

**Molekulare Analyse der kompatiblen Interaktion von**  
***Piriformospora indica***  
**mit *Arabidopsis thaliana***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
(Dr. agr.)

Der Fachbereich Agrarwissenschaften,  
Ökotropologie und Umweltmanagement  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

durchgeführt am  
Institut für Phytopathologie  
und Angewandte Zoologie

vorgelegt von  
M.Sc. Sophie Jacobs  
Gießen, Februar 2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Peter Kämpfer

1. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt



**... für Leni und Edith**





## **Teile dieser Arbeit sind oder werden veröffentlicht**

### **Veröffentlicht:**

Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., Petutschnig, E., Likpa, V., Kogel, K-H., Schäfer, P. (2011) Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of Arabidopsis roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiol* 156: 726-740.

Jacobs, S., Schäfer, P., Kogel, K-H. (2013) Root-based innate immunity and its suppression by the mutualistic fungus *Piriformospora indica*. In: *Sebacinales and their biotechnological applications*; Springer Berlin, Heidelberg: pp 223-237.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>vi</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Grundprinzipien der pflanzlichen Immunität.....	1
1.1.1 Die basale Abwehr – MAMP-vermittelte Immunität .....	1
1.1.2 Prinzipien der Erkennung und Signaltransduktion .....	2
1.1.2.1 Mustererkennungsrezeptoren für MAMPs in Wirt-Pathogen-Interaktionen.....	2
1.1.2.2 Mustererkennungsrezeptoren für Schaden-assoziierte molekulare Strukturen (DAMPs) .....	5
1.1.3 R-Gen-vermittelte Resistenz – Effektor-vermittelte Immunität .....	6
1.1.4 PRRs in mutualistischen Interaktionen .....	7
1.1.5 Abwehrreaktionen auf zellulärer Ebene nach MAMP-Erkennung.....	8
1.2 Systemisch erworbene Resistenz und die Rolle der Phytohormone in der Pathogenabwehr.....	12
1.2.1 Ethylen, Jasmonsäure und Salizylsäure .....	12
1.2.2 Gibberellinsäure .....	13
1.2.3 Die systemisch erworbene Resistenz (SAR).....	14
1.2.4 Induzierte systemische Resistenz (ISR).....	15
1.3 Pflanze-Pathogen-Interaktion.....	16
1.3.1 Mutualistische Pflanze-Pilz Beziehungen.....	16
1.3.2 Arbuskuläre Mykorrhiza .....	17
1.4 <i>Piriformospora indica</i> .....	18
1.4.1 Taxonomische Zuordnung .....	18
1.4.2 Wurzelbesiedlung durch <i>P. indica</i> .....	19
1.4.3 Einfluss von <i>P. indica</i> auf die Wirtspflanze .....	19
1.4.4 Symbiontische Interaktionen und das pflanzliche Immunsystem.....	20
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit .....	21
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen .....	22
2.2 Kultivierung von <i>Piriformospora indica</i> .....	23
2.3 Quantifizierung der Wurzelbesiedlung durch <i>P. indica</i> .....	23
2.4 Molekularbiologische Standardmethoden.....	25
2.4.1 Extraktion genomischer DNA aus Wurzeln.....	25

2.4.2	RNA-Extraktion .....	25
2.4.3	DNaseI-Verdau der RNA-Proben .....	26
2.4.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von RNA-und DNA-Proben .....	26
2.4.5	cDNA Synthese.....	26
2.4.6	Standard Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	26
2.4.7	Gelelektrophorese .....	27
2.4.8	Quantitative Real-time PCR (qPCR) .....	27
2.4.9	Genexpressionsanalysen in besiedelten <i>Arabidopsis</i> -Wurzeln.....	28
2.5	Zyto-histologische Methoden .....	29
2.5.1	Färbung mit WGA Alexa Fluor® 488 ( <i>Wheat Germ Agglutinin</i> ) .....	29
2.5.2	Analyse der Gibberellinsignalgebung in <i>P. indica</i> -besiedelten Wurzeln – RGA-Degradation.....	30
2.6	Analyse zur Untersuchung der MAMP-induzierten Abwehrreaktionen.....	31
2.6.1	Analyse der Flagellin-induzierten Hemmung des Keimlingswachstums .....	31
2.6.2	Anilin-Blau-Färbung zur Kallose-Detektion .....	32
2.6.3	Semiquantitative Analyse der Kallosebildung in Wurzeln .....	32
2.7	Luminol-Assay zur Quantifizierung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung.....	33
2.8	Proteinbiochemische Methoden .....	34
2.8.1	Extraktion von Gesamtprotein aus Wurzelproben .....	34
2.8.2	SDS-Gelelektrophorese.....	35
2.8.3	Coomassiefärbung für Proteingele.....	35
2.8.4	Blotten und Immunodetektion von MAPK-Proteinen .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1	Zytologische Analysen der <i>Arabidopsis-P. indica</i> Interaktion – Verlauf der Wurzelbesiedlung durch <i>P. indica</i> .....	37
3.2	Analyse der MAMP-triggered immunity in <i>P. indica</i> besiedelten Wurzeln.....	40
3.2.1	Quantifizierung des oxidative burst in <i>P. indica</i> besiedelten <i>Arabidopsis</i> -Wurzeln ...	40
3.2.2	Detektion von Kallose in Wurzeln.....	42
3.2.3	Analyse der Flagellin/elf18- induzierten Hemmung des Keimlingswachstums.....	44
3.2.4	Der Einfluss von <i>P. indica</i> auf die Expression von flg22-induzierten Genen .....	46
3.2.5	Die Rolle der MAPK-Kaskaden in der MAMP-assozierten Signaltransduktion in Anwesenheit von <i>P. indica</i> .....	47
3.3	Der Einfluss von <i>P. indica</i> auf die MAMP-triggered immunity in Signalwegmutanten ..	49



3.4	Analyse der Expressionsmuster flg22-induzierter Gene in <i>pub22/23/24</i> in der Interaktion mit <i>P. indica</i> .....	51
3.5	Der Einfluss von Phytohormonen auf die Wurzelbesiedlung durch <i>P. indica</i> .....	53
3.5.1	Die Rolle von Jasmonsäure-assoziiertes Abwehr während der Besiedlung durch <i>P. indica</i> .....	54
3.5.2	Expression von Salizylsäure-und Jasmonsäure-responsiven Genen in der mit <i>P. indica</i> besiedelten JA-Mutante <i>jin1-1</i> .....	55
3.5.3	Der Einfluss von Gibberellinsäure auf die Interaktion mit <i>P. indica</i> .....	57
3.5.4	<i>P. indica</i> -Besiedlung und Genexpression in GA-Mutanten.....	59
3.6	Die Rolle der Pep1-assoziiertes Abwehr während der Besiedlung durch <i>P. indica</i> .....	62
3.6.1	Analyse des Pep1-induzierten <i>oxidative burst</i> in <i>P. indica</i> besiedelten Wurzeln.....	62
3.6.2	Quantifizierung der Besiedlung durch <i>P. indica</i> in <i>pepr</i> -Mutanten.....	65
3.6.3	Expression von Abwehrgenen in <i>P. indica</i> besiedelten Wurzeln nach Pep1-Elizitierung.....	65
3.6.4	Phosphorylierung von MAPKs nach Pep1-Elizitierung in <i>P. indica</i> besiedelten Wurzeln.....	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>68</b>
4.1	Die mutualistische Symbiose von <i>Arabidopsis</i> -Wurzeln mit <i>P. indica</i> .....	68
4.2	<i>P. indica</i> unterdrückt die MAMP-triggered immunity (MTI).....	70
4.3	Die MAMP-triggered immunity kann die Wurzelbesiedlung durch <i>P. indica</i> hemmen .	75
4.4	Der Einfluss Phytohormon-basierter Abwehr auf die Wurzelbesiedlung durch <i>P. indica</i> .....	78
4.4.1	<i>P. indica</i> nutzt den JA-Signalweg um Immunantworten zu unterdrücken .....	78
4.4.2	Die durch <i>P. indica</i> induzierte GA-Signalegebung beeinflusst die Balance zwischen JA und SA-aktivierter Abwehr.....	80
4.5	<i>P. indica</i> kann Pep1-induzierte Immunantworten nicht unterdrücken .....	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung/Summary</b> .....	<b>90</b>
5.1	Zusammenfassung.....	90
5.2	Summary .....	91
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>93</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>115</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>116</b>



## Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Avr	Avirulenz
BAK1	<i>brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1</i>
bp	Basenpaar
BR	Brassinosteroid
BSA	Rinder Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CC	<i>coiled-coil</i>
cDNA	komplementäre DNA
CDPK	Calcium-abhängige Protein-Kinase
CERK1	<i>chitin elicitor receptor kinase 1</i>
CM	Complex Medium
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia-0
d.h.	das heist
dai	Tage nach Inokulation ( <i>days after inoculation</i> )
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTI	<i>DAMP-triggered immunity</i>
EFR	Elongationsfaktor-Tu Rezeptor
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
ER	endoplasmatisches Retikulum
ET	Ethylen
ETI	<i>effector triggered immunity</i> , Effektor induzierte Immunität
ETS	<i>effector triggered susceptibility</i> , Effektor induzierte Suszeptibilität
Flg22	Flagellin22
FLS2	<i>Flagellin sensitive 2</i>
GA	Gibberellinsäure
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	doppelt destilliert Wasser
HR	hypersensitive Reaktion
ISR	induzierte systemische Resistenz
JA	Jasmonsäure
JAZ	<i>Jasmonate ZIM-domain</i>
KLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie
Ler-0	Landsberg (Ökotyp)
LPS	Lipopolysaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leuzinreiche Wiederholung
LysM	Lysin-Motive
M	Molar

---

MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeJA	Methyljasmonat
min	Minute(n)
mock	Kontrollbehandlung ( <i>mock</i> : engl. für Attrappe, Blindprobe)
mRNA	Boten Ribonukleinsäure
MS	Murashige und Skoog
MTI	<i>MAMP-triggered immunity</i>
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCD	<i>programmed cell death</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEPR1/2	<i>PEP receptor 1/2</i>
PR	<i>pathogenesis-related</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae pathovar tomoto</i>
RBOHs	<i>respiratory burst oxidase homologs</i>
R-Gen	Resistenz Gen
RLK	<i>receptor like cytoplasmatic kinase</i> , Rezeptor-ähnliche (zytoplasmatische) Kinase
RLP	<i>receptor like protein</i> , Rezeptor-ähnliches Protein
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
SA	Salizylsäure
SAR	systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
T <sub>anneal</sub>	Anlagerungstemperatur
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
vs.	versus
w/v	Masse pro Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar



# 1 Einleitung

## 1.1 Grundprinzipien der pflanzlichen Immunität

Pflanzen müssen sich durch ihre sessile Lebensform an variierende abiotische und biotische Umweltparameter wie Licht, Wasser, Temperatur, Trockenheit und umgebende Mikroorganismen anpassen. Um sich einem Angriff von potentiellen Krankheitserregern zu entziehen, schützen sie sich durch eine frühe Erkennung und eine effiziente Immunabwehr (Gomez-Gomez & Boller, 2002). Zu den konstitutiven Abwehrmechanismen, die schon vor dem Kontakt mit dem Pathogen vorhanden sind, zählen sowohl mechanische und strukturell dauerhafte Barrieren (Kutikula, Zellwände und Haare) als auch die biochemische und enzymatische Synthese von toxisch wirkenden Sekundärmetaboliten wie Saponinen, Terpenen und Glukosinolaten, die in der Vakuole akkumuliert werden (Papadopoulou et al., 1999; Thordal-Christensen, 2003). Nach Überwindung der präformierten Barrieren stehen der erfolgreichen Besiedlung eines Wirtes induzierte post-invasive Abwehrmechanismen entgegen. Zur Induktion dieser post-invasiven Abwehrmechanismen muss die Pflanze in der Lage sein, potentielle Angreifer zu erkennen. Diese Erkennung folgt dem Prinzip von „*self*“ und „*nonself*“ also der differentiellen Perzeption eigener oder fremder Moleküle. Diese Fähigkeit stellt ein Schlüsselmerkmal in der Aktivierung von Abwehrmechanismen der sogenannten angeborenen Immunität (*innate immunity*) dar (Nürnberger & Brunner, 2002). Hierzu bedient sich die Pflanze eines zweigeteilten Erkennungssystems (Jones & Dangl, 2006), wobei der eine Teil auf erster Ebene Mikroben global erkennt, (Basalresistenz oder *MAMP-triggered immunity*), der zweite Teil direkt auf einzelne mikrobielle Stämme, (R-Gen-spezifische Resistenz) reagiert. Es ist allgemein akzeptiert, dass beide Abwehrsysteme in ihrer Integrität und Relevanz im pflanzlichen Immunsystem nicht voneinander zu trennen sind, da sie sich wahrscheinlich gegenseitig beeinflussen oder begünstigen (Boller & Felix, 2009; Tsuda & Katagiri, 2010; Schwessinger & Ronald, 2011; Thomma et al., 2011).

### 1.1.1 Die basale Abwehr – MAMP-vermittelte Immunität

Pflanzen besitzen ein sehr breites, basales Erkennungssystem für fremde Moleküle, sogenannter MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) oder PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), die charakteristisch für bestimmte nicht-pathogene oder pathogene Mikroorganismen sind. Unter diesen MAMPs und PAMPs werden allgemeine, evolutionär wenig veränderliche Moleküle zusammengefasst, die von essentieller Wichtigkeit

für den mikrobiellen Organismus sind, in dieser Form nicht im Wirt vorkommen und damit die Unterscheidung zwischen fremden Organismen und den eigenen Zellen ermöglichen (Nürnberger & Kemmerling, 2006). Allgemeiner werden MAMPs auch als Elizitoren bezeichnet (Ausubel, 2005; Boller & Felix, 2009). Im Folgenden werden MAMPs und PAMPs der Einfachheit halber nur als MAMPs bezeichnet, da diese konservierten Strukturen mitunter auch in nicht-pathogenen Mikroorganismen vorkommen (He et al., 2007; Boller & Felix, 2009). Zusätzlich können Pathogene auch indirekt wahrgenommen werden. Dies geschieht über die Entstehung und Erkennung wirtseigener Moleküle, den sogenannten Schaden-assoziierten molekularen Strukturen (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*; Boller & Felix, 2009; Monaghan & Zipfel, 2012). Die basale Abwehr wird induziert nach Wahrnehmung eines DAMPs/MAMPs und wird daher heute als MAMP-vermittelte Immunität (MTI; *MAMP-triggered immunity*) definiert (Medzhitov & Janeway, 2002; Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010). Die MAMP-vermittelte Immunität bildet das Fundament gegenüber mikrobiellen Infektionen und trägt entscheidend zur Nichtwirtsimmunität bei (Nürnberger & Lipka, 2005, Schulze-Lefert & Panstruga, 2011). Die sich anschließenden Abwehrreaktionen werden in Kapitel 1.1.5 näher beschrieben und im weiteren Text nur noch als MAMP-vermittelte Immunität bzw. MTI bezeichnet.

### **1.1.2 Prinzipien der Erkennung und Signaltransduktion**

Anders als das menschliche Immunsystem verfügen Pflanzen nicht über mobile Abwehrzellen oder ein auf Antikörpern-basierendes, adaptives Immunsystem. Für eine Pathogenabwehr muss die in jeder Zelle innewohnende Immunität sowie von der Infektionsstelle ausgehende Verbreitung von Signalen ausreichen (Nürnberger et al., 2004; Jones & Dangl, 2006). Die in 1.1.5 skizzierten induzierten Abwehrmechanismen in der MAMP-vermittelten Immunität werden erst ausgelöst, wenn ein attackierendes Pathogen erkannt wird.

#### **1.1.2.1 Mustererkennungsrezeptoren für MAMPs in Wirt-Pathogen-Interaktionen**

Eine zentrale Rolle bei der Pathogen-Erkennung spielen entsprechende Transmembranrezeptoren, die auch als Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *pattern-recognition receptors*) bezeichnet werden (Zipfel, 2008; Postel & Kemmerling, 2009). Sie ermöglichen die Erkennung der jeweiligen MAMPs, zu welchen Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Bakterien, Peptidoglykane Gram-positiver Bakterien, bakterielles Flagellin, der bakterielle Elongationsfaktor Tu (EF-Tu),  $\beta$ -Glukane von Oomyceten sowie Chitin von Pilzen zählen (Felix et al., 1999; Miya et al., 2007; Nürnberger & Kemmerling, 2006; Zipfel,

2008; Silipo et al., 2010). Dabei ist die Erkennung über den respektiven Rezeptor ein sehr spezifischer Prozess (Zipfel & Robatzek, 2010) und die bekannten pflanzlichen PRRs weisen daher unterschiedliche Strukturen auf (Boller & Felix, 2009; Postel & Kemmerling, 2009). Sie bestehen oft aus einer extrazellulären Leucin-reichen Domäne (*leucin-rich repeats*; LRRs) oder aus Lysin-Motiven (LysM), welche für die MAMP-Perzeption gebraucht werden (vgl. Abb. 1.1). Außerdem besitzen sie eine Transmembrandomäne zur Verankerung in der Zellmembran, welche mit einer intrazellulären Kinase-Domäne verbunden ist, die für die Weiterleitung des Signals nach MAMP Erkennung benötigt wird (Postel & Kemmerling, 2009). Der aus *Arabidopsis thaliana* (im weiteren Text nur noch als *Arabidopsis* bezeichnet) zurzeit am besten charakterisierte Pflanzenrezeptor ist FLS2 (*FLAGELLIN-SENSING 2*; Gomez-Gomez & Boller, 2002). Er gehört zur Klasse der LRR-RLKs (*leucin-rich repeat receptor-like kinases*). FLS2 bindet ein 22 Aminosäuren großes Erkennungsmotiv des bakteriellen Flagellinproteins (flg22; Zipfel et al., 2004; Chinchilla et al., 2006) über seine extrazelluläre LRR Domäne. Für die Aktivierung der Flagellin-induzierten Abwehrmaßnahmen ist jedoch ein weiterer Rezeptor notwendig. Hierbei kommt es nach Bindung von Flagellin an FLS2 zu einer Heterodimerisierung mit der Rezeptorkinase BAK1 (*brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1*; Chinchilla et al., 2007). Obwohl BAK1 nicht an der flg22-Bindung beteiligt ist, ist seine Interaktion mit FLS2 für eine vollständige Signalweiterleitung notwendig und hat damit eine wichtige regulatorische Rolle als Rezeptor von MAMP-abhängigen Signalwegen (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). Ferner konnten Lokalisationsstudien zeigen, dass FLS2 in allen Geweben zu finden und eine Erkennung von flg22 durch seinen Rezeptor FLS2 in allen Klassen höherer Pflanzen konserviert ist (Robatzek et al., 2006; Boller & Felix, 2009).

Analog zum FLS2/flg22 System ist der EF-Tu Rezeptor (EFR) ein weiterer Vertreter der abwehrrelevanten LRR-RLKs (Zipfel et al., 2006). Dieser bindet den N-terminalen Teil des bakteriellen Elongationsfaktors EF-Tu, der durch das Peptid elf18 nachgebildet werden kann (Kunze et al., 2004; Zipfel et al., 2006). Elf18 löst nach Erkennung eine pflanzliche Immunreaktion aus, die weitestgehend mit der durch flg22-ausgelösten übereinstimmt und ebenfalls BAK1 als Rezeptor benötigt (Kunze et al., 2004, Zipfel et al., 2006; Roux et al., 2011). Anders als flg22, was von allen Pflanzenfamilien erkannt wird, beschränkt sich die elf18 Responsivität auf die Familie der *Brassicaceae* (Kunze et al., 2004; Zipfel, 2008). Weitere Mustererkennungsrezeptoren, die in der Erkennung von Pilzen eine wichtige Rolle spielen, sind die Chitinbindenden Rezeptoren mit lysinhaltigen (LysM)-Motiven. In Reis sind zwei LysM-tragende PRRs an der Chitin-induzierten Abwehr beteiligt. Das



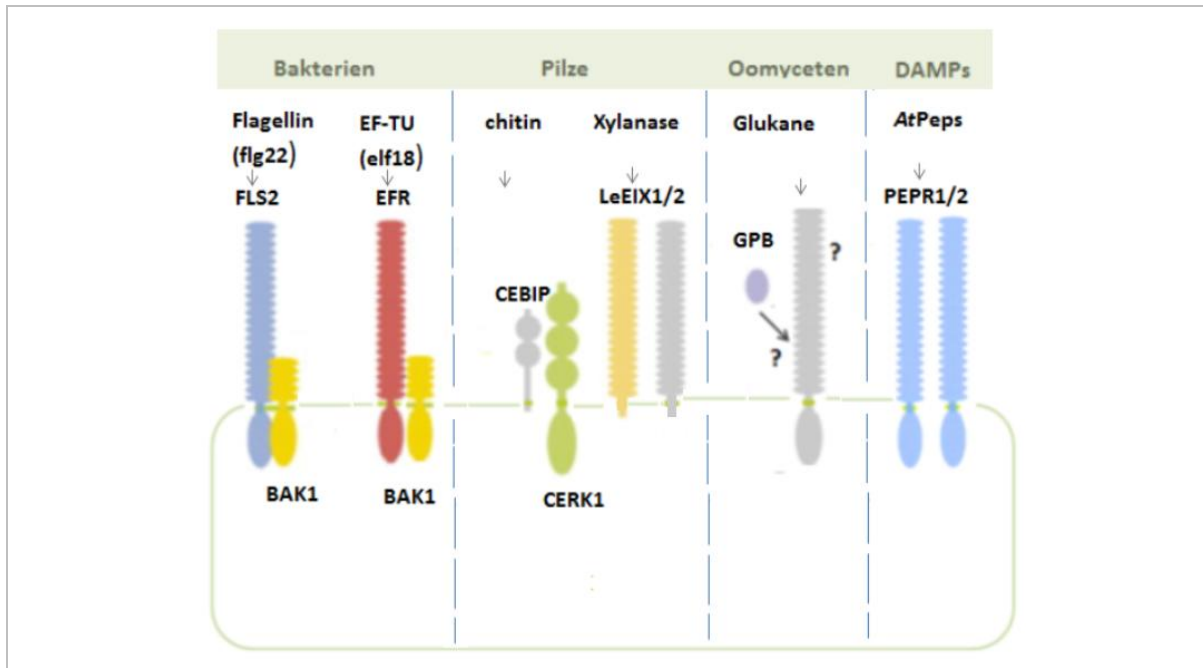
Chitinbindeprotein CEBiP (*chitin elicitor binding protein*) aus Reis, welches zu den LysM-RLPs (*receptor-like proteins*) zählt und daher keine Domäne zur Signalweiterleitung aufweist und CERK1 (*chitin elicitor receptor kinase 1*), welches zu den LysM-RLKs gehört (Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2010). Für eine Transmembranaktivierung und Signalweiterleitung benötigt CEBiP daher wahrscheinlich eine Formation mit einem anderen Membranprotein. Eine Rezeptor-Komplexformation nach Chitinbehandlung zwischen CEBiP und CERK1 konnte kürzlich in Reis gezeigt werden, was CERK1 als einen zusätzlichen Rezeptor ausweist (Shimizu et al., 2010). Obwohl ein Chitin-Bindungsnachweis von CERK1 in Reis noch aussteht, konnte seine Relevanz in der Chitin-induzierten Abwehr belegt werden (Shimizu et al., 2010). In *Arabidopsis* konnten Bindungsstudien CERK1 als Chitinrezeptor identifizieren, wobei eine direkte und spezifische Bindung von Chitin an CERK1 nachgewiesen wurde (Petutschnig et al., 2010; Iizasa et al., 2010). Weitere Studien lieferten Hinweis dafür, dass CERK1 auch eine Rolle in der Erkennung von phytopathogenen Bakterien hat. Obwohl die bakterielle Zellwand aus dem Chitin-verwandten Peptidoglykan (PGN) besteht (Gimenez-Ibanez et al., 2009), konnte *in vitro*-Interaktion nur geringe PGN-Bindung an CERK1 aufzeigen. Dagegen konnten die plasmamembranständige LysM-Proteine LYM1 und LYM3 als weitere Komponenten im PGN-Erkennungssystem identifiziert werden. Sie agieren als PGN-Bindeproteine, aber da sie keine Transmembrandomäne besitzen wird angenommen, dass für eine Signaltransduktion CERK1 als Corezeptor fungiert, wobei Interaktionsstudien *in planta* noch ausstehen (Willmann et al., 2011). CERK1 vereint demnach in *Arabidopsis* die Rolle als Corezeptor bei der PGN-Perzeption und als eigenständiger PRR der Chitinperzeption (Monaghan & Zipfel, 2012).

Für das aus Spezies der Gattung *Phytophthora* bekannte MAMP pep13, ein 13 Aminosäuren langes Peptid aus einer extrazellulären Transglutaminase, steht die molekulare Charakterisierung des Rezeptors noch aus (Nürnberger et al., 1994; Brunner et al., 2002).

