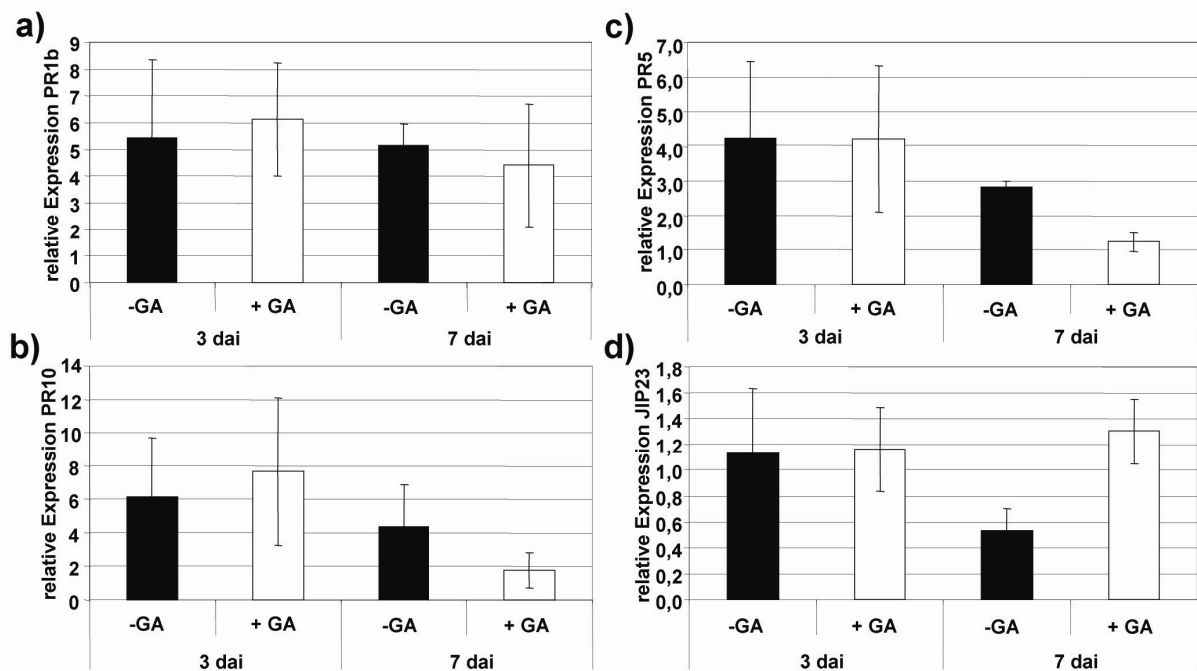


Abb. 3.15: Genexpression in Himalaya 3 und 7 Tage nach Inokulation mit *P. indica* in Abhängigkeit von einer GA₃-Behandlung. Relative Expressionswerte von *PR1b* (a), *PR10* (b), *PR5* (c) und *JIP23* (d) in *P. indica* besiedelten Himalayapflanzen. Schwarze Balken zeigen die Besiedlung der unbehandelten, mit *P. indica* inokulierten Pflanzen (-GA). Weiße Balken zeigen die Besiedlung nach GA₃-Behandlung (+GA). Die Expressionswerte wurden durch quantitative real-time PCR mit der 2^{-ΔΔCt}-Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001) und stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar (Fehlerbalken: Standardfehler).

So ist die *PR1b*-Expression 3 und 7 dai sowie nach der GA₃-Applikation relativ gleich bleibend, obwohl für dieses Gen während der Besiedlung mit *P. indica* eine rückläufige Induktion von 3 nach 7 Tagen erkennbar sein sollte (siehe Microarray-Daten, Kapitel 3.2.3, Abb. 3.7). Die Expression von *PR10* (Abb. 3.15, b) geht 7 dai in den *P. indica*-besiedelten Wurzeln etwas zurück. Auch im Fall von *PR5* ist die Expression 7 dai im Vergleich zu 3 dai leicht reduziert (Abb. 3.15, c). Bei der Untersuchung des JA-responsiven Gens *JIP23* ist 7 dai in *P. indica*-besiedelten Wurzeln ohne GA₃-Behandlung eine deutliche Repression zu erkennen (Abb. 3.15, d), die Applikation von GA₃ hat hier keinen Einfluss auf die Expression.

3.5 Detektion des SLENDER-Proteins während der Besiedlung mit *P. indica*

Aufgrund der zentralen Bedeutung des SLENDER-Proteins im GA-Signalweg sollte durch eine Western Blot-Analyse die Abundanz des Proteins während der Besiedlung von Gerstenwurzeln mit *P. indica* aufgeklärt werden. Dazu wurden Proteinextrakte aus *P. indica*-besiedelten und unbesiedelten Gerstenwurzeln, sowie als Positivkontrolle GA₃-behandelte Wurzeln zu 3 verschiedenen Zeitpunkten (1, 3 und 7 dai) geerntet, Proteine extrahiert und die auf eine Membran geblotteten Proteine mit einem SLN1-spezifischen Antikörper detektiert. Abbildung 3.16 zeigt die Detektion der Chemilumineszenz des sekundären Antikörpers.

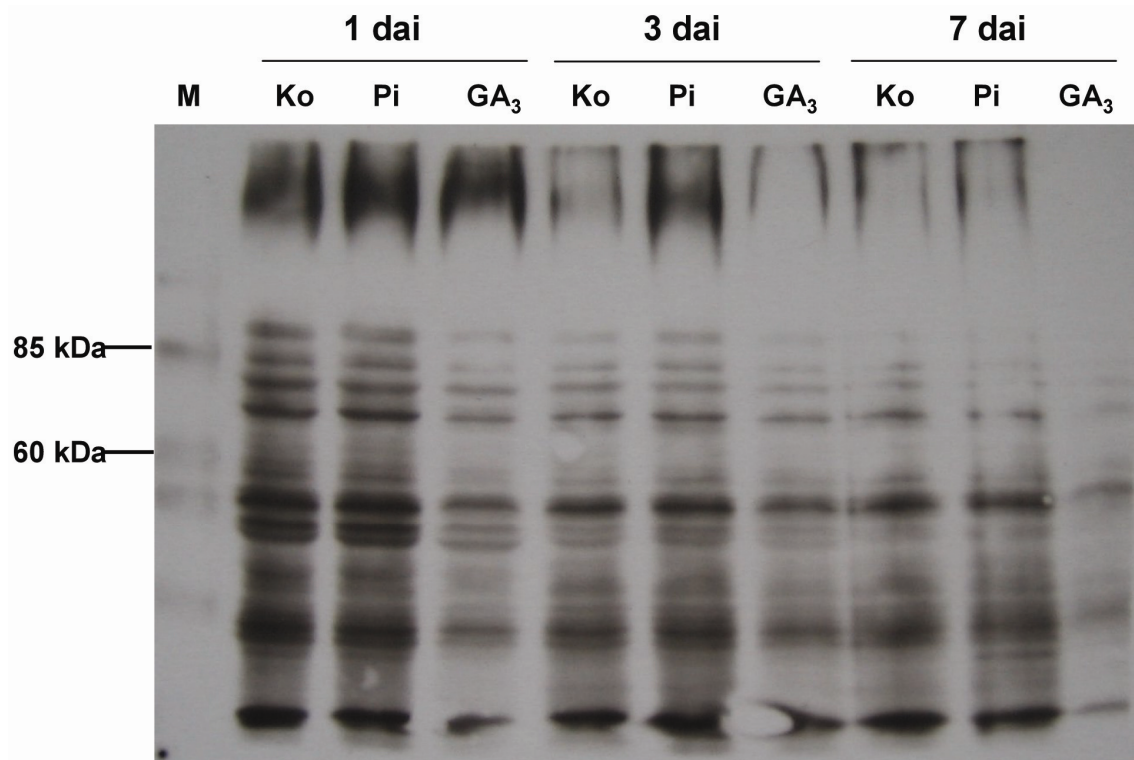


Abb. 3.16: Detektion von SLN1 in Gerstenwurzeln. Western Blot mit Proteinextrakten aus unbesiedelten, *P. indica*-besiedelten und GA₃-behandelten Gerstenwurzeln nach 1, 3 und 7 dai. M: Größenmarker, Ko: Proteinextrakt aus unbesiedelten Wurzeln, Pi: Proteinextrakt aus *P. indica*-besiedelten Wurzeln, GA₃: Proteinextrakt aus GA₃-behandelten Wurzeln (2 mM GA₃).

Obwohl der SLN1-Antikörper spezifisch sein sollte, sind leider sehr viele unspezifische Banden erkennbar, was wohl auf eine mangelnde Spezifität des SLN1-Antikörpers zurückzuführen ist. Die Größe von SLN1 liegt bei 65,2 kDa (Gubler et al., 2002). Das Protein sollte also im Bereich zwischen der 60 kDa und der 85 kDa

Bande des Größenmarkers laufen. Leider sind in diesem Bereich zahlreiche schwache Banden zu sehen, so dass eine klare Zuordnung zu SLN1 nicht möglich ist.

3.6 Quantifizierung des *oxidative burst* in *P. indica*-besiedelten Gerstenwurzeln

Die Transkriptionsanalyse der *P. indica* besiedelten Gerstenwurzeln zeigte eine hohe Zahl an Abwehr- und Stress-bezogenen Genen, die meist nach 3 dai stark, aber generell transient induziert waren, so dass die Expression dieser Gene 7 dai wieder auf einem niedrigeren Niveau lagen. Diese Suppression von Abwehrgenen deutet auf eine Manipulation der pflanzlichen Abwehrreaktionen hin. Normalerweise versuchen Pathogene durch die Sekretion von Effektoren die Abwehrreaktionen der basalen Abwehr, auch *MAMP-triggered immunity* (MTI) genannt, zu unterdrücken und dadurch die Besiedlung zu ermöglichen (Jones und Dangl, 2006). Dieses Phänomen wird auch als *effector-triggered susceptibility* bezeichnet. Zu den allerersten Abwehrreaktionen der Pflanze nach der Erkennung eines Pathogens durch die *pathogen-recognition patterns* (PRR) im Rahmen der MTI gehört die unmittelbare Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was auch als *oxidative burst* bezeichnet wird (Boller und Felix, 2009). Um die Frage zu klären, ob *P. indica* auf der Ebene der *MAMP-triggered immunity* die pflanzliche Abwehr beeinflusst, und ob dabei ein Zusammenhang zwischen unterdrückten Abwehrreaktionen und dem GA-Signalweg besteht, wurde ein auf Chemilumineszenz basierender Assay zur Quantifizierung des während des *oxidative burst* produzierten H₂O₂ durchgeführt. Dazu wurde die Chemilumineszenz unbesiedelter und *P. indica* besiedelter Wurzelstückchen von Himalaya sowie der SLENDER-Mutante M640 in einem luminol- und peroxidasehaltigen Substrat nach Zugabe von Chitin als Elizitor in einem Luminometer gemessen. In Abbildung 3.17 ist die Reaktion der Himalayawurzeln nach Zugabe von Chitin dargestellt. Die Reaktion der unbesiedelten Kontrollwurzeln nach Elizitorzugabe stieg deutlich erkennbar innerhalb von 15 Minuten auf ein Maximum von ca. 650 RLU/min an, und wurde danach wieder schwächer. Diese Reaktion wurde in *P. indica*-besiedelten Wurzeln des Wildtyps im Vergleich völlig unterdrückt.

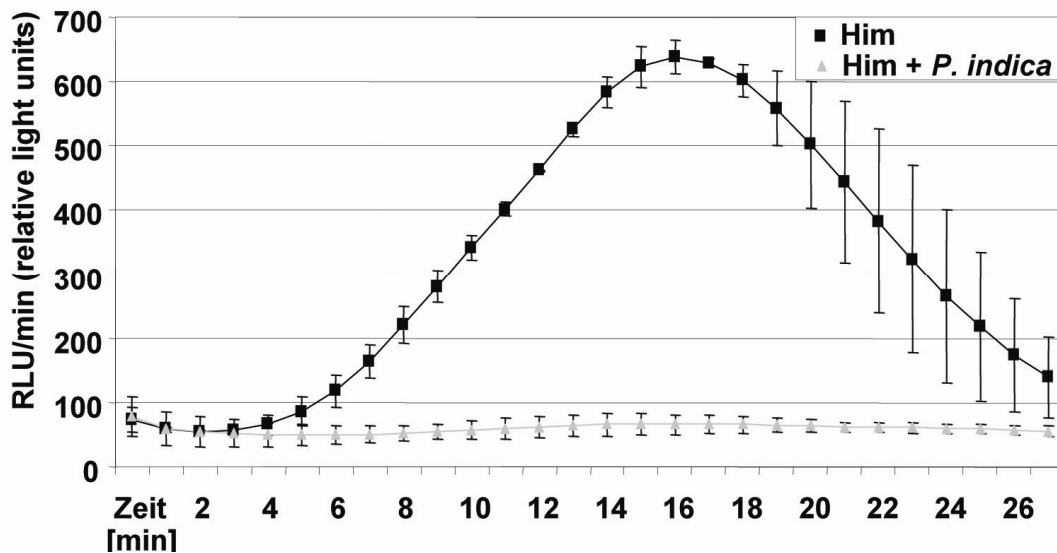


Abb. 3.17: Quantifizierung des *oxidative burst* in Himalaya nach Zugabe von Chitin als Elizitor. Messung der H_2O_2 -Produktion in *P. indica*-besiedelten und unbesiedelten Wurzelstückchen von Himalaya im Luminol-Assay nach Zugabe von $7,5 \mu g$ Chitin in den Reaktionsansatz. Die Chemilumineszenz wurde nach Elizitorzugabe für 27 Minuten gemessen. Aus drei Einzelmessungen wurden Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet. Ähnliche Werte ergaben sich in drei weiteren unabhängigen Messungen.

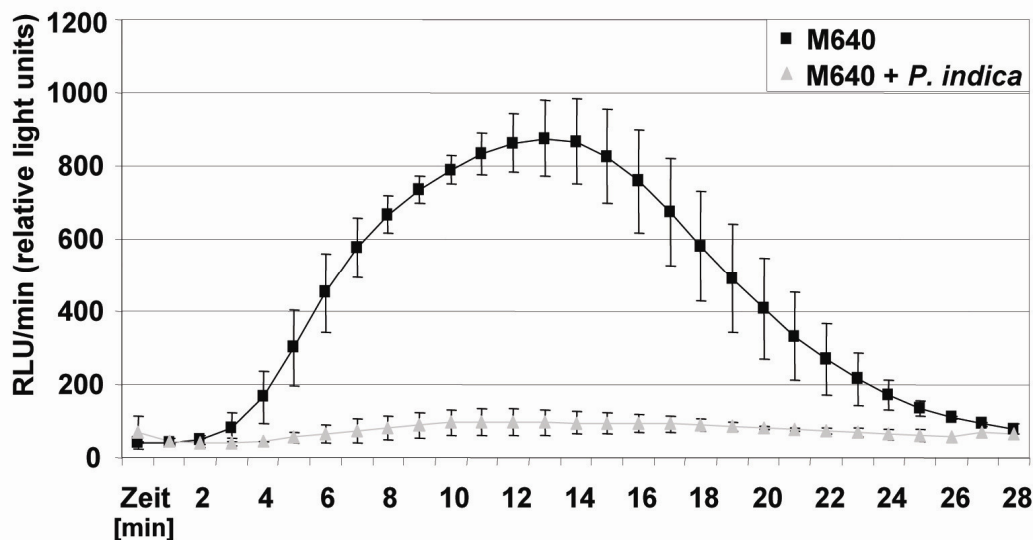


Abb. 3.18: Quantifizierung des *oxidative burst* in M640 nach Zugabe von Chitin als Elizitor. Messung der H_2O_2 -Produktion in *P. indica*-besiedelten und unbesiedelten Wurzelstückchen der Linie M640 im Luminol-Assay nach Zugabe von $7,5 \mu g$ Chitin in den Reaktionsansatz. Die Chemilumineszenz wurde nach Elizitorzugabe in Duplikaten für 28 Minuten gemessen, Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet. Ähnliche Werte ergaben sich in zwei weiteren unabhängigen Experimenten.

Die Messung der H_2O_2 -Produktion nach Chitin-Zugabe in der Mutante M640, die in der GA-Signalweitergabe gestört ist (Chandler et al., 2002), zeigte keinerlei Unterschiede zur H_2O_2 -Produktion im Wildtyp (Abb. 3.18).

Zur Kontrolle, ob dieses Phänomen der unterdrückten H_2O_2 -Produktion nicht generell pathogenspezifisch ist, wurde die gleiche Messung mit *Rhizoctonia solani*-besiedelten Wurzeln von Golden Promise durchgeführt. Der Elizitor Chitin führte hier in *Rhizoctonia*-befallenen Wurzeln ebenso zu einer starken H_2O_2 -Produktion wie in den unbesiedelten Wurzeln von Golden Promise (Abb. 3.19).

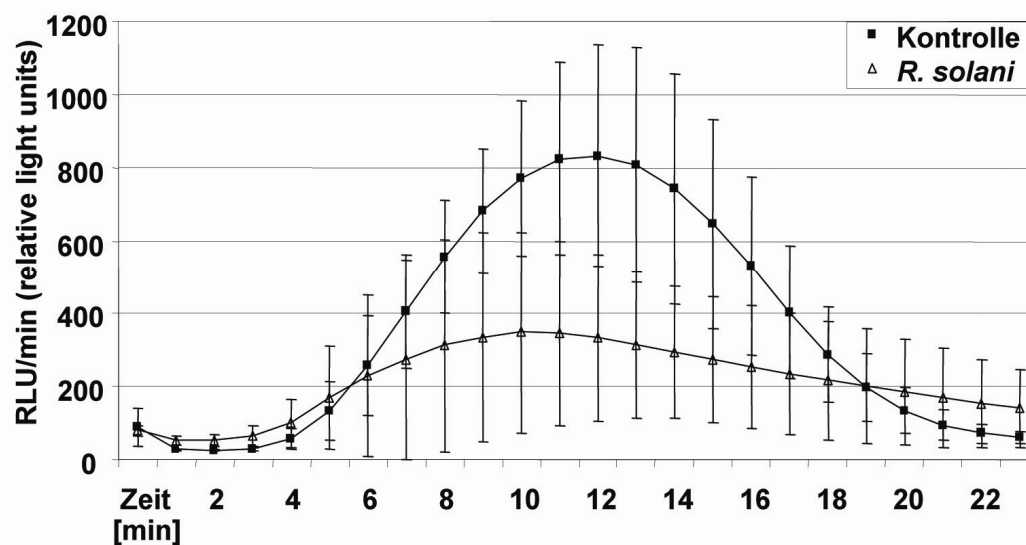


Abb. 3.19: Quantifizierung des oxidative burst in *Rhizoctonia solani*-besiedelten Golden Promise-Wurzeln nach Zugabe von Chitin als Elizitor. Messung der H_2O_2 -Produktion in *R. solani*-besiedelten und unbesiedelten Wurzelstückchen des Wildtyps Golden Promise im Luminol-Assay nach Zugabe von $7,5 \mu\text{g}$ Chitin in den Reaktionsansatz. Die Chemilumineszenz wurde nach Elizitorzugabe in Duplikaten für 24 Minuten gemessen, Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet. Ähnliche Werte ergaben sich in einem weiteren unabhängigen Experiment.

4. Diskussion

Der Basidiomycet *Piriformospora indica* ist ein Wurzelendophyt, dessen Besiedlung verschiedene positive Auswirkungen auf seine Wirtspflanzen hat. So kommt es zu einer Wachstumssteigerung in Wurzel und Spross sowie zu einer lokalen und systemischen Resistenzinduktion gegen verschiedene Pathogene (Baltruschat et al., 2008; Deshmukh und Kogel, 2007). Die vorliegende Arbeit stellt eine detaillierte molekulare Analyse der mutualistischen Interaktion von *P. indica* mit Gerstenwurzeln dar. Es wurde eine auf Microarrays basierende Transkriptionsanalyse durchgeführt, um die Auswirkungen der Interaktion auf das besiedelte Pflanzengewebe umfassend darzustellen. Im Anschluss daran folgte eine auf den Ergebnissen der Transkriptionsanalyse basierende funktionelle Charakterisierung der Interaktion. Hierbei wurde insbesondere die Rolle von Gibberellinsäure auf die Wurzelbesiedlung durch *P. indica* untersucht.

4.1 Transkriptionsanalyse von *P. indica*-besiedelten Gerstenwurzeln

4.1.1 Analyse der Transkriptomdaten des Affymetrix Barley1 GeneChip

Als Voraussetzung für die Transkriptionsanalysen wurde zunächst eine genaue Beschreibung der Besiedlung von Gerstenwurzeln durch *P. indica* durchgeführt, um die entscheidenden Zeitpunkte während der Interaktion zu definieren. Die dazu erstellten zytologischen Daten ergaben ein detailliertes Bild vom zeitlichen Verlauf der Wurzelbesiedlung mit *P. indica*: Die Chlamydosporen keimten auf der Wurzeloberfläche bereits 12 Stunden nach Inokulation aus und bildeten zunächst außerhalb der Rhizodermiszellen verzweigte Hyphen. 36 bis 72 Stunden nach Inokulation begann die Penetration ins Wirtsgewebe, jedoch wurden dabei keine speziellen Penetrationsstrukturen vom Pilz ausgebildet. Im weiteren Verlauf entstand ein Netzwerk aus Hyphen auf der Wurzeloberfläche wobei es innerhalb von Differenzierungs- und Wurzelhaarzone zur Besiedlung von Pflanzenzellen kam. Anhand dieser Beobachtungen wurden drei Zeitpunkte zur Ernte des Wurzelmaterials für die Microarray-Hybridisierung gewählt: Vor der Penetration der Wirtszellen (1 dai; „days after inoculation“), während der Penetrationsphase und frühen Besiedlungsphase (3 dai) sowie ein späterer Zeitpunkt im Laufe der Etablierung des Pilzes in der Wurzel (7 dai). Für die Analysen wurde zunächst der

Affymetrix Barley1 GeneChip verwendet, der zum ersten Mal 2004 beschrieben wurde (Close et al., 2004). Der Microarray wurde mit RNA aus der gesamten Gerstenwurzel hybridisiert. Dieser Versuchsansatz ergab eine geringe Anzahl von 195 differentiell regulierten Genen über alle drei untersuchten Zeitpunkte. Deutlich wird dies in der Betrachtung der so genannten *Scatterplots* (Abb. 3.2), in denen jeweils zwei verschiedene Proben gegeneinander aufgetragen und die Signalintensitäten nach der Normalisierung verglichen wurden. Die Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen und infizierten Pflanzen waren 3 dai geringer als die Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen aus zwei verschiedenen Erntezeitpunkten. Dies zeigt, dass die entwicklungsbedingten Unterschiede von 1 zu 3 dai größere Änderungen im Transkriptom hervorriefen, als die Besiedlung mit *P. indica*. Ein Beispiel, in welchem Ausmaß mutualistische Pilze Änderungen im Transkriptom bewirken können, zeigt eine Transkriptomanalyse von mit dem Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* besiedelten *M. truncatula*-Wurzeln 30 Tagen nach Inokulation (Liu et al., 2007). In mit *G. intraradices* besiedelten Wurzeln wurden 647 differentiell regulierte Gene beschrieben (Liu et al., 2007). Aufgrund der relativ geringen Zahl differentiell regulierter Gene aus *P. indica* besiedelten Wurzeln wurde davon abgesehen, Material aus zwei weiteren unabhängigen Experimenten zu hybridisieren. Daher war eine statistische Auswertung der Microarray-Daten nicht möglich. Dennoch liefern die Daten erste Hinweise auf die generelle Induktion von Abwehrbezogenen Genen. So sind die Transkripte für verschiedene *pathogenesis-related protein 10 (PR10)* Isoformen 3 dai sehr stark induziert, was später durch die Agilent-Daten bestätigt wurde. Ebenso verhält es sich mit einigen *germin-like proteins*; auch diese Transkripte sind in Affymetrix- und Agilent-Daten 3 und 7 dai induziert. Auch in JA-Biosynthese und -Signalwegen involvierte Gene (zwei *Lipoxygenasen* und *JIP23*) wurden differentiell reguliert, was wiederum durch die Agilent-Daten bestätigt werden konnte. Die Ursache für die geringe Anzahl an differentiell regulierten Genen liegt in dem Besiedlungsverhalten des Pilzes. Der Pilz kolonisiert vorwiegend die Wurzelhaarzone und die Differenzierungszone, während die meristematische Zone und die Wurzelspitze fast frei von pilzlichen Hyphen sind. Dies ist zum frühen Zeitpunkt 1 dai noch weniger stark ausgeprägt, da die Wurzeln zum Zeitpunkt der Inokulation komplett in Sporensuspension inkubiert wurden. Nach einem Tag Wachstum im Substrat ist der Anteil der neu gebildeten Wurzeln recht gering, somit ist ein Großteil der Wurzeloberfläche mit Chlamydosporen aus dem Inokulum

bedeckt. Die Wurzeln wachsen jedoch ab diesem Zeitpunkt relativ schnell, wodurch der Anteil an nicht besiedelten, im Vergleich zu besiedelten Wurzelabschnitten ansteigt. Demzufolge ist zwar 1 dai die komplette Wurzeloberfläche mit auskeimenden Sporen bedeckt, 3 Tage nach Inokulation ist dagegen nur die obere Hälfte bis ein Drittel der Wurzel kolonisiert, 7 Tage nach Inokulation sind es nur noch 20%. Da für die Affymetrix-Microarrays das gesamte Wurzelmaterial verwendet wurde, bestanden 50% bis 80% des Materials aus unbesiedelten Wurzelabschnitten. So kam es zu einer massiven Verdünnung der Transkripte besiedelter Abschnitte mit nicht-kolonisierten Wurzelteilen. Verstärkt wurde dieser Verdünnungseffekt durch die Tatsache, dass Wurzelspitzen und meristematische Zone bedeutend mehr RNA enthalten als die Wurzelhaar- und Differenzierungszone, was in den unterschiedlichen RNA-Ausbeuten von komplettem Wurzelmaterial, verglichen mit den Ausbeuten aus Wurzelhaar- und Differenzierungszone, ersichtlich wurde.