In der Sojabohne und anderen Vertretern der *Fabaceae* konnte ein  $\beta$ -Glukan-bindendes Protein (GBP) identifiziert werden, welches  $\beta$ -Glukane aus Oomyceten bindet und mit der Plasmamembran assoziiert ist (Mithöfer et al., 2000). Es verfügt neben einer Bindedomäne auch über  $\beta$ -1-3-Glukanase Aktivität, was eine erhöhte Freisetzung des  $\beta$ -Glukan-MAMPs bewirken könnte. Aufgrund einer fehlenden intrazellulären Kinasedomäne vermutet man, dass GBP mit anderen PRRs co-agiert (Fliegmann et al., 2004; 2005).

Ein weiteres Beispiel stellen die Rezeptoren LeEIX1 und LeEIX2 (*ethylen-inducing xylanase*) aus Tomate dar (Ron & Avni, 2004). Diese gruppieren in die Klasse der rezeptorähnlichen Proteine (RLPs; *receptor-like proteins*), da sie über eine extrazelluläre LRR-Domäne und ein

intrazelluläres Endozytosesignal, aber keine Kinase-Domäne verfügen. Obwohl beide Rezeptoren EIX1/2 das pilzliche PAMP Xylanase aus dem Pilz *Trichoderma viride* erkennen und unabhängig binden, wird die Aktivierung des Abwehrsignals nur durch EIX2 vermittelt (Bar et al., 2010). In Abbildung 1.1 sind die Eigenschaften der bisher am besten untersuchten MAMP/Rezeptor- Systeme nochmals graphisch zusammengefasst.



**Abb. 1.1: Mustererkennungsrezeptoren für MAMPs.**

Die Erkennung der bakteriellen MAMPs wie Flagellin (flg22) und des Elongationsfaktors-Tu (EF-Tu; elf18) wird durch die LRR-RLKs FLS2 und EFR gewährleistet. Als zusätzlicher Rezeptor für den FLS2 und EFR-Signalweg konnte die LRR-RLK BAK1 identifiziert werden. Nach MAMP-Bindung durch FLS2 und EFR dimerisieren diese mit BAK1 zu einem Rezeptorkomplex und die Abwehrsignalgebung wird eingeleitet. AtCERK1 vermittelt die Erkennung von Chitin und Peptidoglykanen in *Arabidopsis*. In Reis arbeitet OsCERK1 zusammen mit einem Chitinbindeprotein CEBiP in der Chitin-Erkennung und Signalweiterleitung. In der Tomate wird die Erkennung der pilzlichen Xylanase über die RLPs LeEIX1 und LeEIX2 vermittelt. In Leguminosen wird die Registrierung von Glukan aus Oomyceten durch Bindung an das Glukan-binde-Protein (GBP) gewährleistet. Für die RLPs GBP, LeEix1/2 -ohne intrazelluläre Kinasedomäne- steht die Identifizierung einer Interaktion mit anderen Membranproteinen noch aus. PEPR1, ein LRR-RLP, vermittelt die Erkennung des endogen produzierten DAMPs, AtPep1. Mit dem Rezeptor BAK1 wird ein DAMP-abhängiges Abwehrsignal eingeleitet (Graphik vereinfacht modifiziert nach Zipfel (2009)).

### 1.1.2.2 Mustererkennungsrezeptoren für Schaden-assoziierte molekulare Strukturen (DAMPs)

Neben den bereits beschriebenen RLKs bzw. RLPs, die in der Pathogenerkennung als Frühwarnsystem zum Initiieren der MTI dienen, sind auch Transmembranrezeptoren bedeutsam, welche indirekt Pathogene erkennen und eine Verstärkung der Abwehrantwort verursachen (Yamaguchi et al., 2006; 2010). Hierbei ermöglichen endogene Moleküle eine Wahrnehmung des Pathogens und dienen der Pflanze als Warnsignal. Diese werden als

sogenannte Schaden-assoziierte molekulare Strukturen bezeichnet (DAMPs; Boller & Felix, 2009). Ein bekannter DAMP Vertreter aus *Arabidopsis* ist das Peptid *AtPep1*. So wird nach verschiedenen Stimuli wie z.B. Verwundung, Methyljasmonat-, Salizylsäure-, Ethylen- oder flg22-Behandlung, das Gen *PROPEP1* induziert (Huffaker et al., 2006). Dabei besteht das eigentliche DAMP aus dem C-terminalen Teil des korrespondierenden Proteins und wird als *AtPep1* bezeichnet. Die *AtPep1* Erkennung erfolgt über die LRR-RLKs, PEPR1 und PEPR2 (*PEP receptor 1/2*; Yamaguchi et al., 2006; 2010). Mittels der *yeast two hybrid* Technik konnte BAK1 als zusätzlicher Rezeptor identifiziert werden, wobei der Nachweis einer *in vivo*-Interaktion noch aussteht (Postel et al., 2010; Monaghan & Zipfel, 2012). Letztendlich wird nach Bindung von *AtPep1* eine DAMP-abhängige Abwehr initiiert, die dem der MAMP-abhängigen Abwehr gleicht (Huffaker et al., 2006; Schulze et al., 2010; Krol et al., 2010). Da prozessierte *AtPep1* Peptide die Expression ihres eigenen *Precursor*-Gens regulieren, kann eine verstärkte Synthese von weiteren *AtPep1* erfolgen und damit ein möglicher positiver Rückkopplungsmechanismus zur Signalverstärkung durch die LRR-RLKs Rezeptoren PEPR1/PEPR2 entstehen (Huffaker & Ryan, 2007; Yamaguchi & Huffaker, 2011).

### 1.1.3 R-Gen-vermittelte Resistenz – Effektor-vermittelte Immunität

Um die MAMP-vermittelte Immunantwort zu umgehen, haben einige Pathogene sogenannte Effektormoleküle co-evolutiv entwickelt, welche ihre Virulenz steigern. Diese Effektoren, früher auch als Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren bezeichnet (Bent & Mackey, 2007; Boller & Felix, 2009), können mit der durch MAMPs/DAMPs ausgelösten Immunantwort interferieren, beispielsweise auf der Ebene der Pathogenerkennung, indem sie entsprechende PRRs Rezeptoren anvisieren oder nachgeschaltete Komponenten in der Signaltransduktion hemmen (Nomura et al., 2006; He et al., 2006; Xiang et al., 2008). Wird nach Überwindung der MTI die Besiedlung einer Wirtszelle ermöglicht, bezeichnet man diesen Prozess als Effektor-vermittelte Suszeptibilität (ETS; *effector-triggered susceptibility*), welche sich in der Ausbildung von Krankheitssymptomen äußert (Jones & Dangl, 2006; Hann & Rathjen, 2010). Gut untersuchte Vertreter dieser Effektormoleküle sind *AvrPto* und *AvrPtoB* aus *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000, welche die Kinaseaktivität der PRRs FLS2, BAK1 und CERK1 hemmen (Cui et al., 2009; Gimenez-Ibanez et al., 2009).

Als evolutionäre Anpassung wurde deshalb auf pflanzlicher Seite ein zweites nachgeschaltetes Erkennungssystem etabliert. Diese zweite Säule im pflanzlichen Immunsystem basiert auf der Erkennung von eingeschleusten Effektormolekülen eines Pathogens durch korrespondierende pflanzliche Resistenz (R)-Proteine. Dabei fungieren R-

Proteine als Rezeptoren und arbeiten größtenteils im Zytoplasma (Tameling & Takken, 2008). Charakteristisch für diese Rezeptoren ist eine NBS-LRR Struktur (*nucleotide binding site leucine-rich repeat*; Nürnberger et al., 2004). Kommt es zu einer Erkennung mikrobieller Anwesenheit über R-Proteine wird eine R-Gen-vermittelte Resistenz ausgelöst. Es handelt sich hierbei um eine rassenspezifische Pathogenerkennung, welche in eine zweite verstärkte Immunabwehr mündet. Diese ist definiert als Effektor-vermittelte Immunität (ETI; *effector-triggered immunity*; Jones & Dangl, 2006; Thomma et al., 2011) und steht mit der MAMP-vermittelten Abwehr evolutiv in Zusammenhang (Jones & Dangl, 2006; Nürnberger & Kemmerling 2006; Tsuda & Katagiri, 2010; Thomma et al., 2011). In diesem Konzept wird in einer dynamischen Co-Evolution ein Wettlauf vorangetrieben, der sich zum einen aus dem ständigen Bemühen des Pathogens, Erkennungsmaßnahmen zu unterdrücken oder zu umgehen und zum anderen dem Ziel des Wirts, dies zu verhindern, darstellt (Jones & Dangl, 2006; Thomma et al., 2011). In Pflanzen werden somit für die beiden Säulen des Immunsystems strukturelle Module eingesetzt, wodurch sowohl MAMPs im Falle der MTI, aber auch Effektormoleküle im Rahmen der ETI erkannt werden (Boller & He, 2009). Mit der Aktivierung der Rezeptoren werden schließlich Abwehrreaktionen eingeleitet, die eine Invasion der Pathogene verhindert (Nürnberger et al., 2004).

#### **1.1.4 PRRs in mutualistischen Interaktionen**

Auch in der Etablierung mutualistischer Interaktionen wird ein spezifischer Erkennungsmechanismus beider Partner vorausgesetzt. So ist bekannt, dass an der frühen Signalkette bei Erkennung und Etablierung mutualistischer Pflanze-Mikroben-Interaktionen LysM-Rezeptorkinasen beteiligt sind. Zur Bildung einer Symbiose zwischen Leguminosen und Wurzelbakterien aus der Familie der *Rhizobiaceae* (Rhizobien) werden Nodulations (Nod)-Faktoren von den Rhizobien abgegeben. Diese Nod-Faktoren sind Lipochitooligosaccharide mit  $\beta$ -1,4-verknüpftem N-Acyl-D-glucosamin-Grundgerüst und ihre Wahrnehmung erfolgt über Nod-Faktor-Rezeptorkinasen (NORKs, *nodulation receptor kinases*; Endré et al., 2002). Hierzu zählen unter anderem NFR1 und NFR5 (NFR, *nodulation factor receptor*; Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Indrasumunar et al., 2010) aus *Lotus japonicus* und *Glycine max*. In ihrem Grundaufbau bestehen sie aus einer extrazellulären LysM-Domäne, an welche die Nod-Faktoren vermutlich binden (Madsen et al., 2011) und einer intrazellulären Kinase-Domäne, die eine starke Homologie zum *Arabidopsis* Chitin-Rezeptor CERK1 aufweist (Lohmann et al., 2010). Kürzlich konnte durch ein „domain-swap“ Experiment zwischen CERK1 und NFR1 gezeigt werden, dass durch

einen Pathogen-responsiven Rezeptor symbiotische Signalweiterleitung übertragen werden kann (Nakagawa et al., 2011). Analog zu den Nod-Faktoren von Rhizobien bilden sogenannte Myk-Faktoren das pilzliche Ausgangssignal der arbuskulären Mykorrhizapilze für die Aktivierung der frühen Signaltransduktion in der Pflanze (Maillet et al., 2011). Bisher konnte kein Myk-spezifischer Rezeptor identifiziert werden, wobei in einer nicht-Leguminosen Pflanze, *Parasponia andersonii*, eine LysM-RLKs (PaNFP; *nod factor perception*) charakterisiert wurde, welche eine duale Rolle bei der frühen Erkennung und Etablierung sowohl von Rhizobien also auch von Mykorrhizapilzen spielt (Op den Camp et al., 2011).

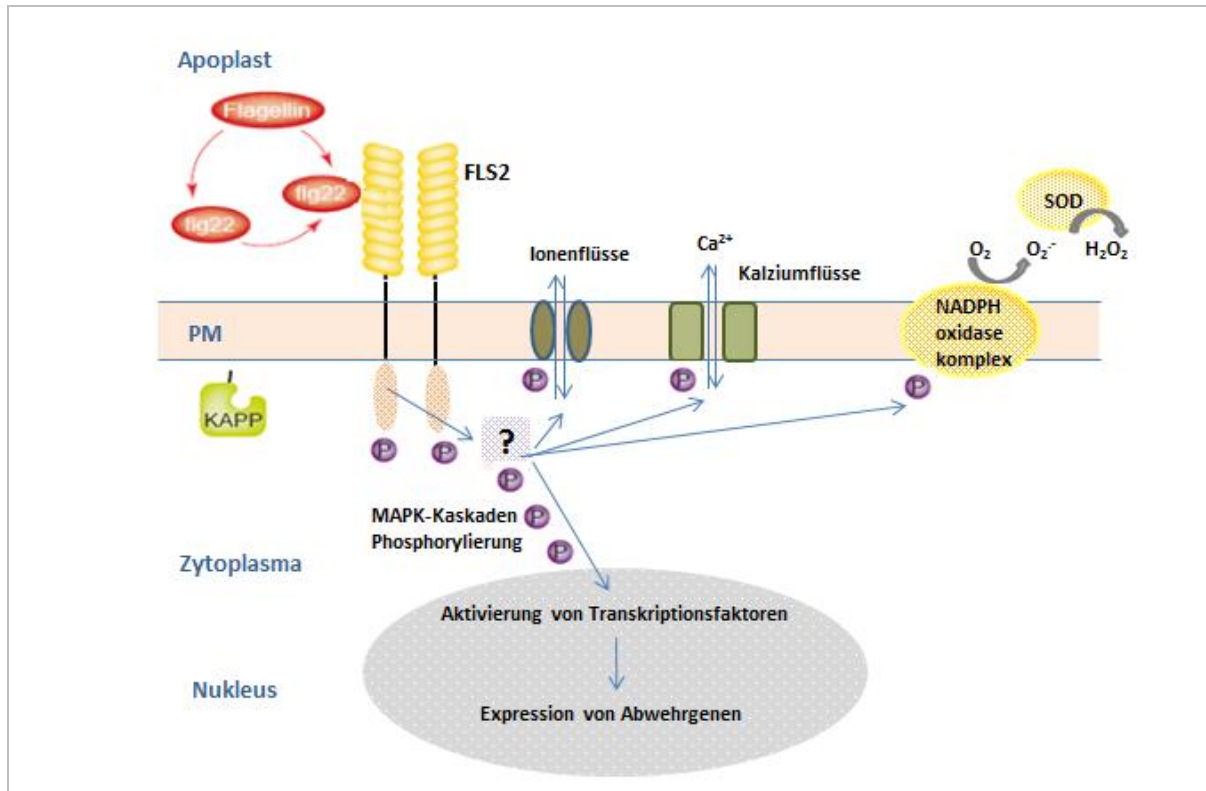
### 1.1.5 Abwehrreaktionen auf zellulärer Ebene nach MAMP-Erkennung

Nach Erkennung eines MAMPs durch seinen entsprechenden MAMP-Rezeptor wird eine komplexe Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt (Zipfel et al., 2004; 2006). Eine solche Signalweiterleitung soll hier anhand der intrazellulären Signalwege nach Erkennung von flg22 durch seinen Rezeptor FLS2 im Rahmen der MTI exemplarisch dargelegt werden (vgl. Abb. 1.2). Hierbei ist eines der ersten nachgewiesenen Ereignisse in der Signalweiterleitung ein Abfall in der Plasmamembranspannung, der 1 - 3 Minuten nach MAMP-Erkennung messbar wird (Felix et al., 1999; Ranf et al., 2008; Jeworutzki et al., 2010). Dieser Abfall der Plasmamembranspannung beruht auf einer Aktivierung von Ionenströmen ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{H}^{+}$ -Einstrom sowie  $\text{K}^{+}$ -,  $\text{Cl}^{-}$ - und Nitrat-Ausstrom). Die Ionenkanalaktivierung und folgende Depolarisation unterliegt der Kinaseaktivität des FLS2 Rezeptors und der BAK1 Kinase (Jeworutzki et al., 2010) und resultiert in einer Alkalisierung des Apoplasten (Felix et al., 1999; Zipfel et al., 2006). Eine transiente Akkumulation von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Zytoplasma ist Voraussetzung für viele nachgelagerte Abwehrantworten wie z. B. eine Aktivierung von Kalzium-abhängigen Proteinkinasen (CDPKs; *calcium-dependent protein kinases*). Sie initiieren u.a. eine schnelle Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; *reactive oxygen species*) im extrazellulären Raum (Boudsocq et al., 2010; Marino et al., 2012). Der Vorgang wird als *oxidative burst* bezeichnet und wird durch membrangebundene NADPH-Oxidasen (Rboh; *respiratory burst oxidase homologs*) (Apel & Hirt, 2004; Torres et al., 2006) katalysiert. In *Arabidopsis* ist lediglich RbohD für eine volle ROS Generierung nach MAMP-Erkennung erforderlich (Zhang et al., 2007). Die ROS-Generierung wird durch eine CDPK-vermittelte Phosphorylierung und direkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung der NADPH-Oxidasen aktiviert, welche gemeinsam mit einer Superoxiddismutase (SOD) die Wasserstoffperoxid- ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )-Freisetzung katalysieren (Ogasawara et al., 2008; Boudsocq et al., 2010). Neuere

Studien konnten aufzeigen, dass auch apoplastische Peroxidasen am flg22-induzierten *oxidative burst* beteiligt sind (Daudi et al., 2012; O'Brien et al., 2012). Die Generierung und Freisetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist dabei schnell, wirkt toxisch auf eindringende Pathogene im Apoplast (Lamb & Dixon, 1997) und trägt zudem zur strukturellen Verstärkung der Zellwand insbesondere durch Vernetzung von Glykoproteinen bei (Lamb & Dixon, 1997; Hückelhoven, 2007). Neben der Etablierung lokaler Barrieren besitzt es als diffuses Signal die Rolle als sekundäre Signaltransmitter für die Induzierung nachgeschalteter Signalwege wie Salizylsäure-abhängiger Signalwege (Durrant & Dong, 2004; Tada et al., 2008).

Neben der Bildung von ROS hat der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom auch einen Einfluss auf die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinase-(MAPKs)-Kaskaden (Asai et al., 2002; Tena et al., 2011; Segonzac et al., 2011). MAPKs modulieren als konservierte Signalmoleküle die Übertragung von externen Signalen, generiert von Rezeptoren, in intrazelluläre Antworten (Pitzschke et al., 2009). Eine MAPK-Kaskade besteht meist aus einer hierarchischen Anordnung von aufeinanderfolgenden MAPKs, die sich durch sukzessive Phosphorylierungsreaktionen transient aktivieren können. Am Ende dieser Signalkaskade steht oft die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, welche das Signal in die Transkription von Abwehr-assoziierten Genen einleiten (Asai et al., 2002; Lee et al., 2004). So resultiert beispielsweise die FLS2-vermittelte flg22-Erkennung in der Aktivierung der MAPKs MPK3, MPK4 und MPK6 (Asai et al., 2002; Suarez-Rodriguez et al., 2007). Ihre Aktivität ist nach flg22-Behandlung nach fünf Minuten messbar und nach einer Stunde biochemisch nicht mehr erfassbar (Asai et al., 2002). Die negative Regulation ihrer Aktivität wird durch Phosphatasen mittels einer Dephosphorylierungsreaktion erreicht und somit eine temporäre Begrenzung gewährleistet (Schweighofer et al., 2007; Anderson et al., 2011). Die Suche nach MAPK-Substraten *in vivo* konnte aufzeigen, dass MPK6 an der Initiierung der flg22-induzierten Ethylenbiosynthese beteiligt ist. Dabei phosphoryliert und stabilisiert MPK6 die zwei Isoformen ACC-Synthase 6 und 2 (1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxyl-Säure-Synthase) (Liu & Zhang, 2004), zwei Enzyme, welche für die Ethylenbildung notwendig sind (Joo et al., 2008). Folglich ist nach flg22-Erkennung eine stressaktivierte Ethylenproduktion innerhalb der ersten zehn Minuten messbar (Felix et al., 1999). Des Weiteren reguliert MPK3 den Transkriptionsfaktor VIP1 (*VirE2-interacting protein*; Djamei et al., 2007). Dieser Transkriptionsfaktor relokalisiert nach der Phosphorylierung durch MPK3 in den Zellkern, wo er dann regulierend an der Expression von *PR*-Genen (*pathogenesis-related genes*) beteiligt ist. Eine weitere regulatorische Rolle wurde MPK3 und 6 im nachgeordneten Biosyntheseweg des Phytoalexins Camalexin zugesprochen (Ren et al., 2008; Mao et al.,

2011). Der MPK3/6-Signalweg scheint für die flg22-induzierte Abwehr eine positiv regulatorische Funktion zu haben. Dagegen wird die FLS2-Aktivierung durch MPK4 negativ reguliert (Bittel & Robatzek, 2007).



**Abb. 1.2: Modell der flg22-induzierten Signalweitergabe in *Arabidopsis*.**

Nach Bindung von flg22 an seine Rezeptorkinase FLS2 werden verschiedene Signaltransduktionsprozesse eingeleitet. Es kommt zu Ionenflüssen, Kalziumströmen und zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch die NADPH-Oxidase RbohD, welche gemeinsam mit der Superoxiddismutase (SOD) in die Wasserstoffperoxid-Freisetzung während des „oxidative burst“ involviert sind. Weiterhin erfolgt eine Aktivierung von MAPK-Kaskaden. Die Aktivierung der MAPK-Kaskaden induziert die von Transkriptionsfaktoren angestoßene Expression von Abwehrgenen. Die Signaltransduktionskaskade wird kontrolliert durch KAPP, eine Kinase-assoziierte Protein Phosphatase, welche als Negativregulator FLS2 dephosphoryliert. Im Gegensatz zur ETI-vermittelten Abwehr führt dieser Weg nicht zu einer HR und somit Zelltod (Graphik vereinfacht modifiziert nach Gomez-Gomez & Boller, 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass MPK4 sowohl die Repression der Salizylsäure-vermittelten Pathogenabwehr als auch die Aktivierung der JA-abhängigen Abwehr koordiniert (Petersen et al., 2000; Brodersen et al., 2006). Als Substrat der MPK4 wurde das Protein MKS1 (*MAP kinase substrate 1*; Andreasson et al., 2005) identifiziert, welches MPK4 phosphoryliert und koppelt und die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren WRKY25 und 33 und der entsprechenden Abwehrgene über einen noch unbekanntem Mechanismus einleitet (Qiu et al., 2008). Die nach Mutation in *mpk4* beobachtete Pathogenresistenz korreliert mit einer erhöhten SA-Akkumulation und einer konstitutiven *PR*-Genexpression (Petersen et al., 2000; Brodersen et al., 2006; Pitzschke et al., 2009). Am Ende der durch flg22-angeregten

Signaltransduktion kommt es zu einer transkriptionellen Induktion von mehr als 1000 Genen in *Arabidopsis*, einschließlich der *PRRs* selbst. Neben der Aktivierung von MPKs haben auch Kalzium-abhängigen Proteinkinasen CPK4/5/6/11 Einfluss auf die flg22-induzierte transkriptionelle Umprogrammierung (Boudsocq et al., 2010; Rodriguez et al., 2010). Die FLS2 *de novo* Synthese dient einer schnellen Rückführung an die Zellmembran, um ein beschleunigtes oder verstärktes MTI-Signal einzuleiten (Zipfel et al., 2004; Robatzek et al., 2006). Zu den später messbaren flg22-induzierten Antworten gehören Zellwandverstärkungen in Form von Kalloseauflagerungen, eine Inhibition des Keimlingswachstums (Gomez-Gomez & Boller, 1999; Luna et al., 2011) und die Bildung von antimikrobiellen Molekülen, den sogenannten Phytoalexinen wie Camalexin (Felix et al., 1999; Zipfel und Felix, 2005). Als eine weitere Abwehrstrategie kommt es zur Akkumulation von verschiedenen Stress-assoziierten Phytohormonen wie Ethylen, Jasmonsäure und Salizylsäure, die in Kapitel 1.2.1 behandelt werden.

Die MAMP-vermittelte Abwehr und die Effektor-vermittelte Abwehr sind zwei verknüpfte Teile in der Immunantwort der Pflanzen, definiert nach ihrer unterschiedlichen Pathogenerkennung (MAMP vs. Effektor; Tsuda et al., 2009; Thomma et al., 2011). Nach einer Pathogenerkennung kommt es zu großen Übereinstimmungen im Mechanismus der Signalweiterleitung und der Abwehrreaktionen, wobei die ETI-vermittelte Signalweiterleitung und Abwehr eine schnellere, verstärkte Form aufweist verglichen mit den Reaktionen der MTI. Die ETI ist meist mit einer hypersensitiven Zellantwort (HR; *hypersensitive response*), einer Form des genetisch programmierten Zelltods (PCD; *programmed cell death*) und einer systemisch erworbenen Resistenz (SAR; *systemic acquired resistance*) assoziiert (Jones & Dangl, 2006; Navarro et al., 2004; Tsuda & Katagiri, 2010). So findet die Bildung des *oxidative burst* im Rahmen der ETI in einer zweiphasigen ROS-Akkumulation statt. Während einer ersten Phase mit geringer Amplitude folgt eine ausdauernde Phase mit großer Amplitude, welche nach Effektorerkennung durch die entsprechenden R-Proteine ausgelöst wird (Torres et al., 2006) und geht mit einer Aktivierung des SA-Signalwegs und der Induktion der HR einher (Jones & Dangl, 2006). MAPKs sind auch in die ETI-vermittelten Signalweiterleitung involviert (Menke et al., 2004). Dennoch unterscheidet sich die ETI in ihrer Kinetik verglichen zur MAMP-vermittelten Resistenzantwort durch eine verlängerte Aktivität (Underwood et al., 2007). Die MAMP- und R-Gen-vermittelten Resistenzantworten zeigen auch starke Überlappung in der transkriptionellen Aktivierung von Genen nach Flagellin-vermittelter bzw. Effektor-vermittelter Erkennung (Navarro et al., 2004). In der MTI und ETI wird das Phytohormon Salizylsäure (SA) für nachgeschaltete Signalwege benutzt



(Tsuda et al., 2008, Vlot et al., 2009). Zusammenfassend lässt dies darauf schließen, dass die ETI mit einer spezifischen Pathogenerkennung sich wahrscheinlich gleicher Signalwege bedient wie die MTI (Tsuda & Katagiri, 2010; Thomma et al., 2011).

## 1.2 Systemisch erworbene Resistenz und die Rolle der Phytohormone in der Pathogenabwehr

### 1.2.1 Ethylen, Jasmonsäure und Salizylsäure

Es ist seit langem bekannt, dass in pflanzlichen Abwehrprozessen, sowohl bei der MTI also auch ETI, verschiedene Phytohormone als primäre Botenstoffe fungieren (Durrant & Dong 2004; Pieterse & Van Loon 2004; Pieterse et al., 2012). Sie können einerseits in die pflanzliche Abwehr involviert sein, dienen aber auch der Etablierung verschiedener Resistenzformen. Die Phytohormone Salizylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) spielen dabei eine bedeutende Rolle in der Regulation der Abwehr gegen verschiedene Pathogene (Bari & Jones, 2009). Die Produktion von SA wird hauptsächlich bei der Abwehr von biotrophen bzw. hemibiotrophen Pathogenen ausgelöst und scheint eine entscheidende Bedeutung in der Bildung der systemisch erworbenen Resistenz (SAR; *systemic acquired resistance*; Grant & Lamp, 2006) zu haben (vgl. Kap. 1.2.3). Dagegen werden die JA/ET-abhängigen Abwehrreaktionen mit der Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen in Zusammenhang gebracht. In Analogie zu den Abwehrreaktionen gegen nekrotrophe Pathogene ist die alleinige JA-abhängige Abwehrreaktion gegen pflanzenpathogene Insekten wichtig (Howe, 2004). Studien mit *Arabidopsis*-Mutanten, welche Defekte in der Biosynthese oder Erkennung und Signaltransduktion von Hormonen besitzen, belegen ein komplexes Zusammenspiel aber auch Entgegenwirken, dem sogenannten *signaling cross-talk*, dieser drei Hormone in Abhängigkeit vom Lebensstils des angreifenden Pathogens (Glazebrook et al., 2003, 2005; Pieterse et al., 2009). So sind in vielen Fällen die Signalwege, die durch SA bzw. JA/ET reguliert werden, antagonistisch. Zum Beispiel führt die Applikation von exogenem SA zur verminderten Transkription von JA-responsiven Markergenen wie *PDF1-2* und *VSP2* (Koorneef et al., 2008). ET dagegen wirkt meist synergistisch mit JA (Pieterse et al., 2009). Eine regulatorische Vernetzung in der JA- und ET-abhängigen Abwehr zeigt beispielsweise das Markergen *PDF1-2*. Dieses wird sowohl in der JA- als auch ET-abhängigen Abwehrreaktion benötigt (Penninckx et al., 1998). Des Weiteren werden die ET-responsiven Transkriptionsfaktoren ERF1 (*Ethylene responsive factor1*) und ORA59 (*Octadecanoid-responsive Arabidopsis*) durch JA co-reguliert und stellen somit Kontrollpunkte für eine

synergistische Nutzung dar (Lorenzo et al., 2003; Pré et al., 2008). Mittlerweile ist bekannt, dass weitere Phytohormone wie Abszisisäure (ABBA), Auxine, Gibberelline und Cytokinine die Signalbalance von SA, JA und ET modifizieren und somit ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Pathogenabwehr spielen. Dabei ist ihre genaue Funktion in vielen Fällen nicht detailliert geklärt (Wang et al., 2007; Navarro et al., 2008; Bari & Jones, 2009). Auxin fördert die Anfälligkeit gegen biotrophe Pathogene wie z. B. bei der Ausbreitung von *Pseudomonas syringae*, wohingegen die Suppression Auxin-regulierter Signalwege die Resistenz erhöht. Eine direkte antagonistische Regulation von Auxin durch SA in *Arabidopsis* konnte belegen, dass SA zur Supprimierung von Auxin-responsiven Genen führt und folglich essentiell für die SA-vermittelte Abwehr gegen biotrophe Pathogene ist (Wang et al., 2007; Pieterse et al., 2009). Das Zusammen- und Entgegenwirken im *signaling cross-talk*, als ein komplexes Abwehrnetzwerk, kann von den Pathogenen selbst dereguliert werden. Dabei wird das Ziel verfolgt, Abwehrantworten zu unterdrücken und letztendlich eine erfolgreiche Kolonisierung zu ermöglichen (Grant & Jones, 2009; Pieterse et al., 2009; Verhage et al., 2010). So nutzt z. B. das virulente Bakterium *P. syringae* DC3000 (*Pst* DC3000) die antagonistische Regulation des JA- und SA-Signalweges für seine eigene Pathogenese. SA-abhängige Abwehrreaktionen der Wirtspflanze werden im Rahmen der ETS antagonistisch durch Modifikation des pflanzlichen JA-Signalweges durch das Pathogen unterdrückt und so eine erfolgreiche Infektion ermöglicht (Nickstadt et al., 2004; Jelenska et al., 2007; Spoel et al., 2007). Zusätzlich vermögen Pathogene selbst Phytohormone oder verwandte Metabolite zu synthetisieren, wie es am Beispiel von einigen *P. syringae* Stämmen gezeigt wurde. *P. syringae* produziert das Phytotoxin Coronatin, welches strukturell die Jasmonate imitiert und somit JA-abhängige Reaktionen induziert und die von SA-vermittelte Abwehrreaktion unterdrückt (Brooks et al., 2005; Uppalapati et al., 2007).

### **1.2.2 Gibberellinsäure**

Eine weitere Komponente, welche das Abwehrsystem moduliert, ist das Phytohormon Gibberellinsäure (GA). Eine besondere Rolle haben hierbei die DELLA-Proteine als negative Regulatoren des GA-Signalweges. In Abwesenheit von bioaktivem GA wird der GA-Signalweg durch die DELLA-Proteine unterdrückt, in Anwesenheit von GA wird die Degradierung der DELLA-Proteine induziert und somit der GA-Signalweg freigegeben (Hirano et al., 2008). Studien von Navarro und Kollegen (2008) demonstrierten, dass DELLA-Proteine die Balance zwischen den SA-vermittelten Abwehrreaktionen und der JA/ET-vermittelten Abwehr steuern. So wurde festgestellt, dass in der *quadruple-DELLA*

Mutante (der vier von fünf bekannten DELLA-Proteinen fehlt) eine Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen und eine Anfälligkeit gegenüber Nekrotrophen besteht. In weiteren Arbeiten konnte die Rolle der DELLA-Proteine genauer charakterisiert werden. Hierbei zeigte sich, dass DELLA-Proteine in Abwesenheit von GA durch kompetitive Bindung an den Transkriptionsfaktor JAZ1 (*jasmonate ZIM-domain*) einen direkten Einfluss auf den JA-Signalweg ausüben. JAZ1 ist bekannt als Negativregulator im JA-Signalweg durch Repression Jasmonat-responsiver Gene zu agieren (Hou et al., 2011). Als ein Resultat dieses Komplexes zwischen DELLA- und JAZ1-Proteinen wird ein positiver Einfluss auf den JA-Signalweg ausgeübt, indem die Expression JA-abhängiger Gene gefördert wird (Hou et al., 2011; Gao et al., 2011). GA wiederum induziert die Degradation der DELLA-Proteine und es kommt zu einer verstärkten SA-vermittelten Abwehr und damit zu einer Resistenz gegen biotrophe Pathogene. Der GA-produzierende nekrotrophe Pilz *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) kann diesen antagonistischen Zusammenhang zwischen GA und JA nutzen und über GA einen Abbau der DELLA-Proteine induzieren um die JA-vermittelte Abwehr zu umgehen (Navarro et al., 2008). Weiterhin konnte eine Stabilisierung der DELLA-Proteine durch ABA und ET demonstriert werden (Achard et al., 2007), was aufzeigt, welchen regulatorischen Einfluss GA im SA-JA-ET Netzwerk hat (Grant & Jones, 2009; Pieterse et al., 2009).

### 1.2.3 Die systemisch erworbene Resistenz (SAR)

Zusätzlich zu den lokalen Abwehrreaktionen in Folge der MTI und der ETI ist die Pflanze auch in der Lage, einen Zustand erhöhter Alarmbereitschaft in nicht infiziertem Gewebe oder der gesamten Pflanze zu aktivieren, um so Sekundärinfektionen zu vermeiden. Dieser Vorgang wird als systemisch erworbene Resistenz (SAR, *systemic acquired resistance*) bezeichnet und kann nach Erkennung eines Pathogens über MTI oder ETI ausgelöst werden (Mishina & Zeier, 2007; Pieterse et al., 2009; Vlot et al., 2009; Tsuda & Katagiri, 2010). Die SAR wird charakterisiert durch eine Pathogen-unspezifische und langanhaltende systemische Abwehr. In *Arabidopsis* scheint SA unerlässlich für das Zustandekommen einer SAR zu sein (Durrant & Dong, 2004). Hierbei wird SA sowohl am Infektionsort (lokal) als auch in entfernten Geweben (systemisch) gebildet (Mishina & Zeier, 2007), scheint aber nicht als das mobile Signal für die Phloem-Übertragung zur Induzierung einer SAR in Frage zu kommen (Dempsey & Klessig, 2012). Auf molekularer Ebene geht die SAR mit der Expression verschiedener *PR*-Gene, welche z. B. für 1,3- $\beta$ -Glukanasen, Chitinasen oder PR1-Proteine kodieren, einher (Van Loon et al., 2006). Diese Transkriptionsveränderungen im lokalen und

im systemischen Gewebe werden durch SA vermittelt und beruhen auf der Aktivierung und der anschließenden Kerntranslokation des Regulatorproteins NPR1. Die nachgeschalteten SA-Signalwege werden durch direkte NPR1-Bindung an TGA (*TGACG-Motif Binding Factor*)-Transkriptionsfaktoren kontrolliert, wo NPR1 als transkriptioneller Co-Aktivator agiert und die *PR*-Gen Expression induziert (Durrant & Dong, 2004; Vlot et al., 2009). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Fu und Kollegen (2012) konnten die NPR1 Paraloge NPR3 und NPR4 als SA-Rezeptoren identifiziert werden.

#### **1.2.4 Induzierte systemische Resistenz (ISR)**

Neben der SAR stellt die sogenannte induzierte systemische Resistenz (ISR, *induced systemic resistance*) eine weitere Form der induzierten Resistenz dar. Sie wird in der Pflanze durch Interaktion mit apathogenen wurzelbesiedelten Rhizobakterien, wie z.B. *Pseudomonas fluorescens*-Stämmen induziert (Van Loon et al., 1998; Van Wees et al., 2008; Van der Ent et al., 2009a). Im Unterschied zur SA-abhängigen SAR, welche eine Abwehr gegen biotrophe Pathogene ermöglicht, dominieren bei der ISR die ET/JA-abhängigen Signalwege und sie geht mit nur geringen Veränderungen auf Transkriptionsebene einher (Verhagen et al., 2004; Alfano et al., 2007; Van Wees et al., 2008; Van der Ent et al., 2009a). Ein Merkmal der Rhizobakterien-vermittelten ISR ist die beschleunigte Induktion der Basalabwehr nach Pathogenbefall. Diese ISR-vermittelte Sensibilisierung der Pflanze führt zu einer verstärkten und schnelleren systemischen Abwehrinduktion als Antwort auf einen Pathogenbefall und ist unter dem Begriff „*Priming*“ bekannt (Conrath et al., 2006; Frost et al., 2008; Van der Ent et al., 2009b). Bisher am besten untersucht sind die Signalwege, die an der durch *P. fluorescens* WCS17r in *Arabidopsis* induzierten Resistenz beteiligt sind. Zur Etablierung der ISR tragen vorwiegend JA/ET-responsive Gene und eine verstärkte Kalloshedeposition bei, wofür wiederum NPR1 und die Aktivierung des wurzelspezifischen Transkriptionsfaktors MYP72 notwendig sind (Van der Ent et al., 2008).

Neben Chemikalien und Bakterien können auch andere nützliche Mikroorganismen durch Wurzelbesiedlung, wie z.B. Mykorrhiza-Pilze oder *Trichoderma* spp. ISR-ähnliche Reaktionen auslösen (Van der Ent et al., 2009a; Segarra et al., 2009). Die durch Mykorrhiza induzierte Resistenz benötigt, ebenso wie die Rhizobakterien-vermittelte Resistenz, den JA-Signalweg, wie es in „geprimten“ Blättern nach Pathogenbefall gezeigt werden konnte (Pozo et al., 2010; Jung et al., 2012).

### 1.3 Pflanze-Pathogen-Interaktion

Im Laufe der Co-Evolution von Pflanzen und Pathogenen sind verschiedene Formen der Interaktion entstanden (Glazebrook, 2005). Aufgrund ihres Lebensstils werden Pathogene in drei Gruppen unterteilt. Während nekrotrophe Pilze wie *Botrytis cinerea* oder *Alternaria brassicicola* das Wirtsgewebe in einem frühen Stadium der Infektion durch Sekretion einer Reihe von toxischen Sekundärmetaboliten abtöten, um anschließend die freigesetzten Bestandteile der toten Zellen als Nährstoffquelle zu nutzen, entziehen biotrophe Pathogene lebenden Zellen über einen langen Zeitraum Nährstoffe. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem der Mehltau-Pilz *Blumeria graminis* und Rostpilze der Gattung *Puccinia*. Eine Zwischenform stellen Pathogene wie z.B. das Gram-negative Bakterium *P. syringae* oder der Pilz *Magnaporthe oryzae* dar. Sie zeigen zu Beginn der Infektion eine biotrophe Phase, gehen jedoch später zu einer nekrotrophen Lebensweise über. Sie werden daher als hemibiotrophe Pathogene eingegliedert (Buchanan et al., 2000; Hammond-Kosack & Jones, 1996). Während nekrotrophe Pathogene über ein relativ breites Wirtsspektrum verfügen, haben biotrophe Pathogene, welche sich in ihrem gesamten Lebenszyklus im lebenden Wirtsgewebe befinden, ein sehr begrenztes Wirtsspektrum und sind darauf angewiesen, die Erkennung durch die Wirtspflanze und die dadurch ausgelösten Abwehrreaktionen möglichst lange zu umgehen (Glazebrook, 2005).

#### 1.3.1 Mutualistische Pflanze-Pilz Beziehungen

Unter Symbiose (griechisch: syn/sym, zusammen; bios, Leben) im weitesten Sinne versteht man nach dem deutschen Botaniker und Mykologen de Bary (1879) eine intensive und andauernde Form des Zusammenlebens von Organismen unterschiedlicher Arten. Hierbei umfasst der Begriff das gesamte Spektrum von mutualistischen (beidseitiger Vorteil) über kommensalen (einseitiger Vorteil ohne negativen Effekt auf den Interaktionspartner) bis parasitären (einseitiger Vorteil, negative Effekte auf den Interaktionspartner) Wechselbeziehungen (Redman et al., 2001; Rodriguez et al., 2009). Es ist zu berücksichtigen, dass eine strikte Einordnung eines Mikroorganismus in eine der drei Kategorien oftmals schwierig ist, denn je nach äußeren Bedingungen, wie z. B. Wirtspflanze, Genotyp, Alter oder Mikroklima kann ein und derselbe Organismus verschiedene Interaktionen hervorbringen (Redman et al., 2001; Sieber et al., 2002; Rodriguez & Redman, 2008; Schulz & Boyle, 2005). Beispielsweise verursacht eine Punktmutation eines Gens beim virulenten Isolat des Pilzes *Colletotrichum magna* den Unterschied zwischen Pathogenität und symptomfreien

Wachstum mit mutualistischem Einfluss. Häufig als pathogen beschriebene Pilzarten können in anderen Wirten auch als kommensale oder mutualistische Partner vorkommen. Als mutualistisch bekannte Pilze können wiederum je nach Wirtspflanze stark positive bis gar keine Effekte hervorbringen (Rodriguez et al., 2004). Ursache hierfür ist ein gut abgestimmtes physiologisches Gleichgewicht zwischen der Ausbreitung und dem Nährstoffbedarf des Pilzes sowie der Pflanze. Gerät die Pflanze in eine Mangelsituation, kommt es zu einer Verschiebung in ihren Abwehrmaßnahmen, was zum Auftreten von Krankheitssymptomen an der Pflanze und/oder beispielsweise zum Ausschluss des Pilzpartners führen kann (Schulz & Boyle, 2005; Kogel et al., 2006; Eaton et al., 2010).

Die prominenteste und älteste Form der mutualistischen Pflanze-Mikroorganismus-Interaktionen bilden die obligat biotrophen Mykorrhizapilze mit Pflanzenwurzeln. Als Mykorrhiza (griech. Mykos, Pilz; rhiza, Wurzel) werden Assoziationen zwischen Pflanzen und Pilzen bezeichnet, die das kortikale Wurzelgewebe des Wirtes besiedeln. Diese Art der Symbiose, die bei 80% aller Landpflanzen vorkommt, zeichnet sich durch gegenseitige Versorgung mit Nährstoffen aus. Eine Vergrößerung der Wurzeloberfläche durch die extraradikalen Pilzhyphen führt bei mykorrhizierten Pflanzen zu einem verbesserten Aufschluss von Nährstoffen aus dem Boden (Parniske, 2008). Dabei sind besonders Phosphat und Wasser, in einem geringeren Ausmaß auch Stickstoff, von Bedeutung. Im Gegenzug erhält der Pilzpartner pflanzliche Kohlenstoffprodukte (Smith & Read, 1997; Finlay, 2008). Aufgrund der Vielseitigkeit des Zusammenlebens von Pflanze und Pilz existieren heute verschiedene Mykorrhiza-Symbiosen. Diese werden aufgrund ihres Besiedlungsmusters an bzw. innerhalb der Wirtszelle in die drei Haupttypen Ekto-, Endo- und Ektendomykorrhiza unterteilt (Übersicht bei Smith & Read, 1997; Redecker et al., 2000).

### **1.3.2 Arbuskuläre Mykorrhiza**

Zu den Ektendomykorrhiza zählen die am weitesten verbreiteten arbuskulären Mykorrhizapilze (AM). Ihre typische Kolonisierungsform zeichnet sich durch die Bildung von haustorienartigen, pilzlichen Strukturen, den Arbuskeln, in den Kortezellen der Pflanze aus, welche namensgebend für die AM-Symbiose ist. An den Arbuskeln findet der Nährstofftransfer zwischen Pilz und Wirtspflanze statt. Nach erfolgreicher Besiedlung der Pflanzenwurzel bildet der AM-Pilz ein extraradikales Hyphennetz aus, das viel effizienter als Pflanzenwurzeln Nährstoffe aufnehmen kann (Parniske, 2008; Smith et al., 2011). Neben einer verbesserten Nährstoffversorgung der Pflanzen wirkt sich die Symbiose außerdem positiv im Hinblick auf eine Vielzahl biotischer und abiotischer Stressfaktoren der Pflanze

aus. So kann die Mykorrhizierung eine erhöhte lokale und systemische Pathogenresistenz, sowohl gegen Wurzelpathogene als auch gegen diverse Blattpathogene, hervorbringen (Liu et al., 2007; Pozo & Azcón-Aguilar, 2007; Jung et al., 2012).

### **Endophytische Pilze**

Endophytische Pilze sind ein weiteres Beispiel einer potentiell symbiontischen Interaktion. Hierbei leben die Pilze im Inneren des Pflanzengewebes, ohne offenkundige Symptome zu verursachen. Im Vergleich zu Mykorrhizapilze können sie in allen Pflanzenteilen vorkommen (Sieber, 2002; Stone et al., 2004; Rodriguez et al., 2008) und oft auch in Reinkultur auf Standardpilzmedien gehalten werden (Christensen et al., 2002). Im folgenden Kapitel wird die Interaktion zwischen Pflanzenwurzeln und dem Wurzelendophyten *Piriformospora indica* genauer beleuchtet.

### **1.4 *Piriformospora indica***

#### **1.4.1 Taxonomische Zuordnung**

Bei *Piriformospora indica* handelt es sich um einen wurzelbesiedelnden Basidiomyceten, der von Verma und Kollegen (1998) erstmals beschrieben wurde. Der Pilz gehört der Ordnung *Sebacinales* an und wurde in der indischen Thar Wüste an der Spore eines AM-Pilzes (*Glomus mossae*) in der Rhizosphäre entdeckt. Die Zuordnung von *P. indica* zu den *Sebacinales*, einer sehr heterogenen und weit verbreiteten Gruppe von verschiedenen Mykorrhiza-(ähnlichen) Pilzen, basiert auf seiner Morphologie und phylogenetischen Sequenzvergleichen auf rDNA (ribosomale DNA)-Basis (Weiss et al., 2004). In der Literatur wird *P. indica* als mutualistischer Endophyt mit breitem Wirtsspektrum beschrieben, welches verschiedene mono- und dikotyledone Pflanzen umfasst (Waller et al., 2005; Schäfer & Kogel, 2009). Eine mutualistische Beziehung etabliert *P. indica* auch mit *Arabidopsis* und liefert aufgrund der zur Verfügung stehenden genetischen Möglichkeiten in dieser Pflanze ein geeignetes Modellsystem zur gezielten molekularen Analyse der Interaktion (Schäfer & Kogel, 2009). Zusätzlich konnte das Genom und Transkriptom des Pilzes aufgedeckt werden (Zuccaro et al., 2011). Da *P. indica* sich in axenischer Kultur kultivieren lässt und ein etabliertes System zur stabilen Transformation des Pilzes besteht, bietet sich die Möglichkeit, die Interaktion funktionell zu studieren (Pham et al., 2004; Peškan-Berghöfer et al., 2004; Zuccaro et al., 2011).

### 1.4.2 Wurzelbesiedlung durch *P. indica*

Durch zytologische Studien an Gerstenwurzeln konnte ein klares Besiedlungsschema des Pilzes von der frühen Phase (drei Tage nach Inokulation) bis zur Etablierung von *P. indica* im Wurzelgewebe (sieben Tage nach Inokulation) identifiziert werden. Nach dem Auskeimen der asexuell gebildeten Chlamydosporen beginnt das extrazelluläre Wachstum der Pilzhypen an der Wurzeloberfläche. Nach den ersten Penetrationsereignissen entstehen erstmals inter- und intrazelluläre Hyphen. Im Laufe der nächsten Tage bildet der Pilz ein verzweigtes Netzwerk aus Hyphen an der Wurzeloberfläche, aber auch in Epidermis und Kortezellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass *P. indica* hauptsächlich älteres Gewebe (Wachstums- und Differenzierungsgewebe) kolonisiert, während das jüngere Gewebe, wie die meristematische Zone, nur selten besiedelt ist (Deshmukh et al. 2006; Schäfer et al., 2009). Dies unterscheidet *P. indica* von AM-Pilzen, welche junges und stoffwechselaktives Gewebe zum Austausch präferieren (Karandashov & Bucher, 2005). An den Hyphenspitzen können sich abschließend birnenförmige Chlamydosporen abschnüren, die sich sowohl auf der Wurzeloberfläche, Wurzelhaaren, aber auch intrazellulär, einzeln oder in Gruppen formieren (Verma et al., 1998; Deshmukh et al., 2006; Schäfer et al., 2009). Einen weiteren Unterschied zu Mykorrhizapilze im Besiedlungsverhalten von *P. indica* konnten Deshmukh und Kollegen (2006) demonstrieren. Dabei zeigte die Analyse von durch *P. indica* kolonisierten Gerstenwurzeln, dass in besiedelten Wurzelbereichen vermehrt Zelltodreaktionen auftraten. Dieser Zusammenhang wurde durch Studien mit transgenen Gerstenpflanzen, welche konstitutiv den Zelltodinhibitor *BAX-Inhibitor1* exprimierten, bestätigt (Deshmukh et al., 2006). Ob der Pilz den Zelltod in besiedelten Wurzelzellen aktiv auslöst oder dieser durch die Pflanze gesteuert ist, konnten neueste Ergebnisse in *Arabidopsis* belegen. Diese machten deutlich, dass *P. indica* auf pflanzlicher Seite eine ER-Stressantwort auslöst, um so einen programmierten Zelltod zu induzieren (Qiang et al., 2012).