4.1.2 Analyse der Transkriptomdaten der Agilent-Microarrays

Aufgrund der oben beschriebenen Erfahrungen wurden in einem neuen Versuchsansatz ausschließlich besiedelte Wurzelbereiche als Probenmaterial verwendet. Die Analyse der Hybridisierung des nun verwendeten, neuen Agilent-Microarrays erbrachte insgesamt 1107 putative Kandidaten, die mindestens zu einem Zeitpunkt mehr als 2-fach reguliert waren. Dabei besteht die größte Überlappung an Genen zwischen 3 und 7 dai im Vergleich zu 10% Übereinstimmung zu 1 dai. Dieses Verhältnis lässt sich zum Teil auf die Tatsache zurückführen, dass 1 dai zunächst die Sporenkeimung stattfindet, jedoch noch keine Penetrationsereignisse zu beobachten sind. Da die Penetration der Rhizodermiszellen ca. 36 Stunden nach Inokulation beginnt, und durch weitere Ausbreitung des Pilzes in der Wurzel nicht nur 3 dai sondern auch noch 7 dai anhält, findet man auch ähnliche Transkriptomänderungen zu beiden Zeitpunkten. Diejenigen Transkripte, die schon 1 Tag nach Inokulation eine Induktion zeigen, sind vermutlich an der Erkennung der auskeimenden Chlamydosporen auf der Wurzeloberfläche sowie darauf folgenden Reaktionen der Pflanze beteiligt. Somit können die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten 3 und 7 dai bzw. 1 dai teilweise auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass der Pilz mit der Penetration der Rhizodermiszellen begonnen hat. Zusätzlich scheinen die Veränderungen auf

transkriptioneller Ebene die Unterschiede zwischen extra- und inter-/intrazellulärer Besiedlung widerzuspiegeln.

4.1.3 Manipulation der pflanzlichen Abwehrreaktionen durch *P. indica*

Die Zahl der Abwehr/Stress-bezogenen Gene ist zwar die größte Gruppe unter allen regulierten Genen (Abb. 3.5), jedoch sind die Expressionslevel in den meisten Fällen nur mäßig hoch (Abb. 3.6). Bei nur einem Drittel aller Abwehr/Stress-bezogenen Gene findet man eine mehr als 4-fache Induktion. Zudem sind etwa zwei Drittel der Gene dieser Gruppe entweder supprimiert oder transient induziert, d.h. die Expressionslevel nehmen nach einem erhöhten Induktionsniveau wieder ab. Dies gilt insbesondere für Gene, die für R-Proteine, antimikrobielle Proteine, PR-Proteine, Germine und für Elizitor-induzierbare Proteine mit vermutlich abwehrbezogener Funktion kodieren. Außerdem findet man *Laccasen*, *Glutathion-S-Transferasen*, *blue copper binding proteins* sowie *late embryogenesis abundant proteins/ dehydrins* differentiell reguliert, was auf eine von *P. indica* induzierte, aber recht unspezifische Abwehrreaktion hindeutet. Die Anzahl der regulierten Gene ist zwar 3 und 7 dai am höchsten, jedoch mit meist mäßig hohen Expressionslevel. Dies und das breite Spektrum an Abwehr-bezogenen Genen deuten auf eine Erkennung des Pilzes über MAMP-triggered immunity (MTI) hin, die als eher unspezifisch und mit mäßig starken Abwehrreaktionen beschrieben wird (Jones und Dangl, 2006; Zipfel et al., 2004; Wan et al., 2008). Auch wurden zwei *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1 (BAK1)* durch *P. indica* 3 und 7 dai stark induziert. Diese Rezeptorkinasen spielen nicht nur in Brassinosteroid-Signalwegen durch die Regulation über den Phytohormonrezeptor BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) während der pflanzlichen Entwicklung eine Rolle (Li et al., 2002) sondern auch bei der Initiierung der *Innate Immunity* über PRRs durch positive Wirkung auf PAMP-Rezeptoren (Chinchilla et al., 2007). So könnten die beiden durch *P. indica* induzierten *BAK1* außer der Hormonwirkung ebenfalls MAMP-Rezeptoren beeinflussen und so die MTI unterstützen.

Auch die relativ hohe Zahl an Rezeptoren und Komponenten von Signalwegen, die zu diesem frühen Zeitpunkt durch *P. indica* induziert werden, zeigen, dass hier die Erkennung des Pilzes über Rezeptoren zu einer über konservierte Signalwege vermittelten Reaktion der Pflanze führt. Die als reguliert gefundenen *elicitor responsive proteins* und verschiedene R-Gene sind zwar meist nicht speziell mit Resistenz gegen pathogene Pilze verbunden, aber zum Teil wichtig für die Abwehr

von bakteriellen Pathogenen, wie z.B. die Proteinkinase Xa21 in Reis Resistenz gegen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* hervorruft (Wang et al., 2006).

Durch die Penetration von Rhizodermiszellen und die weitere Besiedlung durch *P. indica* sind auch Signalerkennungs-Komponenten und verschiedene Rezeptoren der Pflanze reguliert. Die Erkennung des Pilzes und die nachfolgende Penetration führen zu einer Kaskade von Reaktionen, bei denen diese Signalerkennungs-Komponenten eine wichtige Rolle spielen. Die Induktion verschiedener Rezeptorkinasen 1 dai (Tabelle 7.5, Anhang) sowie zweier *LysM receptor-like kinases* 3 und 7 dai lassen weiter vermuten, dass zu Beginn der Interaktion von Gerstenwurzeln mit *P. indica* pilzliche Elizitoren, (z.B. Chitin) über PRRs erkannt werden (Zipfel, 2008). Die LysM-Domänen solcher Rezeptorkinasen wurden am Beispiel der CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1) aus Arabidopsis als Chitin-bindend und essentiell für die Erkennung pilzlicher MAMPs identifiziert (Miya et al., 2007; Wan et al., 2008). LysM-Domänen wurden auch in tierischen Systemen als Chitin- und Peptidoglycan-bindend beschrieben (Zhang et al., 2007). Die Expression dieser *LRKs* wurde am häufigsten in Wurzeln beobachtet (Zhang et al., 2007). In *Medicago truncatula* wurden zwei *LysM receptor-like kinases* LYK3 und LYK4 als Rezeptoren für die bakteriellen Nod-Faktoren identifiziert, die strukturell ähnlich zu Peptidoglycan sind (Limpens et al., 2003). Außerdem sind die Transkripte der *LRKs* in Wurzelzellen von *M. truncatula* mit Arbuskeln erhöht (Gomez et al., 2009). Diese Rezeptoren sind wichtig für die Erkennung von bakteriellen Symbionten und lösen physiologische und zelluläre Reaktionen aus, die zur Suszeptibilität und zur Etablierung der Bakterien in der Wurzel beitragen (Radutoiu et al., 2003; Radutoiu et al., 2007). Außerdem wurden die *LRKs* in Zusammenhang mit Signalgebung bzw. der Erkennung des Symbionten während der Ausbildung von Wurzelknöllchen gebracht (Madsen et al., 2003). So könnten die beiden während der *P. indica*-Gerste-Interaktion induzierten *LRKs* durch ähnliche Funktionen zur Ausbildung der kompatiblen Interaktion beisteuern.

Durch die Aufteilung der Abwehr-bezogenen Gene in vier Cluster konnten verschiedene Expressionsmuster dargestellt werden. So sind z.B. alle Gene in Cluster A supprimiert, während viele der in Cluster B und C eingruppierten Abwehr-bezogenen Gene transient induziert sind. Die meisten dieser Gene sind z.B. 3 dai induziert, aber entweder sind die Expressionslevel 7 dai stark reduziert oder nicht-signifikant geringer als 2-fach erhöht (Abb. 3.6, Cluster B, C). Diese

Expressionsmuster lassen auf eine aktive Manipulation der pflanzlichen Abwehr durch den Pilz schließen.

Oft befanden sich in der Gruppe der Abwehr-bezogenen Genen 3 und 7 die so genannte *germin-like proteins*, meist mit einem hohen Expressionslevel. Die Mitglieder dieser Genfamilie, die in Gerste in verschiedenen Geweben nachgewiesen wurden, sind aufgrund ihrer Genexpressionsmuster an der Pathogenabwehr, insbesondere der Abwehr des Echten Gerstenmehltaus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, beteiligt (Zimmermann et al., 2006). Die Proteine besitzen ein N-terminales Sekretionssignal, das auf eine zellwandgebundene Rolle schließen lässt. Diese Vermutung wird unterstützt von der Oxalatoxidase- bzw. Superoxiddismutase-Aktivität einiger Germinine. Die SOD führt zur H₂O₂-Bildung, welches nicht nur als Signalmolekül für Abwehrreaktionen wie Zelltod fungiert, sondern auch ein Kofaktor für Zellwandauflagerungen ist (Yamahara et al., 1999; Christensen et al., 2004). Vermutlich haben diese Proteine auch im Fall der *P. indica*-Gerste-Interaktion eine ähnliche, die Besiedlung beschränkende Funktion.

Nicht alle differentiell regulierten Gene beeinflussen die pflanzliche Abwehr im positiven Sinn. Zum Beispiel hat das Gen *Mlo* aus Gerste eine negative Auswirkung auf die basale Abwehr der Pflanze (Büschges et al., 1997). Die Infektion mit *P. indica* bewirkt beispielsweise eine Induktion von *Mlo3*, wodurch dem Pilz die Besiedlung erleichtert werden könnte. Interessanterweise wurde auch in mykorrhizierten Wurzeln von *Lotus japonicus* ebenfalls eine Induktion von *Mlo* beobachtet (Guether et al., 2009).

Die Daten der Transkriptomanalyse zeigen einen starken Anstieg in der Zahl der Abwehr- und Stress-bezogenen Gene 1 die. Folglich wird die pflanzliche Abwehr zu Beginn der Wurzelbesiedlung durch *P. indica* induziert. Die Expressionslevel zeigen allerdings eine eher mäßige und oft transiente Induktion der Abwehrgene. Diese transienten Expressionsprofile deuten andererseits darauf hin, dass der Pilz in der Lage ist, die Abwehr der Pflanze zu einem gewissen Grad zu seinem eigenem Vorteil abzuschwächen. Dass die Abwehrreaktionen nicht vollständig, sondern nur zum Teil durch den Pilz supprimiert werden, lässt darauf schließen, dass die Pflanze während der Interaktion immer noch in der Lage ist, die Ausbreitung der Besiedlung zu kontrollieren.

4.1.4 Auswirkungen der *P. indica*-Besiedlung auf Signalgebung und Biosynthese der Phytohormone

Die Aktivierung der pflanzlichen Abwehr wird durch komplexe Signalwege reguliert, in denen Phytohormone wie Salizylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen zentrale Funktionen haben (Pieterse et al., 2009). Auch durch die Besiedlung der Gerstenwurzeln mit *P. indica* wurden verschiedene Gene der Phytohormonbiosynthese oder hormonell regulierten Signalwegen beeinflusst. Ein Beispiel ist die Abscisinsäure (ABA), die an vielen abiotischen und biotischen Stressreaktionen beteiligt ist (Finkelstein und Rock, 2002) und oft antagonistisch zu anderen Hormonen wirkt (Asselbergh et al., 2008). Nicht nur die verschiedenen ABA-induzierten Gene, die durch *P. indica* in der Wurzel als hochreguliert gefunden wurden, sondern auch die ebenfalls induzierten *LEA proteins*, die durch ABA reguliert werden (Hundertmark und Hinch, 2008), zeigen eine mögliche Akkumulation dieses Hormons während der Interaktion an.

ABA ist ebenfalls an der Regulation des Wasserhaushalts der Pflanze beteiligt, eine Tatsache, die wohl dafür verantwortlich ist, dass Pflanzen mit Mykorrhizapilzen resistenter gegen Trockenstress sind. Die unterschiedliche Genexpression von Stress-abhängigen Genen bei Trockenstress von mykorrhizierten Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen konnte auf verschiedene ABA-Gehalte in der Wurzel zurückgeführt werden (Ruiz-Lozano et al., 2006). In einer anderen Studie hatte die exogene Zugabe von ABA zu mykorrhizierten Pflanzen Auswirkungen auf die Genexpression Stress-abhängiger Gene, wie z. B. LEA-Proteine (Aroca et al., 2008a; Aroca et al., 2008b). Daraus wurde gefolgert, dass Pflanzen mit AM ihre ABA-Level bei Trockenstress schneller und effektiver regulieren können als vergleichbare Kontrollpflanzen und dadurch eine bessere Balance zwischen Verdunstung über die Blätter und Wassertransport in Wurzeln herstellen können. Auch die Besiedlung mit *P. indica* führt in *Arabidopsis* zu erhöhter Toleranz gegen Trockenstress (Sherameti et al., 2008). So ist die Induktion der ABA-responsiven Gene sowie der *LEAs* aber auch verschiedener Dehydrine in Gerstenwurzeln ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von ABA an der Trockenstresstoleranz. Nebenbei kann ABA auch Sekundärmetabolite beeinflussen, so wird die Synthese von Phenylpropanoiden durch die Reduzierung der Aktivität der Phenylalaninammoniumlyase (PAL) durch ABA unterdrückt (Ward et al., 1989; Mohr und Cahill, 2007). PAL ist ein wichtiges Enzym in den frühen Schritten der Phenylpropanoidbiosynthese, durch das

verschiedene Sekundärmetabolite wie Phytoalexine aber auch Salizylsäure gebildet werden. Durch die ABA-vermittelte Suppression der PAL-Aktivität werden in Arabidopsis die Lignin- und SA-Biosynthese unterdrückt, wodurch auch die SA-abhängigen Abwehrreaktionen und die Induktion von Abwehrgenen reduziert werden und die Pflanze dadurch susceptibler gegen *P. syringae* wird (Mohr und Cahill, 2007). Auch während der Besiedlung mit *P. indica* könnte ABA zu einer Suppression der Abwehr führen und dem Pilz die Penetration der Rhizodermiszellen so erleichtern. Bei Interaktionen mit Mykorrhizapilzen wurde im Gegensatz dazu häufig eine Induktion der Transkripte für PAL beobachtet (Harrison und Dixon, 1994; Deguchi et al., 2007). Im Transkriptom *P. indica* besiedelter Wurzeln ist ebenfalls eine *PAL 1* dai sowie drei weitere 3 dai transient induziert, während ein andere *PAL 3* dai supprimiert ist. Somit kann man an den Expressionslevel der als PAL annotierten Gene keine negative Wirkung von ABA auf PAL ablesen, diese Regulation findet, wenn überhaupt eher auf Proteinebene statt.

Da viele Mikroorganismen fähig sind, während der Interaktion mit Pflanzen Auxin zu produzieren, war lange Zeit unklar, ob dieses Hormon an der pflanzlichen Abwehr beteiligt ist (Yamada, 1993; Spaepen et al., 2007). Dies konnte mittlerweile in verschiedenen Pflanze-Pathogen-Systemen gezeigt werden (Überblick: Kazan und Manners, 2009). Mit Hilfe der Transkriptomanalyse *P. indica*-infizierten Gerstenwurzeln wurden ebenfalls Transkripte, welche für Enzyme des Auxinbiosyntheseweges kodieren, als induziert gefunden. Darunter fanden sich zwei *Tryptophan-Decarboxylasen*, eine *Indol-3-Glycerolphosphatsynthase* und eine *Anthranilat-Phosphoribosyltransferase*, die zu den späten Zeitpunkten (3 und 7 dai) induziert waren. Diese zum Teil stark hochregulierten Transkripte, aber ebenso ein 3 dai induziertes *auxin-induced protein* deuten auf eine Aktivierung der Auxinbiosynthese sowie des Auxin-Signalgebung durch *P. indica* hin. In neueren Untersuchungen wurde eine Zunahme der Anzahl der Seitenwurzeln in *P. indica*-besiedelten Gerstenpflanzen gezeigt (S. Jacobs, Masterarbeit, 2009), was für eine verstärkte Auxin-Produktion entweder auf pflanzlicher oder auf pilzlicher Seite spricht, da das Phytohormon die Entwicklung von Seitenwurzeln unterstützt (Casimiro et al., 2001). Da der Pilz auch die Fähigkeit hat, Auxin zu produzieren, könnte das Hormon zumindest einer der Faktoren sein, die für die Wachstumsinduktion durch den Pilz verantwortlich sind (Sirrenberg et al., 2007). Somit beeinflusst *P. indica* die Auxinbiosynthese bzw. auch den Signalweg, um die Wurzelmorphologie eventuell zu

seinen Gunsten zu verändern. Zudem ist die antagonistische Wirkung zwischen Auxin und Salizylsäure bekannt. So können durch Auxin SA-abhängige Abwehrgene wie *PR1* supprimiert werden (Wang et al., 2007, Park et al., 2007; Ding et al., 2008). Da bei der Besiedlung mit *P. indica* *PR*-Gene transient induziert sind, könnte möglicherweise die initiale Induktion der SA-Abwehr zu Beginn der Interaktion durch eine von Pflanze oder Pilz ausgehende Auxin-Produktion unterdrückt werden, was sich in den verringerten Induktionslevel der *PR*-Gene 7 dai sowie der Induktion der Auxin-Biosynthesegenen zeigt. Die Unterdrückung dieser Abwehrreaktionen in der *P. indica*-Gerste-Interaktion könnte die Wurzelbesiedlung fördern. Dafür spricht auch, dass Auxin ebenfalls für die Symbiose von Mykorrhizapilzen und ihren Wirtspflanzen von Bedeutung ist, da erhöhte Auxinkonzentrationen während der Besiedlung gemessen wurden (Kaldorf und Ludwig-Müller 2000; Fritze et al., 2005). Ferner wurden in mit *P. indica*-besiedelten Arabidopsiswurzeln erhöhte Auxinkonzentrationen gemessen (Vadassery et al., 2008). Im Gegensatz zu den Daten in Gerste zeigte jedoch eine Arabidopsismutante mit reduzierter Auxinsynthese eine reduzierte Besiedlung durch *P. indica* (Vadassery et al., 2008).

Die Wurzelbesiedlung von Gerste mit *P. indica* verursachte Veränderungen der Expressionsmuster von Genen, die am Oxylipin-Metabolismus beteiligt sind. Oxylipine wie Jasmonsäure sind oxidierte Fettsäuren oder deren Metabolite und sind an verschiedenen pflanzlichen Entwicklungsprozessen sowie an der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress beteiligt (Feussner und Wasternack, 2002). Bei der Biosynthese der Oxylipine katalysieren Lipoxygenasen die Dioxygenierung von Linol- und α -Linolensäure zu (9S)- und (13S)-Hydroperoxyoctadecadiensäuren, die in Pflanzen in verschiedene Folgereaktionen unter anderem zu Jasmonsäure (Blee, 2002; Feussner und Wasternack, 2002), zu Substanzen mit antimikrobieller Wirkung (Weber et al., 1999) oder Zelltod-fördernde Aktivität (Vollenweider et al., 2000) metabolisiert werden. Dass Jasmonsäure in der Pathogenabwehr, Abwehr von Insekten und bei Verwundungen akkumuliert wird, ist bekannt (Glazebrook, 2005; Wasternack et al., 2006; Browse, 2009). Aber auch in Gerstenwurzeln, die mit dem Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* infiziert waren, wurden erhöhte JA-Gehalte und die Induktion von Genen der JA-Biosynthese sowie *JIP23* beobachtet (Hause et al., 2002). In der Transkriptomanalyse von *P. indica*-infizierten Gerstenwurzeln waren drei *Lipoxygenasen* (*LOX*) als Enzyme der JA-Biosynthese differentiell reguliert. Zwei der *Lipoxygenasen* waren 3 dai induziert, während eine weitere 1 dai reprimiert war.

Eine der zu 3 dai induzierten *LOX* wurde als Methyljasmonat-induziert beschrieben (Vörös et al., 1998). Außerdem war ein Gen für eine *S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase*, die die Umwandlung von Jasmonsäure zu Methyljasmonat katalysiert (Seo et al., 2001), sehr stark 3 und 7 dai induziert. Zusätzlich war das JA-Markergen *JIP23* 3 dai reprimiert. Messungen der endogenen JA- und OPDA-Gehalte (12-Oxo-Phytodienolsäure, einem Ausgangsstoff für JA) in 3 Wochen alten *P. indica*-besiedelten Gerstenwurzeln zeigten im Gegensatz zu AM-Pilzen (Hause et al., 2002) keine Veränderungen der endogenen JA-Konzentrationen zu diesem späten Besiedlungszeitpunkt (Daten nicht gezeigt).

Zusammen betrachtet geben die Daten keinen Anhaltspunkt, ob die Synthese bestimmter Oxylipine mit antimikrobieller oder Zelltod-fördernder Aktivität durch *P. indica* induziert sind und die Besiedlung beeinflussen könnte.

Die Transkriptomanalyse zeigte verschiedene in Ethylenbiosynthese und –signalwegen involvierte Gene als differentiell reguliert. Darunter waren zwei *Aminocyclopropan-Carboxylat-Oxidasen* (*ACC-Oxidasen*) die 3 und 7 dai hochreguliert waren, während eine weitere *ACC-Oxidase* 1 dai supprimiert war. Diese Enzyme sind an der Ethylenbiosynthese beteiligt und wandeln Aminocyclopropan-Carboxylat in Ethylen um (Kende, 1993). Somit ist zu vermuten, dass die Ethylensynthese zu Beginn der Interaktion unterdrückt, aber während der Penetration erhöht ist. In *Arabidopsis* fördert Ethylen die Resistenz gegen nekrotrophe, nicht jedoch gegen biotrophe Pathogene (Glazebrook, 2005). So könnte es im Fall von *P. indica* in der Wurzel zu einem Wechsel von einer initialen biotrophen Wachstumsphase zu einer zelltod-abhängigen Phase kommen, was sich dann in den Veränderungen der Ethylenbiosynthese ausdrückt. Allerdings waren zwei Transkriptionsfaktoren (*ethylene-responsive factor*, *RAV2-like DNA binding protein*) 3 und 7 dai supprimiert. Damit gibt es einen Widerspruch zwischen induzierten Genen der Ethylenbiosynthese wie *ACC-Oxidasen* und reprimierten Ethylen-responsiven Genen bzw. Ethylen-Signalkomponenten. Vermutlich gibt es weitere, noch nicht identifizierte Komponenten des Ethylen-Signalweges. Alternativ könnte die Regulation der *ACC-Oxidasen* nicht auf transkriptioneller Ebene stattfinden. In verschiedenen Pflanzen wird jedoch durch Ethylen die Besiedlung der Wurzeln mit AM-Pilzen inhibiert (Geil et al., 2001; Geil und Guinel, 2002).

Transkripte, die für Enzyme kodieren, die an Salizylsäure-Biosynthese oder –Signalgebung beteiligt sind, waren in den Daten der Transkriptomanalyse von *P. indica*

infizierten Wurzeln nicht verändert. Zusammen betrachtet gibt es trotz diversen Änderungen auf transkriptioneller Ebene zur Zeit noch keine eindeutigen Daten darüber, dass eines der drei klassischen Abwehr-bezogenen Phytohormone SA, JA oder ET die Wurzelbesiedlung von Gerste mit *P. indica* beeinflussen könnte.

4.1.5 Die Induktion des MEP-Stoffwechselwegs und der GA-Biosynthese in *P. indica*-besiedelten Gerstenwurzeln

Die Transkriptomanalyse von *P. indica*-besiedelten Wurzeln zeigte eine Vielzahl an Transkripten, welche für Enzyme des MEP-Syntheseweges kodieren, hochreguliert. Somit wird dieser Stoffwechselweg, der biosynthetische Vorläufer für Carotinoide, Abscisinsäure und Gibberellinsäure liefert (Cordoba et al., 2009), durch *P. indica* induziert. Eines dieser Enzyme, die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS) besitzt eine wichtige regulatorische Funktion, so besteht zum Beispiel in Tomate ein Zusammenhang zwischen der Expression der *DXS* und der Mengen an über den MEP-Weg gebildeten Carotinoiden (Lois et al., 2000). Auch in Reis wurden verschiedene Gene des MEP-Stoffwechselweges nach Zugabe des Elizitors Chitin induziert (Okada et al., 2007). Durch *P. indica* wurden zwei Transkripte der *DXS* in Gerstenwurzeln 3 und 7 dai stark induziert, diese Induktion der *DXS* wurde interessanterweise ebenfalls in mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln beobachtet und korrelierte hier mit erhöhten Carotinoid-Mengen in besiedelten Wurzeln (Walter et al., 2002). Dies ist ebenso der Fall in Mais, Gerste und Tabak (Walter et al., 2000). Der *Knock-out* einer *DXS* in *M. truncatula* verursachte nicht nur eine verringerte Akkumulation von Carotinoiden, sondern auch eine verminderte Besiedlung mit dem Mykorrhizapilz (Floss et al., 2008). Da Carotinoide die wichtigsten Produkte des MEP-Stoffwechselwegs sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit Wurzelmaterial für eine Metabolomanalyse der infizierten Gerstenwurzeln der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Sonnewald in Erlangen zur Verfügung gestellt, um mögliche Veränderungen der Carotinoid-Mengen aufgrund der transkriptionellen Induktion des MEP-Stoffwechsels in den Wurzeln zu messen (Schäfer et al., 2009a). Dabei wurden für zwei der zehn gemessenen Carotinoide, Violaxanthin und Neoxanthin in besiedelten Wurzeln 1 dai verringerte Mengen detektiert. 3 und 7 dai jedoch konnten hauptsächlich für Neoxanthin erhöhte Mengen in *P. indica*-infizierten Wurzeln gemessen werden. Diese beiden Stoffe sind jedoch auch Ausgangprodukte für die ABA-Biosynthese

(Finkelstein und Rock, 2002), so dass die erhöhten Werte ebenso auf Zwischenprodukte für die ABA-Synthese deuten könnten.

Nicht nur Transkripte für Enzyme des MEP-Stoffwechselwegs, sondern auch entsprechende Transkripte für Enzyme, die sich an diesen Biosyntheseweg anschließende GA-Biosynthese, waren auffallend oft in *P. indica*-besiedelten Wurzeln hochreguliert. Dies deutet auf eine verstärkte GA-Produktion in *P. indica*-infizierten Wurzeln hin. Derzeit existieren nur wenige Arbeiten über Mykorrhiza und Gibberellinsäure. Die beobachtete Induktion einer *ent-KS* in *P. indica*-infizierten Gerstenwurzeln wurde ebenfalls bei der Interaktion von drei verschiedenen Mykorrhizapilzen (*Glomus intraradices*, *Gigaspora gigantea* und *Glomus versiforme*) mit *M. truncatula* beobachtet (Liu et al., 2007). In einer Transkriptomanalyse von *Lotus japonicus*-Wurzeln infiziert mit *Gigaspora margarita* war eine *GA2-Oxidase* induziert (Guether et al., 2009), welche die Umwandlung von bioaktiven GAs zu inaktiven GAs katalysiert. Eine solche *GA2-Oxidase* war in *P. indica*-besiedelten Wurzeln supprimiert. Zusammenfassend ergeben sich aber durchaus Ähnlichkeiten bei der Expression der GA-Biosynthesegene in *P. indica* und AM besiedelten Pflanzen. Es existieren ebenso Hinweise einer Produktion von Gibberellinen bzw. GA-ähnliche Substanzen durch Mykorrhizapilze selbst (Allen et al., 1982; Barea und Azcon-Aguilar, 1982). Ob *P. indica* auch in der Lage ist, GAs zu produzieren, ist noch unklar. Entsprechende Gene, die für Enzyme der GA-Biosynthese kodieren, finden sich im Genom des Basidiomyzeten (A. Zuccaro, persönliche Mitteilung). Eine funktionelle Analyse dieser Gene steht jedoch aus. Hierzu sollen in weiterführenden Experimenten in Anschluss an diese Arbeit GA-Messungen mit pilzlichem Myzel und Kulturfiltrat, aber auch mit infiziertem Wurzelmaterial durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede in den GA-Mengen zwischen besiedelten und nicht-besiedelten Gerstenwurzeln zu untersuchen.

4.2 GA-Biosynthese und –Signalgebung in *P. indica*-besiedelten Gerstenwurzeln

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten eine deutliche Reduktion der Besiedlung von Gerstenmutanten mit Defekten in der GA-Biosynthese oder der GA-Signalweiterleitung durch *P. indica*. Von den beiden untersuchten Zeitpunkten sich hauptsächlich der spätere, 7 dai, eine signifikante Reduktion in der

Wurzelbesiedlung. 3 dai waren kaum Unterschiede zu erkennen, was durch die vorwiegend extrazelluläre Entwicklung des Pilzes zu diesem Zeitpunkt zu erklären ist. Dagegen zeigte sich bei der Quantifizierung der pilzlichen DNA 7 dai eine deutliche Reduktion der pilzlichen Biomasse in einer Linie mit niedrigen endogenen GA-Konzentrationen (M117), sowie zweier Linien mit verminderter GA-Signalweiterleitung, die einen Defekt im DELLA-Protein hat (M640) bzw. in der GA-Perzeption (M121) tragen. Bei einer weiteren GA-Rezeptormutante (M488) wurde eine sehr große Varianz in den unabhängigen Experimenten detektiert, so dass in diesem Fall zum jetzigen Zeitpunkt keine verlässliche Aussage getroffen werden kann. Bei der Rezeptormutante M121 war, zusätzlich zur geringeren Besiedlungsstärke, die Proliferation bzw. die Differenzierung der Chlamydosporen des Pilzes gehemmt, so dass 21 dai eine stark reduzierte Sporulation in Rhizodermis- und Kortezellen beobachtet werden konnte (Schäfer et al., 2009b). Demzufolge ist der GA-Rezeptor *GID1* für die vollständige Entwicklung des Pilzes in der Gerstenwurzel äußerst wichtig.

Die *P. indica*-Besiedlung war in Gerstenlinien mit Defekten in der GA-Biosynthese und GA-Signalgebung reduziert. Es ist möglich, dass dies durch eine veränderte Expression verschiedener Abwehrgene der SA- und JA-vermittelten Abwehr erklärt werden kann, da GA die Balance zwischen verschiedenen Phytohormonen beeinflussen kann. Zum Beispiel sind die Arabidopsismutanten *sly1-10* und *gai-3*, welche Defekte in der GA-Signalgebung tragen, suszeptibler gegen das hemibiotrophe Bakterium *P. syringae* DC3000, aber resistenter gegen die beiden nekrotrophen Pilze *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea*. Im Gegensatz dazu ist eine Mutante mit Defekten in vier von fünf DELLA-Proteinen, die einen konstitutivem GA-Signalgebungs-Phänotyp zeigen, resistenter gegen biotrophe aber suszeptibler gegen nekrotrophe Pathogene (Navarro et al., 2008). Außerdem wurden in der DELLA-Mutante erhöhte, endogene SA-Mengen nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* sowie die Induktion der SA-abhängigen Gene *PR1* und *PR2* gemessen. Währenddessen war die Induktion JA/ET-abhängiger Transkripte verzögert. Dagegen zeigte die Mutante *gai* mit stabilisiertem DELLA-Protein stärkere und frühere Induktion von JA-responsiven Transkripten nach Infektion mit *A. brassicicola*. Mit diesen Daten wurde eine direkte Verbindung zwischen GA-Signalgebung über DELLA-Proteine und der Regulation von SA- oder JA-abhängiger Abwehr gezeigt.

Die Expressionsstudien von SA- und JA-abhängigen Transkripten in *P. indica*-besiedelten Wurzeln der verschiedenen GA-Mutanten zeigte die größten Differenzen 3 dai, während die Unterschiede in der Besiedlung 7 dai am deutlichsten waren. So waren die untersuchten *PR*-Gene *PR1b*, *PR10* und *PR5* in allen Linien 3 dai stark induziert, was auf eine durch *P. indica* erhöhte SA-vermittelte Abwehr in GA-Mutanten hinweist. Die Transkriptmengen für das JA-Markergen *JIP23* zeigten zu dem Zeitpunkt keine Veränderung. Nach 7 Tagen waren die *PR*-Gene nur noch in M117 leicht erhöht, während M640 eine leichte, wenn auch nicht-signifikante Suppression zeigte. In Übereinstimmung mit der antagonistischen Regulation von SA und JA war die Expression von *JIP23* demnach in M117 nach 7 Tagen supprimiert, in M640 jedoch induziert. Dieses Expressionsmuster ist nicht direkt vergleichbar mit der dargestellten verzögerten JA-Abwehr und verstärkten SA-Abwehr der DELLA-Mutante (Navarro et al., 2008), deren adäquater Vergleich hier die Gerstenlinie M640 wäre. Bei dem Vergleich der Daten aus Gerstenwurzeln mit denen der Arabidopsismutanten (Navarro et al., 2008) muss natürlich auch beachtet werden, dass hierbei nicht nur verschiedene Gewebe, Wurzel und Blatt, sondern auch verschiedene Pathogene miteinander verglichen werden, sodass es alleine durch diese entscheidenden Unterschiede zu Unstimmigkeiten kommen kann. Die Gerstenlinie mit dem defekten DELLA-Protein zeigte 7 Tage nach Inokulation mit *P. indica* ein völlig anderes Verhalten, nämlich Induktion der JA-Abwehr und supprimierte *PR*-Genexpression, während die Genexpression in der Biosynthesemutante mit niedrigem endogenem GA-Gehalt genau gegensätzlich war. Dazu passen wiederum die Expressionsmuster im Wildtyp Himalaya nach Zugabe von exogenem GA₃. Hier waren die *PR*-Gene 7 dai reprimiert, aber *JIP23* induziert. Zusammen betrachtet hat *P. indica* über die GA-Signalgebung bzw. GA-Biosynthese einen Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen SA- und JA-abhängigen Genexpressionsmuster und damit auch auf die entsprechenden Abwehrreaktionen, um die pflanzliche Immunabwehr zu beeinträchtigen und dadurch eine Etablierung der kompatiblen Interaktion zu erreichen.

Abzuklären bleibt, warum die Wurzelbesiedlung mit *P. indica* in Himalaya nach exogener Zugabe von GA₃ geringer ist, was im Widerspruch zu den Ergebnissen mit den GA-Mutanten steht. Hierbei könnten vor allem der Zeitpunkt und die Häufigkeit der GA-Applikation von Bedeutung sein, da diese nur am Anfang während der Inokulation der Wurzeln ausgeführt wurde, und dadurch eventuell die

Sporenkeimung und initiale Besiedlung direkt gestört wurde. Ein anderer Faktor stellt die GA₃-Konzentration dar. Sollte diese im Vergleich zum endogenen GA-Gehalt der Wurzeln zu hoch gewesen sein, könnte dies wahrscheinlich auch negative Auswirkungen auf die Entwicklung der Keimlinge und des Pilzes gehabt haben.

Der Versuch, Expressionsmuster von Signalkomponenten des GA-Signalweges auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, zeigte kaum deutliche Änderungen der Transkriptmengen von *SLN1*, *GID1*, *GID2* und *SLY1*. Folglich greift *P. indica* nicht in die Transkription dieser Gene ein. Da jedoch der GA-Signalweg weitgehend über die DELLA-Proteine reguliert wird (Peng et al., 1997), sollte ein Western Blot Aufschluss über den Einfluss von *P. indica* auf das DELLA-Protein in Gerste geben und eine mögliche Degradation von SLN1 anzeigen. Da sich die Charge des Antikörpers gegen SLN1 (Gubler et al., 2002) jedoch als relativ unspezifisch herausgestellt hatte, konnte ein eventueller, von *P. indica* induzierter Abbau des Proteins in Gerstenwurzeln im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Hierfür wären ein neuer Antikörper sowie eine Wiederholung des Experiments nötig. Zusammen mit den Messwerten des GA-Gehalts in besiedelten Gerstenwurzeln könnten diese Daten zur Aufklärung beitragen, über welchen Mechanismus *P. indica* die GA-Signalgebung beeinflusst, bzw. welche Funktion das Hormon bei der kompatiblen Interaktion hat.

4.3 *P. indica* unterdrückt die Bildung von H₂O₂ in Gerstenwurzeln

Aufgrund der Daten aus der Transkriptomanalyse bezüglich Abwehr- und Stressbezogener Gene zeigt sich deutlich, dass *P. indica* die pflanzliche Immunabwehr supprimiert. Durch die Quantifizierung des *oxidative burst* als eine frühe Reaktion der pflanzlichen *MAMP-triggered Immunity* konnte in *P. indica*-besiedelten Himalayawurzeln aber auch in Wurzeln der Linie M640 eine fast vollständige Unterdrückung der H₂O₂-Produktion nach Zugabe des Elizitors Chitin detektiert werden. Zum Vergleich waren bei den Messungen der mit dem Pathogen *Rhizoctonia solani* infizierten Wurzeln kaum Unterschiede zwischen infizierten und Kontrollwurzeln zu erkennen. Damit ist die Unterdrückung des *oxidative burst* nicht generell auf Wurzelpathogene bezogen, sondern spezifisch für die Besiedlung mit *P. indica*, die mit einem bestimmten Mechanismus der Abwehrsuppression einhergeht. In *Arabidopsis* induzieren die in der GA-Signalweiterleitung involvierten DELLA-

Proteine ROS (*reactive oxygen species*)-abbauende Enzyme nach biotischem oder abiotischem Stress. Durch den damit verzögerten Zelltod wird die Pflanze toleranter gegen Stress und resistenter gegen Pathogene (Achard et al., 2008b). So sollte durch die Quantifizierung des *oxidative burst* nach Elizitorzugabe in der Gerstenlinie M640 mit einem Defekt im DELLA-Protein eine Beteiligung des SLN1-Proteins nachgeprüft werden. Da die verminderte H₂O₂-Produktion in *P. indica*-besiedelten Wurzeln auch in der SLN1-Mutante messbar war, scheint der Mechanismus der Unterdrückung der Abwehr nicht unbedingt die Funktionalität des SLN1-Proteins zu erfordern.

H₂O₂ ist ein wichtiges Signalmolekül bei der Interaktion von Pflanzen mit Pathogenen (Apel und Hirt, 2004) und bewirkt Zellwandverstärkungen, programmierten Zelltod aber auch die Induktion von Abwehrgenen (Hückelhoven, 2007). Die Pflanze muss die Produktion von ROS innerhalb der Zelle kontrollieren, dafür gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum einen existiert ein nicht-enzymatischer Weg über den zellulären Ascorbat- und Glutathion-Pool, zum anderen kann die Menge der gebildeten ROS über enzymatischen Abbau mithilfe von Superoxiddismutasen, Katalasen, Ascorbatperoxidasen und Glutathionperoxidasen reduziert werden (Apel und Hirt, 2004). In *P. indica*-besiedelten Gerstenwurzeln wurde in früheren Studien ein erhöhtes Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Ascorbat gemessen, welches essentiell für den Abbau von ROS ist (Waller et al., 2005). Ebenso wurde ein erhöhter Ascorbat-Gehalt sowie erhöhte Aktivität von antioxidativen Enzymen nach Salzstress in *P. indica*-besiedelten Wurzeln festgestellt (Baltruschat et al., 2008). Dabei wurde in *P. indica* keine Produktion von Ascorbat gefunden, und infolgedessen eine vom Pilz induzierte, vermehrte Ascorbat-Produktion der Pflanze vermutet. Zusammen betrachtet könnte dies ein Grund für die reduzierte H₂O₂-Produktion *P. indica*-besiedelter Wurzeln sein. Einige Endophyten, welche ein breites Wirtsspektrum besitzen, reduzieren außerdem die ROS-Produktion in ihren Wirtspflanzen. Es wird vermutet, dass Endophyten somit einer Produktion von für sie schädlichen ROS-Mengen entgegen wirken (Rodriguez et al., 2008). Im Gegensatz zu *P. indica* wurde für AM wiederum von einer erhöhten Akkumulation von ROS berichtet. Es wurde z.B. in Wurzeln von *M. truncatula* in Zellen mit Arbuskeln des AM-Pilzes *G. intraradices* die Akkumulation von H₂O₂ beobachtet (Salzer et al., 1999), was vermutlich jedoch ebenfalls mit Alterung der Arbuskeln zusammenhängen könnte. Für *P. indica* ist die Unterdrückung des *oxidative burst*

wahrscheinlich ein entscheidender Faktor für die Etablierung der kompatiblen Interaktion.

5. Zusammenfassung/ Summary

5.1 Zusammenfassung

Der mutualistische Basidiomycet *Piriformospora indica* ist ein Wurzelendophyt, dessen Besiedlung verschiedene positive Auswirkungen auf seine Wirtspflanzen hat. So kommt es zu einer Wachstumssteigerung in Wurzel und Spross sowie zu einer lokalen und systemischen Resistenzinduktion gegen verschiedene Pathogene (Baltruschat et al., 2008; Deshmukh und Kogel, 2007). Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Interaktion von *P. indica* mit Gerstenwurzeln wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine auf Microarrays basierende Transkriptomanalyse mit Material aus *P. indica*-besiedelten Wurzeln durchgeführt. Alle 1107 daraus resultierenden differentiell regulierten Transkripte zu den drei, in Anlehnung an das Besiedlungsschema des Pilzes ausgewählten Zeitpunkte 1, 3 und 7 dai („days after inoculation“), wurden aufgrund ihrer jeweiligen Annotation 15 verschiedenen funktionellen Kategorien zugeordnet. Dabei zeigte sich neben vielen der Phytohormonsynthese und -signalwegen zugeordneten Transkripten eine hohe Zahl an Abwehr-/Stress-bezogenen Genen. Deren Expressionsmuster stellte sich jedoch bei näherer Betrachtung meist als transient, d.h. nur zu Beginn der Besiedlung mit *P. indica* induziert, heraus. Somit werden zu Beginn der Interaktion zwar verschiedene Abwehrreaktionen in der Pflanze ausgelöst, jedoch im weiteren Verlauf der Besiedlung wieder unterdrückt. Außer den Abwehr-bezogenen Transkripten induziert *P. indica* in den Gerstenwurzeln viele Transkripte, die dem Biosyntheseweg der Gibberelline zugeordnet werden konnten. Darum wurde die *P. indica*-Besiedlung und Genexpression in Gerstemutanten mit Defekten in der GA-Biosynthese und dem GA-Signalweg untersucht. Dabei konnten zwei Linien mit defekter GA-Signalgebung identifiziert werden, die eine reduzierte *P. indica* Besiedlung aufwiesen: M121, eine Mutante des GA-Rezeptors GID1 und M640, eine Mutante des SLENDER-Proteins, einem negativen Repressor des GA-Signalweges. Zudem zeigte eine Linie mit einem Defekt in der GA-Biosynthese, M117, ebenfalls eine reduzierte Besiedlung mit *P. indica*. Darüber hinaus war die Chlamydosporeneubildung des Pilzes in den Rhizodermiszellen der Linie M121 zu einem späteren Zeitpunkt der Interaktion fast vollständig inhibiert. Zusätzlich wurde durch Expressionsanalysen mit quantitativer real-time PCR nachgewiesen, dass *P. indica* über die GA-Signalgebung bzw. GA-Biosynthese einen Einfluss auf das

Gleichgewicht zwischen Salizylsäure- und Jasmonsäure-abhängigen Genexpressionsmuster und damit auch auf die entsprechenden Abwehrreaktionen hat. Da die Daten der Transkriptomanalyse aufgrund der transienten Expressionsmuster der Abwehr- und Stress-bezogenen Gene eine Unterdrückung der pflanzliche Immunabwehr durch *P. indica* zeigten, wurde die Induktion des *oxidative burst* als eine frühe Reaktion der pflanzlichen *MAMP-triggered Immunity* in *P. indica*-besiedelten Wurzeln untersucht. In Wurzeln des Wildtyps Himalaya, aber auch in Wurzeln der Linie M640 wurde dabei eine fast vollständige Unterdrückung der H₂O₂-Produktion nach Zugabe des Elizitors Chitin beobachtet.

5.2 Summary

The basidiomycete *Piriformospora indica* is an endophytic fungus, which colonizes roots and thereby causes several mutualistic benefits such as growth induction and enhanced local and systemic resistance against pathogens (Baltruschat et al., 2008; Deshmukh und Kogel, 2007). To investigate the interaction of *P. indica* with barley roots on the molecular level, a microarray-based transcriptome analysis of *P. indica* colonized barley roots has been conducted. According to the fungal colonization pattern, samples were taken 1, 3 and 7 days after inoculation. Altogether, 1107 genes were identified as differentially regulated and, based on their annotation, classified into 15 functional groups. Besides the high number of genes related to phytohormone synthesis and signaling, many defence/ stress related genes were found to be regulated in *P. indica* colonized roots. The expression profiles of those transcripts were mostly transient, showing induction only at the first interaction stage. Therefore, *P. indica* induces several defence reactions which are, however, suppressed at later time points. In particular, genes of the gibberelline biosynthesis pathway were found to be induced by *P. indica*. To examine whether GA signaling is functionally involved in the *P. indica*-barley interaction, root colonization and gene expression in barley GA mutant lines with defects in GA synthesis and signaling were examined. Two lines with defects in GA signaling, the GID1 receptor line M121 and the SLENDER1 mutant M640, but also the GA biosynthesis deficient mutant M117, showed a reduced fungal colonisation. Moreover, the formation of fungal chlamydospores in rhizodermal cells was nearly completely inhibited in line M121 at later stages of the interaction. In addition, gene expression analysis revealed, that

P. indica modulates the balance between salicylic acid and jasmonic acid dependent defence reactions via the GA signaling pathway. Since the transcriptome data displayed a suppression of plant immune responses during interaction, the influence of *P. indica* on the MAMP-triggered oxidative burst in barley roots was analyzed. These experiments demonstrated a suppression of chitin-induced H₂O₂-production in roots colonized by *P. indica* compared to non-infected controls.

6. Literaturverzeichnis

Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., Harberd, N.P. (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311(5757):91-4.

Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., Genschik, P. (2008a) The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell*, 20(8):2117-29.

Achard, P., Renou, J.P., Berthomé, R., Harberd, N.P., Genschik, P. (2008b) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol*, 18(9):656-60.

Allen, M.F., Moore, T.S., Christensen, M. (1982) Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Can J Bot*, 60:468–471.

Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373–399.

Aroca, R., Del Mar Alguacil, M., Vernieri, P., Ruiz-Lozano, J.M. (2008a) Plant responses to drought stress and exogenous ABA application are modulated differently by mycorrhization in tomato and an ABA-deficient mutant (sitiens). *Microb Ecol*, 56(4):704-19.

Aroca, R., Vernieri, P., Ruiz-Lozano, J.M. (2008b) Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *J Exp Bot*, 59(8):2029-41.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis thaliana* innate immunity. *Nature*, 415:977-983.

Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., Höfte, M. (2008) Global switches and fine-tuning – ABA modulates plant pathogen defence. *Mol Plant Microbe Interact*, 21:709-719.

Audenaert, K., De Meyer, G.B., Höfte, M. (2002) Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol*, 128:491–501.

Ausubel, F.M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*, 6:973-979.

Bago, B., Pfeffer, P.E., Abubaker, J., Jun J, Allen, J.W., Brouillette, J., Douds, D.D., Lammers, P.J., Shachar-Hill, Y. (2003) Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol*, 131:1496-1507.

- Baltruschat, B., Fodor, J., Harrach, B.D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K.H., Schäfer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A., Skoczowski, A. (2008) Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol*, 180:501-510.
- Barea, J.M., Azcon-Aguilar, C. (1982) Production of plant growth regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl Environ Microbiol*, 43:810–813.
- Bari, R., Jones, J.D. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol*, 69(4):473-88.
- Blechert, O., Kost, G., Hassel, A., Rexer, K.-H., Varma, A. (1999) First remarks on the symbiotic interaction between *Piriformospora indica* and terrestrial orchids. In: Varma, A., Hock, B. (eds). *Mycorrhiza*, 2nd edn. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 683–688.
- Blee, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci*, 7:315–321.
- Block, A., Schmelz, E., Jones, J.B., Klee, H.J. (2005) Coronatine and salicylic acid: the battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control. *Mol Plant Pathol*, 6:79-83.
- Boller, T., Felix, G. (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 60:379-406.
- Brooks, D.M., Bender, C.L., Kunkel, B.N. (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol*, 6:629-639.
- Browse, J. (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol*, 60:183-205.
- Brundrett, M.C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol*, 154:275–304.
- Buchanan, B.B., Grissem, W., Jones, R.L. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.
- Büsches, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. (1997) The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 88:695-705.
- Bütehorn, B., Rhody, D., Franken, P. (2000) Isolation and characterisation of Pitef1 encoding the translation elongation factor EF-1a of the root endophyte *Piriformospora indica*. *Plant Biol*, 2:687–692.

- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M. (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*, 13:843–852.
- Caplan, J., Padmanabhan, M., Dinesh-Kumar, S.P. (2008) Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe*, 3:126–35.
- Chandler, P.M. und Robertson, M. (1999) Gibberellin dose–response curves and the characterization of dwarf mutants of barley. *Plant Physiol*, 120:623–632.
- Chandler, P.M., Marion-Poll, A., Ellis, M., Gubler, F. (2002) Mutants at the Slender1 locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiol*, 129:181-90.
- Chandler, P.M., Harding, C.A., Ashton, A.R., Mulcair, M.D., Dixon, N.E., Mander, L.N. (2008) Characterization of gibberellin receptor mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Plant*, 1:282–294.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G. (2006) The *Arabidopsis thaliana* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, 18:465- 476.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., Boller, T. (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448:497–500.
- Christensen, A.B., Thordal-Christensen, H., Zimmermann, G., Gjetting, T., Lyngkjaer, M.F., Dudler, R., Schweizer, P. (2004) The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Mol Plant Microbe Interact*, 17:109–117.
- Close, T.J., Wanamaker, S.I., Caldo, R.A., Turner, S.M., Ashlock, D.A., Dickerson, J.A., Wing, R.A., Muehlbauer, G.J., Kleinhofs, A., Wise, R.P. (2004) A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. *Plant Physiol*, 134:960-8.
- Cordier, C., Pozo, M.J., Barea, J.M., Gianinazzi-Pearson, V. (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Plant Microbe Interact*, 11:1017-1028.
- Cordoba, E., Salmi, M., León, P. (2009) Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J Exp Bot*, 60(10):2933-43.
- Deguchi, Y., Banba, M., Shimoda, Y., Chechetka, S.A., Suzuri, R., Okusako, Y., Ooki, Y., Toyokura, K., Suzuki, A., Uchiumi, T., Higashi, S., Abe, M., Kouchi, H., Izui, K., Hata, S. (2007) Transcriptome profiling of *Lotus japonicus* roots during arbuscular mycorrhiza development and comparison with that of nodulation. *DNA Res*, 14(3):117-33.