### 1.4.3 Einfluss von *P. indica* auf die Wirtspflanze

Wie auch andere Vertreter der Ordnung der *Sebacinales* besitzt *P. indica* die Fähigkeit, mit einem breiten Spektrum an Pflanzenarten wurzelendophytisch zu interagieren. Dies geht anschließend mit einer Reihe positiver Effekte für die Wirtspflanze einher. Sowohl in Leguminosen als auch ökonomisch relevanten Nutzpflanzen (z.B. Gerste und Weizen) konnte eine Steigerung des Wachstums und des Ertrags nachgewiesen werden (Peskan-Berghöfer et al., 2004; Waller et al., 2005; Serfling et al., 2007). In Gerste und Tomate konnte zudem eine schnellere Entwicklung im frühen vegetativen Wachstum beobachtet werden (Achatz et al.,



2010; Andrade-Linares, 2010). Dass die verbesserten Wachstumseffekte auf gesteigerte Nährstoffversorgung zurückzuführen sind, konnte zumindest in Mais belegt werden. Durch die Identifizierung und Charakterisierung eines Phosphattransporters (*PiPT*) aus *P. indica*, dem eine Rolle in der Phosphataufnahme der Wirtspflanze zukommt, konnte gezeigt werden, dass dieser für die beobachteten Wachstumseffekte in kolonisierten Wurzeln notwendig ist (Yadav et al., 2010). Eine gesteigerte Stresstoleranz aufgrund der Besiedlung durch *P. indica* zeigt sich sowohl gegenüber biotischen als auch abiotischen Stressfaktoren. So konnte aus Studien mit Gerste eine Steigerung der Toleranz gegenüber erhöhter Salzkonzentration im Boden festgestellt werden, die u. a. auf erhöhte Aktivität antioxidativer Enzyme in der Wurzel zurückzuführen ist (Baltrusch et al., 2008). Des Weiteren kann die Besiedlung durch *P. indica* eine erhöhte lokale Resistenz gegen nekrotrophe bzw. hemibiotrophe Wurzelpathogene wie *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* und *Cochliobolus sativus* induzieren (Waller et al., 2005; Deshmukh & Kogel, 2007; Schäfer & Kogel, 2009). Systemische Resistenzeffekte gegen Blattpathogene wie *Blumeria graminis f. sp. hordei* und *Golovinomyces orontii* zeigten sich in Gerste und *Arabidopsis*-Blättern (Waller et al., 2005; Stein et al., 2008). Dabei wird der ISR eine entscheidende Rolle in der Resistenzprägung zugewiesen (Stein et al., 2008; Molitor et al., 2011).

### **1.4.4 Symbiotische Interaktionen und das pflanzliche Immunsystem**

In einer mutualistischen Symbiose finden auch Abwehrreaktionen statt. Denn wie pilzliche Pathogene sind auch pilzliche symbiotische Assoziationen auf molekularer Ebene mit dem pflanzlichen Immunsystem konfrontiert. Diese Konfrontation erfolgt z. B. in der frühen Besiedlungsphase durch Penetration der Wurzelzellen mit der Rezeptor-vermittelten Erkennung von pilzlichen MAMPs, wie z.B. Zellwandkomponenten wie Chitin oder Glukanen (Gutjahr & Paszkowski, 2009; Corradi & Bonfante, 2012; Pel & Pieterse, 2012). Studien an Mykorrhiza-Pilzen wiederum zeigten, dass eine aktive Pflanzenabwehr nur transient und lokal, beispielsweise durch die Akkumulation von ROS, die Induktion abwehrassoziierter Gene und die Akkumulation hydrolytischer Enzyme wie Chitinasen und Glukanasen, meist im frühen Stadium der Penetration bzw. Kolonisierung, stattfindet. Im weiteren Verlauf der Interaktion werden diese Abwehrmechanismen durch den Symbionten unterdrückt (Salzer et al., 2000; Garcia-Garrido & Ocampo, 2002; Liu et al., 2003; Pozo & Azcon-Aguilar, 2007; Chabaud et al., 2011). Da Mykorrhizapilze als biotrophe Organismen eine langfristige Beziehung zu ihrem Wirt aufrechterhalten müssen, muss eine Aktivierung der MTI umgangen werden, um eine dauerhafte Kompatibilität zu etablieren (Kloppholz et al.,

2011; Zamioudis & Pieterse, 2012). Dabei können sich symbiotische Pilze ähnlicher Mechanismen und Strategien bedienen wie pathogene biotrophe Pilze, z. B. der allgemeinen Vermeidung der Erkennung, Deregulation der Hormonbalance, oder der zentralen Hemmung der Signaltransduktion durch Sekretion von symbiotischen Effektormolekülen mit Abwehr-supprimierender Wirkung. Dies wurde kürzlich für den AM-Pilz *Glomus intraradices* beschrieben (Kloppholz et al., 2011; Pozo & Azcon-Aguilar, 2007; Martin et al., 2008; Bonfante & Genre, 2010). Diese neuesten Erkenntnisse machen deutlich, dass ökologisch verschiedene Mikroorganismen (Pathogene versus Symbionten) sich in der Interaktion ähnlicher Strategien bedienen (Bonfante & Genre, 2010).

### **1.5 Zielsetzung dieser Arbeit**

Der wurzelbesiedelnde Pilz *P. indica* verfügt über das Potenzial, entfernt verwandte Pflanzenarten (Mono- und Dikotyledone) zu besiedeln. Eine Nichtwirts-Pflanze konnte bislang nicht identifiziert werden. Die Fähigkeit mit entfernt verwandten Pflanzenarten wurzelendophytisch zu interagieren, deutet auf die Entwicklung hocheffizienter Werkzeuge durch *P. indica* zur Überwindung der Wurzelimmunität hin.

Da die meisten diskutierten und umfangreichen Erkenntnisse über das pflanzliche Immunsystem aus Untersuchungen mit Blattpathogenen sowie pflanzlichen Abwehrreaktionen aus Analysen von oberirdischem Pflanzengewebe stammen und detaillierte Untersuchungen über Abwehrprozesse in der Wurzel fehlen, war es ein Ziel dieser Arbeit, solche genauer zu beleuchten. Dabei war es Teil dieser Arbeit, zunächst die Besiedlungsstrategie von *Arabidopsis*-Wurzeln durch *P. indica* näher zu charakterisieren. Aufgrund der zur Verfügung stehenden genetischen Transparenz von *Arabidopsis* bot sich die Möglichkeit, die Interaktion zwischen Wirtspflanze und Endophyt genauer zu untersuchen. Um die Besiedlungsstrategie in *Arabidopsis*-Wurzeln zu verfolgen, wurde der Schwerpunkt auf die frühe Phase der Interaktion bis zur Etablierung des Pilzes im Wurzelgewebe gelegt. Weiterhin sollte die Wurzelabwehr unter dem Einfluss von *P. indica* und der Behandlung mit verschiedenen gut charakterisierten MAMPs eingehend untersucht werden. Diese Analysen sollten ferner eine mögliche Überlappung oder Differenzierung zwischen Blatt- und Wurzelabwehr aufzeigen. Zusätzlich war es ein Ziel, die Mechanismen der Unterdrückung der Wurzelabwehr durch *P. indica* zu erfassen. Im größeren Zusammenhang betrachtet sollte diese Arbeit dazu beitragen, auf molekularer Ebene eventuelle Gemeinsamkeiten von Mutualisten und Pathogenen in ihrer Strategie, das pflanzliche Immunsystem zu modulieren, zu erkennen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Für alle Experimente, wenn nicht anders angemerkt, wurde *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) eingesetzt. Vor der Verwendung wurden die *Arabidopsis*-Samen oberflächensterilisiert, indem das Saatgut zehn Minuten in 3%-iger Natriumhypochlorid-Lösung geschwenkt und anschließend bis zu 4 x mit autoklaviertem Wasser gewaschen wurde. Anschließend wurden die Samen unter sterilen Bedingungen in Petrischalen auf Filterpapier getrocknet. Zur Anzucht wurde das Saatgut dann steril auf ½ MS-Medium (Murashige & Skoog-Medium) oder ATS-Medium in quadratischen Petrischalen ausgelegt. Das obere Viertel des Mediums wurde nach Aushärten entfernt, um dem Blattapparat genügend Platz zum Ausbreiten zu bieten. Nach einer Inkubation im Dunkeln für 48 h bei 4°C wurde die Kultivierung anschließend für 7, 10 oder 21 Tage - je nach Versuchsziel - in einer Phytokammer fortgesetzt. Hierbei wurden folgende Konditionen verwendet: Acht Stunden Lichtperiode (*fluorescent cool white*, Toshiba FL40SSW/37, 180  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  Photonenfluxdichte) und 16 Stunden Nacht, 22°C bzw. 18°C und 60% relative Feuchtigkeit. Um ein planes Wachstum der Wurzeln über die Gelrite Fläche zu garantieren, wurden die Platten vertikal aufgestellt. Für die Vermehrungsanzucht wurden sterilisierte *Arabidopsis*-Samen auf einem 1:3 Sand/Erde-Gemisch (N:P:K = 150:150:250 mg/L) ausgelegt und im Gewächshaus unter Langtagbedingungen bis zur Samenreife kultiviert.

#### ½MS-Medium

4-5% Gelrite  
½ Konzentration MS-Salze  
1% Saccharose

#### ½ MS<sup>+</sup>-Medium

4-5% Gelrite  
½ Konzentration MS-Salze

#### ATS-Medium

1 M KNO<sub>3</sub>  
1 M KPO<sub>4</sub>  
1 M MgSO<sub>4</sub>  
1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
Mikroelemente  
0,5 mM CuSO<sub>4</sub>  
1 mM ZnSO<sub>4</sub>

#### Stammlösung Vol. für 1 L

5 ml  
2,5 ml  
2 ml  
2 ml  
1 ml

#### Mikroelemente

0,2 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>  
10 mM NaCl  
0,01 mM CoCl<sub>2</sub>  
70 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
14 mM MnCl<sub>2</sub>

## 2.2 Kultivierung von *Piriformospora indica*

Bei den durchgeführten Versuchen wurde das *P. indica*-Isolat DSMZ 11827 aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig eingesetzt.

Zur Erhaltung des Pilzes wurden Aliquots von Chlamydosporen in Glycerol bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Mit diesen wurden Masterplatten beimpft, die nach 4 Wochen zur Herstellung einer größeren Anzahl an *P. indica*-Platten für die Versuche verwendet wurden. Die Kultivierung erfolgte dabei bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln auf modifiziertem *Aspergillus* Minimalmedium, sogenanntem CM-Medium (*complex medium*, verändert nach Pham et al., 2004) für 4 - 5 Wochen.

### CM-Medium (modifiziertes *Aspergillus* Minimalmedium)

<u>Zusammensetzung (1 l)</u>	<u>20 x Salzlösung</u>	<u>Mikroelemente</u>
20 x Salzlösung	120 g $\text{NaNO}_3$	6 g $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
20 g Glucose	10,4 g KCl	1,5 g $\text{H}_3\text{BO}_3$
2 g Pepton	10,4 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,65 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
1 g Hefe-Extrakt	30,4 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$	750 mg KI
1 g Caseinhydrolysat	ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$ dest	2,4 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
1 ml Mikroelemente		130 mg $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
950 ml $\text{H}_2\text{O}$ dest.		ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$ dest
optional: 15g Agar-Agar		

### **Herstellung der Chlamydosporensuspension**

Die Inokulation von *Arabidopsis*-Wurzeln mit *P. indica* erfolgte mit Sporensuspension. Zu 3 - 4 Wochen alter, auf CM-Platten kultivierter *P. indica*, wurde 10 - 15 ml Tween- $\text{H}_2\text{O}$  (0,005% v/v) gegeben und die Sporen mit Hilfe eines Drygalskispatels abgerieben. Die Suspension wurde gefiltert (Miracloth, Porengröße 22-25  $\mu\text{m}$ , steril) und anschließend für 7 Minuten bei  $3500 \times g$  zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und mit Tween- $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die Endkonzentration wurde nach dem Zählen mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer auf 500.000 Sporen/ml eingestellt.

## 2.3 Quantifizierung der Wurzelbesiedlung durch *P. indica*

Ob sich in *Arabidopsis*-Mutantenlinien ein Unterschied in der Besiedlungsstärke relativ zu den entsprechenden Wildtypen feststellen lässt, sollte durch die Quantifizierung der Menge an *P. indica*-DNA in den Pflanzenwurzeln überprüft werden. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte dabei unter sterilen Bedingungen auf  $\frac{1}{2}$  MS- oder ATS-Medium in quadratischen Petrischalen. Das obere Viertel des Mediums wurde nach Aushärten entfernt, um dem

Blattapparat genügend Platz zum Ausbreiten zu ermöglichen. Nach 21 Tagen wurde jeweils 1 ml einer *P. indica*-Chlamyosporensuspension (500.000 Sporen/ml) gleichmäßig auf die Wurzeln einer Petrischale pipettiert. Pro *Arabidopsis*-Linie wurden 3 und 7 Tage nach Inokulation (dai; *days after inoculation*) Wurzelproben geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Dabei wurden pro Zeitpunkt Wurzeln von 3 - 5 Platten vereint. Es folgte eine anschließende DNA-Extraktion nach der CTAB-Methode (vgl. 2.4-1) und eine quantitative Bestimmung der Besiedlung durch *P. indica* in den Wurzeln mittels quantitativer RT-PCR (vgl. 2.4.8).

**Tabelle 2.3-1: Liste verwendeter *Arabidopsis*-Linien**

Linie	Bezeichnung	Bezugsstelle
Col-0 (Columbia)	Wildtyp	NASC:N1092
Col-8	Wildtyp	NASC:N6000
Col-3g11	Wildtyp	V. Lipka
LER (Landsberg erecta)	Wildtyp	NASC:N20
<i>cerk1-2</i>	<i>chitin elicitor receptor kinase 1-2</i>	S. Gimenez-Ibanez
<i>quintuple-DELLA</i>	Pentuple mutant of all five DELLA genes (RGA, GAI, RGL1, RGL2 and RGL3)	NASC:N16298
<i>gal-6</i>	<i>Ga-insensitiv1-6</i>	NASC:N3170
<i>jin1-1</i>	Alias <i>myc2</i> , <i>jasmonate-insensitive1-1</i>	NASC:N517005
<i>jar1-1</i>	<i>jasmonate-resistant1-1</i>	NASC:N8072
<i>pad3</i>	<i>phytoalexin-deficient3-1</i>	NASC:N3805
<i>pen2-1</i>	<i>penetration2-1</i>	V. Lipka
<i>npr1-1</i>	<i>Nonexpressor of PR-Genes1</i>	NASC:N37266
<i>coi1-16</i>	<i>coronatine-insensitive1-16</i>	B. Hause
<i>eds1</i>	<i>enhanced disease susceptibility1</i>	J. Parker
<i>RGAp:GFP-RGA</i>	<i>GFP-RGA fusion protein</i>	T-P. Sun
<i>sid2-2</i>	<i>SA induction-deficient2-2</i>	F. M. Ausubel
<i>pub22/23/24</i>	triple mutant: <i>plant u-box type E3 ligases</i> (PUBs),	M. Trujillo
<i>pepr1</i>	<i>Pep1 receptor</i>	Y. Yamaguchi
<i>pepr2</i>	<i>Pep2 receptor</i>	Y. Yamaguchi
<i>pepr1/pepr2</i>	double mutant: <i>pep1/2 receptor</i>	Y. Yamaguchi
<i>GFP-Chi</i>	GFP-labelled vacuolar system	R. Flückiger

NASC = Nottingham Arabidopsis Stock Centre

## 2.4 Molekularbiologische Standardmethoden

### 2.4.1 Extraktion genomischer DNA aus Wurzeln

Die Extraktion genomischer DNA aus *Arabidopsis*-Wurzeln erfolgte nach der CTAB-Methode. Hierbei wurde das zuvor unter flüssigem Stickstoff gemörserte Wurzelmaterial mit 900 µl vorgewärmtem (65°C) CTAB-Extraktionspuffer vermischt und 60 - 90 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurde das Material mit 450 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt, 10 min leicht geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10.000 rpm, 15 min, RT). Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und der Aufreinigungsschritt wiederholt. Anschließend wurde die obere Phase in ein neues Gefäß mit 3 µl RNase A (10 mg/ml) überführt und 30 Minuten inkubiert, mit 600 µl Isopropanol vermischt und über Nacht bei 4°C gelagert. Das Pellet wurde durch abzentrifugieren (30 min, 13.000 rpm, RT) isoliert und mit WASH 1 (75% Ethanol, 0,2 M Natriumacetat) und WASH 2 (75% Ethanol, 10 mM Ammoniumacetat) gereinigt und nach dem Trocknen in 30 - 40 µl TE-Puffer gelöst.

#### CTAB-Extraktionspuffer

100 mM Tris (pH 7,5)  
700 mM NaCl  
50 mM EDTA (pH 8,0)  
1% CTAB<sub>2</sub>  
140 mM β-Mercaptoethanol (frisch hinzufügen)

#### TE-Puffer

5 mM Tris-HCl pH 8,0  
1 mM EDTA

### 2.4.2 RNA-Extraktion

Zur RNA-Isolierung wurde das tiefgefrorene Wurzelmaterial mit einem Mörser und Pistill unter flüssigem Stickstoff zu Puder gemörsert, in 2 ml-Gefäße abgefüllt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. In dieser Arbeit wurden alle RNA-Proben mit TRIzol-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) extrahiert. Um RNAsen zu inaktivieren, wurden alle wässrigen Lösungen vor Benutzung 16 Stunden mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und anschließend autoklaviert. Pulverisiertes Wurzelmaterial wurde mit 1 ml TRIzol-Reagenz gemischt und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 200 µl Chloroform. Die Proben wurden anschließend für 15 Sekunden stark geschüttelt und für 2 - 3 Minuten bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4°C für 20 Minuten und 14.000 rpm wurde die RNA aus dem Überstand mit 500 µl Isopropanol für 30 Minuten bei RT gefällt. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (4°C, 30 min,

14.000 rpm). Das RNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen in 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser aufgenommen und für fünf Minuten auf dem Heizblock bei 64°C gelöst.

### 2.4.3 DNaseI-Verdau der RNA-Proben

Zur vollständigen Entfernung von DNA wurde jeweils 2  $\mu$ g RNA mit je 2  $\mu$ l 10 x DNase-Puffer, 2  $\mu$ l DNaseI und 0,5  $\mu$ l RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l 25 mM EDTA wurde die DNaseI bei 70°C wieder inaktiviert und die Reinheit mittels NanoDrop ermittelt (siehe unten). Zur Sicherstellung eines vollständigen DNase-Verdau wurde eine Kontroll-PCR mit Primern für das konstitutiv exprimierte Referenz-Gen *AtUbiquitin 5 (UBQ 5)* verwendet.

### 2.4.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von RNA- und DNA-Proben

Die Reinheits- und Konzentrationsbestimmungen von RNA- und DNA-Proben erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen). DNA-Proben wurden bei -20°C und RNA-Proben bei -80°C gelagert.

### 2.4.5 cDNA Synthese

Aus der mit DNaseI behandelten Gesamt-RNA wurde cDNA mit Hilfe des qScript cDNA Synthese Kits (Quanta Bioscience, Gaitersburg) laut Herstellerangaben synthetisiert. Dazu wurden je 500 ng verdaute Gesamt-RNA eingesetzt. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurden die Proben mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf 2,5  $\mu$ g/ $\mu$ l Eingangs-RNA eingestellt. Eine Qualitätsüberprüfung der cDNA erfolgte mittels einer Kontroll-PCR mit Ubiquitin-spezifischen Primern und anschließender Gelelektrophorese. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.4.6 Standard Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die standardmäßige PCR setzte sich aus einem Endvolumen von 25  $\mu$ l zusammen mit folgenden Komponenten: 1,25 u DSCP<sub>ol</sub> DNA-Polymerase (DNA Cloning Service, Hamburg), 2,5  $\mu$ l 10 x Taq-Reaktionspuffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und je 10 pmol der entsprechenden Primer. Die eingesetzten DNA/cDNA-Konzentrationen waren abhängig vom jeweiligen Template zwischen 5-10 ng. Die Amplifikation wurde mit folgendem Standardprogramm durchgeführt:

**Tabelle 2.4-1: Programm für Standard-PCR**

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5	Schritt 6
95°C	95°C	AT x	72°C	72°C	8°C
10 min	30 s	30 s	30 - 45 s	5 min	∞
26-35 Zyklen					

Die *Annealing*-Temperaturen (AT) variierten (x) je nach genutztem Primerpaar und sind in Tab. 2.4-3 aufgeführt.

### 2.4.7 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte auf 1,5%-gen Agarosegelen, die mit ~0,75 - 1 µg/ml Ethidiumbromid versehen waren. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Vor dem Auftragen wurde den Proben 10 x DNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:10 (Ladepuffer:DNA) zugesetzt. Die 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) diente als Standard. Die Visualisierung der DNA-Banden wurde mit einem UV-Transilluminator und einem Videoprintgerät (INTAS, Göttingen) festgehalten.

#### 10 x TBE

900 mM Tris  
900 mM Borsäure  
25 mM EDTA  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> pH 8,0

#### 10 x DNA-Ladepuffer

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

### 2.4.8 Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) wurde als Quantifizierungsmethode gewählt, um mit Hilfe des Verhältnisses von genomischer Pilz- zu genomischer Pflanzen-DNA die Besiedlungsintensität von *P. indica* in verschiedenen *Arabidopsis*-Mutantenlinien im Vergleich zum entsprechenden *Arabidopsis*-Wildtyp zu bestimmen. Zusätzlich diente die qPCR zur relativen Quantifizierung von ausgewählten Transkripten in cDNA-Proben. Die quantitative Bestimmung erfolgte in einem qPCR-Gerät von Applied Biosystems (Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR, Applied Biosystems Inc., CA) unter Verwendung des SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (10 µl; Sigma-Aldrich). Für die qPCR-Reaktionen wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl jeweils 10 ng cDNA (zur Quantifizierung von ausgesuchten Transkripten) oder 40 ng genomische DNA (zur Quantifizierung pilzlicher DNA in Wurzeln) und je 0,7 µl (350 nM) der entsprechenden Forward und Reverse Primer eingesetzt. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt mit folgendem



Reaktionsprogramm: Nach einem ersten Denaturierungsschritt (95°C, 7 min) folgten 40 Amplifikationszyklen (95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s). Die Fluoreszenzmessung erfolgte für alle Proben während jedem PCR-Zyklus am Ende des Elongationsschrittes (72°C). Am Ende des letzten PCR-Zyklus wurde eine Dissoziationskurve im Bereich von 60 - 95°C in 0,5°C-Schritten aufgezeichnet, um mögliche Unreinheiten auszuschließen. Die *Cycle threshold* (Ct)-Werte wurden automatisch berechnet. Hiervon wurden die relativen Expressionswerte ( $2^{-\Delta Ct}$ ) nach Livak und Schmittgen (2001) berechnet. Die Effizienz der Oligonukleotide wurde anhand von Verdünnungsreihen bestimmt. Zur Normalisierung wurde das Referenzgen *AtUbiquitin 5 (UBQ 5)* verwendet (siehe Tab. 2.4-3).

#### 2.4.9 Genexpressionsanalysen in besiedelten *Arabidopsis*-Wurzeln

Um zeitlich detaillierte Transkriptionsmuster von aus der Literatur bekannten Stress- und Abwehr-assoziierten Genen in *P. indica* besiedelten Wurzeln zu erhalten, wurde in verschiedenen Mutantenlinien und deren entsprechenden Wildtypen zu den folgenden Zeitpunkten und Behandlungen Wurzelmaterial gesammelt und weiter analysiert.

**Tabelle 2.4-2: Erntezeitpunkte diverser Kinetiken**

Kinetiken	Behandlung 1 (21 Tage nach Keimung)	Behandlung 2 (3 dai; 3 Tage nach Inokulation )	Erntezeitpunkte
Col-0 flg22-Kinetik (I-III)	<i>P. indica</i>	1 µM flg22	2, 24, 72 h nach Behandlung 2
LER/ <i>ga1-6/</i> <i>quintuple-DELLA</i> (I-II)	<i>P. indica</i>	–	0, 3, 7 dai
Col-8 / <i>pub22/23/24</i> (I-II)	<i>P. indica</i>	–	0, 1, 3, 7 dai
Col-0/ <i>jin1-1</i> (I-II)	<i>P. indica</i>	–	0, 3, 7 dai

In diesen Kinetiken wurden *Arabidopsis*-Pflanzen auf ATS-Medium angezogen (siehe Tab. 2.4-2) und deren Wurzeln nach 21 Tagen mit *P. indica* inokuliert oder mit Tween 20-Lösung (0,05%; Kontrolle) behandelt. Nur in den flg22-Kinetiken wurde anschließend eine zweite Behandlung durchgeführt, so dass sich folgende vier Varianten ergaben: Kontrolle, Kontrolle + flg22, *P. indica*, und *P. indica* + flg22. Das Wurzelmaterial wurde anschließend 2, 24, 72 hat (*hours after treatment*) abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In den übrigen Kinetiken wurde das Wurzelmaterial nach *P. indica* Inokulation zu den oben genannten Zeitpunkten geerntet und in Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss erfolgte eine RNA-Extraktion mit TRIzol und eine cDNA Synthese wie im Kapitel 2.4.5 beschrieben. Der Einfluss der Besiedlung auf das Expressionsmuster ausgewählter Gene wurde mittels qPCR

untersucht (vgl. Kap. 2.4.8). Die verwendeten Primersequenzen finden sich in Tab. 2.4-3. In jedem Experiment wurde die Besiedlung der Wurzeln zusätzlich mikroskopisch über WGA-Färbung überprüft.

**Tabelle 2.4-3: Primersequenzen für ausgewählte qPCR-Primer**

AGI Code	Primer	Richtung	Sequenz 5'→3'
AT3G62250	<i>AtUBQ5</i>	Fwd	CCAATGTGCATTCAGAACGA
		Rev	CCAATGTGCATTCAGAACGA
–	<i>P. indica</i> ITS	Fwd	CCAATGTGCATTCAGAACGA
		Rev	CCAATGTGCATTCAGAACGA
AT4G19700	<i>BOI</i>	Fwd	TCTTCGAACAAACCTAGACC
		Rev	CACAAACCGTACACAAACAC
AT5G26920	<i>CPB60g</i>	Fwd	AAGAAGAATTGTCCGAGAGGAG
		Rev	GGCGAGTTTATGAAGCACAG
AT2G45900	<i>Exp-PTI</i>	Fwd	GGATTTTCATTCGTCAAACCT
		Rev	CAACCAATATCAAAGCGGAG
AT1G18570	<i>MYB51</i>	Fwd	ACCAACCTCGAATCTTCTCTG
		Rev	TTTCAACACAAGACTCCTCCA
AT3G25250	<i>OXII</i>	Fwd	TCATCTACATTGGCCGTGTC
		Rev	CGTCGCTCCATACAACATCT
AT1G74710	<i>SID2</i>	Fwd	TCCGTGACCTTGATCCTTTC
		Rev	ACAGCGATCTTGCCATTAGG
AT5G24770	<i>VSP2</i>	Fwd	CAAACCTAAACAATAAACCATACCATAA
		Rev	GCCAAGAGCAAGAGAAGTGA
AT4G01250	<i>WRKY22</i>	Fwd	ATCTCCGACGACCACTATTG
		Rev	TCATCGCTAACCACCGTATC
AT2G38470	<i>WRKY33</i>	Fwd	CAAAGGAAAGGAGAGGATGG
		Rev	GTAGACTGAGGTTTAGGATGG
AT4G23810	<i>WRKY53</i>	Fwd	GCAACGAAACAAGTCCAGAG
		Rev	GTCTTTACCATCATCAAGCCC

## 2.5 Zyto-histologische Methoden

### 2.5.1 Färbung mit WGA Alexa Fluor® 488 (*Wheat Germ Agglutinin*)

Um pilzliche Strukturen in Wurzelproben anzufärben, wurde das frisch geerntete Wurzelmaterial in eine Fixierlösung, bestehend aus Chloroform (20% v/v), Ethanol (80% v:v) und 1,5 g/l Trichloressigsäure gegeben. Für die Färbung und Visualisierung pilzlicher Zellwände an und in der Wurzel wurde der Farbstoff WGA Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Karlsruhe) genutzt. Fixierte Wurzeln wurden zunächst für zwei Minuten in 10% Kaliumhydroxid erhitzt und anschließend durch mehrere Waschschriffe mit 1 x PBS-Puffer

gewaschen, bis sich ein pH-Wert von ca. 7 - 7,5 einstellte. Danach wurden die Wurzeln in die WGA-Färbelösung überführt und 3 x 1 Minute vakuuminfiltiert und 30 Minuten bei RT belassen. Für die anschließende Mikroskopie wurden die Proben noch einmal mit 1 x PBS-Puffer gewaschen und auf einen Objektträger mit Glycerin überführt. WGA-AF 488 wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen) bei einer Anregungs- bzw. Detektionswellenlänge von 470/20 nm bzw. 505–530 nm detektiert.

### **WGA-Färbelösung**

5 ml 1 x PBS-Puffer (pH 7,4)  
50 µg WGA (*Wheat Germ Agglutinin*)  
Alexa Fluor® 488 1µg/µl  
0,05% Silwet I-77

### **1 x PBS-Puffer (pH 7,4)**

0,2 g KCl  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
Mit 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auffüllen

## **2.5.2 Analyse der Gibberellinsignalgebung in *P. indica*-besiedelten Wurzeln – RGA-Degradation**

Durch Studien in Gerste wird vermutet, dass die Besiedlung durch *P. indica* einen Einfluss auf die Gibberellin-Biosynthese in Wurzeln ausübt (Schäfer et al., 2009). In Analogie zu Gerste wurde in dieser Arbeit in *Arabidopsis* analysiert, inwieweit Gibberellinsäure einen Einfluss auf die Besiedlung durch *P. indica* und die Wurzelabwehr hat. Hierbei wurde die Fusionsmutante RGAp:*GFP-RGA*, in der GFP an den N-Terminus des DELLA-Proteins RGA fusioniert ist (Navarro et al., 2008), verwendet. Um einen Einfluss von *P. indica* auf den GA-Signalweg zu überprüfen, wurde die Degradation des DELLA-Proteins RGA nach zuvor applizierter GA-Behandlung und/ oder Inokulation durch *P. indica* verglichen. Dazu wurden 14 Tage auf ATS-Medium angezogene RGAp:*GFP-RGA*-Pflanzen mit einer *P. indica*-Chlamydosporensuspension (500.000 Sporen/ml) inokuliert, bzw. mit einer Tween-20 Lösung (Kontrolle) oder mit 10 µM GA<sub>3</sub> behandelt. Es folgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung nach 3 und 7 Tagen. Als Marker diente das GFP-Signal (RGA Akkumulation/DELLA Stabilisation) in Wurzelspitzen bzw. gebildeten Seitenwurzelspitzen.

Die Einordnung der Stärke des GFP-Signales in Wurzelspitzen erfolgte dabei quantitativ nach folgenden Kategorien:

- kein Signal
- schwaches Signal
- starkes Signal

Ausgewertet wurden pro Zeitpunkt und Behandlung jeweils Seitenwurzelspitzen von 10-20 Pflanzen.

## 2.6 Analyse zur Untersuchung der MAMP-induzierten Abwehrreaktionen

### 2.6.1 Analyse der Flagellin-induzierten Hemmung des Keimlingswachstums

Zur Klärung der Frage, ob eine Wurzelbesiedlung durch *P. indica* einen Einfluss auf das flg22-induzierte Wachstumsinhibierung von Keimlingen hat, wurde das System von Gomez-Gomez et al. (1999) verwendet. Dazu wurden 14 Tage auf ATS-Medium angezogene *Arabidopsis*-Pflanzen mit einer *P. indica*- Chlamydosporensuspension (500.000 Sporen/ml) oder mit einer Tween-20 Lösung (Kontrolle) inokuliert. 3 Tage nach Inokulation (3 dai) wurden die Pflanzen in 4-Well-Multischalen mit flüssigem ATS-Medium, angereichert mit 1% Saccharose und 1  $\mu$ M flg22- oder (flg22) Kontrollbehandlung überführt (20 Pflanzen pro Behandlung, 1 Pflanze/Well). Die Pflanzen wurden dann für weitere 10 Tage kultiviert und die Wachstumsinhibierung durch Bestimmung des Frischgewichts analysiert. Insgesamt umfasste dieser Versuch also die vier Varianten Kontrolle, Kontrolle + flg22, *P. indica* und *P. indica* + flg22. Derselbe Versuchsaufbau wurde auch zur Untersuchung des Einflusses der Peptide elf18 und Pep1 auf das Pflanzenwachstum verwendet, da für diese Peptide ebenfalls eine wachstumshemmende Wirkung bekannt ist (Zipfel et al., 2006; Krol et al., 2010).

#### Lösungsmittel

0,1% BSA / 0,1 M NaCl  
1,5 g BSA + 8,766 g NaCl  
ad 100ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>  
steril filtriert

#### 1 $\mu$ M flg22-Lösung

1,5  $\mu$ l flg22-Stammlösung (10mM)  
wird in 1 ml Flagellin-Lösung gelöst  
und mit je 14 ml flüssig ATS (+ 1% Saccharose)

#### flg22-Kontrolllösung

1 ml Lösungsmittel wurden mit 14 ml flüssigem ATS (+ 1% Saccharose) steril filtriert.

#### Peptidsequenzen

flg22 QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA (Felix et al., 1999)  
elf18 SKEKFERTKPHVNVGTIG (Kunze et al., 2004)  
Pep1 ATKVKAKQRGKEKVSSGRPGQHN (Krol et al., 2010)

### **2.6.2 Anilin-Blau-Färbung zur Kallose-Detektion**

Um Kallose in besiedelten Wurzeln nachzuweisen, erfolgte die Färbung mit dem Farbstoff Anilin-Blau nach einem modifizierten Protokoll von Prof. Lipka (Georg-August-Universität, Göttingen). Zunächst wurden dafür 14 Tage alte, auf ATS-Medium vorgekeimte *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps Col-0 entweder mit einer Suspension von *P. indica* Chlamydosporen (500.000 Sporen/ml) oder mit einer 0,05% Tween-Lösung behandelt (Kontrolle). 3 Tage nach Inokulation (3 dai) wurden die Pflanzen in 4-Well-Multischalen mit flüssigem ATS-Medium und 1% Saccharose überführt. Für eine Elizitierung wurde 1  $\mu$ M flg22 oder flg22-Kontrollbehandlung (siehe 2.6) dem autoklavierten ATS-Medium sterilfiltriert zugesetzt. In diesem Versuch wurden die vier Varianten Kontrolle, Kontrolle + flg22, *P. indica* und *P. indica* + flg22 unterschieden und 24 Stunden nach flg22-Behandlung geerntet. Dazu wurden Einzelpflanzen zunächst in Lactophenol fixiert und für 15 Minuten vakuuminfiltriert. Anschließend wurden die Proben in eine neue Lactophenol-Lösung überführt und auf einem Heizblock bei 65°C für 15 Minuten erhitzt, gefolgt von einer Inkubation bei RT für weitere 12 Stunden. Anschließend wurden die Proben zunächst in 50% Ethanol, danach in Wasser gespült. Die Anfärbung der Kallosedepositionen erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation in einer Anilinblau-Färbelösung im Dunkeln.

#### **Lactophenol-Stammlösung**

100 ml Phenol  
100 ml Milchsäure  
200 ml Glycerin  
vor Gebrauch 1:2 mit Ethanol verdünnen

#### **Anilinblau-Färbelösung**

150 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.01% Anilinblau  
pH 9.5 mit KOH einstellen

### **2.6.3 Semiquantitative Analyse der Kallosebildung in Wurzeln**

Die Analyse der jeweiligen Kallosephänotypen erfolgte mikroskopisch mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen) mit einer Anregungs- bzw. Detektionswellenlänge von 365 nm bzw. 420 nm. Als Marker wurden Kallosedepositionen herangezogen, welche in Wurzelspitzen nach verschiedenen Behandlungen gebildet wurden. Das Ausmaß der Kallosebildung konnte jedoch nur semiquantitativ erfasst werden, da eine Einzelauswertung von Depositionen aufgrund der teilweise massiven Kallose-Bildung

unmöglich war. Die Stärke der Kalloseedeposition in den vier verschiedenen Behandlungen wurde in den folgenden Kategorien erfasst:

- keine bzw. geringe Kallosebildung
- mittlere Kallosebildung
- starke Kallosebildung

## 2.7 Luminol-Assay zur Quantifizierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung

Die ROS-Produktion in *Arabidopsis*-Wurzeln wurde durch Lumineszenzdetektion mit Hilfe von Luminol und Meerrettichperoxidase nachgewiesen. Die dabei auftretende Chemolumineszenz wurde mit einem Luminometer (Lumat LB 9501 Berthold, Bad Wildbad) detektiert. Die Messung erfolgte in 5 ml Polystyrolröhrchen (Sarstedt) mit 195 µl der Luminol-Peroxidase-Stammlösung und 7,5 µl 200 mM Phosphatpuffer (pH 8,0). Detektiert wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nach Elizitierung mit folgenden Peptiden: flg22, elf18, N-Acetylchitooctaoase (folgend kurz: Chitin) oder Pep1 (je 1 µM). Die Messung erfolgte im Minutentakt für 30 Minuten. Für den Luminol-Assay wurden zunächst 15 Tage alte, auf ATS-Medium angezogene *Arabidopsis*-Pflanzen entweder mit einer Suspension von *P. indica*-Chlamydosporen (500.000 Sporen/ml) oder mit einer 0,05%igen Tween-Lösung behandelt. 3 Tage nach Inokulation (3 dai) wurden die Wurzeln aus dem Medium entfernt, in 0,5 cm lange Wurzelfragmente geschnitten und 10 mg dieser Fragmente in ein mit 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gefülltes Polystyrolröhrchen überführt und bei RT im Dunkeln über Nacht inkubiert. Das Wasser wurde kurz vor der Messung durch die Stammlösung und Puffer ersetzt und im Luminometer die Hintergrundmessung für 10 Minuten aufgenommen. Nach anschließender Elizitierung begann die Detektion der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung.

### **1 mM Luminol-Lösung**

1,77 mg Luminol (Sigma Aldrich, München), gelöst in 1 ml NaOH (10 mM)  
auf 10 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

### **Horseradish-Peroxidase-Lösung 2U/ml**

1 mg Horseradish Peroxidase (Roche Diagnostics, Mannheim) in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

### **Luminol-Peroxidase-Stammlösung**

1 ml Luminol-Lösung  
100 µl Horseradish-Peroxidase-Lösung  
auf 50 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, im Dunkeln halten

### **Phosphatpuffer (pH 8)**

200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7,12g/200 ml)  
200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5,52g/200 ml)

## 2.8 Proteinbiochemische Methoden

### 2.8.1 Extraktion von Gesamtprotein aus Wurzelproben

Für alle Proteinexperimente wurden 21 Tage alte, auf ATS angezogene *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps Col-0 entweder mit einer Suspension von *P. indica* Chlamydosporen (500.000 Sporen/ml) oder mit 0,05%iger Tween-Lösung behandelt (Kontrolle). 3 Tage nach Inokulation (3 dai) wurden die Pflanzenwurzeln mit 1  $\mu$ M flg22 oder flg22-Kontrollösung behandelt. In diesem Versuch wurden die vier Varianten Kontrolle, Kontrolle + flg22, *P. indica* und *P. indica* + flg22 unterschieden und 0, 10, 30, 60 Minuten nach flg22-Behandlung geerntet und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Der gleiche Versuchsaufbau wurde auch für die Experimente mit dem Elizitor-Peptid Pep1 verwendet. Für die Extraktion von Gesamtprotein aus *Arabidopsis*-Wurzeln wurde das unter flüssigem Stickstoff gemörserte Material in einem Kinase-Extraktionspuffer (vgl. Tab. 2.8-1) suspendiert. Der Kinase-Extraktionspuffer wurde zuvor mit 1 x Proteaseinhibitor-Tabletten (Roche) und Phosphatase-Inhibitoren versetzt. Zu 100 mg Wurzelmaterial wurden jeweils 100-150  $\mu$ l Extraktionspuffer gegeben und die Wurzeln durch mehrmaliges Vortexen aufgeschlossen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm, 20 min und 4°C. Anschließend wurde der Rohextrakt abgenommen und direkt verwendet oder bei -80°C gelagert. Für die Immunodetektion von Proteinen mit dem Phospho-p44/42 MAP-Kinase Antikörper (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology) wurden die Proben stets direkt weiterverarbeitet. Dabei erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung des Überstands nach der Methode von Bradford (1976) mit einem Fertigreagenz von Bio-Rad (München) nach Angaben des Herstellers.

**Tabelle 2.8-1 Zusammensetzung des Kinase-Extraktionspuffers**

Bestandteil	Konzentration
TrisHCl (pH 7,8)	25 mM
NaCl	75 mM
EGTA	15 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Tween 20	0,1% (v/v)
PMSF	0,5 mM
Leupeptin	10 $\mu$ g/ $\mu$ l
Aprotinin	10 $\mu$ g/ $\mu$ l
Glyzerophosphat	15 mM
Bis(4-Nitrophenyl)Phosphat [Tris]	15 mM
NaF	1 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,5 mM
DTT	1 mM

### 2.8.2 SDS-Gelelektrophorese

Die Proteinproben wurden in 4 x Lämmli-Puffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 2% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,05% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Für jede Probe wurden jeweils 30  $\mu$ g Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 V für ~1,5 h in einem 1 x SDS-Laufpuffer. Als Größenstandard diente der *Prestained Protein Ladder* Marker (Fermentas).

#### Polyacrylamidgel (1 mm)

##### Trenngel (12%)

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	4,3 ml
Acrylamid	3 ml (40%)
1,5 M Tris	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
Temed	4 $\mu$ l

##### Sammelgel (5%)

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	3,61 ml
Acrylamid	0,62 ml
1 M Tris	0,63 ml
10% SDS	0,05ml
Temed	5 $\mu$ l

##### 10 x Laufpuffer (pH 8,3)

250 mM Tris
1,92 M Glycine
1% SDS
mit 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> auffüllen

### 2.8.3 Coomassiefärbung für Proteingele

Zur Kontrolle der Gelbeladung wurden die Proteingele mit Blue R-250 Lösung (0,125% Coomassie Brilliant Blue R-250; 50% Methanol; 10% Essigsäure) unter leichtem Schütteln angefärbt und mit Entfärberlösung (5% Essigsäure) überschüssiger Farbstoff wieder entfernt.

### 2.8.4 Blotten und Immunodetektion von MAPK-Proteinen

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Protein-Auftrennung in einer Transferapparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Biorad) mit Hilfe der *Semi-Dry*-Methode auf eine Roti-PVDF Membran mit einer Porengrösse von 0.45  $\mu$ m (Karl Roth, Karlsruhe) überführt. Vor dem Gebrauch der PVDF Membran wurde diese eine Minute in 100%-iges Methanol getaucht, bis keine weißen Bereiche mehr erkennbar waren und in 1 x Towbin- Puffer vorbereitet. Der Transfer erfolgte mit 1 x Towbin-Puffer (192 mM Glyzin, 25 mM Tris 20% (v/v) Methanol, 0,1% (w/v) SDS) bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für eine Stunde. Anschließend wurden die Membranen durch Tauchen in TBS+T Puffer von Methanol-Resten befreit. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden mit 5% (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBS+T für eine Stunde bei RT unter konstantem Schütteln geblockt. Es folgten drei Waschschrte mit TBS+T für jeweils fünf Minuten.



### **TBS+T**

20 mM Tris/HCl (pH 7,5)  
150 mM NaCl  
0,1% Tween 20

### **TBS-T**

wie TBS+T nur ohne Tween 20

### **Blocking-Puffer**

TBS+T mit 5% fettfreier Trockenmilch (Karl-Roth, Karlsruhe)

Im Anschluss wurden die Membranen mit dem primären Antikörper in der jeweiligen Konzentration über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei wurden folgende Antikörper der Firma Sigma (Sigma Aldrich, München) verwendet: AtMPK6 (1:10000), AtMPK3 (1:5000), AtMPK4 (1:5000) in 5%-igem Milchpulver und 1 x TBS-T. Die Detektion von phosphorylierten MAP-Kinasen erfolgte durch den Kaninchen-Phospho-p44/42 (1:1000) MAP-Kinase Antikörper (Cell Signaling Technology). Letzterer wurde in 5%igem BSA in TBS-T inkubiert. Wieder folgten drei Waschschrte mit TBS+T für jeweils 5 min. Danach wurde der sekundäre Anti-Kaninchen-Antikörper (Anti-Rabbit IgG HRP-conjugate, Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:10.000 in 5%-igem Milchpulver und TBS-T verwendet und es wurde für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten mit TBS+T für jeweils 5 min wurde die Membran mit dem Femto-ECL-Kit von Pierce entwickelt. Die anschließende Entwicklung der Filme (Amersham™ Hyperfilm™, GE Healthcare), erfolgte in der Optimax-Entwicklermaschine von Protec (PROTEC Medizintechnik, Oberstenfeld).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zytologische Analysen der Arabidopsis-*P. indica* Interaktion – Verlauf der Wurzelbesiedlung durch *P. indica*

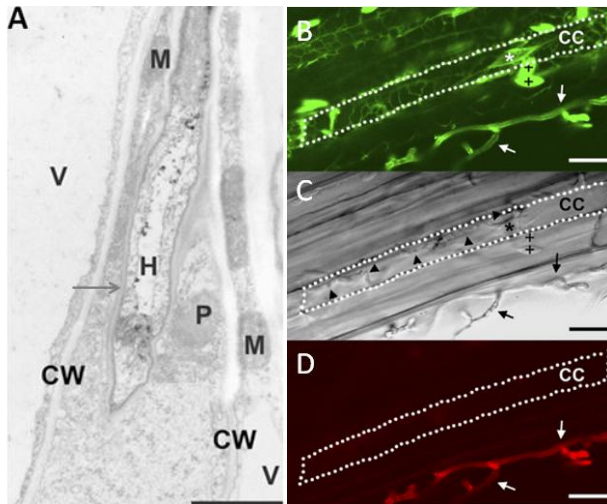
Durch zytologische Studien an Gerstenwurzeln konnten Deshmukh und Kollegen (2006) ein klares Besiedlungsschema von *P. indica* im Wurzelgewebe identifizieren.

In einem Vorversuch wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit B. Zechmann (Karl-Franzen Universität, Graz) der Verlauf der Besiedlung von der Sporenkeimung über Penetration und intra- und interzellulärem Wachstum des Pilzes in *Arabidopsis*-Wurzeln dokumentiert. In Analogie zu den Ergebnissen aus Gerste beginnt die Sporenkeimung ½ Tag nach Inokulation (dai; *days after inoculation*). Nach 3 Tagen kann inter- und intrazelluläres Wachstum in Epidermis- und Kortexzellen, aber auch in Wurzelhaarzellen beobachtet werden. Im weiteren Verlauf bildet der Pilz ein Netzwerk aus Hyphen. Nach 7 Tagen beginnt die extrazelluläre Chlamydosporenbildung. Kongruent zu Gerste ist das Wachstum des Pilzes auf ältere Wurzelzonen, insbesondere der Epidermis und des Kortex beschränkt, während eine Besiedlung des jüngeren Gewebes (z.B. meristematische- und Streckungszone) fast gänzlich ausbleiben. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden drei Besiedlungsphasen für die späteren Analysen gewählt:

- 1 dai (extrazelluläres Wachstum von *P. indica*)
- 3 dai (Penetrations- und frühe Besiedlungsphase)
- 7 dai (Etablierung von *P. indica* in der Wurzel)

Um zu einzelnen Besiedlungsphasen subzelluläre Veränderungen in *P. indica* besiedelten Wurzelzellen nachzuweisen, wurde die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Dabei zeigte sich, dass die intrazelluläre Besiedlung durch *P. indica* mit einer Invagination der Plasmamembran einhergeht. Wie aus Abbildung 3.1-1 A hervorgeht, waren in besiedelten Zellen zelluläre Strukturen wie Plasmamembran, Organellen und das Cytosol sichtbar und intakt. Mit der Annahme, dass lebende Zellen besiedelt werden, wurden darauf aufbauend Besiedlungsstudien mit der GFP-Chi-Linie durchgeführt. In dieser Linie ist das Endoplasmatische Retikulum (ER), ER *bodies* und der Zellkern durch GFP markiert (Flückiger et al., 2003). Mit Hilfe von konfokaler Laserrastermikroskopie (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) wurden *P. indica*-besiedelte Wurzelzellen zu 3 dai (vgl. Abb. 3.1-1 B-D) und 7 dai analysiert (vgl. Abb. 3.1-2 B-D). Die parallele Visualisierung von extra- und intrazellulären Hyphen erfolgte mit AF488 und AF633 konjugiertem WGA (*wheat germ*

*agglutinin*), einem Lectin mit hoher Affinität zu Chitin. Die CLSM-Untersuchungen zeigten, dass in besiedelten Zellen sowohl ER als auch Zellkern intakt waren (vgl. Abb. 3.1-1 B-D). Die Aufnahmen bestätigten somit, dass eine biotrophe Besiedlungsstrategie durch *P. indica* in Zellen bei 3 dai stattfindet.

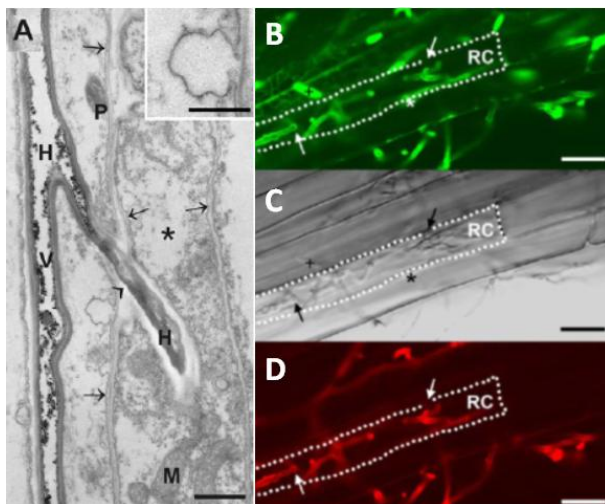


**Abb. 3.1-1: Die frühe Besiedlungsphase in der *Arabidopsis*-*P. indica* Interaktion.**

**A:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer besiedelten Wurzelzelle (WT: Col-0) 3 Tage nach Inokulation mit *P. indica*. Während der frühen biotrophen Phase, 1 - 3 Tage nach Inokulation, wächst die *P. indica*-Hyph (H) intrazellulär und ist dabei kontinuierlich von der Plasmamembran (grauer Pfeil) der Wirtszelle umgeben (Balken: 1  $\mu$ m). Die besiedelten Zellen und die Nachbarzellen zeigen ein intaktes Zytosol, Mitochondrien (M), Plastiden (P), Vakuole (V) sowie ein intaktes ER und Zellwände (CW, cell wall). **B-D:** Eine repräsentative Wurzelzelle der GFP-Chi Linie, 3 Tage nach Inokulation mit *P. indica*, wurde mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Extrazelluläre Pilzhyphe wurden mit WGA-AF488 und WGA-AF633 gefärbt (Pfeilspitzen in B-D). Die Besiedlung einer lebenden Zellen (CC, colonised cell) wurde im Durchlicht visualisiert (C). Die GFP-Fluoreszenz in dieser Zelle verdeutlicht, dass ER bzw. ER bodies (+) und Zellkernen (\*) intakt sind. Die Zelle zeigt keine Autofluoreszenz, was ein Zeichen für eine Abwehrreaktion wäre (D). Aufnahmen geben eine besiedelte Epidermiszelle im Bereich der Streckungszone wieder. Der Längenmaßstab entspricht 15  $\mu$ m (B-D).