- Deshmukh, S., Hückelhoven, R., Schäfer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F., Kogel, K.H. (2006) The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:18450-18457.
- Deshmukh, S.D., Kogel, K.H. (2007) *Piriformospora indica* protects barley from root rot caused by *Fusarium graminearum*. *J Plant Dis Prot*, 114:263–268.
- Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, Li X, Wang S. (2008) Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell*, 20(1):228-40.
- Dotzler, N., Krings, M., Taylor, T.N., Agerer, R. (2006) Germination shields in *Scutellospora* (Glomeromycota: Diversisporales, Gigasporaceae) from the 400 million-year-old Rhynie chert. *Mycol Prog*, 5:178–184.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- Felix, G., Regenass, M., Boller, T. (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells - induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J*, 4:307–16.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*, 18(3):265-76.
- Feussner, I., Wasternack, C. (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 53:275–297.
- Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., Turner, J.G. (1994) Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, 6:751-759.
- Finkelstein, R.R., Rock, C.D. (2002) Abscisic acid biosynthesis and response. In: Somerville, C.R. und Meyerowitz, E.M. (eds). *The Arabidopsis Book*. Rockville, MD, American Society of Plant Biologists, pp. 1–48.
- Finlay, R.D. (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J Exp Bot*, 59:1115-1126.
- Flors, V., Ton, J., van Doorn, R., Jakab, G., Garcia-Agustin, P., Mauch-Mani, B. (2008) Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J*, 54:81–92.
- Floss, D.S., Hause, B., Lange, P.R., Küster, H., Strack, D., Walter, M.H. (2008) Knock-down of the MEP pathway isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase

- 2 inhibits formation of arbuscular mycorrhiza-induced apocarotenoids, and abolishes normal expression of mycorrhiza-specific plant marker genes. *Plant J*, 56(1):86-100.
- Fitze, D., Wiepning, A., Kaldorf, M., Ludwig-Müller, J. (2005) Auxins in the development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize. *J Plant Physiol*, 162:1210–1219.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261:754–56.
- Gagne, J.M., Downes, B.P., Shin-Han, S., Durski, A.M., Vierstra, R.D. (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:11519–24.
- Ganjewala, D., Kumar, S., Luthra, R. (2009) An account of cloned genes of Methylerythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Curr Issues Mol Biol*, 11:(Suppl 1) i35-45.
- Geil, R., Guinel, F. (2002) Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. *Can J Bot*, 80:114–119.
- Geil, R., Peterson, R., Guinel, F. (2001) Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. *Sparkle*) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza*, 11:137–143.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 43:205–227.
- Goehre, V., Robatzek, S. (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol*, 46:189-215.
- Gomez, S.K., Javot, H., Deewatthanawong, P., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Blancaflor, E.B., Udvardi, M.K., Harrison, M.J. (2009) *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biol*, 9:10.
- Gómez-Gómez, L., Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell*, 5:1003–1011.
- Grant, M., Lamb, C. (2006) Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 9:414–420.
- Grant, M.R., Jones, J.D. (2009) Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science*, 324(5928):750-2.
- Gubler, F., Chandler, P.M., White, R.G., Llewellyn, D.J., Jacobsen, J.V. (2002) Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol*, 129:191-200.

- Guether, M., Balestrini, R., Hannah, M., He, J., Udvardi, M.K., Bonfante, P. (2009) Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytol*, 182(1):200-12.
- Harrison, M.J., Dixon, R.A. (1994) Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J*, 6:9–20.
- Hause, B., Maier, W., Miersch, O., Kramell, R., Strack, D. (2002) Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol*, 130(3):1213-20.
- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J. (2001) The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:2065-70.
- Hirano, K., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M. (2008) GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends Plant Sci*, 13:192-9.
- Hückelhoven, R. (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol*, 45:101–127.
- Hundertmark, M., Hinch, D.K. (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9:118.
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., Yamaguchi, J. (2001) Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell*, 13:999–1010.
- Jacobs, S. (2009) Analysis of quantitative *Piriformospora indica* effects on barley growth and functional test of a *Piriformospora indica*-regulated barley gene. Masterarbeit, Justus-Liebig Universität Gießen.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.F. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444:323 – 329.
- Kaldorf, M., Ludwig-Müller, J. (2000) AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. *Physiol Plant*, 109: 58–67.
- Kaliff, M., Staal, J., Myrenas, M., Dixelius, C. (2007) ABA is required for *Leptosphaeria maculans* resistance via ABI1 and ABI4 dependent signaling. *Mol Plant Microbe Interact*, 20:335–345.
- Karandashov, V., Bucher, M. (2005) Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci*, 10:22–29.
- Kazan, K. und Manners, J.M. (2009) Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, 14(7):373-82.

- Kende, H. (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 44:283–307.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., Peng, J. (2002) Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev*, 16:646–58.
- Li, J., Wen, J., Lease, .K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., Walker, J.C. (2002) BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, 110(2):213-22.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., Geurts, R. (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, 302:630–633.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D., Harrison, M.J. (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J*, 50:529–544.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(DDCT) method. *Methods*, 25:402–408.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., Sandberg, G. (2005) Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in Arabidopsis Roots. *Plant Cell*, 17:1090-1104.
- Lois, L.M., Rodriguez-Concepcion, M., Gallego, F., Campos, N., Boronat, A. (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J*, 22:503–513.
- MacMillan, J. (2002) Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J Plant Growth Regul*, 20:387–442.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J. (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425(6958):637-640.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., Steber, C.M. (2003) The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell*, 15:1120–1130.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., He, S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126: 969–980.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H.H., Michelmore, R.W. (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15:809–34.

- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., Shibuya, N. (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:19613–18.
- Mohr, P.G., Cahill, D.M. (2007) Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in Arabidopsis infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Funct Int Genomics*, 7:181-191.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J.D. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772):436-9.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P., Jones, J.D.G. (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol*, 18:650–655.
- Okada, A., Shimizu, T., Okada, K., Kuzuyama, T., Koga, J., Shibuya, N., Nojiri, H., Yamane, H. (2007) Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. *Plant Mol Biol*, 65: 177–187.
- Park, J.E., Park, J.Y., Kim, Y.S., Staswick, P.E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S.Y., Kim, J., Lee, Y.H., Park, C.M. (2007) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 282(13):10036-46.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., Harberd, N.P. (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev*, 11:3194–3205.
- Peyronel, B., Fassi, B., Fontana, A., Trappe, J. M. (1969) Terminology of mycorrhizae. *Mycologia*, 61:410–411.
- Pham, G.H., Singh, A., Malla, R., Kumari, R., Prasad, R., Sachdev, M., Luis, P., Kaldorf, M., Peskan, T., Herrmann, S., Hehl, S., Declerck, S., Buscot, F., Oelmüller, R., Rexer, K-H., Kost, G., Varma, A. (2004) Interaction of *P. indica* with other microorganisms and plants In: Varma, A., Abbot, L., Werner, D., Hampp, R. (eds). *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 237-265.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C. (1998) A novel signaling pathway controlling induced disease resistance in plants. *Plant Cell*, 10:1571-80.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol*, 5(5):308-16.
- 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. *J Exp Bot*, 53:525-534.

- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J. (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425(6958):585-92.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M.H., Albrektsen, A.S., James, E.K., Thirup, S., Stougaard, J. (2007) LysM domains mediate lipochitin–oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *EMBO J*, 26:3923–3935.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., Kerp, H. (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:11841–11843.
- Robert-Seilantantz, A., Navarro, L., Bari, R., Jones, J.D.G. (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol*, 10:372–379.
- Rodriguez, R.J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim, Y.O., Redman, R.S. (2008) Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME J*, 2: 404–416.
- Rohmer, M. (1999) The discovery of a mevalonate independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep*, 16:565–574.
- Ruiz-Lozano, J.M., Porcel, R., Aroca, R. (2006) Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? *New Phytol*, 171(4):693-8.
- Sacchettini, J.C., Poulter, C.D. (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science*, 277(5333):1788-9.
- Salzer, P., Corbiere, H., Boller, T. (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta*, 208:319–325.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York.
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M. (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science*, 299:1896–1898.
- Schäfer, P., Kogel, K.H. (2009) The sebacinoid fungus *Piriformospora indica*: an orchid mycorrhiza which may increase host plant reproduction and fitness. In: Deising, H.B., Esser, K. (eds). *The Mycota, Vol. 5, Plant Relationships*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 99–112.
- Schäfer, P., Pfiffli, S., Voll, L.M., Zajic, D., Chandler, P.M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kogel, K.H. (2009a) Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the

- mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *Plant J*, 59(3):461-74.
- Schäfer, P., Pfiffi, S., Voll, L.M., Zajic, D., Chandler, P.M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kogel, K.H. (2009b) Phytohormones in plant root-*Piriformospora indica* mutualism. *Plant Signal Behav*, 4:669-671.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res*, 105:1413–1421.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., Choi, Y.D. (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(8):4788-93.
- Serfling, A., Wirsel, S.G.R., Lind, V., Deising, H.B. (2007) Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. *Phytopathol*, 97:523-531.
- Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A., Oelmüller, R. (2008) The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Arabidopsis by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. *Mol Plant Microbe Interact*, 21(6):799-807.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., Sun, T. (1998) The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell*, 10:155–169.
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., Sun, T.P. (2001) Repressing a repressor: gibberellin induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell*, 13:1555–1566.
- Sirrenberg, A., Göbel, C., Grond, S., Czempinski, N., Ratzinger, A., Karlovsky, P., Santos, P., Feussner, I., Pawlowski, K. (2007) *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiol Plant*, 131(4):581-9.
- Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 3:3.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*, 31:425–448.
- Spielmeyer, W., Ellis, M., Robertson, M., Ali, S., Lenton, J.R., Chandler, P.M. (2004) Isolation of gibberellin metabolic pathway genes from barley and comparative mapping in barley, wheat and rice. *Theor Appl Genet*, 109(4):847-55.
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D., Katagiri, F. (2008) Interplay between MAMP triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J*, 53:763–775.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., Matsuoka, M. (2005)

- GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437:693–698.
- Vadassery, J., Ritter, C., Venus, Y., Camehl, I., Varma, A., Shahollari, B., Novák, O., Strnad, M., Ludwig-Müller, J., Oelmüller, R. (2008) The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol Plant Microbe Interact*, 21(10):1371-83.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 36:453–483.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 44:135 – 162.
- Van Wees, S.C., Pieterse, C.M., Trijssenaar, A., Van't Westende, Y.A., Hartog, F., Van Loon, L.C. (1997) Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol Plant Microbe Interac*, 10:716–24.
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütchorn, B., Franken, P. (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth promoting root endophyte. *Appl Environ Microbiol*, 65:2741-2744.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Bütchorn, B., Franken, P. (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*, 90:898–905.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chételat, A., Farmer, E.E. (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J*, 24: 467–476.
- Vörös, K., Feussner, I., Kühn, H., Lee, J., Graner, A., Löbler, M., Parthier, B., Wasternack, C. (1998) Characterization of a methyljasmonate-inducible lipxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. *Salome*) leaves. *Eur J Biochem*, 251:36–44.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hüchelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein D., Franken, P., Kogel, K.H. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:13386–13391.
- Walter, M.H., Fester, T., Strack, D. (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. *Plant J*, 21(6):571-8.
- Walter, M.H., Hans, J., Strack, D. (2002) Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J*, 31(3):243-54.

- Wan, J.R., Zhang, X.C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S.Y., Stacey, M.G. and Stacey, G. (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20: 471–481.
- Wang, B., Qiu, Y.L. (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16:299–363.
- Wang, Y.S., Pi, L.Y., Chen, X., Chakrabarty, P.K., Jiang, J., De Leon, A.L., Liu, G.Z., Li, L., Benny, U., Oard, J., Ronald, P.C., Song, W.Y. (2006) Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell*, 18:3635-46.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., Dong, X. (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol*, 17:1784–1790.
- Ward, E.W.B., Cahill, D.M., Bhattacharyya, M. (1989) Abscisic acid suppression of phenylalanine ammonia lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma* f.sp. *Glycinea*. *Plant Physiol*, 91:23–27.
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I., Miersch, O. (2006) The wound response in tomato--role of jasmonic acid. *J Plant Physiol*, 163(3):297-306.
- Weber, H., Chételat, A., Caldelari, D., Farmer, E.E. (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell*, 11:485–494.
- Weiss, M., Selosse, M.A., Rexer, K.H., Urban, A., Oberwinkler, F. (2004) Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycol Res*, 108:1003–1010.
- Wen, C.K., Chang, C. (2002) Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell*, 14:87–100.
- Whipps, J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot*, 52:487-511.
- Yamada, T. (1993) The role of auxin in plant-disease development. *Annu Rev Phytopathol*, 31:253–273.
- Yamaguchi, S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, 59:225–251.
- Yamahara, T., Shiono, T., Suzuki, T., Tanaka, K., Takio, S., Sato, K., Yamazaki, S., Satoh, T. (1999) Isolation of a germin-like protein with manganese superoxide dismutase activity from cells of a moss, *Barbula unguiculata*. *J Biol Chem*, 274:33274–33278.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S., Nakashita, H. (2008)

- Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20:1678–1692.
- Zhang, X.C., Wu, X., Findley, S., Wan, J., Libault, M., Nguyen, H.T., Cannon, S.B., Stacey, G. (2007) Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. *Plant Physiol*, 144(2):623-36.
- Zimmermann, G., Baumlein, H., Mock, H.P., Himmelbach, A., Schweizer, P. (2006) The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in basal host resistance. *Plant Physiol*, 142:181-192.
- Zipfel, C., Felix, G. (2005) Plant and animal: a different taste for microbes. *Curr Opin Plant Biol*, 8:353 -360.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E., Jones, J.D.G., Felix, G., Boller, T. (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428:764–767.
- Zipfel, C. (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 20:10-16.
- Zuccaro, A., Basiewicz, M., Zurawska, M., Biedenkopf, D., Kogel, K.H. (2009) Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*. *Fungal Genet Biol*, 46(8):543-50.
- Zwar, J.A., Chandler, P.M. (1995) α -Amylase production and leaf protein synthesis in gibberellin-responsive dwarf mutant of 'Himalaya' barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta*, 197:39-48.

7. Anhang

Tab. 7.1: Kandidaten der Affymetrix-Microarrays 1 dai. Liste aller durch *P. indica* > 1,8-fach differentiell regulierter Transkripte 1 dai mit dem jeweiligen *fold change* (FC).

Annotation	probe set	FC
LEA2 protein related cluster	Contig2406_at	3,14
LEA2 protein related cluster	EBro08_SQ007_B12_s_at	2,93
Putative phosphatidylglycerol specific phospholipase C related cluster	HA10E24r_at	2,71
Class III peroxidase 135 precursor related cluster	Contig6515_at	2,37
Putative ethylene-responsive transcriptional coactivator related cluster	Contig18796_at	2,26
Peroxidase 6 related cluster	HVSMEm0021O22r2_x_at	2,26
GCN5-related N-acetyltransferase-like related cluster	Contig10924_at	2,23
Auxin-regulated protein-like protein related cluster	Contig8839_at	2,11
Actin-11 related cluster	Contig1390_5_at	2,03
	EBem09_SQ005_D09_at	1,99
	HV14K13u_at	1,98
	Contig7654_at	1,97
Putative selenium binding protein related cluster	Contig2837_at	1,96
Hypothetical protein P0445D12.15 related cluster	Contig13039_s_at	1,94
BZIP transcription factor related cluster	Contig15335_s_at	1,94
Hypothetical protein OSJNBa0093M23.5 related cluster	Contig11491_at	1,91
Putative selenium binding protein related cluster	EBma08_SQ004_C15_s_at	1,91
	Contig4751_at	1,9
Electron transfer oxidoreductase, putative related cluster	HV06K05u_s_at	1,89
Putative glyoxylate induced protein related cluster	Contig9882_at	1,88
Hypothetical protein OSJNBa0030C08.6 related cluster	Contig12383_at	1,87
Hypothetical protein related cluster	Contig4247_at	1,85
Putative lipase related cluster	Contig8646_at	1,84
Putative translation elongation factor P related cluster	EBpi01_SQ005_B24_at	1,83
OSJNBb0034I13.13 protein related cluster	HV_CEb0010M02r2_s_at	1,8
16.9 kDa class I heat shock protein related cluster	Contig2007_s_at	-1,83
At5g49570 related cluster	Contig18871_at	-1,84
Putative harpin inducing protein related cluster	Contig11615_s_at	-1,85
Hypothetical protein P0519E12.120 related cluster	Contig18074_at	-1,85
putative 1,4-benzoquinone reductase' related cluster	Contig5217_at	-1,85
Transducin / WD-40 repeat protein-like related cluster	Contig6243_at	-1,85
40S ribosomal protein S16 related cluster	Contig1603_at	-1,88
	EBem05_SQ001_G16_at	-1,88
Probable potassium transporter 15 related cluster	Contig15800_at	-1,89
similar to histone 1, H2ai (predicted)	HA22C01r_s_at	-1,92
NPH3 family protein related cluster	EBpi07_SQ002_P18_s_at	-1,96
Cytochrome P450 related cluster	HVSMEa0013F14r2_at	-1,97
	HS05K07u_at	-1,99
Glycosyl hydrolases family 17, putative related cluster	HV_CEb0021I03r2_at	-2,01
	Contig3142_at	-2,02
	HW06P12u_x_at	-2,03
Hypothetical protein OSJNBa0087O09.6 related cluster	Contig10485_at	-2,04
	HW08F07V_x_at	-2,06
	Contig19111_at	-2,08
Putative peroxidase related cluster	HW05C10u_s_at	-2,1
	HVSMEf0023D17f_x_at	-2,15
Lipid transfer protein-like protein related cluster	Contig3783_s_at	-2,3
	Contig1309_at	-2,34
OSJNBa0010H02.23 protein related cluster	Contig11853_at	-2,37
	HT09J20u_x_at	-2,41
Iron-deficiency specific clone No.3 related cluster	Contig12916_s_at	-2,51
At3g13650 related cluster	HVSMEg0005E17r2_s_at	-2,69
Putative cobW protein related cluster	Contig9974_at	-2,71

Boron transporter related cluster	Contig14139_at	-3,47
	Contig1751_x_at	-4,26
	HW01B13u_at	-7,58

Tab. 7.2: Kandidaten der Affymetrix-Microarrays 3 dai. Liste aller durch *P. indica* > 1,8-fach differentiell regulierter Transkripte 3 dai mit dem jeweiligen *fold change* (FC).

Annotation	probe set	FC
Pathogenesis-related protein 10 related cluster	Contig4405_x_at	10,21
Pathogenesis-related protein 10 related cluster	Contig4402_s_at	7,42
	MitoContig11_at	3,94
	HVSMef0023D17f_x_at	3,74
	Contig3157_at	3,72
OSJNBa0096F01.14 protein related cluster	Contig25605_at	3,7
Putative phosphatidylglycerol specific phospholipase C related cluster	HA10E24r_at	3,67
Pathogenesis-related protein 10 related cluster	HD08F14r_x_at	3,1
Putative dihydroipoamide S-acetyltransferase related cluster	rbaal31f01_s_at	2,99
Hypothetical protein precursor related cluster	Contig590_at	2,97
Putative cytochrome P450 related cluster	Contig10985_at	2,96
Pathogenesis-related protein 10 related cluster	Contig4406_x_at	2,51
Transposable element protein, putative related cluster	Contig8111_at	2,36
Putative histidine-rich protein related cluster	Contig6309_at	2,28
	Contig1751_x_at	2,09
Chromatin structure remodeling complex protein BSH related cluster	Contig6183_at	2,02
Germin-like protein precursor related cluster	Contig3156_s_at	2
Putative SINA2 protein, seven in absentia related cluster	Contig10787_at	1,95
	HVSMEm0002G22r2_at	1,94
Chloroplast protein-translocon-like protein related cluster	Contig16500_at	1,91
	HVSMEn0020F17r2_x_at	1,9
P0497A05.16 protein related cluster	S0001000015G12F1_s_at	1,89
	Contig3193_at	1,85
H0103C06.8 protein related cluster	Contig12326_at	1,81
	Contig20407_at	1,81
Bowman-Birk type trypsin inhibitor related cluster	Contig10717_at	-1,81
16.9 kDa class I heat shock protein related cluster	Contig2007_s_at	-1,81
Hypothetical protein P0427D10.108 related cluster	HT13J15r_s_at	-1,82
	Contig2118_at	-1,83
Hypothetical protein related cluster	Contig23584_at	-1,83
	HT07A03u_at	-1,85
	AB011266_at	-1,88
Hypothetical protein P0427D10.108 related cluster	HT13J15r_at	-1,89
Hypothetical protein OJ1362_D02.1 related cluster	HS01M21w_s_at	-1,94
	Contig12650_at	-1,95
Putative methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial related cluster	Contig9789_s_at	-1,96
Metallothionein-like protein related cluster	Contig2422_at	-1,97
Metallothionein-like protein related cluster	Contig2424_at	-1,97
Putative membrane protein related cluster	Contig9715_s_at	-1,97
Putative 41 kD chloroplast nucleoid DNA binding protein related cluster	Contig11996_at	-1,98
Putative ripening-related protein 6 precursor related cluster	Contig9469_s_at	-1,98
Hypothetical protein P0644B06.26 related cluster	Contig9734_at	-1,99
Expressed protein related cluster	Contig17410_at	-2,04
Nicotianamine synthase 8 related cluster	Contig10741_at	-2,06
Nicotianamine aminotransferase related cluster	Contig7288_at	-2,06
23 kDa jasmonate-induced protein related cluster	Contig1678_s_at	-2,13
Iron-deficiency specific clone No.3 related cluster	D37796_at	-2,14
Metallothionein-like protein 1 related cluster	Contig2421_at	-2,15
	Contig24666_at	-2,19
Dihydroipoamide dehydrogenase related cluster	Contig451_at	-2,28
Leaf-specific thionin DB4 precursor related cluster	Contig1570_s_at	-2,33
	Contig13817_at	-2,35

	AB011264_at	-2,46
	Contig10740_at	-2,65
Expressed protein related cluster	Contig23219_at	-6,13
	HV03G23u_x_at	-12,22

Tab. 7.3: Kandidaten der Affymetrix-Microarrays 7 dai. Liste aller durch *P. indica* > 1,8-fach differentiell regulierter Transkripte 7 dai mit dem jeweiligen *fold change* (FC).

Annotation	probe set	FC
Expressed protein related cluster	Contig4812_at	10,13
	HVSMEb0008C20r2_x_at	6,14
Hypothetical protein related cluster	Contig18358_x_at	5,65
Germin-like protein precursor related cluster	Contig3155_s_at	4,96
	HVSMEf0023D17f_x_at	4,81
Expressed protein related cluster	HVSMEb0011117r2_s_at	4,17
ABCF-type protein related cluster	baak19i22_s_at	2,83
O-methyltransferase related cluster	Contig5311_at	2,71
	HVSMEb0014C02r2_at	2,66
Glycine rich protein, RNA binding protein related cluster	Contig15_s_at	2,53
OSJNBa0067K08.5 protein related cluster	Contig23391_at	2,38
Lipoxygenase 2 related cluster	HVSMEf0009L21r2_s_at	2,31
Lung seven transmembrane receptor, putative related cluster	Contig15922_at	2,27
Hypothetical protein OSJNBa0061H20.2 related cluster	HY06G13u_at	2,26
OSJNBa0042I15.8 protein related cluster	Contig6733_at	2,25
OSJNBa0086B14.19 protein related cluster	EBro04_SQ001_H21_at	2,25
OSJNBa0096F01.14 protein related cluster	Contig25605_at	2,19
	HVSMEa0011L19r2_x_at	2,17
	Contig2491_at	2,09
Membrane acyl-CoA binding protein related cluster	Contig4283_at	2,08
Leaf-specific thionin DB4 precursor related cluster	Contig1570_s_at	2,04
Putative cytochrome P450 related cluster	Contig10985_at	2,03
	Contig3157_at	2,02
Putative Serine/threonine Kinase related cluster	Contig14940_at	2,01
Chitinase related cluster	Contig2992_s_at	2,01
Putative NAM (No apical meristem) protein related cluster	Contig14026_at	2
Chitin-inducible gibberellin-responsive protein 2 related cluster	Contig5444_s_at	1,98
	HT06G21u_x_at	1,96
Hypothetical protein P0481E12.9 related cluster	Contig18622_at	1,92
Putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase related cluster	Contig2639_at	1,92
Germin-like protein precursor related cluster	Contig3156_s_at	1,91
Lipoxygenase 2 related cluster	Contig1735_s_at	1,88
Putative membrane related protein CP5 related cluster	Contig8831_at	1,88
R40g3 protein related cluster	HW03F12u_s_at	1,88
Hypothetical protein P0459B01.27 related cluster	Contig25707_at	1,86
	EBro02_SQ006_O21_s_at	1,85
Putative aldehyde oxidase related cluster	Contig15797_at	1,84
	HT08L11u_x_at	1,84
PDR-like ABC transporter related cluster	Contig20553_at	1,83
Putative LytB protein related cluster	Contig3848_at	1,82
OSJNBa0088H09.13 protein related cluster	Contig4646_at	-1,8
Glycine-rich protein-like related cluster	Contig6726_at	-1,81
	HVSMEg0010B23r2_at	-1,81
	HVSMEg0005M22r2_at	-1,82
Putative dihydrolipoamide S-acetyltransferase related cluster	rbaal31f01_s_at	-1,82
	rbaal38c18_at	-1,82
Putative heat stress transcription factor Spl7 related cluster	Contig18870_at	-1,83
Alcohol dehydrogenase 3 related cluster	Contig393_at	-1,84
Putative mitochondrial processing peptidase related cluster	Contig8352_at	-1,84
Hypothetical protein P0427D10.108 related cluster	HT13J15r_s_at	-1,87
Putative peroxidase related cluster	HW05C10u_s_at	-1,87

Expressed protein related cluster	EBro03_SQ008_I11_at	-1,88
Zinc finger protein-like related cluster	Contig4486_at	-1,9
	Contig14826_at	-1,91
	Contig4324_at	-1,93
At3g13650 related cluster	HVSMEg0005E17r2_s_at	-1,94
	AB011264_at	-1,95
	Contig21349_at	-1,95
Hypothetical protein related cluster	Contig12979_s_at	-1,96
	Contig19111_at	-1,96
	HV14K13u_at	-1,96
BRI1-KD interacting protein 118 related cluster	Contig11716_at	-1,97
Emsy N terminus domain-containing protein-like related cluster	HVSMEg0010M24r2_s_at	-2,05
60S ribosomal protein L44 related cluster	Contig2129_x_at	-2,06
NAD-dependent malic enzyme 62 kDa isoform, mitochondrial precursor related	Contig5489_at	-2,09
Putative low temperature and salt responsive protein related cluster	Contig15171_at	-2,1
Putative ripening-related protein 6 precursor related cluster	Contig9469_s_at	-2,15
Cluster related to UPI000043DF0B; Putative cysteine proteinase	Contig8896_s_at	-2,17
Putative subtilisin-like proteinase related cluster	Contig12029_s_at	-2,21
Hypothetical protein P0499C11.31 related cluster	Contig7275_at	-2,27
Cluster related to UPI000058781E; similar to CG8385-PB, isoform B	Contig1008_x_at	-2,29
Putative cysteine proteinase related cluster	EBma01_SQ002_F07_s_at	-2,29
Eukaryotic translation initiation factor 4E-2 (eIF4E-2) (eIF-4E-2) related cluster	Contig5933_at	-2,37
Acrosin precursor (EC 3.4.21.10) (53 kDa fucose-binding protein)] related cluster	Contig13171_at	-2,55
	Contig1751_x_at	-2,63
H0410G08.7 protein related cluster	Contig5348_s_at	-3,02
	HVSMEg0015H12r2_s_at	-3,03
H0410G08.7 protein related cluster	Contig11923_at	-3,19
	HW07G24u_at	-3,45
Hypothetical protein OJ1111_B11.5 related cluster	HK06N02r_s_at	-3,68
H0410G08.7 protein related cluster	Contig3512_s_at	-3,85
	HV03G23u_x_at	-5,52

Tab. 7.4: Liste aller verwendeter Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende angegeben.