Dies stand im Kontrast zu späteren Interaktionsstadien (> 3 dai). Hierbei wurden in besiedelten Zellen vermehrt Zelltodreaktionen beobachtet (vgl. Abb. 3.1-2 A-D). Diese Annahme stützt sich auf der Beobachtung, dass in *P. indica*-besiedelten Wurzelzellen der GFP-Chi Linie weder die GFP-Fluoreszenz vom ER noch vom Zellkern sichtbar waren. Der Beginn dieser Zelltod-assoziierten Besiedlung konnte durch eine Desintegration des Endomembransystems charakterisiert werden. Des Weiteren wurde das Platzen des Tonoplasten und somit der Kollaps der Vakuole beobachtet, was die Lyse des Zytoplasmas zur Folge hatte. Die Zelltodreaktion beschränkte sich auf die zuvor biotroph besiedelten Zellen, da angrenzende Nachbarzellen diese Symptome nicht aufwiesen. Zudem fiel auf, dass die Zelltodreaktionen nicht von einer Autofluoreszenz der Zellen begleitet wurde, was auf

pflanzliche Abwehrreaktionen wie die Akkumulation phenolischer Substanzen zurückzuführen wäre (Hammond-Kosack & Jones, 1996). Auch konnte in besiedelten Wurzelzellen die Merkmale wie beispielsweise Läsionen sowie braune Bereiche toter Zellen, welche typisch für eine hypersensitive Reaktion (HR) sind, nicht gefunden werden. Als Resultat der zytologischen Untersuchungen konnte eine initiale biotrophe Besiedlungsstrategie von *Arabidopsis*-Wurzeln (< 3 dai) durch *P. indica* aufgezeigt werden. Die zytologischen Untersuchungen zeigten selten Abwehrreaktionen, wie beispielsweise Zellwand-Appositionen oder eine hypersensitive Reaktion (HR) von besiedelten Pflanzenzellen. Aus diesen Vorergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass *P. indica* in der Lage ist, Abwehrreaktion zu unterdrücken bzw. die pflanzliche Abwehr so zu steuern, dass die Etablierung und Erhaltung der biotrophen Interaktion möglich wird. Darauf aufbauend, wurde die Fähigkeit von *P. indica* untersucht, die Wurzel-MTI zu unterdrücken, Außerdem sollten Signalwege der Wurzel-MTI identifiziert und deren Beeinflussung durch *P. indica* untersucht werden (Kap. 3.2).



**Abb. 3.1-2: Die späte Besiedlungsphase in der *Arabidopsis*-*P. indica* Interaktion.**

**A:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer besiedelten *Arabidopsis*-Zelle (WT: Col-0) 7 Tage nach Inokulation mit *P. indica*. Während der späten Besiedlungsphase kommt es zu einer Zelltodreaktion in besiedelten Zellen. Dargestellt sind zwei besiedelte Zellen. Die Pfeile zeigen Zellwände der besiedelten und Nachbarzelle an. Die linke besiedelte Zelle ist stark durch eine pilzliche Hyphe (H) besiedelt, während die rechte teilweise kolonisiert ist. Dabei ist die Hyphe (H) kontinuierlich von der Plasmamembran der Wirtszelle umgeben (Pfeilspitzen). Die Zelltod-assoziierte Besiedlung ist charakterisiert durch ein desintegriertes Zytosol (\*), während Mitochondrien (M) und Plastiden (P) zunächst unversehrt bleiben. Der Bildeinsatz zeigt einen Membranausschnitt in der Nähe der Penetrationsstelle, welcher sogenanntes *membran blebbing* aufweist. **B-D:** Mittels konfokaler Mikroskopie wurden repräsentative Wurzelzellen der GFP-Chi Linie untersucht. Diese ermöglicht eine Visualisierung von markierten ER bzw. ER *bodies* (+) und Zellkernen (\*) anhand der GFP-Fluoreszenz in lebenden Zellen. Extrazelluläre Pilzhypen wurden mit WGA-AF488 in B oder WGA-AF633 in D gefärbt. Pfeilspitzen zeigen Penetrationsereignisse einer toten besiedelten Epidermiszelle (RC) an. Die Zelltod-assoziierte Besiedlung wurde bestätigt in der GFP-Chi Mutante, welche kein GFP-markiertes ER bzw. ER *bodies* (+) und Zellkerne (\*) aufweisen, jedoch eine Färbung von intrazellulären Hyphen. Der Längenmaßstab entspricht 1  $\mu\text{m}$  (A); 0,5  $\mu\text{m}$  (Bildeinsatz); 15  $\mu\text{m}$  (B-D).

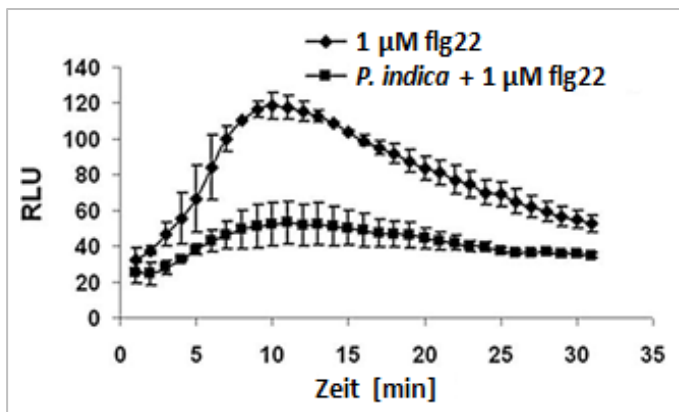
### 3.2 Analyse der MAMP-triggered immunity in *P. indica* besiedelten Wurzeln

Zur Klärung der Frage, ob *P. indica* die pflanzliche Abwehr umgeht oder aktiv unterdrückt, wurden eine Reihe von Experimenten auf der Ebene der MAMP-triggered immunity (kurz: MTI) durchgeführt. Da in Blättern ein fundiertes Wissen über ausgelöste Immunantworten besteht, nicht jedoch in Wurzeln, war es ein weiteres Ziel, neue Erkenntnisse über die Organisation der Wurzel-MTI zu erhalten sowie darzustellen, wie sie von *P. indica* gesteuert wird. Die Untersuchungen umfassten dabei die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies, die Regulation von Abwehrgenen im Wildtyp (WT) und ausgewählten Mutantenlinien, die Analyse der Kalloseproduktion und den Nachweis von phosphorylierten MAPKs in *Arabidopsis*-Wurzeln in Interaktion mit *P. indica*.

#### 3.2.1 Quantifizierung des oxidative burst in *P. indica* besiedelten *Arabidopsis*-Wurzeln

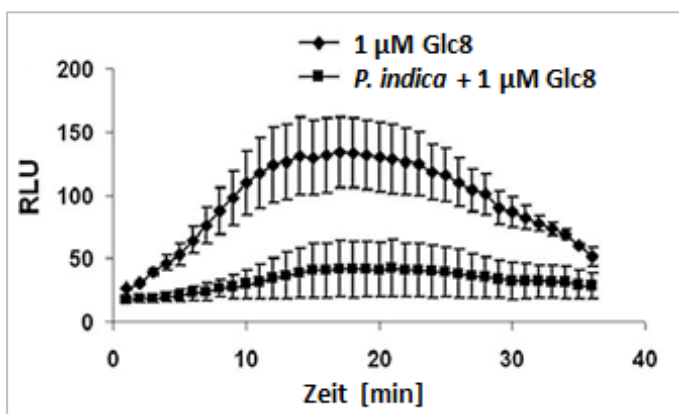
Zu den sehr frühen Abwehrreaktionen nach Erkennung eines Pathogens gehört die unmittelbare transiente Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere  $H_2O_2$ , im Apoplast (Felix et al., 1999). Diese Reaktion wird als *oxidative burst* bezeichnet. Die bereits etablierte Methode (Felix et al., 1999) wurde im vorliegenden Fall so modifiziert, dass eine Quantifizierung in Wurzeln durchführbar war. Es wurde der Frage nachgegangen, ob eine Besiedlung durch *P. indica* einen MAMP-induzierten *oxidative burst* beeinflusst und welcher Auslöser hierbei eine Rolle spielen könnte. Dazu wurde die Chemilumineszenz unbesiedelter und mit *P. indica* besiedelter Wurzelsegmente vom *Arabidopsis*-WT Col-0 in einem Luminol- und Peroxidase-haltigen Substrat nach Zugabe verschiedener MAMPs in einem Luminometer gemessen. In Abbildung 3.2-1 ist die Wurzelreaktion von Col-0 WT nach Elizitierung mit 1  $\mu M$  flg22 wiedergegeben. Bei flg22 handelt es sich um ein 22 Aminosäuren umfassendes synthetisches Peptid, was den Immunität-induzierenden Bestandteil des bakteriellen Flagellins von *Pseudomonas syringae* darstellt (Felix et al., 1999). Während unbesiedelte flg22-elizitierte Wurzeln einen schnellen ROS-Anstieg mit einem Maximum nach 10 Minuten erzielten, war diese in mit *P. indica* kolonisierten Wurzeln fast vollständig unterdrückt (vgl. Abb. 3.2-1). Aufgrund der eindeutigen Repression der ROS-Bildung nach flg22-Gabe in mit *P. indica* besiedelten Wurzeln wurde der Einfluss der Besiedlung auf die ROS-Bildung nach Behandlung mit Chitin überprüft. Eine Elizitierung durch Chitin in unbesiedelten Wurzeln zeigte in Übereinstimmung mit flg22 einen deutlichen ROS-Anstieg. In mit *P. indica* besiedelten Wurzeln war die ROS-Produktion fast vollständig unterdrückt (vgl. Abb. 3.2-2). Neben Flagellin gibt es noch weitere bakterielle Elizitoren.

Daher wurde auch untersucht, inwieweit die Besiedlung durch *P. indica* den durch elf18 ausgelösten *oxidative burst* unterdrückt. Elf18 ist ein aus 18 Aminosäuren bestehendes synthetisches Peptid, das den Immunität-induzierenden Bestandteil des bakteriellen Elongationsfaktors EF-Tu darstellt (Kunze et al., 2004). Hierbei zeigte sich, dass eine Besiedlung durch *P. indica* auch den elf18-induzierten *oxidative burst* supprimiert (vgl. Abb. 3.2-3). Die Ergebnisse verdeutlichen somit, dass der *oxidativ burst* durch diverse MAMPs, als eine frühe Reaktion der MTI, durch *P. indica* sehr effizient unterdrückt wird.



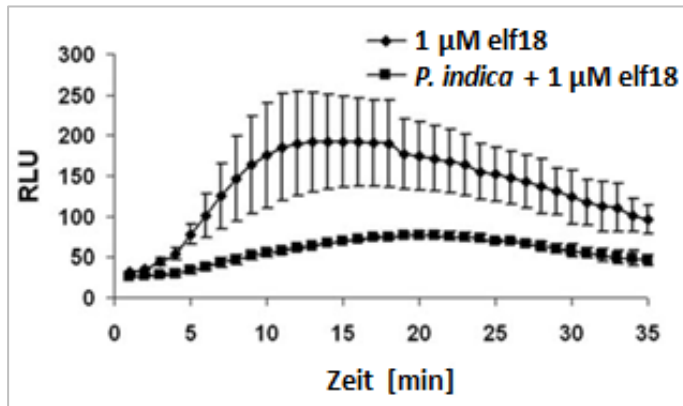
**Abb. 3.2-1: Quantifizierung des flg22-induzierten *oxidative burst* in *Arabidopsis*-Wurzeln.**

Messung der  $H_2O_2$ -Produktion in mit *P. indica* besiedelten und unbesiedelten Col-0 Wurzelsegmenten nach Zugabe von 1  $\mu M$  flg22. Die Messwerte wurden über 32 Minuten aufgezeichnet und die Ergebnisse werden in relativen Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) angegeben. Aus vier Einzelmessungen wurden Mittelwerte berechnet und die Standardabweichung bestimmt. Ergebnisse wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten bestätigt.



**Abb. 3.2-2: Quantifizierung des Chitin-induzierten *oxidative burst* in *Arabidopsis*-Wurzeln.**

Messung der  $H_2O_2$ -Produktion in mit *P. indica* besiedelten und unbesiedelten Col-0 Wurzelsegmenten nach Zugabe von 1  $\mu M$  N-Acetylchitooctaoase (Chitinoktamer, Glc8). Die Messwerte wurden über 36 Minuten aufgezeichnet und die Ergebnisse werden in relativen Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) angegeben. Aus vier Einzelmessungen wurden Mittelwerte berechnet und die Standardabweichung bestimmt. Ergebnisse wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten bestätigt.

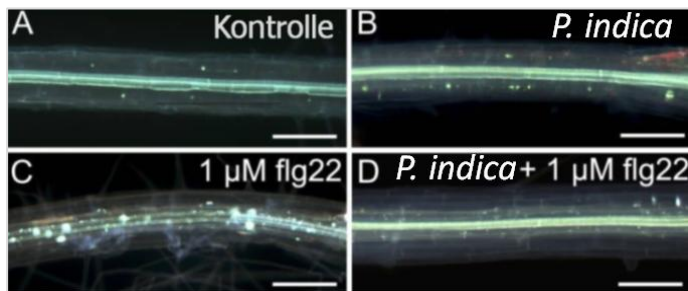


**Abb. 3.2-3: Quantifizierung des elf18-induzierten oxidative burst in Arabidopsis-Wurzeln.**

Messung der  $H_2O_2$ -Produktion in mit *P. indica* besiedelten und unbesiedelten Col-0 Wurzelsegmenten nach Zugabe von  $1 \mu M$  elf18. Die Messwerte wurden über 35 Minuten aufgezeichnet und die Ergebnisse werden in relativen Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) angegeben. Aus vier Einzelmessungen wurden Mittelwerte berechnet und Standardabweichung bestimmt. Ergebnisse wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten bestätigt.

### 3.2.2 Detektion von Kallose in Wurzeln

Kallose, ein  $\beta$ -1-3-Glucan, dient zur Verstärkung der Zellwände z. B. nach Pathogenbefall, indem es als physikalische Barriere die Penetration der Zellen verhindern und somit die Ausgrenzung des Pathogens bewirken soll (Thordal-Christensen et al., 1997). Mittels einer histochemischen Färbung mit Anilinblau wurde in Wurzeln des *Arabidopsis*-Wildtyps Col-0 die flg22-induzierte Akkumulation von Kallose in besiedelten und unbesiedelten Wurzeln vergleichend evaluiert. Wie aus Abbildung 3.2-4 ersichtlich, konnte in den Kontroll-Behandlungen keine Kallosebildung beobachtet werden. Die Besiedlung durch *P. indica* bewirkte einen ähnlichen Phänotyp. Besiedelte Wurzeln zeigten keine bzw. geringe Kalloseakkumulation. Dagegen führte die Inkubation der Wurzeln in einer  $1 \mu M$  flg22-Lösung zu einer starken Bildung von Kallose im gesamten Wurzelbereich. Die Kallose zeigte sich diffus über lange Strecken von der Differenzierungszone über die Elongationszone bis zum meristematischen Bereich. In Wurzeln, die mit *P. indica* besiedelt waren und anschließend mit einer flg22-Lösung inkubiert wurden, konnte keine bzw. eine geringe Kallosebildung festgestellt werden (vgl. Abb. 3.2-4).

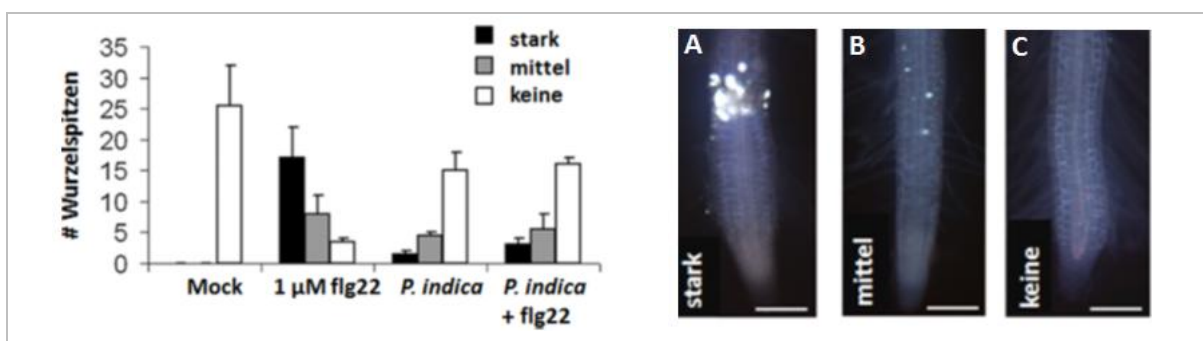


**Abb. 3.2-4: Detektion von Kallose in Wurzel.**

Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Arabidopsis-Wurzeln des Wildtyps Col-0. Drei Tage nach Inokulation mit *P. indica* (B) oder Kontroll-Behandlung (A) wurden diese mit 1  $\mu\text{M}$  flg22 behandelt (C und D), um Kalloseanreicherungen mittels Anilinblaufärbung unter UV-Anregung zu detektieren. Teilstrich 200  $\mu\text{m}$ .

Zur Verifizierung, ob *P. indica* in der Lage ist, in *Arabidopsis*-Wurzeln die Kallosebildung zu unterdrücken, sollte Kallosebildung mit oder ohne vorherige Kolonisierung der Wurzeln durch den Endophyten in drei unabhängigen Experimenten verglichen werden. Hierzu wurden vorgekeimte Pflanzen zuvor mit *P. indica* bzw. Kontroll-Behandlung und anschließend mit flg22-Lösung inkubiert und vergleichend evaluiert. Dabei wurde eine quantitative Auswertung der Kallosedeposition in Wurzelspitzen angewendet (stark, mittel oder keine Kallosedeposition). In drei unabhängigen Experimenten zeigte sich dabei, dass eine flg22-Elizitierung zu einer starken Kalloseakkumulation in nicht besiedelten Wurzeln führt und diese Bildung in *P. indica*-besiedelten Wurzel (vgl. Abb. 3.2-5) aufgehoben ist.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass *P. indica* die flg22-induzierte Kallosebildung unterdrückt. Auffällig dabei war, dass die beobachtete Supprimierung der Kallosedepositionen nicht nur im pilzlich favorisierten Wurzelgewebe, der Wachstumszone, sondern auch im nicht besiedelten Gewebe wie der Elongations- und meristematischen Zone auftrat.



**Abb. 3.2-5: Flg22-induzierte Kallosedeposition und deren Unterdrückung durch *P. indica*.**

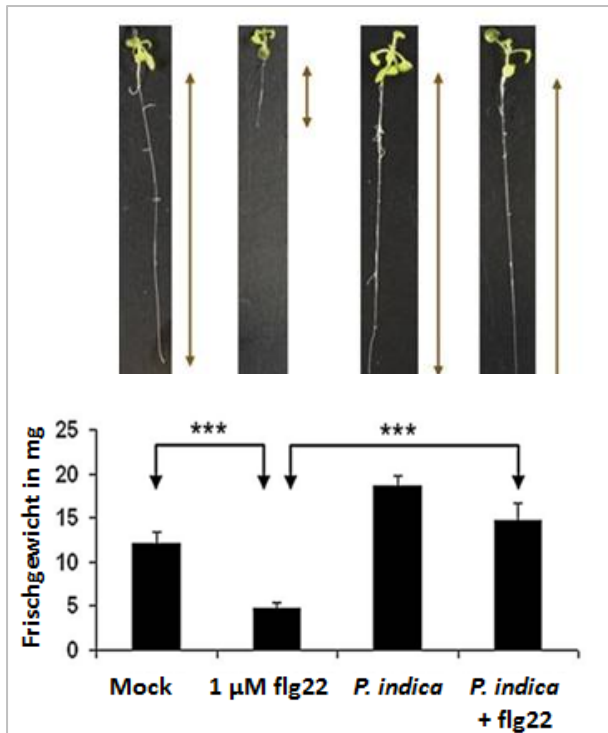
Dargestellt ist die Häufigkeit der Kallosedeposition, verursacht durch die vier entsprechenden Behandlungen. Dabei wurde eine quantitative Bewertung stark [A], mittel [B], nicht vorhanden [C] vorgenommen. Abgebildet ist der Mittelwert eines repräsentativen Experiments ( $n = 20$ ) mit Angabe der Standardabweichung. Teilstrich 200  $\mu\text{m}$ .



### 3.2.3 Analyse der Flagellin/elf18- induzierten Hemmung des Keimlingswachstums

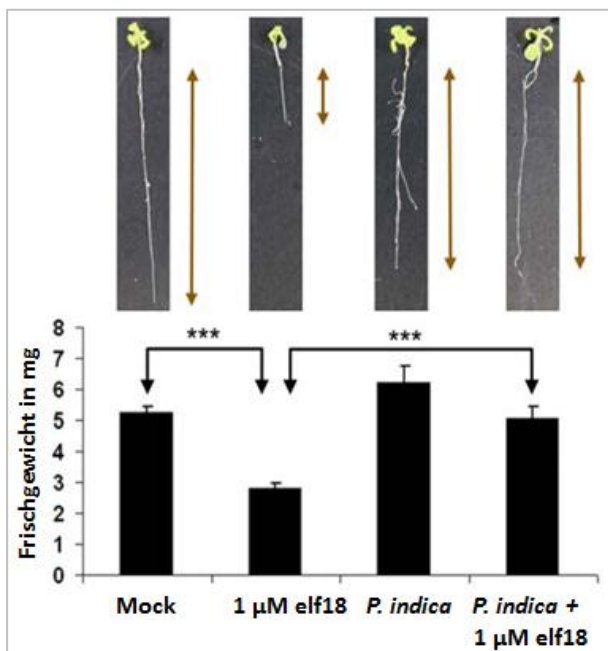
Als weiteres Experiment zur Analyse der MTI wurde der Einfluss von flg22 auf die Keimlingsentwicklung in Gegenwart von *P. indica* getestet. Es ist bekannt, dass die Zugabe von flg22 das Wachstum von Keimlingen inhibiert. Diese flg22-induzierte Antwort gilt als Indikator der komplexen Vernetzung zwischen der Etablierung von Abwehrmechanismen und anderen pflanzlichen Prozessen; häufig wird auch von einer kompletten Umsteuerung der Zelle nach Pathogenbefall gesprochen (Boller & Felix, 2009). Dieser Seiteneffekt wurde genutzt, um den Einfluss von *P. indica* auf die Behandlung der Keimlinge mit verschiedenen MAMPs (flg22 und elf18) zu analysieren. Dabei wurden 14 Tage alte Keimlinge mit oder ohne vorheriger Kolonisierung der Wurzeln durch *P. indica* und anschließender 1  $\mu$ M flg22- oder Kontroll-Behandlung für 10 Tage inkubiert und anschließend das Frischgewicht bestimmt. Die Auswertungen der morphologischen Daten zeigte, dass eine flg22-Behandlung zu einer Wachstumsinhibierung der Keimlinge führte, was sich in einem verringerten Frischgewicht widerspiegelte und somit bereits veröffentlichte Ergebnisse bestätigte (Gomez-Gomez & Boller, 2002). Die Inokulation mit *P. indica* wirkte sich bei den angezogenen Pflanzen positiv auf das Gesamtgewicht aus. Dies wird in Abbildung 3.2-6 deutlich. Eine flg22-Behandlung in mit *P. indica* besiedelten Wurzeln führte dazu, dass die Gesamtpflanzen insensitiv auf flg22 reagierten. Das Keimlingswachstum verlief trotz flg22-Behandlung normal und entsprach in etwa dem der unbehandelten Kontrolle (vgl. Abb. 3.2-6). Die dargestellten Resultate zeigen, dass eine Kolonisierung von Wurzeln durch *P. indica* zu einer Flagellin-Insensitivität führt.

Des Weiteren wurde die elf18-Responsivität in besiedelten und unbesiedelten Keimlingen untersucht (vgl. Abb. 3.2-7). In einem gleichen Versuchsaufbau konnte dabei gezeigt werden, dass unbesiedelte Kontrollpflanzen eine elf18-Responsivität haben, was sich in einem verringerten Frischgewicht niederschlug. Im Falle von mit *P. indica* besiedelten Pflanzen führte eine elf18-Behandlung zu einem normalen Keimlingswachstum und das gemessene Frischgewicht entsprach in etwa dem der unbehandelten Kontrolle. Die dargestellten Resultate verdeutlichen, dass eine Kolonisierung durch *P. indica* zu einer elf18-Insensitivität führt.