Bezeichnung	Acession-Nummer/ Unigene	Primerbezeichnung	Sequenz (5' 3')
<i>Hordeum vulgare</i> Ubiquitin	M60175	HvUbi_for	CAGTAGTGGCGGTCTGAAGTG
		HvUbi_rev	ACCCTCGCCGACTACAACAT
<i>P. indica</i> Translations- elongationsfaktor EF1 α	AJ249912	PiTef_for	TCGTCTGTCAACAAGATG
		PiTef_rev	ACCGTCTTGGGGTTGTATCC
<i>pathogenesis-related protein 1b (PR1b)</i>	Z21494	PR1b_for	GGACTACGACTACGGCTCCA
		PR1b_rev	GGCTCGTAGTTGCAGGTGAT
<i>pathogenesis-related protein 10 (PR10)</i>	AY220734	PR10_for	GGAGGGCGACAAGGTAAGTG
		PR10_rev	CGTCCAGCCTCTCGTACTCT
<i>23 kDa jasmonic acid induced protein (JIP23)</i>	X98124	JIP23_for	GGAGTGTTTGGTACCCCAT
		JIP23_rev	GGCACCAGTGGCATTGTAGA
<i>Terpensynthase 7 (TPS7)</i>	AY518316	TPS_for	ACCAAGGAAGCACTGGAATG
		TPS_rev	ATCTTGTC AATGGCGACCTC
<i>pathogenesis-related protein 5 (PR5)</i>	AY839293	PR5_for	TAGAGCTTGCAGCAATGTGCGACC
		PR5_rev	CCTGAGCCCAGCTCGAAG
<i>syn-Copalylidiphosphat- synthase (syn-CPS)</i>	AY530101	27003_for	GAACGACTCTGGCGTCATTG
		27003_rev	GAGGTGAATTGCGGTCCATC
<i>Slender 1 (SLN1)</i>	AF460219	SLN1_for	CCGCGATTATTGGCTAGGTA
		SLN1_rev	ACGACGACACCATCATCTTG
<i>SLEEPY1 (SLY1)</i>	AC097280	SLY1_for	GACCGAACGGAAGAAGATGA
		SLY1_rev	GCATGTTCCGATCCACAGTA
<i>GA-insensitive dwarf 1 (GID1)</i>	CAO98733	GID1_for	ATCCCACCCGTAGCTCAAAC
		GID1_rev	GCTGCTGCTGCTTATCTTCC
<i>GA-insensitive dwarf 2 (GID2)</i>	AB100246	GID2_for	GCTGTCGCTCTTCTCGAT
		GID2_rev	CTTGTCCAGACTAGCTGTTAGG

Tab. 7.5: Kandidaten der Agilent-Microarrays 1, 3 und 7 dai. Liste aller durch *P. indica* > 2-fach differentiell regulierter Transkripte zu den verschiedenen Zeitpunkten 1, 3 und 7 dai (p-Value >0,05). Die erste Spalte beinhaltet die Gen-Identifikationsnummer, die zweite Spalte die Annotation, die dritte Spalte die Accessionnummer, die vierte Spalte die funktionelle Kategorie, und Spalten fünf bis sieben den jeweiligen *fold change* der Zeitpunkte 1, 3 und 7 dai. Abkürzungen: FC: *fold change*; Gen-ID: Gen-Identifikationsnummer; ZW: Zellwandmetabolismus; ZS: Zytoskelett; AbStr: Abwehr-/ Stress-bezogen; DNA: DNA-Metabolismus/ Genomorganisation; Hor: Hormonmetabolismus; Lip: Lipid-metabolismus; Nähr: Nährstoffspeicherung; Son: Sonstige; Prim: Primärmetabolismus; Pdeg: Protein-degradation; Pmet: Proteinmetabolismus; Rez: Rezeptoren; Sek: Sekundärmetabolismus; Sig: Signalübertragung; TkP: Transkription/ Proteinbiosynthese; Trans: Transporter/ Kanäle; U: Unbekannt.

Gen-ID	Annotation	Accession	Funkt. Kategorie	FC 1 dai	FC 3 dai	FC 7 dai
U35_34993	vegetative cell wall protein gp1 -like	BAD68319.1	ZW			
U35_11638	putative H ⁺ -exporting ATPase	BAD19091.1	ZW	3,13		
U35_19010	alpha-rhamnosidase-like protein	BAC83370.1	ZW	2,95		
U35_35557	putative polygalacturonase	BAD19438.1	ZW	2,71		
U35_29281	Pectinesterase family protein	ABA95296.1	ZW	-2,09		
U35_3804	putative glycine rich protein	BAD61566.1	ZW		4,10	2,93
U35_26317	Glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain containing protein	ABF98881.1	ZW		2,64	
U35_22777	cellulose synthase-like CslF9	ABZ01581.1	ZW		-2,00	
U35_22144	Root-specific lectin precursor	P15312	ZW		-2,12	
U35_422	xyloglucan endotransglycosylase (XET)	CAA63662.1	ZW		-2,26	
U35_41618	Xet3 protein	CAC40809.1	ZW		-2,33	
U35_16456	Alpha-L-arabinofuranosidase C-terminus family protein	ABA91369.1	ZW		-2,36	
U35_1977	putative pectinesterase	BAD45460.1	ZW		-3,58	
U35_177	xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH3	AAS46241.1	ZW		-3,58	
U35_25078	polysaccharide lyase family 14 protein	XP_001878109.1	ZW		-3,75	
U35_38256	putative aldose reductase	BAB64275.1	ZW			2,92
U35_39662	putative xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase	BAD08162.1	ZW			2,79
U35_41715	pherophorin-like protein	BAD68701.1	ZW			2,01
U35_49179	putative cinnamyl alcohol dehydrogenase	BAD28500.1	ZW	2,59		
U35_31569	cinnamyl alcohol dehydrogenase	AAL99536.1	ZW			-2,81
U35_16583	cinnamoyl CoA reductase	BAD19133.1	ZW			-4,40
U35_46249	AP-1 adaptor complex subunit mu, putative	XP_001274087.1	ZS	2,57		
U35_29410	Exo70 exocyst complex subunit family protein	ABA95888.1	ZS		-2,15	
U35_46884	Secretory carrier-associated membrane protein	Q75IC7.1	ZS			3,46
U35_25021	EXOCYST SUBUNIT EXO70 FAMILY PROTEIN A1	NP_195974.2	ZS			2,44
U35_8698	LAs17 Binding protein-like	BAC83843.1	ZS			2,21
U35_13894	putative endoplasmatic reticulum retrieval protein Rer1B	BAD53619.1	ZS			2,04
U35_22770	putative exosome component 4	BAD22331.1	ZS			-2,51
U35_42356	synaptobrevin	XP_001554594.1	ZS			-3,53
U35_28431	novel protein similar to vertebrate spectrin repeat containing, nuclear envelope 1 (SYNE1)	CAI12049.2	ZS			-3,72
U35_32342	map/microtubule affinity-regulating kinase 2,4	XP_001866823.1	ZS	3,36		
U35_25557	putative myosin XI	BAD16376.1	ZS	-2,36		
U35_9182	kinesin heavy chain	XP_001843236.1	ZS		12,31	9,46
U35_12087	Formin-like protein 13	Q9LVN1.2	ZS		3,53	
U35_36627	beta tubulin 2	CAM58980.1	ZS		-2,49	
U35_14165	actin	AAW56958.1	ZS			2,18

U35_47247	Formin-like protein 6	Q6ZCX3.2	ZS			-2,47
U35_44238	TOC75_ORYSJ Protein TOC75, chloroplast precursor (75 kDa translocon at the outer-envelope-membrane of chloroplasts)	Q84Q83	ZS	3,52		
U35_31491	PTS protein-like	BAD33323.1	ZS		2,10	
U35_20185	peroxisome biogenesis factor 7	AAN39560.1	ZS			3,50
U35_32325	putative Nuclear pore complex protein Nup155	BAD62392.1	ZS			-3,15
U35_14532	dehydrin 4	ABO14397.1	AbStr	36,35		
U35_14533	dehydrin 4	AAF01692.1	AbStr	32,37		
U35_789	LEA protein	BAD22766.1	AbStr	25,67		
U35_20640	LEA protein 12	AAT99310.1	AbStr	13,52	-4,06	
U35_14544	dehydrin 6	AAF01694.1	AbStr	12,93		
U35_17661	WSI18 protein induced by water stress	BAB44029.1	AbStr	10,66		
U35_18037	LE25	Q00747	AbStr	9,83		
U35_14542	dehydrin 7	AAX14224.1	AbStr	8,09		
U35_31171	LEA1 protein	AAN74637.1	AbStr	6,85		
U35_45168	LEA protein	BAD22766.1	AbStr	4,60		
U35_831	glyoxalase family-like protein	BAC83945.1	AbStr	4,58		
U35_15919	putative beta-1,3-glucanase	BAC84505.1	AbStr	4,34		
U35_1235	hypersensitive-induced reaction protein 3	AAN17464.1	AbStr	3,50		
U35_48111	peroxidase-like protein	BAD82471.1	AbStr	3,16		
U35_17368	tocopherol cyclase	ABE41800.1	AbStr	3,07		
U35_15828	pathogenesis-related protein 10	AAP04429.1	AbStr	3,03	7,12	6,21
U35_16218	Non-symbiotic hemoglobin (HORvu GLB1)	Q42831.1	AbStr	2,96		
U35_6165	disease resistance protein RPM1, putative	ABA97409.1	AbStr	2,67		
U35_23834	callose synthase 1 catalytic subunit-like protein	BAD87670.1	AbStr	2,66		
U35_6811	putative syringolide-induced protein B13-1-1	BAD33459.1	AbStr	2,59	13,87	11,81
U35_40698	putative protein kinase Xa21	BAC10827.1	AbStr	2,52		
U35_48374	putative protein kinase Xa21	BAD19467.1	AbStr	2,50		
U35_21911	putative germin A	BAD05737.1	AbStr	2,40	13,45	10,90
U35_15826	pathogenesis-related protein 10	AAP04429.1	AbStr	2,19	5,12	4,86
U35_3942	putative blue copper binding protein	BAD03004.1	AbStr	2,15		
U35_10620	Putative laccase-18 precursor	A2XCN6	AbStr	2,11	4,61	2,01
U35_24296	putative rust resistance kinase Lr10	BAB17127.1	AbStr	-2,00		
U35_10019	NBS-LRR disease resistance protein homologue	CAD45029.1	AbStr	-2,07		
U35_26357	Vrga1	AAF19148.1	AbStr	-2,11		
U35_49169	MAK16-like protein (IC)	CAL52146.1	AbStr	-2,12		
U35_13456	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GIV	Q02437	AbStr	-2,23		
U35_2276	putative protein kinase Xa21	BAD19467.1	AbStr	-2,27		
U35_14157	class III peroxidase 107 precursor	CAH69349.1	AbStr	-2,31		
U35_40410	RGA2	ABS88264.1	AbStr	-2,33	2,08	
U35_49240	putative disease resistance protein RPS2	BAD53266.1	AbStr	-2,36		
U35_47347	harpin-induced protein-related-like	BAB85244.1	AbStr	-2,43		
U35_36622	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein-like	BAD35804.1	AbStr	-2,68		
U35_7483	putative verticillium wilt disease resistance protein	BAD68095.1	AbStr	-2,76		
U35_46704	laccase LAC12	AAN59950.1	AbStr	-3,56		
U35_32330	putative protein kinase Xa21	BAD05503.1	AbStr	-3,69		
U35_49076	putative Erwinia induced protein 1	BAD38015.1	AbStr	-3,74		
U35_14325	basal layer antifungal peptide	NP_001105658.1	AbStr	-3,82		
U35_48916	Harpin-induced protein 1 containing protein, expressed	ABA91314.1	AbStr	-5,33		
U35_19086	putative UVB-resistance protein	BAD33304.1	AbStr	-8,32		
U35_33564	germin-like protein 4d	ABG46236.1	AbStr		12,73	11,68
U35_13049	Putative laccase-19 precursor	A2Y9C5	AbStr		12,67	

U35_13229	putative germin A	BAD05742.1	AbStr		10,57	10,90
U35_6898	pathogenesis-related protein	CAA71773.1	AbStr		9,47	6,38
U35_14954	germin-like protein 4c	ABG46235.1	AbStr		8,76	10,38
U35_14951	germin A	AAG00425.1	AbStr		8,32	13,26
U35_17800	Elicitor-responsive protein 1	Q0JHU5.1	AbStr		7,43	3,07
U35_3653	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	ZP_02297561.1	AbStr		6,95	2,78
U35_14950	germin-like protein 4c	ABG46235.1	AbStr		6,91	7,67
U35_14955	oxalate oxidase-like protein or germin-like protein	CAA63659.1	AbStr		6,85	5,96
U35_16427	putative blue copper binding protein	BAD03003.1	AbStr		6,30	3,62
U35_43197	germin-like protein 4c	ABG46235.1	AbStr		6,16	3,93
U35_18546	Elicitor-responsive protein 1	Q0JHU5.1	AbStr		5,79	5,33
U35_702	PR-1a pathogenesis related protein (Hv-1a)	CAA52893.1	AbStr		5,69	
U35_704	Pathogenesis-related protein 1 precursor	Q05968	AbStr		5,42	
U35_20557	HcrVf1 protein-like	BAB89968.1	AbStr		5,15	7,66
U35_43501	Putative laccase-19 precursor	A2Y9C5	AbStr		4,59	2,51
U35_703	PR-1a pathogenesis related protein (Hv-1a)	CAA52893.1	AbStr		4,34	
U35_15287	blue copper-binding protein	ABU56004.1	AbStr		4,19	2,83
U35_25842	predicted protein of CLR family	XP_001699113.1	AbStr		4,07	
U35_6982	putative immediate-early fungal elicitor protein CMPG1	BAD16037.1	AbStr		3,98	4,31
U35_17890	disease resistance response protein/dirigent protein, putative	AAX96314.1	AbStr		3,95	2,26
U35_15273	Oxalate oxidase 2 precursor	P45851	AbStr		3,77	
U35_8949	putative blue copper binding protein	BAD03003.1	AbStr		3,68	7,40
U35_15620	chitinase IV precursor	AAD28733.1	AbStr		3,58	2,12
U35_19415	NBS-LRR disease resistance protein homologue	CAD45027.1	AbStr		3,54	
U35_15289	blue copper-binding protein	ABU56004.1	AbStr		3,53	2,42
U35_23548	putative protein kinase Xa21	BAD68717.1	AbStr		3,52	
U35_14156	class III peroxidase 107 precursor	CAH69349.1	AbStr		3,48	
U35_945	glutathione S-transferase	ABU56005.1	AbStr		3,48	2,33
U35_13184	syringolide-induced protein 1-3-1B-like protein	BAD73836.1	AbStr		3,44	
U35_14552	pathogenesis-related protein	CAA71773.1	AbStr		3,43	6,44
U35_28599	putative antifungal zeamatin-like protein	AAS07338.1	AbStr		3,40	
U35_946	glutathione S-transferase	ABU56005.1	AbStr		3,22	
U35_15708	thaumatin-like protein TLP8	AAK55326.1	AbStr		3,13	3,48
U35_31317	Dirigent-like protein	ABA91734.1	AbStr		3,08	2,34
U35_15288	blue copper binding protein	CAE51320.1	AbStr		2,96	2,81
U35_50221	putative peroxidase	BAC45201.1	AbStr		2,93	
U35_23184	glutathione S-transferase GSTU6	AAM12330.1	AbStr		2,92	
U35_7374	blue copper-binding protein	AAU84431.1	AbStr		2,88	4,16
U35_31622	class III peroxidase 106 precursor	CAH69348.1	AbStr		2,86	
U35_5923	class III chitinase RCB4	AAK26395.1	AbStr		2,83	3,17
U35_39680	putative rust resistance kinase Lr10	BAD52487.1	AbStr		2,80	2,69
U35_7685	peroxidase 1 precursor-like protein	BAC84009.1	AbStr		2,72	
U35_20300	Mlo3	AAS93431.1	AbStr		2,69	
U35_43352	blue copper-binding protein	AAU84431.1	AbStr		2,65	2,48
U35_20558	putative Cf2/Cf5 disease resistance protein	BAC65975.1	AbStr		2,56	5,27
U35_40770	WRKY1	AAD32677.1	AbStr		2,52	
U35_21934	glutathione-S-transferase	AAL47688.1	AbStr		2,38	3,14
U35_15274	oxalate oxidase	CAA74595.1	AbStr		2,35	
U35_39396	putative immediate-early fungal elicitor protein	BAD45713.1	AbStr		2,35	
U35_32917	putative LZ-NBS-LRR class RGA	BAD23250.1	AbStr		2,33	2,04
U35_5960	putative immunophilin / FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans	BAD03102.1	AbStr		2,22	

U35_35337	putative protein kinase Xa21	BAD19465.1	AbStr		2,22	
U35_11996	putative Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 141	BAD33805.1	AbStr		2,21	2,22
U35_22561	putative protein kinase Xa21	BAD17688.1	AbStr		2,21	
U35_4430	putative blue copper binding protein	BAD03004.1	AbStr		2,16	2,12
U35_487	WIR1A	Q01482.1	AbStr		2,10	3,38
U35_21876	HcrVf1 protein-like	BAB89968.1	AbStr		2,10	2,12
U35_20965	putative class IV chitinase	BAD19330.1	AbStr		2,08	2,46
U35_249	PR17c precursor	ABV22582.1	AbStr		2,03	4,80
U35_27956	putative peroxidase	BAD15723.1	AbStr		2,03	
U35_30934	lycogenin glucosyltransferase (glycogenin)-like protein	BAD15458.1	AbStr		2,03	
U35_21731	csAtPR5	ABU55301.1	AbStr		-2,32	
U35_1074	metallothionein-like protein type 4	CAD88267.1	AbStr		-2,42	
U35_20358	putative defensin	BAD23741.1	AbStr		-2,53	
U35_23447	HFR-3	ABE77384.1	AbStr		-2,55	
U35_14534	dehydrin 5	AAD02262.1	AbStr		-3,00	
U35_48451	Catalase-1	Q43206	AbStr		-4,07	
U35_4777	putative stress-responsive protein	BAB92723.1	AbStr		-5,92	
U35_25017	Jacalin-like lectin domain containing protein	ABA94732.1	AbStr			7,90
U35_33638	putative laccase	NP_001105875.1	AbStr			5,56
U35_34098	NB-ARC domain, putative	AAX95465.1	AbStr			3,87
U35_5984	WIR1B	Q01481.1	AbStr			3,56
U35_17716	WIR1A	Q01482.1	AbStr			2,98
U35_20826	immunophilin, putative / FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	NP_187617.1	AbStr			2,98
U35_36507	thionin-like peptide	AAX19516.1	AbStr			2,90
U35_3742	NBS-LRR type resistance protein	AAB96976.1	AbStr			2,89
U35_22352	putative immediate-early fungal elicitor protein CMPG1	BAD16037.1	AbStr			2,75
U35_11723	putative Cf2/Cf5 disease resistance protein homolog	BAC65975.1	AbStr			2,66
U35_1898	putative CPRD2	BAD53702.1	AbStr			2,56
U35_29677	Endo-1,4-beta glucanase 15	Q6L412	AbStr			2,55
U35_8682	ascorbate oxidase	AAV47050.1	AbStr			2,46
U35_37619	putative rust resistance kinase Lr10	BAB17127.1	AbStr			2,41
U35_38976	Pathogenesis-related protein 1A/1B precursor	P32937	AbStr			2,39
U35_15377	Pathogenesis-related protein 1C precursor	P32938	AbStr			2,35
U35_157	PR17c precursor	ABV22582.1	AbStr			2,26
U35_147	oxalate oxidase	AAF34811.1	AbStr			2,21
U35_40564	putative Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein	BAD16491.1	AbStr			2,15
U35_6939	glutathione S-transferase GST 24	NP_001104988.1	AbStr			2,11
U35_509	Thionin BTH7 precursor	Q42838	AbStr			2,11
U35_7561	putative Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 264	BAD38072.1	AbStr			2,09
U35_5554	putative disease resistance protein RPM1	BAD05298.1	AbStr			2,09
U35_22685	NBS-LRR disease resistance protein-like	BAB03441.1	AbStr			2,08
U35_15891	putative glutathione transferase	BAD28950.1	AbStr			2,05
U35_37792	putative glutathione S-transferase OsGSTF5	AAG32475.1	AbStr			2,01
U35_25947	putative protein kinase Xa21	BAD45411.1	AbStr			-2,07
U35_24828	putative laccase LAC5-6	BAB86452.1	AbStr			-2,20
U35_14520	pore-forming toxin-like protein Hfr-2	AAW48295.1	AbStr			-2,25
U35_15776	phytochelatin synthetase	AAO86520.1	AbStr			-2,48
U35_11632	class III peroxidase 120 precursor	CAH69362.1	AbStr			-2,48
U35_25690	NB-ARC domain containing protein	ABA92208.1	AbStr			-2,70
U35_31252	endoglucanase/cellulase, putative	XP_001260445.1	AbStr			-2,86
U35_12815	HcrVf1 protein-like	BAD53108.1	AbStr			-3,23
U35_15272	germin-like protein 1a	ABG46232.1	AbStr			-3,44

U35_23784	putative senescence-associated protein	AAL79714.1	AbStr			-5,42
U35_9301	Metallothionein-like protein 3A	A2WLS0.1	AbStr			-7,21
U35_27825	exodeoxyribonuclease VII large subunit	YP_294822.1	DNA	2,24		2,31
U35_40842	related to lethal(2) denticleless protein	CAB88627.1	DNA	-2,09		
U35_39956	DNA repair protein rhp51	XP_001592541.1	DNA	-2,90		
U35_40637	DNA replication licensing factor mcm5	XP_001543371.1	DNA	-3,02		
U35_33024	putative DNA repair protein rhp54	BAC79886.1	DNA		2,07	
U35_15978	meiosis 5	AAV58857.1	DNA		-2,26	
U35_48213	Putative DNA topoisomerase III	AAM15783.1	DNA		-4,31	
U35_38388	putative ribonucleotide reductase	BAD67618.1	DNA			2,24
U35_40589	Crossover junction endonuclease MUS81	Q4INS6	DNA			-2,44
U35_46044	DNA ligase-like	BAB90354.1	DNA			-2,60
U35_38483	similar to Histone H2B	XP_001104238.1	DNA	44,54		
U35_28435	putative transposase	AAQ56575.1	DNA	4,08		
U35_43707	transposon protein, putative, Mutator sub-class	ABF94023.1	DNA	3,21		
U35_42687	hAT family dimerisation domain, putative	AAX96757.1	DNA	2,68		
U35_50283	transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class	ABF94231.1	DNA	2,62		
U35_44880	histone H4-like	NP_001093194.1	DNA	2,51		
U35_12171	hAT family dimerisation domain containing protein	ABF99612.1	DNA	2,41		
U35_27220	transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class	ABA94905.1	DNA	2,08		
U35_49957	transposon protein	AAX96666.1	DNA	-2,07		
U35_40937	retrotransposon protein, putative, unclassified	ABA95227.1	DNA		2,71	3,32
U35_18235	hAT family dimerisation domain, putative	AAX96757.1	DNA		2,69	
U35_49180	histone H4	XP_001768205.1	DNA		-2,39	
U35_26783	retrotransposon protein, putative, LINE subclass	ABA92743.2	DNA			2,98
U35_12635	FUSCA3	CAL91173.1	Hor	-2,24		-2,09
U35_15689	ABA induced plasma membrane protein PM 19	AAB38504.1	Hor	8,61		
U35_22394	Putative abscisic acid-induced protein	AAN06848.1	Hor	6,85	-12,66	
U35_791	ABA-inducible protein PHV A1	P14928	Hor	6,80		
U35_15687	ABA induced plasma membrane protein PM 19	AAB38504.1	Hor	6,19		
U35_16444	putative MtN3	BAB90353.1	Hor	3,40		
U35_15465	putative Lignostilbene-alpha,beta-dioxygenase and related enzymes	BAD03492.1	Hor		2,15	2,80
U35_26517	BLE2 protein	BAC20065.2	Hor	4,43		
U35_15508	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1	ABA93885.1	Hor		9,64	5,07
U35_15510	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1	ABA93885.1	Hor		4,90	10,69
U35_43995	Cycloartenol synthase	ABA92749.2	Hor	5,24		
U35_38590	ethylene-responsive element binding protein	ABO93372.1	Hor	4,32		
U35_29736	ethylene insensitive 3-like 2	AAV68140.1	Hor	-3,12		
U35_15346	AP2 domain transcription factor EREBP	AAP56251.1	Hor		2,02	
U35_11393	Similar to probable RAV2-like DNA binding protein	AAX92718.1	Hor		-2,24	
U35_39060	ethylene-responsive factor	ABQ52686.1	Hor		-2,58	
U35_15343	ethylene-binding protein-like	BAD38371.1	Hor			-3,26
U35_572	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	ABM74187.1	Hor	-2,28		
U35_42938	putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC) oxidase	BAB84460.1	Hor		4,31	
U35_574	putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	AAU44031.1	Hor		2,63	2,75
U35_31003	ent-kaurene synthase 1A	AAQ72559.1	Hor	6,09	12,42	10,74
U35_40511	ent-kaurene synthase like-4	AAQ72563.1	Hor		14,24	17,29
U35_22565	OsGA2ox1	BAB40934.1	Hor		-2,31	
U35_19592	putative auxin induced protein	BAD46464.1	Hor		2,97	

U35_5729	YUCCA3, putative flavin-containing monooxygenase	BAA88198.1	Hor		2,33	2,76
U35_18641	auxin efflux carrier family protein	NP_201399.1	Hor		2,06	
U35_18504	putative indole-3-glycerol phosphate synthase	BAD23563.1	Hor		13,84	6,83
U35_18460	tryptophan decarboxylase	BAD11769.1	Hor		4,15	2,92
U35_11803	tryptophan decarboxylase	BAD11769.1	Hor		2,22	
U35_28245	putative anthranilate phosphoribosyltransferase	BAC16176.1	Hor		2,02	
U35_11274	Lipoxygenase 2.2	Q8GSM3	Hor	-2,39		
U35_15174	jasmonate induced protein	CAA58110.1	Hor	-3,81		
U35_19375	putative S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase	BAD33074.1	Hor		14,46	17,74
U35_27132	lipoxygenase-2	ABU55901.1	Hor		5,05	2,87
U35_14643	Lipoxygenase 2.1	P93184	Hor		2,62	2,32
U35_14314	23 kDa jasmonate-induced protein	P32024	Hor		-3,18	
U35_30509	putative S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase	BAD12867.1	Hor			2,69
U35_38723	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (AdoMetDC) (SamDC)	Q42829	Hor			-3,16
U35_29467	long-chain fatty acid condensing enzyme	ABG73470.1	Lip		2,12	
U35_5315	putative Gl1	BAD37412.1	Lip	4,43		
U35_38207	2-alkenal reductase	AAX99161.1	Lip	3,03		
U35_42661	phosphatidic acid phosphatase-related	NP_190970.1	Lip	-2,47		
U35_33813	lipase class 3 family protein	NP_181773.2	Lip	-3,77		
U35_10405	putative delta-12 oleate desaturase	BAD09176.1	Lip		10,58	22,22
U35_42230	delta-12 fatty acid desaturase	BAE93382.1	Lip		10,15	7,40
U35_13437	putative cytochrome b5	BAD26552.1	Lip		9,67	6,05
U35_39766	phosphatidic acid phosphatase beta-like	BAD82502.1	Lip		7,06	5,62
U35_42236	delta-12 fatty acid desaturase	BAE93382.1	Lip		6,91	3,65
U35_11877	putative delta-12 oleate desaturase	BAD09176.1	Lip		5,03	
U35_42410	phospholipid/glycerol acyltransferase family protein	NP_565249.1	Lip		-2,09	
U35_38281	lipin, N-terminal conserved region family protein, expressed	ABA94690.1	Lip			2,62
U35_13251	phosphatidic acid phosphatase beta-like	BAD82502.1	Lip			2,39
U35_13596	phosphatidic acid phosphatase beta-like	BAD82502.1	Lip			2,25
U35_31627	putative lipase	AAT69581.1	Lip			2,15
U35_44422	lipase	AAV17358.1	Lip			2,10
U35_5047	fatty acid alpha-oxidase	AAF64042.2	Lip			2,06
U35_5786	putative fatty acyl coA reductase	BAC84377.1	Lip			-2,61
U35_47192	PIP5K, Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase family protein, expressed	ABA96911.2	Lip	4,24		
U35_897	putative selenium binding protein	BAB86133.1	Lip	2,62		
U35_12702	PI4K, 1-phosphatidylinositol 4-kinase, putative	XP_001609802.1	Lip	2,45		
U35_25929	putative GDSL-motif lipase/hydrolase protein	BAD09513.1	Lip	-2,17		
U35_40262	putative anter-specific proline-rich protein APG	BAD28305.1	Lip	-2,24		
U35_14970	lipid transfer protein-like protein	AAR30139.1	Lip	-5,52		
U35_4075	sec14 like protein	BAB89672.1	Lip		3,62	3,54
U35_2460	putative cellular retinaldehyde-binding protein	AAR01635.1	Lip		2,68	2,65
U35_1474	putative early nodulin 8 precursor	BAC80099.1	Lip		2,32	3,40
U35_49022	putative Osnop	BAD54435.1	Lip		2,28	
U35_7738	putative phospholipase	AAL87258.1	Lip		2,09	
U35_5187	putative proline-rich protein APG	BAD15755.1	Lip		2,08	2,10
U35_6917	Anter-specific proline-rich protein APG precursor-like	BAD37508.1	Lip		-2,35	
U35_43407	lysophospholipase homolog	AAB97366.1	Lip		-3,12	
U35_27677	myotubularin-like protein	CAB85561.1	Lip		-5,15	-2,30
U35_1475	putative early nodulin 8 precursor	BAC80099.1	Lip			2,03
U35_14985	putative PTEN-like phosphatase	BAD86944.1	Lip			-3,95

U35_3427	Cupin family protein, expressed	ABF95817.1	Nähr	10,89		
U35_14221	D hordein	BAA11642.1	Nähr	5,51		
U35_36975	Gamma-hordein-1 precursor	P17990	Nähr	3,22		
U35_327	B hordein precursor	CAA37729.1	Nähr	2,42		
U35_45134	embryo globulin	AAA32936.1	Nähr	2,39		
U35_301	B hordein	ABH01262.1	Nähr	2,15		
U35_332	hordein	AAA32967.1	Nähr	-2,07		
U35_47358	D-Hordein	AAP31051.1	Nähr		4,83	
U35_196	B hordein	ABH01262.1	Nähr		3,97	
U35_20326	LGC1, putative	ABA93988.1	Nähr		2,31	
U35_14425	putative avenin-like a precursor	CAJ32656.1	Nähr		-4,35	
U35_24181	pollen oleosin	ABK40507.1	Nähr	4,48		
U35_14	high molecular weight oleosin	CAA57994.1	Nähr			-2,61
U35_1674	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit, mitochondrial	ABA95971.1	Son	-2,31		
U35_24347	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	YP_193749.1	Son	-2,06		
U35_34511	ATP synthase gamma chain, mitochondrial precursor	XP_958891.1	Son	-2,01		
U35_31833	vacuolar ATP synthase subunit c	XP_001264688.1	Son	-2,06		
U35_16157	mitochondrial F1F0 ATP synthase epsilon subunit	NP_001105595.1	Son		3,24	
U35_12853	ATP synthase a chain, putative	XP_001737137.1	Son			2,45
U35_27981	ATP synthase subunit 9	YP_001648752.1	Son			-10,18
U35_34422	IN2-1 protein, putative, expressed	ABF95327.1	Son		4,21	
U35_1952	IN22_MAIZE IN2-2 protein	P49249	Son		3,03	
U35_33614	SOUL heme-binding family protein	NP_197514.2	Son	-2,19		
U35_50586	cystatin Hv-CPI7	CAG38131.1	Son	-2,83		
U35_1998	Defender against cell death 2 (DAD-2)	Q9SME8	Son		-2,17	
U35_24122	bifunctional nuclease	NP_176996.1	Son			4,90
U35_41307	B-cell receptor-associated protein 31-like containing protein	ABF99895.1	Son			-2,31
U35_24194	putative ear1 protein	BAD46261.1	Son			-2,11
U35_10641	putative phi-1	BAD37241.1	Son			2,84
U35_46786	Flap endonuclease 1b	Q75LI2	Son	2,83		
U35_24487	Putative CCR4-associated factor 1	AAK52531.1	Son		2,71	
U35_1068	putative BURP domain-containing protein	BAB68072.1	Son	4,87		
U35_1606	putative sex determination protein tasselseed 2	BAC10091.1	Son	2,03		
U35_7038	putative ZmEBE-1 protein	BAD89458.1	Son	33,04		
U35_12897	WD-40 repeat protein-like	BAC99788.1	Son	-2,80		
U35_4923	WD repeat domain 48, putative, expressed	ABG21896.1	Son		2,49	
U35_27758	RAFTIN1b protein	CAE02614.1	Son		5,61	14,63
U35_1564	putative chemocyanin precursor	BAD29705.1	Son			-3,17
U35_1216	putative protodermal factor	BAD26174.1	Son	-2,24		
U35_42669	homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase	AAL28115.1	Son	2,11		
U35_9014	putative SNF4b	BAD28037.1	Son		-6,36	
U35_42450	putative argonaute protein	BAD27856.1	Son	2,80		
U35_38863	AS2	AAX21517.1	Son		5,50	
U35_41264	putative methyl chloride transferase	AAS07345.1	Son		2,15	
U35_22291	3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase	O49354	Son			-3,45
U35_28226	cytidine and deoxycytidylate deaminase family	XP_743253.1	Son	3,60		
U35_2360	CMV 1a interacting protein 1, Tcoi1	ABB46958.2	Son	2,58		
U35_38407	formate dehydrogenase	AAP80655.1	Prim	-2,01	-4,37	
U35_42638	formamidase	NP_001031801.1	Prim	-2,06		
U35_1049	5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase	ABJ15730.1	Prim	-2,42		
U35_18518	folylpolyglutamate synthetase	ABP01353.1	Prim	-2,59		

U35_6660	formate dehydrogenase	CAH60893.1	Prim		7,64	
U35_9091	Formate dehydrogenase 2, mitochondrial precursor (NAD-dependent formate dehydrogenase 2) (FDH 2)	Q67U69	Prim		7,61	4,80
U35_18611	putative gamma-glutamyl hydrolase	AAT01320.1	Prim			-2,52
U35_36713	ornithine--oxo-acid aminotransferase	ABP38411.1	Prim	-3,86		
U35_33493	isoamylase	BAD89532.1	Prim		6,01	
U35_41841	putative glucose-6-phosphate/phosphate translocator	BAD08930.1	Prim		3,54	
U35_21600	Soluble inorganic pyrophosphatase	ABB47572.1	Prim		2,42	
U35_43953	KHG-KDPG bifunctional aldolase-like	BAC45190.1	Prim	2,32		
U35_15467	putative CP12	BAB93161.1	Prim		-2,23	
U35_39457	malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	XP_001224386.1	Prim	2,02		
U35_43146	putative mono-lipoyl E2	BAD36253.1	Prim	-2,05		
U35_47312	putative pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit	BAC75438.1	Prim		2,07	
U35_427	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase1	NP_001105414.1	Prim			2,43
U35_12362	urease	BAB78715.1	Prim	-3,57		
U35_46413	putative thioredoxin reductase	BAE98622.1	Prim	2,59		
U35_18554	2Fe-2S iron-sulfur cluster protein-like	BAC80058.1	Prim		3,92	
U35_10128	alternative oxidase	BAA28771.1	Prim		2,19	2,04
U35_39796	NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit	XP_001549682.1	Prim	2,38		
U35_24838	putative NADH dehydrogenase	BAC15811.1	Prim	-2,15		
U35_34520	malate dehydrogenase-like protein	AAX07691.1	Prim			3,10
U35_48594	Cytochrome C biogenesis protein transmembrane region containing protein, expressed	ABA91416.1	Prim			2,42
U35_21553	alternative oxidase	BAA28771.1	Prim			2,37
U35_29162	AC025296_2 putative electron transfer oxidoreductase	AAK39567.1	Prim			2,21
U35_30101	putative Rieske iron-sulfur protein Tic55	BAD19185.1	Prim			2,03
U35_41613	cytochrome c biogenesis protein-like	BAD21809.1	Prim			-2,59
U35_30984	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial precursor	XP_001213719.1	Prim			-6,64
U35_9566	ramosa 3	ABD92784.1	Prim		2,38	
U35_7759	sister of ramosa 3	ABD92788.1	Prim		2,28	
U35_39965	dihydrolipoamide succinyltransferase, putative	XP_001270562.1	Prim			-2,88
U35_28845	putative subtilisin-like proteinase AIR3	BAD25466.1	Pdeg	2,99		
U35_42728	Cysteine proteinase EP-B 1 precursor	P25249	Pdeg	2,83		
U35_31071	putative SAG12 protein	BAB63883.1	Pdeg	2,56	5,62	3,19
U35_45806	Serine carboxypeptidase family protein	ABA93121.2	Pdeg	-2,10		
U35_49213	putative serine carboxypeptidase	AAS16895.1	Pdeg	-2,21		
U35_13151	serine protease 2	CAC85639.1	Pdeg	-2,25		
U35_49875	Ulp1 protease family protein, putative, expressed	ABA92137.2	Pdeg	-2,80		
U35_21795	putative subtilisin-like serine proteinase	BAD29425.1	Pdeg		13,51	6,29
U35_36756	subtilase family protein	AAT81739.1	Pdeg		7,19	
U35_19087	putative subtilisin-like serine proteinase	BAD29425.1	Pdeg		4,24	3,77
U35_33866	putative nucleoid DNA-binding protein cnd41	BAC15912.1	Pdeg		3,86	3,61
U35_16231	putative subtilisin-like serine proteinase	BAD29425.1	Pdeg		2,89	2,38
U35_6638	chloroplast nucleoid DNA-binding protein cnd41-like	BAB84414.1	Pdeg		2,82	
U35_30144	putative subtilisin-like serine protease	BAC83078.1	Pdeg		2,09	
U35_16148	putative cysteine proteinase	BAD09076.1	Pdeg		-2,01	
U35_25595	serine protease	XP_001595193.1	Pdeg		-2,67	
U35_31111	Papain family cysteine protease containing protein	XP_001022365.1	Pdeg			5,73
U35_23573	serine protease-like protein	BAD36430.1	Pdeg			2,08
U35_13462	alkaline serine protease	XP_001265902.1	Pdeg			-5,28

U35_47823	F-box protein-like	BAB85324.1	Pdeg	2,86		
U35_26891	similar to F-box/LRR-repeat protein 14 (F-box and leucine-rich repeat protein 14)	XP_232330.4	Pdeg	2,27	23,73	20,90
U35_48542	PRS4_26S protease regulatory subunit 4 homolog (TAT-binding protein homolog 2)	P46466	Pdeg	-2,12		
U35_46776	polyubiquitin	CAG28691.1	Pdeg	-2,73		
U35_44665	F-box domain containing protein	AAP51949.1	Pdeg	-2,76		
U35_12112	26S proteasome regulatory subunit	XP_964366.2	Pdeg	-3,28		
U35_30926	F-box-like	BAD25648.1	Pdeg		5,86	5,16
U35_26745	U-box domain containing protein	ABF94888.1	Pdeg		4,46	2,03
U35_25805	F-box-like	BAD25651.1	Pdeg		3,70	3,23
U35_7994	F-box protein interaction domain containing protein	AAP53561.1	Pdeg		2,73	
U35_27007	U-box domain containing protein	ABA96539.1	Pdeg		2,13	
U35_33911	F-box family protein-like	BAD21652.1	Pdeg			2,20
U35_38755	F-box protein-like	BAD36059.1	Pdeg			2,06
U35_34933	BRE1B_E3 ubiquitin-protein ligase BRE1-like 2	Q336R3	Pdeg			-2,02
U35_38192	F-box protein family-like	BAD08724.1	Pdeg			-7,49
U35_14944	IAAC_trypsin inhibitor CMc precursor (Chloroform/methanol-soluble protein CMc) (BTICMc)	P34951.2	Pmet	3,02		
U35_14078	IAAD_Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMD precursor (Chloroform/methanol-soluble protein CMD)	P11643	Pmet	2,45		
U35_8223	LCR72/PDF2.6 (Low-molecular-weight cysteine-rich 72); protease inhibitor	NP_178322.1	Pmet	2,29		
U35_22862	Bowman-Birk trypsin inhibitor-like protein	ABX84379.1	Pmet		2,31	2,37
U35_2289	putative Bowman Birk trypsin inhibitor	AAS48158.1	Pmet			3,65
U35_4386	AF427791_20 Cl2D	AAM22829.1	Pmet			2,42
U35_50592	Trypsin inhibitor CMc precursor (Chloroform/methanol-soluble protein CMc) (BTICMc)	P34951.2	Pmet			-9,93
U35_6738	NAD-dependent epimerase/dehydratase	YP_783107.1	Pmet	11,16		
U35_40284	protein disulfide isomerase	AAC60578.1	Pmet	2,84		
U35_48837	beta-D-glucan exohydrolase, isoenzyme ExoII	AAC49170.1	Pmet	2,63		
U35_48492	putative glycoside hydrolase	AAU90103.1	Pmet	2,47		
U35_48383	coatomer protein complex, subunit beta 2 (beta prime), putative	NP_175645.1	Pmet	2,26		
U35_26761	protein disulfide isomerase	AAC60578.1	Pmet	2,15		
U35_48935	HGA1-like protein	BAD69004.1	Pmet	-2,16		
U35_11445	putative UDP-glucosyltransferase	BAC83833.1	Pmet	-2,59		
U35_11793	ATPase, AAA family protein	ABF93631.1	Pmet	-3,00		
U35_39608	Not56-like protein	AAC63631.1	Pmet	-3,03		
U35_26882	palmitoyl-protein thioesterase precursor	XP_001271339.1	Pmet	-3,27		
U35_6238	putative UDP-glucose glucosyltransferase	BAC84366.1	Pmet	-3,28		
U35_28263	putative beta-1,3-galactosyltransferase	BAD34256.1	Pmet		3,65	2,21
U35_31703	putative UDP-glucose glucosyltransferase1	BAD17253.1	Pmet		3,00	
U35_3491	putative UDP-glucose glucosyltransferase1	BAD17253.1	Pmet		2,95	2,85
U35_46098	mannitol transporter	ABF94464.1	Pmet		2,32	2,03
U35_12395	putative glucosyltransferase	BAB68082.1	Pmet		2,18	
U35_43131	Putative DNAJ protein	AAN05335.1	Pmet		-2,67	
U35_33133	osgrx_s14 - glutaredoxin subgroup ii	ABR26131.1	Pmet		-2,96	
U35_32130	putative UDP-glucose glucosyltransferase1	BAD17253.1	Pmet			3,55
U35_31947	putative glucosyltransferase	BAD67837.1	Pmet			2,90
U35_741	27K protein	BAC76688.1	Pmet			2,75
U35_39643	putative PDR-type ABC transporter 2	BAD52527.1	Pmet			2,27
U35_30450	GrpE protein	YP_758223.1	Pmet			2,18
U35_621	beta-glucosidase	AAA87339.1	Pmet			2,05
U35_48775	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl	ABF98969.1	Pmet			-2,64

	transferase family protein					
U35_26796	CLAVATA1 receptor kinase(CLV1)-like protein	BAD33838.1	Rez	6,15		
U35_50264	receptor-like protein kinase	AAU49988.1	Rez	3,76		
U35_11986	putative receptor-type protein kinase LRK1	BAD09254.1	Rez	3,34		5,99
U35_30378	putative receptor serine/threonine kinase PR5K	BAD61471.1	Rez	3,01	3,18	2,36
U35_30482	putative receptor like protein kinase	AAU44057.1	Rez	2,28		
U35_37620	receptor-like kinase	AAU44031.1	Rez	2,06		
U35_50244	putative leucine-rich repeat receptor-like kinase	AAU12605.1	Rez	2,02		
U35_32898	TAK19-1	AAK20737.1	Rez	-2,02		
U35_43806	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	ABF99290.1	Rez	-2,10		
U35_24184	putative S-receptor kinase	BAD35442.1	Rez	-2,18		
U35_27969	putative receptor kinase 5	BAD33887.1	Rez	-2,21		
U35_27939	putative receptor serine/threonine kinase PR5K	BAD61470.1	Rez		11,32	14,41
U35_41435	putative lectin receptor-type protein kinase	CAH17379.2	Rez		6,19	4,92
U35_9455	S-receptor kinase PK3 precursor-like	BAD37843.1	Rez		4,17	2,30
U35_12783	putative phytoalkaline kinase receptor precursor	BAD28161.1	Rez		3,72	2,42
U35_15509	benzothiadiazole-induced SERK 1	AAR26543.1	Rez		3,19	3,98
U35_17962	LysM receptor-like kinase	CAJ14969.2	Rez		3,04	2,97
U35_17961	LysM receptor-like kinase	CAJ14969.2	Rez		2,84	3,46
U35_20304	putative lectin receptor-type protein kinase	CAH17379.2	Rez		2,63	3,71
U35_25206	putative receptor-like protein kinase 4	BAC79583.1	Rez		2,60	
U35_12763	putative wall-associated kinase 4	BAD26485.1	Rez		2,58	2,92
U35_22617	S-locus receptor-like kinase RLK14	AAM90694.1	Rez		2,58	3,35
U35_39523	receptor-like protein kinase-like	BAD53082.	Rez		2,34	
U35_26262	putative receptor-type protein kinase LRK1	BAC06925.1	Rez		2,17	2,54
U35_27694	putative lectin receptor-type protein kinase	CAH17379.2	Rez		2,08	
U35_12045	putative receptor-like protein kinase 4	BAC79582.1	Rez		2,05	2,48
U35_21203	putative receptor kinase	BAD28507.1	Rez		2,01	
U35_26859	putative serine/threonine-specific receptor protein kinase	BAD38375.1	Rez		-2,77	
U35_39515	putative Hv1LRR2	BAD73414.1	Rez		-8,41	
U35_24837	receptor protein kinase-like protein	BAD53972.1	Rez			3,14
U35_47844	Receptor-like serine/threonine kinase(RFK1)-like protein	BAD03114.1	Rez			2,98
U35_2957	putative receptor serine/threonine kinase PR5K	BAD45068.1	Rez			2,93
U35_28216	S-locus receptor-like kinase RLK13	AAM90695.1	Rez			2,83
U35_2174	putative receptor protein kinase CRINKLY4	BAD61462.1	Rez			2,69
U35_39742	S-domain receptor-like protein kinase-like	BAD67854.1	Rez			2,57
U35_2498	receptor-like serine/threonine kinase, putative, expressed	ABA99370.2	Rez			2,33
U35_40651	putative lectin receptor-type protein kinase	CAH17379.2	Rez			2,20
U35_41829	serine/threonine kinase receptor precursor-like protein	BAC57305.1	Rez			2,15
U35_11643	CLV1 receptor kinase-like	BAD23458.1	Rez			-2,06
U35_2945	putative non-cell-autonomous protein pathway2; plasmodesmal receptor	BAD34245.1	Rez			-2,15
U35_25328	Serpentine Receptor, class J family member (srj-49)	NP_503770.1	Rez			-2,64
U35_27446	putative receptor serine/threonine kinase PR5K	BAD61470.1	Rez			-2,77
U35_44454	anthocyanidin synthase	ABM64801.1	Sek	-2,69		
U35_30090	putative anthocyanin 5-aromatic acyltransferase	BAD68410.1	Sek	4,73		
U35_24791	putative anthocyanin 5-O-glucosyltransferase	BAD32872.1	Sek		2,00	
U35_48116	putative betanidin-5-O-glucosyltransferase	AAT93861.1	Sek		-2,84	
U35_3680	progesterone 5-beta-reductase	AAU89185.1	Sek		2,68	
U35_10121	putative mandelonitrile lyase	BAD29242.1	Sek			2,78
U35_35234	vestitone reductase-related	NP_195251.1	Sek	-2,92		