**Abb. 3.2-6: Hemmung des Keimlingswachstums in der Gegenwart von flg22.**

14 Tage alte Arabidopsiskeimlinge des Wildtyps Col-0 wurden mit flg22 behandelt, *P. indica* inokuliert, Kontroll-behandelt oder mit *P. indica* und flg22 (drei Tage nach Inokulation) behandelt. 10 Tage nach flg22-Applikation oder Kontrollbehandlung wurde das Wachstum gemessen (Frischgewicht in mg). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.  $P < 0,001$  (\*\*\*)



**Abb. 3.2-7: Hemmung des Keimlingswachstums in der Gegenwart von elf18.**

14 Tage alte *Arabidopsis*-Keimlinge des Wildtyps Col-0 wurden mit elf18 behandelt, mit *P. indica* inokuliert, Kontroll-behandelt oder mit *P. indica* und elf18 (drei Tage nach Inokulation) behandelt. 10 Tage nach elf18-Applikation oder Kontrollbehandlung wurde das Wachstum gemessen (Frischgewicht in mg). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.  $P < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.2.4 Der Einfluss von *P. indica* auf die Expression von flg22-induzierten Genen

Flg22 ist einer der bestuntersuchten MAMPs. Die durch flg22 aktivierten Signalwege sind exemplarisch für pflanzliche Immunantworten, wie z. B. die Aktivierung von Abwehrgenen (Zipfel et al., 2004). Um ein genaueres Bild der Expression von Genen, die mit Stress oder Abwehr assoziiert oder für bestimmte Signalwege typisch sind zu erhalten und aufzuzeigen, in welcher Breite *P. indica* abwehrbezogene Signalwege beeinflusst, wurden Kinetiken mit den Zeitpunkten zwei, 24 und 72 Stunden erstellt. Zu den untersuchten Genen zählten die mit der basalen Abwehr assoziierten *WRKYs* und das mit oxidativen Stress assoziierte *OXII*. Des Weiteren wurden das Jasmonat-induzierte Markergen *VSP2* und die Salizylsäure-abhängigen Markergene *SID2* und *CBP60g* untersucht. *MYP51*, welcher als Transkriptionsfaktor an der Aktivierung von Indol-Glukosinolat-Biosynthesegenen beteiligt ist, wurde ebenfalls hinzugezogen.

Wie aus Abbildung 3.2-8 hervorgeht, waren alle überprüften Gene (*OXII*, *WRKYs*, *SID2*, *CBP60g*, *MYP51*) in der Wurzel durch flg22 induziert. Als Resultat dieser Studien konnte ferner eine eindeutige Überlappung der Expression in Blatt und Wurzel MTI nachwiesen werden. Der Expressionsspiegel aller Gene (ausgenommen *VSP2*) zeigte in den unbesiedelten flg22-behandelten Wurzeln eine deutliche Induktion (2 h bzw. 24 h). Dagegen wies die Expression in den *P. indica* kolonisierten Pflanzen, in Gegenwart von flg22, ein anderes Muster auf. Die flg22-Behandlung führte hier nicht zu einem Anstieg der Transkriptmenge (vgl. Abb. 3.2-8). Zu den jeweiligen Zeitpunkten fand sich kein oder ein geringer Unterschied nach flg22-Behandlung in *P. indica* besiedelten Wurzeln, äquivalent zu den unbehandelten Kontrollvarianten. Nur das Jasmonat-responsive Markergen *VSP2* war in besiedelten Kontrollwurzeln (24 h) und besiedelten flg22-behandelten Wurzeln (24 h und 72 h) deutlich induziert. Wie aus Abbildung 3.2-8 hervorgeht, war die flg22-vermittelte Induktion der hier getesteten Stress- und Abwehrgene in *P. indica* besiedelten Wurzeln deutlich reduziert. Daraus wird deutlich, dass Abwehrmechanismen auf transkriptioneller Ebene durch *P. indica* aktiv unterdrückt werden.

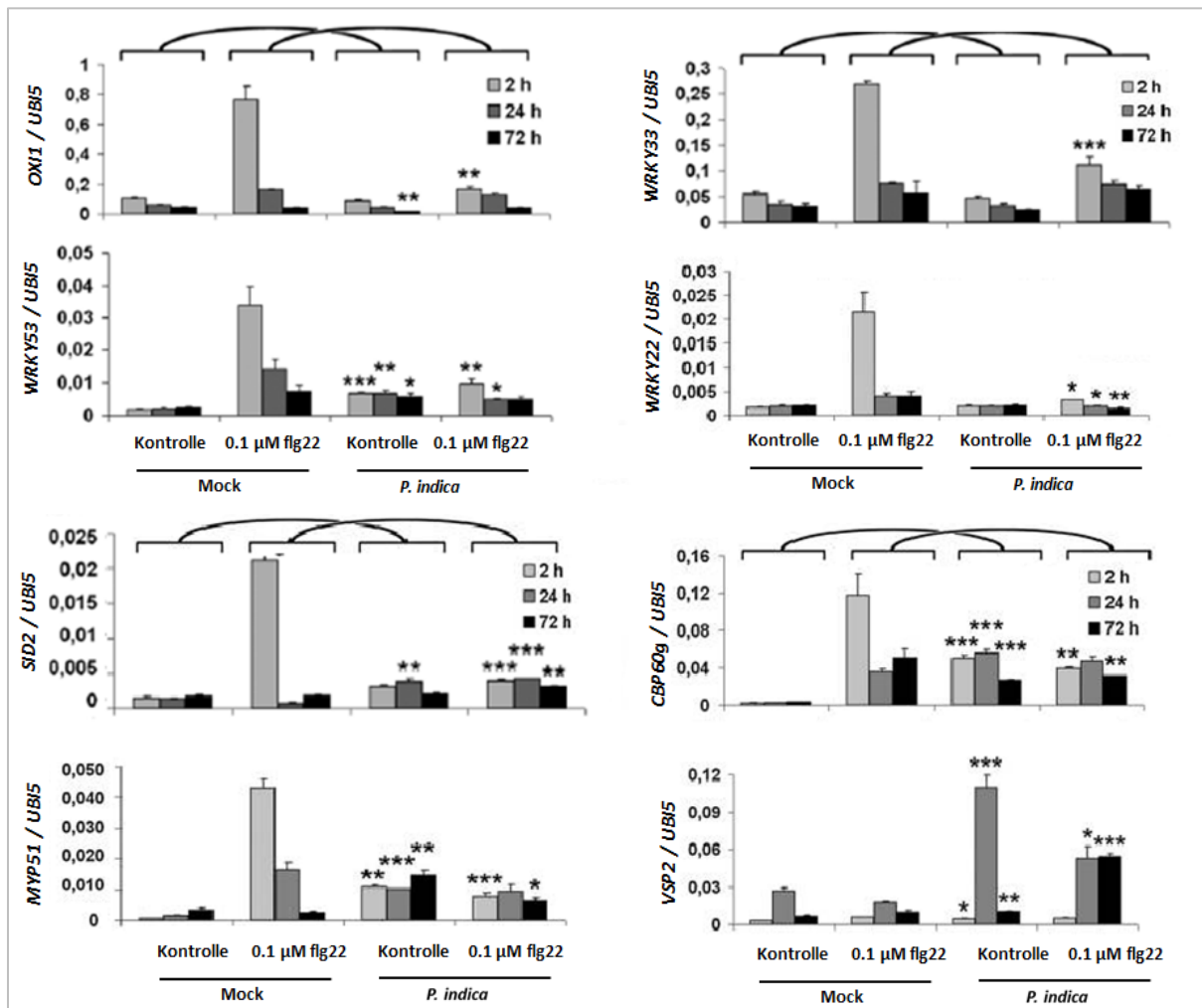


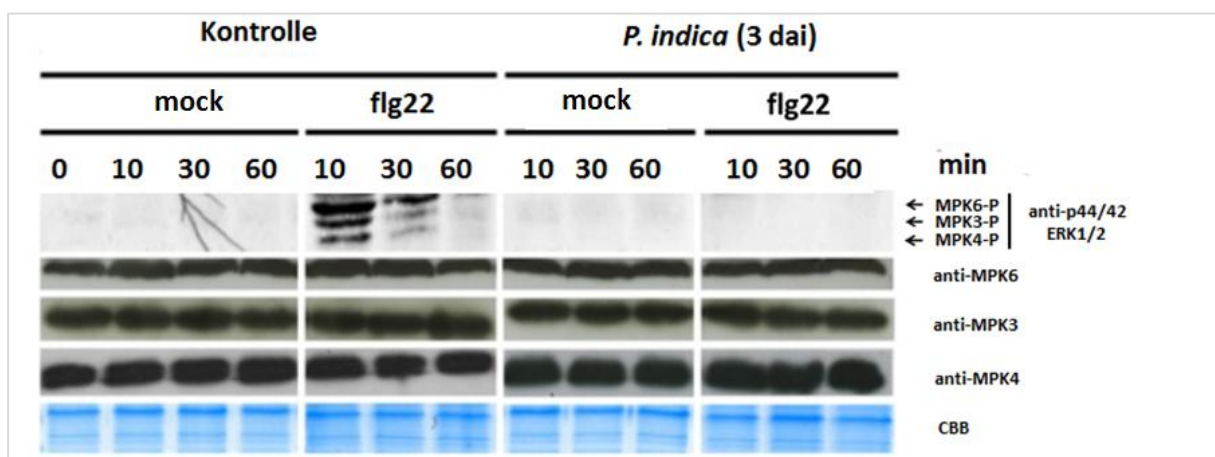
Abb. 3.2-8: Suppression von flg22-induzierten Genen durch *P. indica*.

21 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps Col-0 wurden zunächst mit *P. indica* inokuliert bzw. Kontroll-behandelt und drei Tage später mit 1  $\mu\text{M}$  flg22 oder Wasser (Kontrolle) behandelt. Die Wurzeln wurden 2, 24 und 72 Stunden nach der Kontrolle/flg22-Behandlungen geerntet. Mittels quantitativer Real-Time PCR wurde die Expression von *OX11*, *WRKYs*, *SID2*, *CBP60g*, *MYP51* sowie *VSP2* bestimmt. Abgebildet sind die relativen Expressionswerte, bestimmt durch die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Zur Normalisierung wurde das Referenzgen *AtUbiquitin 5 (UBQ 5)* verwendet. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers eines Experiments. Die Ergebnisse wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt. Für die Bestimmung der signifikanter Unterschiede wurden die relativen Expressionswerte zu individuellen Zeitpunkten zwischen Col-0/Kontrolle und Col-0/*P. indica* oder Col-0/flg22 und Col-0 + *P. indica*/flg22 verrechnet.  $p < 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*)).

### 3.2.5 Die Rolle der MAPK-Kaskaden in der MAMP-assoziierten Signaltransduktion in Anwesenheit von *P. indica*

MAP-Kinasen sind wichtige Komponenten in MAMP- und DAMP-induzierten Signaltransduktionswegen (Asai et al., 2002; Ranf et al., 2011). Wie bereits in Abschnitt 1.1.5 beschrieben, werden *AtMPK3*, *AtMPK4* und *AtMPK6* nach MAMP-Behandlung (z. B. Chitin, elf18, flg22) aktiviert (Rodriguez et al., 2010; Ranf et al., 2011). Aus diesem Grund sollte die Aktivierung der MAP-Kinasen in Abhängigkeit von *P. indica* und Flagellin-Behandlung

überprüft werden. Zum Nachweis von phosphorylierten MAPKs wurden Western-Blots mit Wurzelmaterial durchgeführt. Hierbei wurden 21 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps Col-0 mit *P. indica* inokuliert bzw. Kontroll-behandelt und drei Tage später mit flg22 inokuliert bzw. Kontroll-behandelt. Die vier verschiedenen Wurzelbehandlungen (Kontrolle, flg22, *P. indica* und *P. indica* + flg22) wurden anschließend nach 0, 10, 30 und 60 min geerntet und mittels eines Western Blots der Phosphorylierungszustands der MAPKs bestimmt. Es wurde dabei der ursprünglich gegen tierische MAPKs gerichtete antiphospho-p44/42-Antikörper genutzt. Dieser erkennt phosphorylierte MPK3, MPK4 und MPK6 durch Bindung an ihr phosphoryliertes TEY-Motiv. Zusätzlich wurde mit spezifischen Antikörpern gegen MPK6, MPK3 und MPK4 überprüft, ob diese Proteine innerhalb der getesteten Versuchszeit in unterschiedlichen Mengen produziert wurden (vgl. untere Reihen, Abb. 3.2-9) Bei Betrachtung des Phosphorylierungszustands (vgl. Abb. 3.2-9; oberste Reihe) zeigte sich – nach flg22-Elizitierung – eine sehr schnelle transiente Phosphorylierung der drei Proteinkinasen. Das Maximum der Phosphorylierung wurde nach 10 min gefunden. In diesem Zeitraum sind MAPKs nach MAMP-Behandlung durchschnittlich am stärksten phosphoryliert (Asai et al., 2002). MPK6 gab das stärkste Signal. Dagegen war die Phosphorylierung der MAPKs in der Behandlung *P. indica* + flg22 vollständig blockiert. Diese Beobachtung ist ein starker Hinweis darauf, dass *P. indica* einen Einfluss auf die Inaktivierung der immunresponsiven MPK6, MPK3 und MPK4 hat.



**Abb. 3.2-9: MAPK-Phosphorylierung in *Arabidopsis*-Wurzeln.**

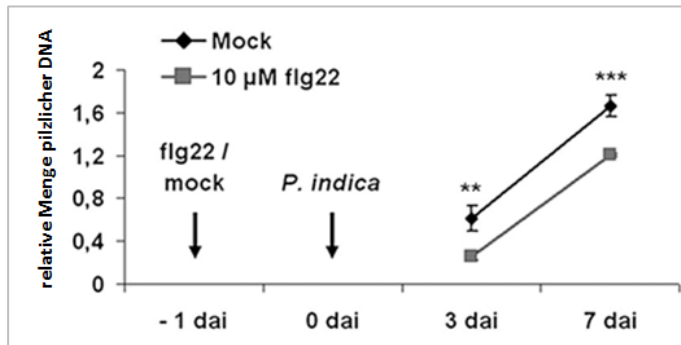
21 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps Col-0 wurden zunächst mit *P. indica* inokuliert oder Kontroll-behandelt und drei Tage später mit 1  $\mu$ M flg22 oder Wasser (Kontrolle) behandelt. Die Wurzeln wurden nach 0, 10, 30 und 60 min der Mock/flg22-Behandlungen geerntet. Nach der Extraktion der jeweiligen Gesamtproteine wurde ein Western-Blot durchgeführt, bei dem ein Antikörper gegen phosphorylierte MAPKs (anti-phospho p44/42 MAPK) verwendet wurde. Spezifische Antikörper gegen MPK6, MPK3 und MPK4 zeigen, dass keine Behandlung zu einer veränderten Synthese dieser Proteine führte. Im unteren Bereich ist jeweils der Comassiegefärbte Proteinblot dargestellt.

### 3.3 Der Einfluss von *P. indica* auf die MAMP-triggered immunity in Signalwegmutanten

Aufgrund der generellen Suppression Abwehr- und Stress-bezogener Gene und Inaktivierung der Stress-induzierten MAPKs in mit *P. indica* besiedelten Wurzeln, sollte nun untersucht werden, inwieweit die MAMP-triggered immunity (MTI) in Wurzeln die Besiedlung durch den Endophyten beeinflusst oder auch steuert. Dazu wurde überprüft, ob eine bereits aktivierte Wurzel-MTI zu einer Veränderung im Besiedlungsphänotyp führt.

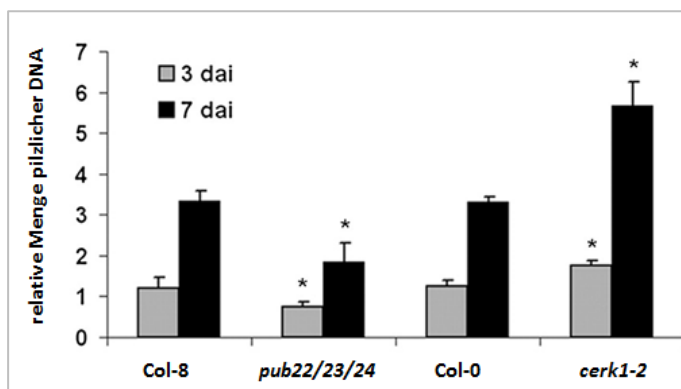
21 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit *flg22* vorbehandelt und 24 Stunden später mit *P. indica* inokuliert. 3 und 7 Tage nach Inokulation mit *P. indica* wurden je Behandlung (*P. indica* ohne *flg22*; *P. indica* mit *flg22*) und Zeitpunkt (3; 7 dai) die gesamte DNA aus den Wurzelproben isoliert und anhand quantitativer „real-time“ PCR (qPCR) die pilzliche *P. indica* ITS-Sequenz sowie das pflanzliche *Ubiquitin* Gen amplifiziert. Auf diese Weise konnte die relative Pilzmasse innerhalb der Pflanze bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass eine vorangegangene *flg22*-Elizitierung zu einer verringerten Besiedlung führte. Zu beiden Zeitpunkten verblieb die Besiedlungsstärke in vorbehandelten Wurzeln signifikant unter den Werten der Kontrollpflanzen (vgl. Abb. 3.3-1). Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass eine bereits ausgelöste Wurzelabwehr eine Kolonisierung durch den Wurzelendophyten beeinträchtigt.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, wurden weitere Besiedlungsstudien mit verschiedenen *Arabidopsis*-Mutanten durchgeführt. Die *cerk1-2* (*chitin elicitor receptor kinase 1-2*) Mutante ist in der Erkennung des pilzlichen MAMPs Chitin und damit in der Chitin-induzierten Abwehr kompromittiert und verhält sich folglich gegenüber pilzlichen Pathogenen deutlich suszeptibler (Miya et al., 2007). Zudem wurde die Dreifachmutante *pub22/23/24* (PUBs; *U-box-tyr E3 Ubiquitin Ligase*) verwendet, die nach MAMP-Elizitierung eine konstitutive Abwehr zeigt, da PUB22, PUB23 und PUB24 als negative Regulatoren des MTI-Signalwegs dienen (Trujillo et al., 2008). In diesem Versuchsansatz wurden *cerk1-2*, *pub22/23/24* und deren respektive Wildtypen auf einen veränderten Besiedlungsphänotyp 3 und 7 dai mittels qPCR überprüft. *cerk1-2* zeigte im Vergleich zu ihrem Wildtyp Col-0 eine signifikante stärkere Besiedlung zu 3 und 7 dai. *pub22/23/24*, welche eine Hyperaktivierung der MTI nach Elizitierung aufweist, wurde im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp Col-0 signifikant schlechter besiedelt, sowohl nach 3 als auch nach 7 Tagen (vgl. Abb. 3.3-2).



**Abb. 3.3-1: Die MAMP-triggered immunity beeinträchtigt die Wurzelbesiedlung durch *P. indica*.**

21 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps Col-0 wurden mit flg22 behandelt oder Kontroll-behandelt und einen Tag später mit *P. indica* inokuliert. Nach 3 und 7 Tagen wurden die Wurzeln geerntet. Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis von pilzlicher zu pflanzlicher DNA in den entsprechenden Wurzelproben mittel qRT-PCR bestimmt. Abgebildet sind die relativen Expressionswerte, bestimmt durch die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Verwendet wurden Primer spezifisch für die ITS Sequenz von *P. indica* und *AtUbiquitin5*. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente mit Standardfehler.  $P < 0,01$  (\*\*) und  $0,001$  (\*\*\*)).



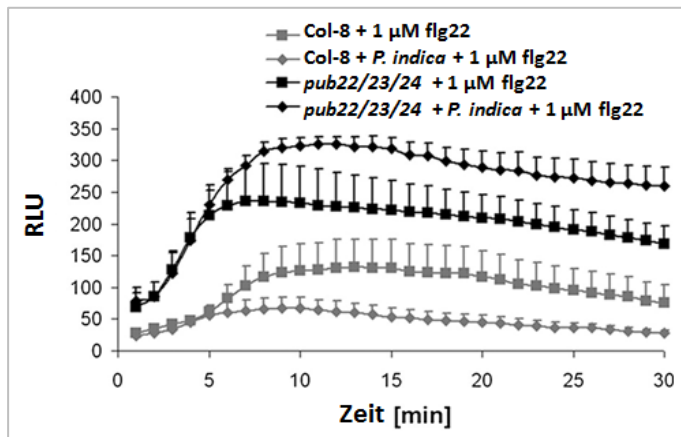
**Abb. 3.3-2: Besiedlungsphänotypen in Mutanten mit veränderter Signalgebung in der MTI.**

Die 21 Tage alten *Arabidopsis*-Mutanten *pub22/23/24* und *cerk1-2* und entsprechende Wildtypen (Col-8 und Col-0) wurden mit *P. indica* inokuliert und nach 3 und 7 Tagen geerntet. Zur Quantifizierung der Besiedlungsstärke wurde das Verhältnis von pilzlicher zu pflanzlicher DNA in den entsprechenden Wurzelproben mittels qRT-PCR bestimmt. Verwendet wurden Primer spezifisch für die ITS Sequenz von *P. indica* und *AtUbiquitin5*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Experimenten mit Standardfehler.  $P < 0,05$  (\*).

Basierend auf den Quantifizierungsversuchen von *pub22/23/24* sollte weiterhin überprüft werden, ob *P. indica* MAMP-Antworten in *pub22/23/24* supprimieren kann. Dabei sollten pflanzliche Abwehrreaktionen wie der *oxidative burst* und die Induktion von Stress- und Abwehrgenen auf transkriptioneller Ebene untersucht werden. Hierzu wurden unbesiedelte und mit *P. indica* besiedelte Wurzelsegmente von *pub22/23/24* mit flg22 elizitiert und vergleichend mit dem entsprechenden Wildtyp Col-8 evaluiert.

In Abbildung 3.3-3 ist die Wurzelreaktion von Col-8-WT nach Elizitierung mit  $1 \mu\text{M}$  flg22 dargestellt. Während unbesiedelte flg22-elizitierte Wurzeln einen schnellen ROS-Anstieg

erzielten, war in *P. indica*-kolonisierten Wurzeln dagegen eine flg22-Elizitierung fast vollständig unterdrückt (vgl. Abb. 3.3-3). Hingegen führte eine flg22-Elizitierung zu einem generell stärkeren ROS-Anstieg in der Mutante. Der gemessene ROS-Anstieg nach flg22-Gabe war in *P. indica*-besiedelten Wurzeln am höchsten. Die Ergebnisse zeigen somit, dass der flg22-induzierte *oxidative burst* in *pub22/23/24* durch *P. indica* nicht unterdrückt werden kann, sondern verstärkt wird.



**Abb. 3.3-3: Quantifizierung des flg22-induzierten *oxidative burst* in *pub22/23/24*.**

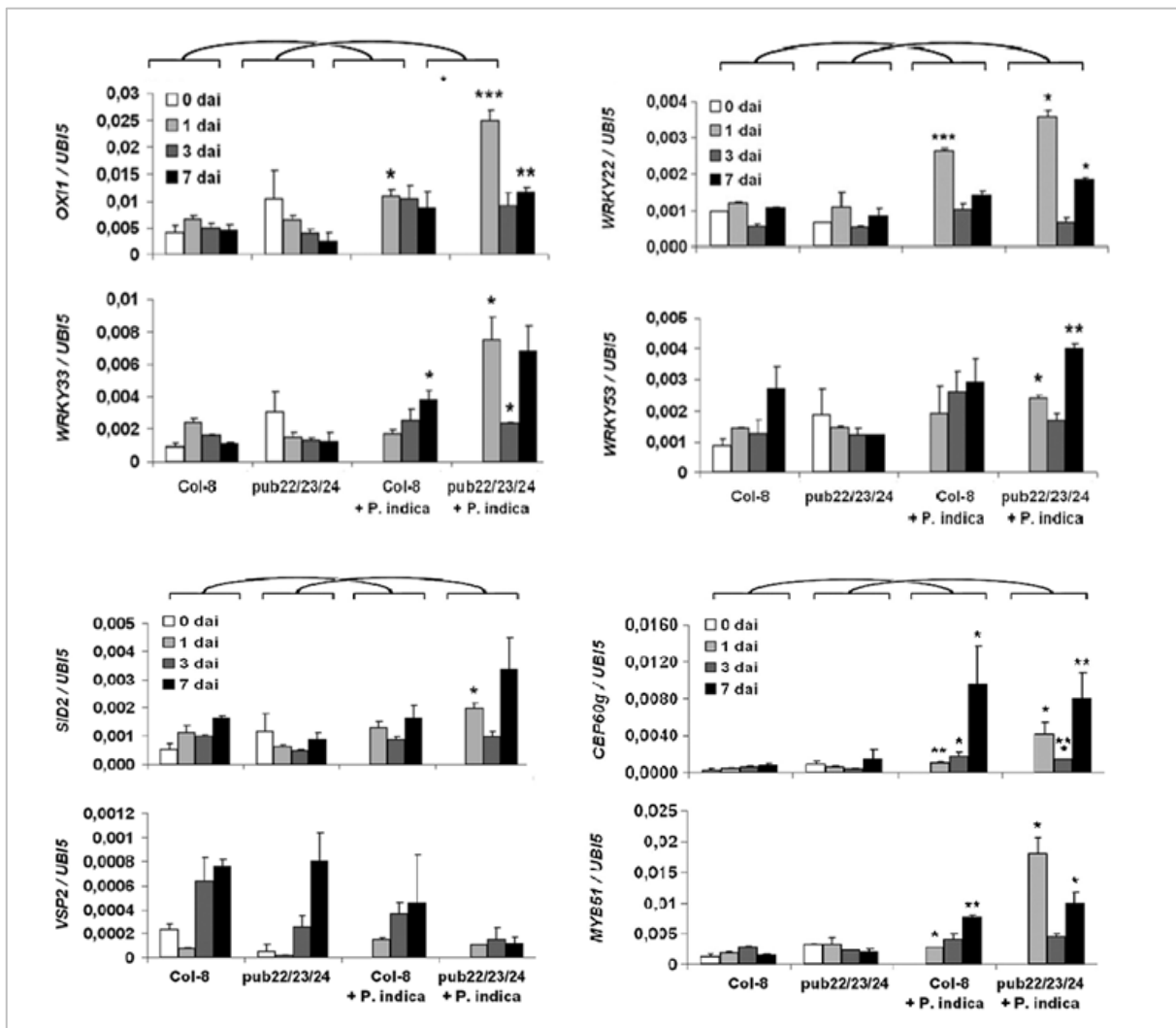
Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in mit *P. indica* besiedelten und unbesiedelten Wurzelsegmenten der Mutante *pub22/23/24* sowie Col-8 (WT) nach Zugabe von 1 µM flg22. Die Messwerte wurden über 30 Minuten aufgezeichnet und die Ergebnisse sind als relative Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) angegeben. Aus vier Einzelmessungen wurden Mittelwerte berechnet und Standardabweichung bestimmt. Ergebnisse wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten bestätigt.