U35_41270	phenylalanine ammonia-lyase	CAA89005.1	Sek	2,41		
U35_42827	putative chalcone synthase	BAC79571.1	Sek		4,03	2,93
U35_9897	putative chalcone synthase	BAD30758.1	Sek		3,69	3,16
U35_14239	Phenylalanine ammonia-lyase	Q43210	Sek		2,22	
U35_31595	phenylalanine ammonia-lyase	CAA89007.1	Sek		2,14	
U35_14233	phenylalanine ammonia-lyase	CAA89005.1	Sek		2,04	
U35_37372	putative hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase 2	BAD08989.1	Sek		-2,52	
U35_33341	putative phenylalanine ammonia-lyase	BAF93189.1	Sek		-2,88	
U35_22863	putative catechol O-methyltransferase	BAD01311.1	Sek			-2,91
U35_24256	GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase	AAT39168.1	Sek	2,78		
U35_22055	Cytochrome P450 CYP99A1	O48957	Sek	3,97	8,63	10,64
U35_21295	putative cytochrome P450	AAK38088.1	Sek	3,84	7,54	9,29
U35_43061	putative cytochrome P450	AAK38088.1	Sek	3,66	7,56	8,06
U35_22373	putative cytochrome P450	AAK38089.1	Sek	3,03	7,29	7,49
U35_35111	Cytochrome P450 family protein	ABF93878.1	Sek	2,69		
U35_41941	putative cytochrome P450	AAK38091.1	Sek	2,63		
U35_30787	putative flavin-containing monooxygenase	AAK15447.1	Sek	-2,04	2,51	2,03
U35_48052	P450 monooxygenase	ABG85296.1	Sek	-2,10		
U35_12050	cytochrome P450 monooxygenase CYP72A26	AAL60592.1	Sek	-3,74		
U35_29178	putative cytochrome P450 monooxygenase CYP92A1	BAD36157.1	Sek	-6,85		
U35_31402	Cytochrome P450 family protein	ABA96676.1	Sek		8,98	
U35_27261	cytochrome P450 monooxygenase CYP71U4v2	AAX89134.1	Sek		8,84	9,04
U35_23708	Putative cytochrome P-450 like protein	AAK92612.1	Sek		5,59	8,68
U35_37165	cytochrome P450 monooxygenase CYP704G7	ABC59095.1	Sek		3,24	4,26
U35_16949	putative cytochrome P450 monooxygenase	BAD53446.1	Sek		2,50	2,41
U35_5003	cytochrome P450-like	BAD61186.1	Sek		2,47	
U35_13349	putative P450	BAD08937.1	Sek		2,07	
U35_47000	putative cytochrome P450	BAA99523.1	Sek		-2,17	
U35_23117	P450	BAD93368.1	Sek		-2,43	
U35_41915	putative cytochrome P450	AAK38091.1	Sek			3,09
U35_8680	putative cytochrome P450	BAD15430.1	Sek			3,01
U35_40425	monooxygenase, FAD-binding	YP_113233.1	Sek			-3,05
U35_18664	putative cytochrome P450	BAB93411.1	Sek			-4,12
U35_39689	cytochrome P450 monooxygenase, putative	XP_001257932.1	Sek			-4,97
U35_14625	10-deacetylbaicatin III-10-O-acetyl transferase-like	BAB17109.1	Sek	3,16	5,19	6,53
U35_43265	Strictosidine synthase family protein	ABA91449.1	Sek	-3,48		
U35_38294	terpene synthase 7	NP_001105249.1	Sek		44,88	36,22
U35_12374	putative 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase	BAC84616.1	Sek		11,28	14,02
U35_566	hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase	NP_001105676.1	Sek		5,38	4,51
U35_43500	putative 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	CAE47438.1	Sek		4,58	4,80
U35_48590	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	BAF98296.1	Sek		4,00	5,37
U35_42374	putative strictosidine synthase	BAD35674.1	Sek		3,41	
U35_13762	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	ABF98702.1	Sek		3,06	3,13
U35_7092	putative 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	AAT58851.1	Sek		2,83	3,32
U35_4397	putative geranylgeranyl diphosphate synthase	BAC79826.1	Sek		2,54	3,21
U35_30472	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	P93841	Sek		2,46	2,41
U35_5539	4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase	BAF98293.1	Sek		2,31	2,34
U35_27003	syn-copalyl diphosphate synthase	AAS98158.1	Sek	3,79	15,09	12,03
U35_17879	putative 4-methyl-5(B-hydroxyethyl)-thiazol	BAD73058.1	Sek		2,04	

	monophosphate biosynthesis enzyme					
U35_19942	putative cyanase	AAG21913.1	Sek		2,38	2,70
U35_31239	1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase	ZP_02523033.1	Sek	-4,96		
U35_48288	zinc finger (CCCH-type) protein-like	BAD37519.1	Sig	2,78		
U35_46225	C2H2 finger and ankyrin domain protein	XP_753840.1	Sig	2,11		
U35_49002	zinc finger (C3HC4-type RING finger)protein-like	BAD37529.1	Sig	-2,66		
U35_48446	putative PIT1	BAD87553.1	Sig	-4,04		
U35_23655	ring-H2 zinc finger protein-like	BAD45455.1	Sig		2,28	
U35_25629	C2H2-type zinc finger protein ZFP36	AAP51130.1	Sig		2,06	
U35_10222	putative C3HC4 type RING zinc finger protein	AAT75260.1	Sig		2,02	2,53
U35_47294	putative RING finger 1	BAD10051.1	Sig		-2,81	
U35_42484	putative RING protein; putative VWA protein; putative Zn-finger protein	CAE53908.1	Sig		-3,34	
U35_24078	Putative GATA-1 zinc finger protein	AAK98698.1	Sig			-2,52
U35_29375	putative Serine/threonine Kinase	BAD87597.1	Sig	5,89		
U35_40244	Serine/threonine-protein kinase nrc-2	O42626.1	Sig	4,03		
U35_2689	39 kDa EF-Hand containing protein	ABB46938.1	Sig	3,74		
U35_10720	Putative protein kinase	AAK02024.2	Sig	3,48	7,52	10,23
U35_33421	wall-associated kinase-like 1	AAAY34779.1	Sig	2,34		
U35_45490	putative protein phosphatase 2C	BAD33042.1	Sig	2,24		
U35_10138	calmodulin-binding motif family protein	XP_001311194.1	Sig	2,19		
U35_19467	putative histidine kinase 1	BAD37425.1	Sig	2,16		
U35_6443	protein phosphatase type 2C	AAD17805.1	Sig	2,13	2,76	
U35_18141	putative wall-associated kinase	BAD25294.1	Sig	2,11		
U35_5035	protein phosphatase 2c	ABA91135.1	Sig	2,11		
U35_39851	wall-associated kinase 1	AAAY34780.1	Sig	2,01	3,52	4,62
U35_39581	GHMP kinase-like	BAD53791.1	Sig	-2,12		
U35_32069	putative protein kinase	BAD25847.1	Sig	-2,25		
U35_26834	protein kinase family protein	NP_001077592.1	Sig	-2,30		
U35_45590	Putative protein kinase	AAK95672.1	Sig	-2,46		
U35_32847	putative wall-associated serine/threonine kinase	BAD22228.1	Sig	-2,64		
U35_24896	serine/threonine protein kinase, putative	XP_001264973.1	Sig	-3,74		
U35_20112	putative wall-associated serine/threonine kinase	BAD22228.1	Sig	-4,02		
U35_11281	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), alpha isoform	XP_001151388.1	Sig	-6,21		
U35_23098	Protein kinase	YP_001617392.1	Sig		8,30	9,33
U35_27106	putative wall-associated kinase 4	BAD46097.1	Sig		3,94	3,88
U35_12343	putative serine/threonine kinase	CAJ19356.1	Sig		3,76	
U35_11559	Protein kinase domain containing protein	ABA99835.1	Sig		3,64	3,62
U35_11175	Protein kinase domain containing protein, expressed	ABA99271.1	Sig		3,25	3,90
U35_24670	Protein kinase domain containing protein	ABA99271.1	Sig		2,92	
U35_43137	leucine-rich repeat family protein /protein kinase family protein-like	BAD29102.1	Sig		2,66	3,15
U35_33291	putative diphosphonucleotide phosphatase 1	BAD68132.1	Sig		2,59	
U35_44046	putative wall-associated serine/threonine kinase	BAD08904.1	Sig		2,53	2,77
U35_50859	putative calcium-dependent protein kinase	CAF18446.1	Sig		2,23	
U35_26118	putative LRK1 protein	BAD87898.1	Sig		2,08	2,58
U35_27087	putative protein kinase AtSIK	BAD73441.1	Sig		2,05	
U35_3268	serine/threonine-specific protein kinase -like	BAD61459.1	Sig		2,01	2,17
U35_7794	putative protein kinase AtSIK	BAD73441.1	Sig		2,01	
U35_5257	serine/threonine kinase-like protein	BAC84907.1	Sig		2,00	2,33
U35_29329	calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase	AAQ14593.1	Sig		-2,90	
U35_20431	putative protein kinase	AAT39152.1	Sig		-3,11	

U35_47904	putative GTP-binding protein typA	BAD21496.1	Sig		-3,94	
U35_49974	PrkcsH-prov protein-like	BAD87105.1	Sig		-4,05	
U35_26360	lectin protein kinase	ABA99276.2	Sig			4,95
U35_13717	Protein kinase APK1A	ABF96113.1	Sig			4,12
U35_44471	wall-associated kinase-like 1	AAV34779.1	Sig			2,93
U35_11624	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans), isoform CRA_a	EDL20001.1	Sig			2,54
U35_27978	leucine rich repeat containing protein kinase	AAF34426.1	Sig			2,48
U35_4393	putative serine/threonine-specific protein kinase	BAC84489.1	Sig			2,44
U35_22792	Putative serine/threonine kinase	AAM08810.1	Sig			2,43
U35_10951	protein kinase-like	BAB68111.1	Sig			2,40
U35_5259	serine/threonine kinase-like protein	BAC84907.1	Sig			2,25
U35_11038	serine/threonine-protein kinase NAK	ABF96536.1	Sig			2,17
U35_13397	lectin protein kinase	ABB47706.1	Sig			2,03
U35_49132	putative protein kinase (KIPK)	BAD08827.1	Sig			-2,02
U35_31098	ZZ type zinc finger domain protein	XP_001263867.1	Sig			-2,23
U35_6312	CDKC2_ORYSJ Cyclin-dependent kinase C-2	Q5JK68.1	Sig			-2,25
U35_41865	putative p21 C-terminal-binding protein	AAO66530.1	Sig			-2,40
U35_11880	Kelch-like protein	BAC65044.1	Sig			-4,00
U35_12727	putative homeobox	BAD35894.1	Sig	3,36		
U35_43536	WRKY transcription factor 14	DAA05079.1	Sig	3,26		
U35_30765	WRKY transcription factor	ABN43183.1	Sig	2,92		
U35_10202	LOB domain-containing protein 6	Q8LQH4	Sig	2,86		
U35_26304	N-acetyltransferase and Transcription factor-like protein	BAD10244.1	Sig	2,43		
U35_12500	putative amelogenin precursor like protein	AAV17588.1	Sig	2,37		
U35_24482	YABBY 4	Q6H668.1	Sig	2,20		
U35_45830	Myb proto-oncogene protein-like	BAD82476.1	Sig	2,08		
U35_20486	transcriptional coactivator-like	BAB44036.1	Sig	2,05		
U35_36874	WOX5-WUSCHEL-related homeobox 5	Q8LR86.1	Sig	-2,64		
U35_47126	homeodomain leucine zipper protein Vrs1	BAF43315.1	Sig	-3,02		
U35_27692	transcriptional regulator, LysR family	YP_547529.1	Sig	-3,16		
U35_22806	putative transcription factor HAP3	AAU44106.1	Sig		9,12	9,43
U35_7871	myb-like DNA-binding domain, SHAQKYF class family protein, expressed	ABA91074.1	Sig		4,07	2,26
U35_38101	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein-like	BAD17619.1	Sig		3,14	3,37
U35_29629	Helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein, expressed	ABA93991.1	Sig		2,25	
U35_23506	WRKY transcription factor 26	DAA05091.1	Sig		2,04	
U35_9187	putative growth-regulating factor 1	AAL68844.1	Sig		-2,83	
U35_21116	putative transcription factor OsGLK2	BAD81484.1	Sig			3,00
U35_32886	putative tubby protein	AAT07611.1	Sig			2,78
U35_1767	ZIM motif family protein	AAP53563.1	Sig			-2,13
U35_6718	typical A-type R2R3 Myb protein	AAL84631.1	Sig			-2,17
U35_18333	MIKC-type MADS-box transcription factor WM29B	ACB45306.1	Sig			-2,20
U35_11701	transcription factor Forkhead box protein N1	BAF74366.1	Sig			-2,22
U35_4183	dof zinc finger protein 12	CAJ29317.1	Sig			-2,36
U35_47364	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	NP_190337.1	TkP	3,15		
U35_48828	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like	BAD35328.1	TkP	2,18		
U35_28681	putative pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like protein	BAD28089.1	TkP	2,03		
U35_22853	PPR repeat containing protein	AAU90276.1	TkP	-2,13		
U35_28875	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like	BAD35499.1	TkP	-3,18		
U35_6377	TPR Domain containing protein, expressed	ABF95554.1	TkP	-3,98		
U35_30606	Ribosome inactivating protein	AAX96490.1	TkP		3,78	3,70

U35_48411	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like	BAD19082.1	TkP		3,30	
U35_12259	SR-rich pre-mRNA splicing activator	AAP06931.1	TkP		3,20	
U35_27289	putative pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	BAD07992.1	TkP		3,14	
U35_46443	putative 40s ribosomal protein S23	BAB92932.1	TkP		2,87	
U35_47325	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein-like	BAD29695.1	TkP		2,65	2,14
U35_19850	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	NP_171639.3	TkP		2,26	2,13
U35_5397	TPR repeats-like protein	ABO15005.1	TkP			-2,14
U35_7124	DEAD/DEAH box helicase domain protein	YP_001671249.1	TkP	5,90	15,90	24,24
U35_2407	emys N terminus domain-containing protein-like	BAD26024.1	TkP	3,07		
U35_28721	RH3_ DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 3	Q0DM51	TkP	2,22		
U35_39517	IF4A_ ATP-dependent RNA helicase eIF4A (Eukaryotic initiation factor 4A) (eIF-4A) (Translation initiation factor 1)	Q0CXD0.2	TkP	-2,20		
U35_8650	putative regulator of gene silencing	BAB90781.1	TkP		2,86	
U35_9510	putative DEAD/DEAH RNA helicase	AAT47443.1	TkP		2,83	2,24
U35_48036	putative TPR-containing nuclear phosphoprotein	BAC16228.1	TkP		2,31	
U35_32449	RNA helicase SDE3	ABF94100.1	TkP		-3,08	
U35_36871	HACL1_Probable histone acetyltransferase HAC-like 1	Q6YXY2	TkP			3,38
U35_41250	PRP28_Pre-mRNA-splicing ATP-dependent RNA helicase prp28	A6RJA2.1	TkP			2,42
U35_48637	putative tRNA modification GTPase trmE	BAC98601.1	TkP	5,05		
U35_35014	60S ribosomal protein L23-like protein	AAX07700.1	TkP	4,63		
U35_34567	40S ribosomal protein S29	XP_961514.1	TkP	2,99		
U35_28197	ribosomal protein S14p/S29e containing protein, expressed	ABF99104.1	TkP	2,59		
U35_31903	large subunit ribosomal protein L3	XP_567698.1	TkP	2,25	14,64	37,84
U35_45670	60S ribosomal protein L26	XP_001556324.1	TkP	-2,22		
U35_23503	translation initiation factor SUI1, putative	XP_001270644.1	TkP	-2,35		
U35_28447	putative CRP1 protein	BAC55770.1	TkP	-2,52		
U35_14326	50S ribosomal protein L5	Q9ZST0	TkP	-2,58		
U35_41429	60S ribosomal protein L5	XP_001588768.1	TkP	-2,67		
U35_31287	translation elongation factor 1-alpha	ABU48798.1	TkP	-3,08		
U35_367	putative elongation factor 2	BAD26337.1	TkP	-3,96		
U35_45389	elongation factor 1 alpha	ABI36579.2	TkP		4,89	10,88
U35_30891	putative eukaryotic translation initiation factor 5	BAD54665.1	TkP		-2,26	
U35_12954	putative eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3	BAB89728.1	TkP		-2,82	
U35_5444	putative peptide chain release factor subunit 1 (eRF1)	AAT01338.1	TkP		-2,83	
U35_6961	Aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B, putative, expressed	ABA94201.1	TkP		-2,92	
U35_19843	RNaseP-associated protein-like	BAC79524.1	TkP			2,51
U35_31251	putative 60S ribosomal protein RPL24	ABX44827.1	TkP			2,00
U35_31198	60S ribosomal protein L34	XP_001481561.1	TkP			-2,01
U35_14694	60S acidic ribosomal protein P0, putative, expressed	ABA95724.1	TkP			-2,13
U35_6114	putative ubiquitin / ribosomal protein CEP52	BAD38019.1	TkP			-2,55
U35_31135	40S ribosomal protein S10	XP_001247928.1	TkP			-2,69
U35_42164	40S ribosomal protein S15	XP_001597504.1	TkP			-5,95
U35_32258	neuronal-type voltage-gated calcium channel subunit Cav2.2	AAP83588.1	Trans		-3,95	
U35_18354	mechanosensitive ion channel domain-containing protein-like	BAD28130.1	Trans			-2,83
U35_12194	F1 ATPase assembly protein 11	ABW72066.1	Trans	11,11		
U35_43453	mitochondrial ATPase (Afg1), putative	XP_001262390.1	Trans	2,06		
U35_36282	V-ATPase subunit c" proteolipid	AAR26002.1	Trans	-2,27		

U35_18654	AAC3 (ADP/ATP CARRIER 3); ATP:ADP antiporter/ binding	NP_194568.1	Trans	8,46		
U35_24450	peptide transporter-like	BAD09179.1	Trans	7,30		
U35_25543	putative peptide transporter protein	CAD42636.1	Trans	4,70	12,21	8,41
U35_46695	putative peptide transport protein	AAG21906.1	Trans	3,05		
U35_49989	putative potassium transporter	BAD87321.1	Trans	2,87	12,75	
U35_12868	putative magnesium transporter	BAB89805.1	Trans	2,30		
U35_33007	putative PDR6 ABC transporter	BAD09728.1	Trans	2,20	4,76	9,58
U35_38121	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHEXL1b	ABC65852.1	Trans	2,19		
U35_2545	proline transporter	BAB69951.1	Trans	-2,06		
U35_43609	putative hexose transport protein HEX6	BAA83554.1	Trans	-2,18		
U35_43244	iron transport protein 2	AAS49494.1	Trans	-2,28		
U35_49223	AC084766_3 putative amino acid transporter	AAL82517.1	Trans	-4,03		
U35_31971	AF366565_1 aquaporin PIP2	AAM00369.1	Trans	-8,74		
U35_46118	putative amino acid permease	BAA96139.1	Trans	-20,05		
U35_46286	putative nitrate transporter NRT1	BAD07874.1	Trans		21,65	9,72
U35_45772	putative potassium transporter	BAD87321.1	Trans		17,19	
U35_4682	POT family protein	ABF93882.1	Trans		10,56	4,56
U35_12545	POT family protein	ABF93882.1	Trans		9,94	10,86
U35_31536	POT family protein	ABF93882.1	Trans		9,05	7,30
U35_39899	putative nitrate transporter NRT1	BAD07874.1	Trans		8,61	7,02
U35_25491	putative peptide transport protein	AAG21906.1	Trans		7,55	8,48
U35_42983	mitochondrial phosphate carrier protein Mir1	XP_365668.2	Trans		4,14	
U35_20068	Probable potassium transporter 16 (OsHAK16)	Q84MS3	Trans		3,22	2,61
U35_15954	RIP2_Putative ripening-related protein 2 precursor	Q6H5X0	Trans		2,80	5,52
U35_27012	putative ripening regulated protein DDTFR18	BAC20746.1	Trans		2,74	2,48
U35_18303	ABC transporter, putative, expressed	ABA94465.2	Trans		2,66	
U35_2727	vitamer uptake	AAP80647.1	Trans		2,60	
U35_24248	putative MATE efflux protein family protein	BAC83974.1	Trans		2,53	2,67
U35_10623	ABC transporter, putative	AAX92722.1	Trans		2,50	
U35_40515	multidrug resistance protein 1 homolog	BAB85651.1	Trans		2,46	4,25
U35_31956	Sodium/calcium exchanger protein	ABA99431.1	Trans		2,32	
U35_17817	putative high affinity sulfate transporter	BAC98594.1	Trans		2,31	2,00
U35_21642	Sugar transporter family protein, expressed	ABF94465.1	Trans		2,24	2,19
U35_24381	ABC transporter, putative, expressed	ABA94465.2	Trans		2,18	2,65
U35_17816	putative high affinity sulfate transporter	BAC98594.1	Trans		2,17	
U35_5702	putative ABC transporter	BAC99428.1	Trans		2,14	2,18
U35_45844	PDR-like ABC transporter	CAD59573.1	Trans		-2,01	
U35_43509	nitrate transporter NRT1;2	AAP70034.1	Trans		-2,02	
U35_28347	putative sugar transporter	AAU10692.1	Trans		-2,64	
U35_30944	BCH2/HvNRT2.2	AAC49532.1	Trans		-3,45	
U35_33324	amino acid selective channel protein	CAA09867.1	Trans		-4,49	
U35_23308	multidrug resistance protein 1 homolog	BAB85651.1	Trans			2,71
U35_46818	ABC transporter, putative, expressed	ABA94465.2	Trans			2,44
U35_4221	putative phosphate transport protein, mitochondrial	BAD38269.1	Trans			2,35
U35_10619	ammonium transporter AMT2.1	AAR87397.1	Trans			2,22
U35_12483	putative ABC transporter	BAC99428.1	Trans			2,22
U35_18302	PDR-like ABC transporter	CAD59574.1	Trans			2,07
U35_17401	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein	YP_332949.1	Trans			-2,24
U35_23811	hypothetical protein	AAX95683.1	U	24,07		
U35_474	Os04g0610600	NP_001053831.1	U	21,71		
U35_18264	Os09g0127700	NP_001062611.1	U	19,41		
U35_7481	hypothetical protein Osl_005660	EAY84427.1	U	12,35		

U35_45182	hypothetical protein Osl_030756	EAZ09524.1	U	10,57		
U35_17496	Os03g0723400	NP_001051116.1	U	10,44		
U35_27363	unknown protein	NP_178522.2	U	6,07		
U35_25687		no hit	U	5,84		
U35_19286	OSIGBa0139112.3	CAH66254.1	U	5,77		
U35_8979	hypothetical protein Osl_009845	EAY88612.1	U	5,62		
U35_10323	Os05g0480500	NP_001055855.1	U	4,99		
U35_4859	hypothetical protein Osl_005660	EAY84427.1	U	4,96		
U35_27468		no hit	U	4,40		
U35_12160	hypothetical protein	XP_505889.1	U	4,39		
U35_14946	RNA binding protein	ABA97622.2	U	4,19		
U35_26937		no hit	U	4,18		
U35_8192	activin A receptor, type IIA	NP_776652.1	U	4,17		
U35_10455	hypothetical protein Osl_014458	EAY93225.1	U	4,12	7,32	7,65
U35_44250	hypothetical protein Osl_000851	EAY73004.1	U	4,10	3,08	
U35_34177	hypothetical protein OsJ_033563	EAZ19354.1	U	4,05		
U35_27797	unnamed protein product	CAO66433.1	U	3,97		
U35_9462	hypothetical protein OsJ_013416	EAZ29933.1	U	3,91	16,14	13,08
U35_17956	Os03g0133100	NP_001048873.1	U	3,84		
U35_27	LY6/PLAUR domain containing 5 isoform 2	XP_001158230.1	U	3,82		
U35_9051	endosperm transfer cell specific PR9 precursor	ACA04810.1	U	3,60		
U35_24821	Os01g0389200	NP_001043107.1	U	3,42	5,03	5,95
U35_42655	Os08g0561600	NP_001062513.1	U	3,29		
U35_24933	PREDICTED: similar to Ajuba homolog (Xenopus laevis)	XP_598167.3	U	3,26		
U35_18778	unknown protein	BAD52952.1	U	3,24		
U35_26402	erythrocyte binding protein	CAA72206.1	U	3,20		
U35_35408	hypothetical protein OsJ_023710	EAZ40227.1	U	3,19		
U35_22317	PREDICTED: hypothetical protein	XP_001717221.1	U	3,15	13,77	12,00
U35_4171	H0512B01.11	CAH67716.1	U	3,09		
U35_7123	hypothetical protein MED92_09601	ZP_01167300.1	U	3,05	8,67	13,82
U35_48614	hypothetical protein Osl_009861	EAY88628.1	U	2,98		
U35_6102	hypothetical protein	BAD19822.1	U	2,97		
U35_15957	putative plastid protein	BAD22293.1	U	2,91		
U35_46484	hypothetical protein Osl_015262	EAY94029.1	U	2,90		
U35_10906	hypothetical protein FG00062.1	XP_380238.1	U	2,85		
U35_41085	hypothetical protein AN0812.2	XP_658416.1	U	2,81		
U35_50323	hypothetical protein Osl_024210	EAZ02978.1	U	2,80		
U35_25249	lipoprotein	ZP_02478679.1	U	2,79		
U35_25900		no hit	U	2,77		
U35_44463	hypothetical protein OsJ_021622	EAZ38139.1	U	2,74		
U35_9668	opsin	BAF95826.1	U	2,71	2,95	3,79
U35_50410	TP-binding region, ATPase-like domain-containing protein-like	BAD88048.1	U	2,71		
U35_21388	Os08g0332700	NP_001061569.1	U	2,70		
U35_22989	Os01g0384800	NP_001043098.1	U	2,66	2,44	
U35_13430	hypothetical protein Osl_020115	EAY98882.1	U	2,65		
U35_35159	unnamed protein product	CAO47468.1	U	2,59		
U35_25683	Os01g0357900	NP_001043012.1	U	2,59		
U35_36903	tobamovirus multiplication protein 3-like	BAD27846.1	U	2,56		
U35_32537	integral membrane protein-like	BAD87069.1	U	2,55		
U35_24460	Os04g0553500	NP_001053508.1	U	2,49		
U35_29839	NHP2-like protein 1	ABF94894.1	U	2,47		
U35_44629	hypothetical protein LbrM34_V2.5350	XP_001568632.1	U	2,45		
U35_10148	hypothetical protein SNOG_11257	XP_001801499.1	U	2,44		

U35_48962	Os01g0769900	NP_001044373.1	U	2,38		
U35_46199	oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein, expressed	ABF97588.1	U	2,38		
U35_48967	expressed protein	ABF99153.1	U	2,36		
U35_25119	hypothetical protein OsJ_005237	EAZ21754.1	U	2,33		
U35_19644	hypothetical protein OsJ_022036	EAZ38553.1	U	2,32		
U35_36922	unnamed protein product	CAO43313.1	U	2,26		
U35_23571	putative MtN21	BAD67705.1	U	2,25		
U35_41695	Nucleolar protein, putative, expressed	AAP53938.2	U	2,24		
U35_38972	OSIGBa0140L04.2	CAH65933.1	U	2,23		2,30
U35_13079		no hit	U	2,20		-2,96
U35_26305	OSJNBa0056L23.20	CAE05322.2	U	2,16		2,42
U35_8025	hypothetical protein Osl_009845	EAY88612.1	U	2,13		
U35_30527	LMBR1 integral membrane protein-like	BAD36105.1	U	2,12	2,59	2,50
U35_38926	hypothetical protein Osl_015440	EAY94207.1	U	2,05		
U35_8481	Os04g0458800	BAF14894.1	U	2,03		
U35_17621	hypothetical protein Osl_026991	EAZ05759.1	U	2,02		
U35_19521	H0512B01.11	CAH67716.1	U	2,01		2,33
U35_22425	Os12g0569200	NP_001067071.1	U	-2,01		2,10
U35_25843	hypothetical protein SS1G_04779	XP_001594971.1	U	-2,04		
U35_12434	hypothetical protein OsJ_004645	EAZ14820.1	U	-2,05		
U35_20905	H0823A09.8	CAH66907.1	U	-2,06		
U35_19263	hypothetical protein Osl_026793	EAZ05561.1	U	-2,07		
U35_24081	integral membrane protein	EDP55278.1	U	-2,08		
U35_30753		no hit	U	-2,09		
U35_39603	Os09g0413600	NP_001063165.1	U	-2,12		
U35_2173	hypothetical protein OsJ_022361	EAZ38878.1	U	-2,14		2,18
U35_13204	hypothetical protein SS1G_00228	XP_001598142.1	U	-2,14		
U35_11313		no hit	U	-2,19		
U35_2737	Os02g0814300	NP_001048491.1	U	-2,21		
U35_790	podoplanin, isoform CRA_b	EDL81045.1	U	-2,21		
U35_26590	hypothetical protein FG00657.1	XP_380833.1	U	-2,25		
U35_26588	hypothetical protein SS1G_10706	XP_001588259.1	U	-2,26		
U35_40953	hypothetical protein FG07052.1	XP_387228.1	U	-2,30		
U35_6555	hypothetical protein PFF1365c	XP_966264.1	U	-2,33		
U35_11899	hypothetical protein	BAD35397.1	U	-2,33		
U35_108	hypothetical protein OsJ_024603	EAZ41120.1	U	-2,37		
U35_18462	Os05g0526200	NP_001056100.1	U	-2,38		
U35_39903	hypothetical protein SS1G_13289	XP_001585773.1	U	-2,40		
U35_24140	Os01g0730800	NP_001044145.1	U	-2,42		
U35_14507	CRC-related protein	AAQ11881.1	U	-2,45		
U35_100	hypothetical protein OsJ_006114	EAZ22631.1	U	-2,45		
U35_4845	MutT/nudix protein-like	BAD67649.1	U	-2,46		
U35_46241	hypothetical protein BURPS1106A_A2746	YP_001076776.1	U	-2,51		
U35_11305	hypothetical protein OsJ_020224	EAZ36741.1	U	-2,70		
U35_50837	unknown protein	BAC84210.1	U	-2,73		
U35_19922	hypothetical protein PF11_0417	XP_001348087.1	U	-2,76		
U35_46169	hypothetical protein BC1G_04031	XP_001556646.1	U	-2,78		
U35_8452		no hit	U	-2,79		
U35_23310	hypothetical protein	BAC16010.1	U	-2,84		
U35_40763	hypothetical protein SS1G_13666	XP_001585427.1	U	-2,87		
U35_27197	hypothetical protein SS1G_08493	XP_001590753.1	U	-2,95		
U35_9444	Os04g0482300	NP_001053117.1	U	-3,03		
U35_49024	ankyrin-like protein	BAB64266.1	U	-3,07		

U35_25444	integral membrane protein	NP_825142.1	U	-3,09		
U35_37527	putative alpha/beta hydrolase	ZP_00998698.1	U	-3,15		
U35_34553	hypothetical protein FG04654.1	XP_384830.1	U	-3,23		
U35_50639	hypothetical protein OsJ_022262	EAZ38779.1	U	-3,24		
U35_12798	hypothetical protein SS1G_10210	XP_001588663.1	U	-3,27		
U35_34060	hypothetical protein Osl_001239	EAY73392.1	U	-3,27		
U35_9192	hypothetical protein Osl_035849	EAY81890.1	U	-3,49		
U35_11248	hypothetical protein SH0250	YP_252165.1	U	-3,53		
U35_40754	hypothetical protein BC1G_04616	XP_001556900.1	U	-3,61		
U35_26776	hypothetical protein OsJ_004261	EAZ14436.1	U	-3,65		
U35_32077	hypothetical protein OsJ_018767	EAZ35284.1	U	-3,68		
U35_46234	hypothetical protein SS1G_14012	XP_001585152.1	U	-3,84		
U35_34544	hypothetical protein FG07049.1	XP_387225.1	U	-3,86		
U35_9642		no hit	U	-3,91		
U35_10302	Os12g0573900	NP_001067098.1	U	-4,19		
U35_37273	hypothetical protein Osl_020466	EAY99233.1	U	-4,48		
U35_24825	hypothetical protein Osl_020327	EAY99094.1	U	-4,63		
U35_13512		no hit	U	-4,75		
U35_33635	Os07g0641600	NP_001060430.1	U	-5,57		
U35_27849	hypothetical protein OsJ_008278	EAZ24795.1	U	-5,62		
U35_19964	PREDICTED: similar to TRIM40 protein	XP_001490304.1	U	-6,22		
U35_31662	hypothetical protein OsJ_001284	EAZ11459.1	U	-6,55		
U35_34459	hypothetical protein MGL_2614	XP_001730232.1	U	-8,45		
U35_8264	hypothetical protein Osl_014916	EAY93683.1	U		32,64	17,01
U35_26837	predicted protein	XP_001749454.1	U		18,64	10,94
U35_30399	hypothetical protein Osl_014916	EAY93683.1	U		14,57	10,19
U35_3654	hypothetical protein amb0355	YP_419718.1	U		11,38	3,46
U35_10228	PREDICTED: hypothetical protein	XP_001366427.1	U		7,56	
U35_23760	Os03g0734200	NP_001051178.1	U		6,33	
U35_43458	unnamed protein product	CAO64291.1	U		5,81	
U35_35140	hypothetical protein	AAV49984.1	U		5,79	
U35_6867	Os01g0763000	NP_001044331.1	U		5,61	
U35_13495	hypothetical protein FG08335.1	XP_388511.1	U		5,59	21,63
U35_9946	Os07g0123800	NP_001058800.1	U		5,39	5,86
U35_20056	Keratin associated protein 10-5	AAI20951.1	U		5,18	5,79
U35_35582	hypothetical protein FG03032.1	XP_383208.1	U		4,60	
U35_22645	hypothetical protein OsJ_009351	EAZ25868.1	U		4,44	3,37
U35_5331	Os03g0734100	NP_001051177.1	U		4,33	3,72
U35_13088	hypothetical protein Osl_010072	EAY88839.1	U		4,30	2,70
U35_9407	hypothetical protein Osl_032204	EAY78245.1	U		3,90	
U35_38660	hypothetical protein OsJ_018912	EAZ35429.1	U		3,87	
U35_25050		no hit	U		3,86	2,17
U35_48430	PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein	NP_850340.1	U		3,52	
U35_30663	Transferase family protein, expressed	ABF94357.1	U		3,51	
U35_22974	regulatory protein-like	BAB86123.1	U		3,48	2,29
U35_23514	hypothetical protein Osl_002269	EAY74422.1	U		3,44	
U35_9953	putative 1,4-benzoquinone reductase	AAU90228.1	U		3,39	2,83
U35_48085	hypothetical protein OsJ_028759	EAZ45276.1	U		3,37	
U35_24823	OSIGBa0092M08.11	CAH67599.1	U		3,34	
U35_27203	PDZ and LIM domain 5	NP_001026320.1	U		3,27	
U35_27397	hypothetical protein Osl_022724	EAZ01492.1	U		3,25	3,20
U35_4251	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	ABF94387.1	U		3,22	4,24
U35_17216	putative latex protein allergen	BAD09204.1	U		3,18	2,49

U35_9829	hypothetical protein	BAC83704.1	U		3,17	
U35_12044	PREDICTED: similar to chitinase	XP_001161780.1	U		3,17	6,32
U35_45673	hypothetical protein FG03406.1	XP_383582.1	U		3,16	
U35_2894	hypothetical protein Osl_029945	EAZ08713.1	U		3,15	6,63
U35_17217	hypothetical protein OsJ_026562	EAZ43079.1	U		3,10	2,68
U35_46857	hypothetical protein FG10334.1	XP_390510.1	U		3,08	
U35_12371	hypothetical protein Osl_017020	EAY95787.1	U		3,02	3,57
U35_11539	hypothetical protein OsJ_006316	EAZ22833.1	U		2,97	
U35_23802	hypothetical protein Osl_019999	EAY98766.1	U		2,90	3,04
U35_3805	unnamed protein product	CAG09007.1	U		2,90	2,89
U35_11758	PREDICTED: KIAA0467 protein	XP_513379.2	U		2,78	
U35_8054	hypothetical protein	BAD34435.1	U		2,74	4,05
U35_953	hypothetical protein Osl_019225	EAY97992.1	U		2,67	
U35_22514	hypothetical protein Osl_010072	EAY88839.1	U		2,67	2,78
U35_30881	unnamed protein product	XP_001911887.1	U		2,66	
U35_11196		no hit	U		2,65	3,41
U35_11878	hypothetical protein Osl_026325	EAZ05093.1	U		2,64	2,42
U35_27423	Os05g0533400	NP_001056140.1	U		2,61	2,67
U35_12295	hypothetical protein	AAS07266.1	U		2,61	
U35_22788	hydrolase, alpha/beta fold family protein	ABA99974.1	U		2,59	2,62
U35_25376	putative male sterility protein	AAV70496.1	U		2,56	
U35_28907	hypothetical protein Osl_000283	EAY72436.1	U		2,55	
U35_29302	hypothetical protein Osl_032573	EAY78614.1	U		2,51	
U35_24679	embryogenesis transmembrane protein-like	BAD54432.1	U		2,46	
U35_19522	Os04g0202500	NP_001052227.1	U		2,35	2,27
U35_5069	Os03g0322200	NP_001049966.1	U		2,31	
U35_307		no hit	U		2,31	
U35_28167	hypothetical protein Osl_002678	EAY74831.1	U		2,25	3,32
U35_48079	hypothetical protein OsJ_017732	EAZ34249.1	U		2,22	
U35_43150	putative mRNA binding protein precursor	BAC83225.1	U		2,21	
U35_5388	hypothetical protein Osl_030211	EAZ08979.1	U		2,21	4,48
U35_2729	hypothetical protein Osl_017020	EAY95787.1	U		2,21	2,06
U35_8117	hypothetical protein OsJ_021514	EAZ38031.1	U		2,20	
U35_26753	hypothetical protein OsJ_012879	EAZ29396.1	U		2,19	3,12
U35_22743	Os04g0647900	NP_001054072.1	U		2,18	2,24
U35_6761	hypothetical protein Osl_002894	EAY75047.1	U		2,16	
U35_30558	hypothetical protein OsJ_025326	EAZ41843.1	U		2,15	2,42
U35_121	hypothetical protein lp_1525	NP_785130.1	U		2,15	
U35_15476	hypothetical protein Osl_018782	EAY97549.1	U		2,12	
U35_6768	hypothetical protein Osl_034373	EAY80414.1	U		2,12	
U35_5951	hypothetical protein Osl_026240	EAZ05008.1	U		2,11	
U35_3901	Os01g0678000	NP_001043855.1	U		2,11	2,47
U35_6929	hypothetical protein Osl_008945	EAY87712.1	U		2,10	
U35_20551	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	ABF94387.1	U		2,10	2,26
U35_24416	hypothetical protein LOC_Os12g42950	ABA99435.1	U		2,09	
U35_47968	hypothetical protein Osl_017020	EAY95787.1	U		2,08	
U35_30578		no hit	U		2,07	2,60
U35_27709	hypothetical protein Osl_018636	EAY97403.1	U		2,06	
U35_46109	hypothetical protein OsJ_014622	EAZ31139.1	U		2,05	
U35_34983	hypothetical protein OsJ_017703	EAZ34220.1	U		2,02	
U35_13136	hypothetical protein Osl_002713	EAY74866.1	U		-2,03	
U35_49192	unnamed protein product	CAO39632.1	U		-2,03	
U35_15205	PREDICTED: similar to Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus (Acinus)	XP_858297.1	U		-2,03	

	isoform 18				
U35_14684	PREDICTED: similar to UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4 isoform 1	XP_612336.3	U		-2,03
U35_49064	Os04g0678200	NP_001054271.1	U		-2,05
U35_26779		no hit	U		-2,08
U35_15239	hypothetical protein STIAU_3846	ZP_01462983.1	U		-2,08
U35_27853	type III effector HopN1	NP_791197.1	U		-2,10
U35_8997	myo-inositol 2-dehydrogenase	NP_786807.1	U		-2,11
U35_29474	hypothetical protein OsJ_028344	EAZ44861.1	U		-2,15
U35_11247	esterase	CAG27610.1	U		-2,19
U35_22513	Os02g0658200	NP_001047633.1	U		-2,20
U35_505	unnamed protein product	XP_001909108.1	U		-2,31
U35_29107	Os04g0662900	NP_001054160.1	U		-2,31
U35_46854	hypothetical protein Osl_018718	EAY97485.1	U		-2,37
U35_50304	Os06g0207200	NP_001057099.1	U		-2,39
U35_30312	hypothetical protein Osl_018561	EAY97328.1	U		-2,40
U35_36996	Os07g0633800	NP_001060376.1	U		-2,44
U35_11941	AC092387_20 putative membrane protein	AAL82672.2	U		-2,45
U35_6892	T120A_Transmembrane protein 120A	Q5FWV6.2	U		-2,46
U35_8850	H1005F08.24	CAH65995.1	U		-2,55
U35_10215	OSIGBa0093L02.1	CAH66405.1	U		-2,62
U35_25445	DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase	YP_001738403.1	U		-2,64
U35_49451	Os12g0109600	NP_001065957.1	U		-2,67
U35_15236	structural protein	CAA56552.1	U		-2,77
U35_30654	hypothetical protein LOC_Os03g07700	ABF94237.1	U		-2,80
U35_50765	hypothetical protein Osl_014318	EAY93085.1	U		-2,87
U35_24208	Os01g0647000	NP_001043709.1	U		-2,89
U35_22581	hypothetical protein FG01516.1	XP_381692.1	U		-2,91
U35_3984	unnamed protein product	CAO61122.1	U		-2,96
U35_18830	Os08g0290100	NP_001061461.1	U		-3,10
U35_45327	unnamed protein product	CAO70778.1	U		-3,10
U35_49335	hypothetical protein Osl_019872	EAY98639.1	U		-3,21
U35_21078	hypothetical protein OsJ_018926	EAZ35443.1	U		-3,24
U35_26376	Os01g0159800	NP_001042087.1	U		-3,24
U35_37445	hypothetical protein OsJ_023275	EAZ39792.1	U		-3,31
U35_15390	type VI secretion system Vgr family protein	ZP_02511790.1	U		-3,43
U35_26256	hypothetical protein FG03125.1	XP_383301.1	U		-3,75
U35_9591	HGWP repeat containing protein-like	BAD35609.1	U		-4,05
U35_10288	PREDICTED: similar to latent transforming growth factor beta binding protein 4	XP_001371470.1	U		-6,22
U35_10418	Os04g0494600	NP_001053188.1	U		-6,86
U35_1290	O-methyltransferase/	BAC54275.1	U		-9,96
U35_1547	O-methyltransferase family protein	ABA94107.1	U		-2,11
U35_45737	hypothetical protein FG10145.1	XP_390321.1	U		13,86
U35_12263		no hit	U		7,03
U35_41063	hypothetical protein SS1G_08391	XP_001590651.1	U		4,86
U35_43918	hypothetical protein OsJ_012999	EAZ29516.1	U		4,84
U35_26610	PREDICTED: hypothetical protein	XP_001139069.1	U		4,51
U35_47071	hypothetical protein MGG_08932	XP_364087.2	U		4,42
U35_5387	hypothetical protein Osl_030211	EAZ08979.1	U		4,27
U35_9347	Os04g0606200	NP_001053799.1	U		4,15
U35_23025	hypothetical protein Osl_014722	EAY93489.1	U		4,15
U35_2026	PGPS/D12	ABF99697.1	U		3,51
U35_23307	hypothetical protein OsJ_027309	EAZ43826.1	U		3,39

U35_27145		no hit	U			3,37
U35_35308	putative PRIP-interacting protein, 5'-partial	AAP12939.1	U			3,18
U35_10621	hypothetical protein	CAN83506.1	U			3,11
U35_47951	Os01g0761000	NP_001044320.1	U			3,06
U35_12166	PREDICTED: hypothetical protein	XP_001231704.1	U			3,04
U35_48804		no hit	U			2,93
U35_23689	hypothetical protein Osl_002291	EAY74444.1	U			2,90
U35_414	hypothetical protein	CAA74593.1	U			2,80
U35_46662	protein of unknown function DUF882	YP_001769991.1	U			2,77
U35_6760	putative oxidase-like	BAD10557.1	U			2,77
U35_21293		no hit	U			2,76
U35_12859	hypothetical protein SS1G_00231	XP_001598145.1	U			2,75
U35_21975	hypothetical protein OsJ_027799	EAZ44316.1	U			2,73
U35_42318	hypothetical protein Osl_036206	EAY82247.1	U			2,73
U35_31141	PREDICTED: similar to myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	XP_999353.2	U			2,66
U35_44974	putative snRNA associated protein	AAV31348.1	U			2,65
U35_18973	putative nodulin-like protein	BAD34227.1	U			2,57
U35_6257	hypothetical protein Osl_017737	EAY96504.1	U			2,53
U35_12220	predicted protein	XP_001415398.1	U			2,53
U35_40837	hypothetical protein BC1G_04077	XP_001556692.1	U			2,47
U35_8632	hypothetical protein Osl_014664	EAY93431.1	U			2,46
U35_10685	predicted protein	XP_001700115.1	U			2,46
U35_31804	hypothetical protein Osl_016863	EAY95630.1	U			2,46
U35_8280	Os12g0136600	NP_001066104.1	U			2,45
U35_11265	conserved hypothetical protein	ZP_02297209.1	U			2,45
U35_44618	AC025294_29 unknown protein	AAG50891.1	U			2,43
U35_34056	putative latex protein allergen	BAD09208.1	U			2,42
U35_39292	putative RNA recognition motif (RRM)-containing protein	BAD08853.1	U			2,40
U35_11784	PREDICTED: similar to CG10961-PA	XP_972955.1	U			2,39
U35_7118	hypothetical protein Osl_031272	EAZ10040.1	U			2,38
U35_17225	MtN3-like	BAD81867.1	U			2,37
U35_48632	H0702G05.11	CAH67752.1	U			2,36
U35_47573	hypothetical protein OsJ_017756	EAZ34273.1	U			2,32
U35_7516	hypothetical protein OsJ_015961	EAZ32478.1	U			2,32
U35_48932	putative HGA6	BAD61765.1	U			2,28
U35_31692	catalytic/coenzyme binding protein	ABV89636.1	U			2,22
U35_23415	Os05g0318100	NP_001055181.1	U			2,20
U35_20700	Os06g0530600	NP_001057780.1	U			2,17
U35_20849	Os09g0558800	NP_001063913.1	U			2,11
U35_24738	Os07g0119800	NP_001058773.1	U			2,10
U35_7369	hypothetical protein Osl_020375	EAY99142.1	U			2,07
U35_46892	POZ domain protein family-like	BAD33174.1	U			2,07
U35_43323	hypothetical protein Osl_015446	EAY94213.1	U			2,05
U35_49970	vegetative storage protein, putative	ABG22332.1	U			2,04
U35_4929	rpfN	CAP51151.1	U			2,04
U35_26159		no hit	U			2,03
U35_12394	hypothetical protein Osl_035946	EAY81987.1	U			2,03
U35_5068	unknown	ABK28123.1	U			2,02
U35_5844	putative leaf protein	BAB78680.1	U			2,02
U35_37685	hypothetical protein Osl_024258	EAZ03026.1	U			-2,03
U35_35662	hypothetical protein Osl_017389	EAY96156.1	U			-2,04
U35_32409	Os09g0563700	NP_001063940.1	U			-2,06
U35_27036	hypothetical protein OsJ_028183	EAZ44700.1	U			-2,07

U35_48879	hypothetical protein OsJ_008171	EAZ24688.1	U			-2,08
U35_733	OSIGBa0132D06.5	CAH66439.1	U			-2,09
U35_17558	Os05g0171900	NP_001054776.1	U			-2,10
U35_42636	hypothetical protein Osl_016907	EAY95674.1	U			-2,10
U35_25921	hypothetical protein TTHERM_00526610	XP_001028072.1	U			-2,13
U35_9619	hypothetical protein Osl_018722	EAY97489.1	U			-2,13
U35_46383	unnamed protein product	CAO61185.1	U			-2,13
U35_11537	hypothetical protein Osl_020472	EAY99239.1	U			-2,14
U35_8424	hypothetical protein MGL_3896	XP_001728902.1	U			-2,16
U35_32436	hypothetical protein Osl_004954	EAY77107.1	U			-2,16
U35_5900	OSJNBb0003B01.9	CAE03618.3	U			-2,17
U35_8460	putative RNA binding motif protein	AAT77901.1	U			-2,17
U35_50092	HGWP repeat containing protein-like	BAD61607.1	U			-2,18
U35_12030	hypothetical protein Osl_004250	EAY76403.1	U			-2,18
U35_44309	hypothetical protein OsJ_029445	EAZ15236.1	U			-2,21
U35_12789	hypothetical protein Osl_018563	EAY97330.1	U			-2,22
U35_39202	PREDICTED: hypothetical protein	XP_001717879.1	U			-2,22
U35_30550	Os05g0465000	NP_001055780.1	U			-2,23
U35_24799	OSIGBa0126J24.6	CAH65861.1	U			-2,25
U35_26213	hypothetical protein, conserved	XP_001463377.1	U			-2,25
U35_13494	hypothetical protein SSO2828	NP_344148.1	U			-2,27
U35_42585	hypothetical protein SNOG_02715	XP_001793312.1	U			-2,30
U35_9307	hypothetical protein BURPS1710b_A1302	YP_336459.1	U			-2,32
U35_33057	hypothetical protein Osl_002319	EAY74472.1	U			-2,35
U35_42239	Os06g0702400	NP_001058490.1	U			-2,36
U35_19196	hypothetical protein Osl_005450	EAY84217.1	U			-2,40
U35_47471	hypothetical protein OsJ_017787	EAZ34304.1	U			-2,41
U35_27456	expressed protein	ABA99196.2	U			-2,42
U35_47038	hypothetical protein OsJ_028376	EAZ44893.1	U			-2,47
U35_19052	hydrolase, alpha/beta fold family protein	NP_175660.2	U			-2,52
U35_45310	unknown	ABK21576.1	U			-2,55
U35_42359	hypothetical protein SNOG_04656	XP_001795069.1	U			-2,58
U35_14906	GA10917-PA	XP_001357411.1	U			-2,60
U35_11767	PR domain zinc finger protein 1	XP_001844966.1	U			-2,61
U35_13253	GAF domain/GGDEF domain/EAL domain protein	YP_258554.1	U			-2,61
U35_25951	hypothetical protein SNOG_15279	XP_001805435.1	U			-2,61
U35_12423	hypothetical protein SNOG_07301	XP_001797642.1	U			-2,68
U35_47878	hypothetical protein OsJ_002803	EAZ12978.1	U			-2,68
U35_41975	hypothetical protein SNOG_15648	XP_001805792.1	U			-2,72
U35_7996	hypothetical protein Osl_004822	EAY76975.1	U			-2,72
U35_28078	unknown	AAL77105.1	U			-2,73
U35_43562	unnamed protein product	CAO41679.1	U			-2,78
U35_26827	AT-hook DNA-binding protein	ABO42262.1	U			-2,79
U35_46866	Os04g0229100	NP_001052290.1	U			-2,84
U35_45054	Os01g0219900	NP_001042422.1	U			-2,85
U35_3415	ALDOL_ORYSJ Putative aldehyde oxidase-like protein	Q6Z351	U			-2,92
U35_42192	hypothetical protein Osl_019775	EAY98542.1	U			-3,15
U35_39183	hypothetical protein OsJ_015898	EAZ32415.1	U			-3,20
U35_5129	hypothetical protein Osl_020777	EAY99544.1	U			-3,40
U35_17480	Os09g0483100	NP_001063506.1	U			-3,55
U35_43972	hypothetical protein OsJ_000281	EAZ10456.1	U			-3,97
U35_49724	hypothetical protein OsJ_016476	EAZ32993.1	U			-4,09
U35_43057	putative PSR9	BAD10056.1	U			-4,17

U35_49680	hypothetical protein Osl_010150	EAY88917.1	U			-4,56
U35_36059	hypothetical protein FG08319.1	XP_388495.1	U			-4,58
U35_42283	hypothetical protein SNOG_06942	XP_001797302.1	U			-5,26
U35_11528	hypothetical protein SNOG_00708	XP_001791385.1	U			-5,70
U35_39825	hypothetical protein FG05565.1	XP_385741.1	U			-6,69
U35_41840	ribonucleoprotein antigen-like	BAD34420.1	U			-7,61
U35_41974	putative hydrolase	AAL79743.1	U			2,24

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel für die hervorragende Betreuung, für die Bereitstellung des Themas und für die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Volker Wissemann danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und seinen Bemühungen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Patrick Schäfer für die exzellente Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen kreativen Ideen, mit denen er dieses Projekt erst lebendig gemacht hat.

Danke auch an Joern Pons-Kühnemann, für die tolle Unterstützung bei der Microarray-Auswertung.

Weiterhin danke ich für die kompetente technische Unterstützung im täglichen Laboralltag: Rebekka Fensch, Christina Neumann, Dagmar Biedenkopf und Martina Claar.

Ich möchte mich auch bei allen Kollegen im IPAZ bedanken, für die wissenschaftliche Unterstützung, das freundschaftliche Verhältnis und den nötigen Humor, die das Arbeiten im Institut zum Vergnügen gemacht haben.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Gunther Döhlemann, Alexandra Molitor, Sophie Jacobs und Stefan Arndt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern bedanken, die mich während meines Studiums und dieser Arbeit unterstützt haben.

Danke Gunther, für deine Liebe, Unterstützung und deine Motivation.

DANKE