### 3.4 Analyse der Expressionsmuster flg22-induzierter Gene in *pub22/23/24* in der Interaktion mit *P. indica*

Es wurde die Regulation von Genen, die mit Stress oder Abwehr assoziiert sind, während der Interaktion mit *P. indica* vergleichend in *pub22/23/24* und Col-8 untersucht. Dabei wurde die Expression von Markergenen (vgl. Kap. 3.2.4) in mit *P. indica* kolonisierten bzw. Kontrollbehandelten Wurzeln verglichen. In unbesiedelten Wurzeln zeigte keines der untersuchten Gene einen deutlichen Expressionsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp. Im Falle der Gene *WRKY33*, *WRKY22* und *WRKY53* war in der besiedelten Kontrollvariante (Col-8 + *P. indica*) ein moderater Anstieg zu erkennen. Des Weiteren waren *CBP60g* und *MYP51* von allen getesteten Genen in *P. indica*-besiedelten Col-8 Wurzeln am stärksten induziert. In besiedelten *pub22/23/24*-Wurzeln war dagegen in allen getesteten Genen eine Induktion (1 dai; 7 dai) zu erkennen. Auffällig war, dass in besiedelten *pub22/23/24*-Wurzeln die erhöhte Expression von SA-Markergenen (*SID2*; *CBP60g*) mit einer parallel schwächeren Induktion des JA-Markergens *VSP2* einherging (vgl. Abb. 3.4-1). Zusammenfassend lässt sich



feststellen, dass *P. indica* die getesteten Stress- und Abwehrgene in *pub22/23/24* nicht unterdrückt und dies mit einer verminderten Besiedlung korreliert.



**Abb. 3.4-1: Erhöhte Abwehrgenregulation in *P. indica*-besiedelten *pub22/23/24*-Wurzeln.**

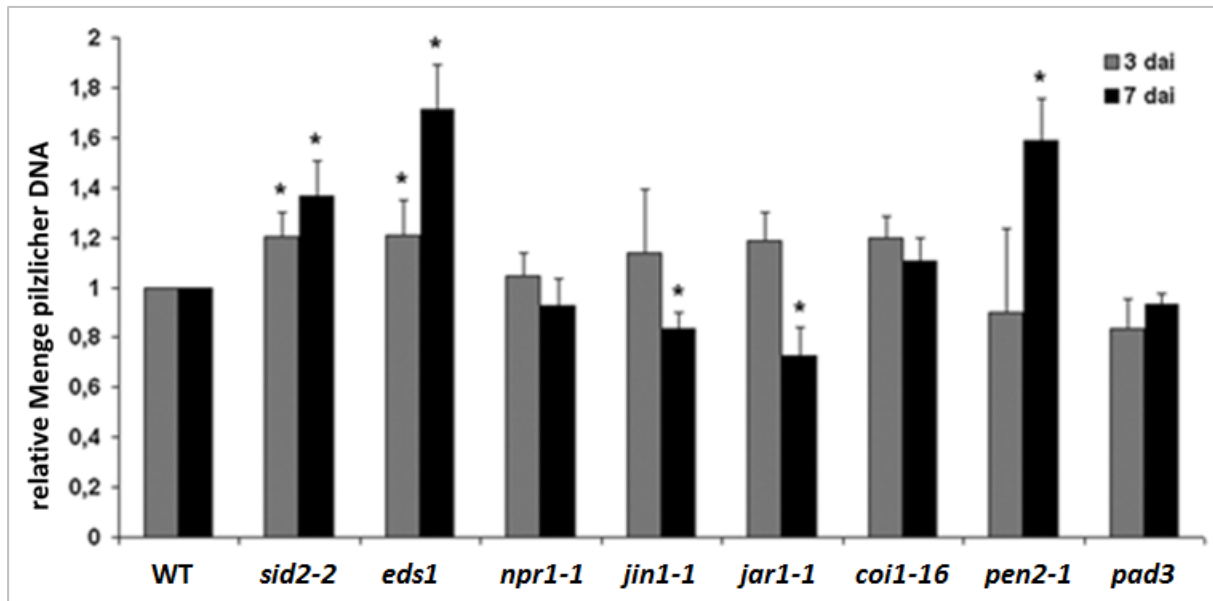
21 Tage alte Pflanzen der *Arabidopsis*-Mutante *pub22/23/24* und ihr Wildtyp Col-8 wurden mit *P. indica* inokuliert bzw. Kontroll-behandelt. Die Wurzeln wurden nach 0, 1, 3 und 7 Tagen geerntet. Mittels quantitativer Real-Time PCR wurde die Expression von *OX11*, *WRKYs*, *SID2*, *CBP60g*, *MYP51* sowie *VSP2* bestimmt. Abgebildet sind die relativen Expressionswerte, bestimmt durch die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Zur Normalisierung wurde das Referenzgen *AtUbiquitin 5 (UBQ 5)* verwendet. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers eines Experiments. Die Ergebnisse wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt. Für die Bestimmung signifikanter Unterschiede wurden die relativen Expressionswerte zu individuellen Zeitpunkten zwischen Col-8/ Kontrolle und Col-8/*P. indica* oder *pub22/23/24* /Kontrolle mit *pub22/23/24* /*P. indica* verrechnet.  $P < 0,05$  (\*),  $0,01$  (\*\*),  $0,001$  (\*\*\*)

### 3.5 Der Einfluss von Phytohormonen auf die Wurzelbesiedlung durch *P. indica*

Basierend auf den Genexpressionsanalysen von Jasmonat (JA)-, Salizylat (SA)- und Glukosinolat-Markergenen im Abschnitt 3.2.4 wurde der Einfluss von JA, SA und Glukosinolate für die Etablierung der symbiotischen Wurzelinteraktion untersucht. In den nachfolgenden Experimenten sollte geklärt werden, welche Signalwegkomponenten eine erfolgreiche Besiedlung durch *P. indica* regulieren. Dies sollte anhand des Besiedlungsphänotyps der ausgesuchten Hormon- und Signalwegmutanten, vergleichend zum Wildtyp mittels qPCR ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dafür SA-Signalwegmutanten wie *npr1-1* (*nonexpressor of pathogenesis-related genes 1*), *eds1* (*enhanced disease susceptibility 1*) und die SA-Biosynthesemutanten *sid2-2* (*salicylic acid inducible defective 2-2*) verwendet. Des Weiteren wurden JA-Signalwegmutanten wie *jin1-1* (*jasmonate insensitive 1-1*) und *coil-16* (*coronatine insensitive 1-16*) sowie die JA-Biosynthesemutante *jar1-1* (*jasmonate resistant 1-1*) hinzugezogen. Die Ergebnisse aus dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.5-1 zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass alle SA-Mutanten (ausgenommen *npr1-1*) eine im Vergleich zum Wildtyp stärkere Besiedlung zeigten (3 und 7 dai). Im klaren Gegensatz zu den SA-Mutanten zeigten die JA-Signalweg- und Biosynthesemutanten *jin1-1* und *jar1-1* eine verringerte Besiedlung im Vergleich zum Wildtyp (7 dai). Im Falle der JA-Mutante *coil-16* zeigte die Besiedlung relativ zum Wildtyp keine Veränderung. Da diese Mutante zusätzlich in *PEN2* mutiert ist, könnte diese zweite Mutation die Besiedlung beeinträchtigen. Daher wurde *pen2* in den Screen miteinbezogen. *PEN2* ist eine Glykosyl-Hydrolase, welche die Bildung von Glukosinolaten an der Infektionsstelle und damit die Verhinderung der Penetration von Pathogenen in das Pflanzengewebe mitsteuert (Lipka et al., 2005). In *pen2* Mutanten zeigte sich eine deutlich stärkere Besiedlung zu 7 dai, was die Annahme unterstützt, dass die *pen2*-Mutation die Besiedlung in *coil-16* beeinflussen könnte. Eine mögliche Beteiligung von Camalexin an der Besiedlung durch *P. indica* wurde mit der Camalexin-defizienten Mutante *pad3* (*phytoalexin deficient 3*) in diesem Versuch ebenso in Betracht gezogen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten *pad3*-Pflanzen keinen Unterschied in der Besiedlungsstärke zu 3 und 7 dai.

Insgesamt betrachtet konnte mit diesen Versuchen eine Parallele zwischen der in Blättern bekannten und durch JA, SA und Glukosinolat organisierten Immunantwort und der in Wurzeln ausgelösten Immunantwort belegt werden. Dabei zeigte sich, dass Mutanten mit einer verminderten SA- und Glukosinolat-assoziierten Abwehr stärker durch *P. indica* besiedelt werden als Mutanten mit verminderter JA-assoziiierter Abwehr. Die Besiedlungsstudien verdeutlichen damit, dass eine SA- und Glukosinolat-basierte Abwehr

eine Rolle bei der Limitierung von *P. indica* durch die Pflanze spielen, JA hingegen die Besiedlung von Wurzeln durch *P. indica* unterstützt.



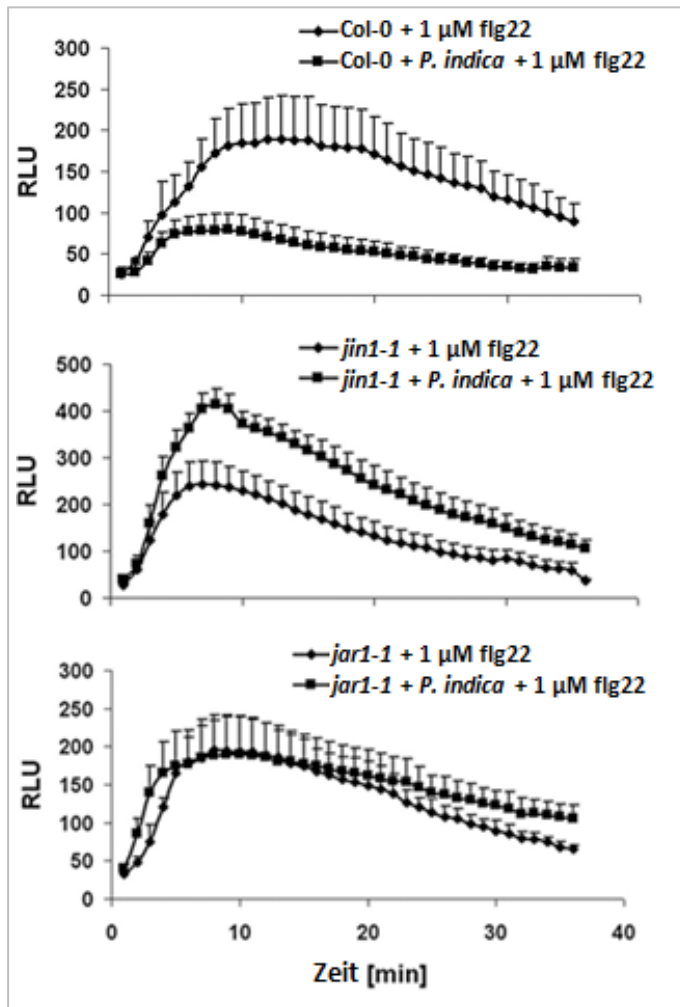
**Abb. 3.5-1: Besiedlungsphänotyp diverser *Arabidopsis*-Mutanten mit veränderter Signalgebung in der MTI.** 21 Tage alte *Arabidopsis*-Mutanten mit respektivem Wildtyp wurden mit *P. indica* inokuliert und nach 3 und 7 Tagen geerntet. Zur Quantifizierung der Besiedlungsstärke wurde das Verhältnis von pilzlicher zu pflanzlicher DNA in den entsprechenden Wurzelproben mittels qRT-PCR bestimmt. Verwendet wurden Primer spezifisch für die *ITS*-Sequenz von *P. indica* und *AtUbiquitin 5 (UBQ 5)*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Experimenten mit Standardfehler.  $P < 0,05$  (\*).

### 3.5.1 Die Rolle von Jasmonsäure-assoziiertes Abwehr während der Besiedlung durch *P. indica*

Basierend auf den oben aufgeführten Ergebnissen der JA-Signalweg- und Biosynthesemutanten, welche eine verminderte Besiedlung zeigten, stellte sich die Frage, ob *P. indica* Komponenten des JA-Signalweges benötigt, um die MTI zu unterdrücken. In einem weiteren Versuchsansatz wurden pflanzliche Abwehrreaktionen wie der *oxidative burst* und die Induktion von Stress- und Abwehrgenen in JA-Mutanten untersucht. Dazu wurden unbesiedelte und mit *P. indica* besiedelte Wurzelsegmente der Signalweg- und Biosynthesemutanten *jin1-1* und *jar1-1* mit flg22 elizitiert und vergleichend zum Wildtyp Col-0 evaluiert.

In Abbildung 3.5-2 ist die Wurzelreaktion von Col-0 nach Behandlung mit 1  $\mu$ M flg22 dargestellt. Während unbesiedelte flg22-elizitierte Wurzeln einen schnellen ROS-Anstieg erzielten, ist in mit *P. indica* kolonisierten Wurzeln dagegen eine flg22-Elizitierung fast vollständig unterdrückt. In den untersuchten Mutanten *jin1-1* und *jar1-1* war dieser Effekt aufgehoben (vgl. Abb. 3.5-2). Dabei zeigte sich, dass eine Elizitierung mit flg22 in mit *P.*

*indica* besiedelten und auch in unbesiedelten Wurzeln zu einem starken ROS-Anstieg führte. In besiedelten *jin1-1* war der gemessene ROS-Anstieg nach flg22-Gabe im Vergleich zu den unbesiedelten Wurzeln am höchsten. Die Ergebnisse dokumentieren somit, dass der flg22-induzierte *oxidative burst* in *jin1-1* und *jar1-1* durch *P. indica* nicht unterdrückt wird.



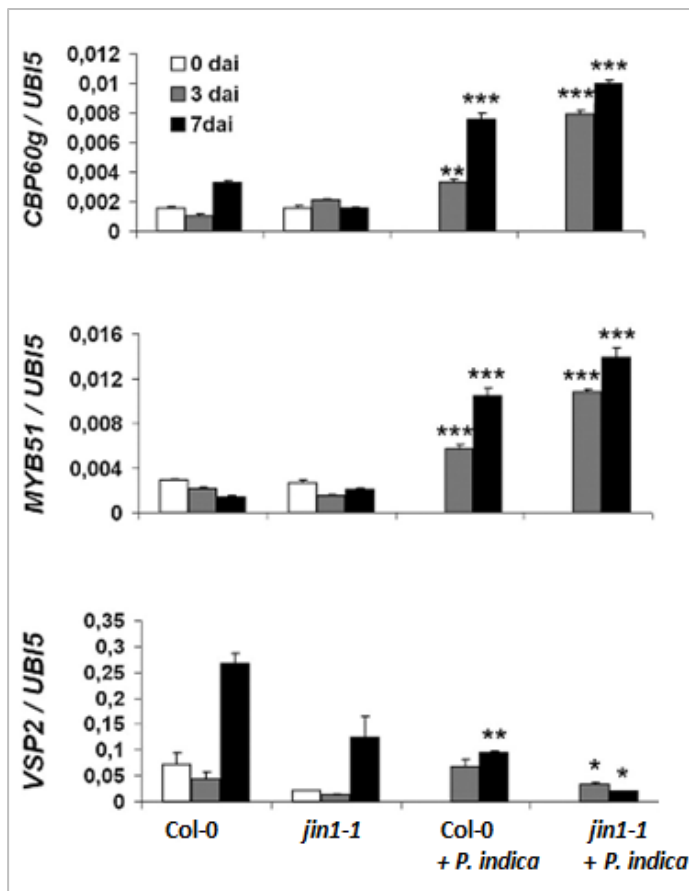
**Abb. 3.5-2: Quantifizierung des flg22-induzierten *oxidative burst* in *jin1-1* und *jar1-1*.**

Messung der  $H_2O_2$ -Produktion in mit *P. indica* besiedelten und unbesiedelten Wurzelsegmenten von *jin1-1*, *jar1-1* und Col-0 (WT) nach Zugabe von  $1 \mu M$  flg22. Die Messwerte wurden über 37 Minuten aufgezeichnet und die Ergebnisse sind als relative Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) angegeben. Aus vier Einzelmessungen wurden Mittelwerte berechnet und eine Standardabweichung bestimmt. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen biologischen Experimenten bestätigt.

### 3.5.2 Expression von Salizylsäure- und Jasmonsäure-responsiven Genen in der mit *P. indica* besiedelten JA-Mutante *jin1-1*

Zur weiteren Analyse der beobachteten verminderten Besiedlung der *jin1-1* Mutante durch *P. indica* wurde die Expression von Stress- und Abwehrgenen während der Interaktion mit dem Pilz bestimmt. Um ein genaueres Bild der Expression ausgewählter Gene zu erhalten, wurden

Kinetiken mit den Zeitpunkten 0, 1, 3 und 7 Tage nach *P. indica*-Inokulation erstellt und mittels qPCR die relative Expression untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression des SA-Markergens *CBP60g* in mit *P. indica* besiedelten *jin1-1* Wurzeln deutlich erhöht war (vgl. Abb. 3.5-3). Auch *MYP51* war in besiedelten *jin1-1*-Wurzeln stärker exprimiert (3 dai und 7 dai). Auffällig war, dass in besiedelten *jin1-1*-Wurzeln eine erhöhte Expression von *CBP60g* mit einer parallel verlaufenden Repression des JA-Markergens *VSP2* korrelierte (insbesondere 3 dai), welches bekannt ist, durch SA negativ reguliert zu werden.



**Abb. 3.5-3: Expression von SA- und JA-responsiven Genen in *P. indica* besiedelten Wurzeln der *jin1-1* Mutante.**

21 Tage alte Pflanzen der *Arabidopsis*-Mutante *jin1-1* und des Wildtyps Col-0 wurden mit *P. indica* inokuliert oder Kontroll-behandelt. Die Wurzeln wurden nach 0, 3 und 7 Tagen geerntet. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der Gene *CBP60g*, *MYP51* sowie *VSP2* ermittelt. Abgebildet sind die relativen Expressionswerte, bestimmt durch die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Zur Normalisierung wurde das Referenzgen *AtUbiquitin 5 (UBQ5)* verwendet. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers eines Experimentes. Die Experimente wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt. Für die Bestimmung signifikanter Unterschiede wurden die relativen Expressionswerte zu individuellen Zeitpunkten zwischen Col-0/ Kontrolle und Col-0/*P. indica* oder *jin1-1*/Kontrolle mit *jin1-1*/*P. indica* verrechnet.  $P < 0,05$  (\*),  $0,01$  (\*\*),  $0,001$  (\*\*\*)

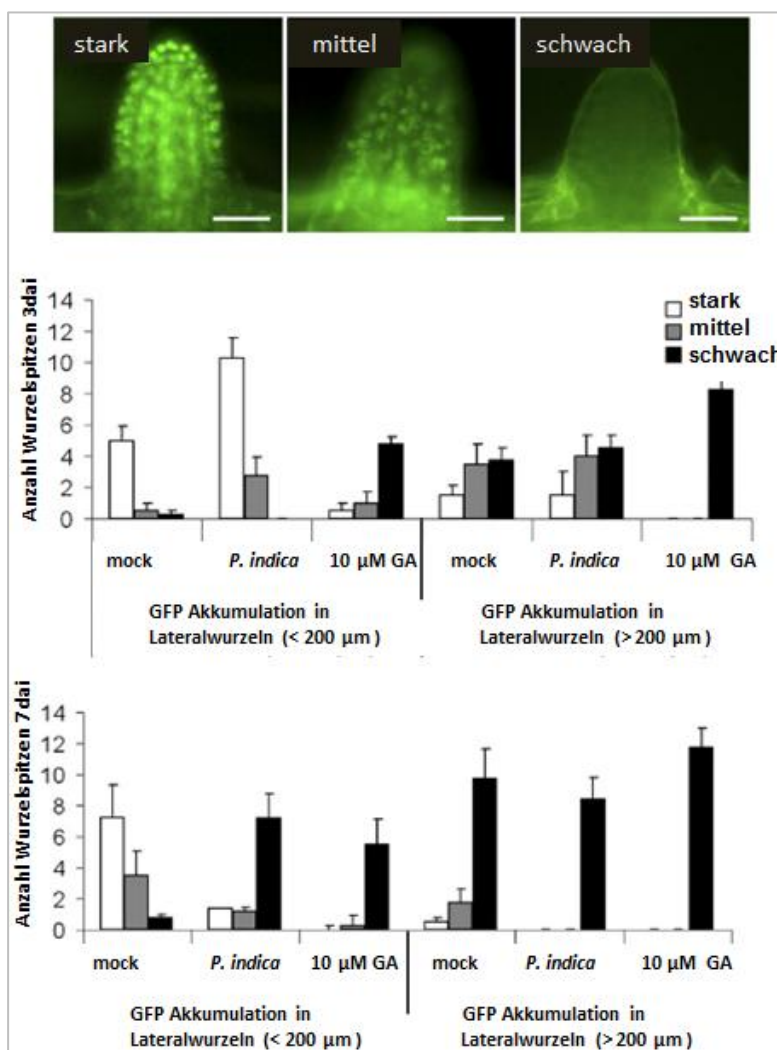
### 3.5.3 Der Einfluss von Gibberellinsäure auf die Interaktion mit *P. indica*

Eine weitere Komponente in der Abwehr stellt das Phytohormon Gibberellinsäure (GA) dar. In früheren Arbeiten konnte eine verschlechterte Wurzelbesiedlung in Gerstenlinien mit Defekten in GA-Biosynthese und GA-Signalgebung festgestellt werden. Diese beruhte zumindest teilweise auf einer verstärkten Expression von SA-abhängigen Abwehrgenen und parallel verlaufender Supprimierung JA-abhängiger Abwehrgene (Schäfer et al., 2009). Durch Studien von Navarro und Kollegen (2008) ist bekannt, dass GA die Balance zwischen verschiedenen Phytohormonen beeinflussen kann. Dabei spielen die DELLA-Proteine als Schlüsselregulatoren im GA-Signalweg eine entscheidende Rolle. In Abwesenheit von GA verüben DELLA-Proteine einen direkten Einfluss auf den JA-Signalweg durch kompetitive Bindung an den Transkriptionsfaktor JAZ1 (*Jasmonate ZIM-domain 1*). Dieser ist als Negativregulator an der Repression Jasmonat-responsiver Gene beteiligt. Als ein Resultat dieses Komplexes zwischen den DELLA und JAZ1-Proteinen wird ein positiver Einfluss auf den JA-Signalweg ausgeübt (Hou et al., 2011). Die Anwesenheit von GA resultiert demnach im Abbau von DELLA-Proteinen und es kommt zu einer Förderung der SA-Signaltransduktion und einer Hemmung der JA/ET-Signalweiterleitung (Hou et al., 2011). Auf diesen Grundlagen aufbauend und in Analogie zu den bekannten Ergebnissen aus Gerste wurde im Rahmen dieser Arbeit die Fähigkeit von *P. indica* getestet, die Besiedlung und die Immunantworten in Wurzeln via GA zu beeinflussen. Dazu wurde zuerst die Fähigkeit von *P. indica* getestet, die GA-Signalgebung zu beeinflussen. Hierbei wurde die Repressoraktivität des DELLA-Proteins RGA genutzt. Durch einen exogenen Anstieg der Gibberellin-Konzentration kommt es zu einem zielgerichteten Abbau des RGA-Proteins über das Ubiquitin-Proteasom, was seine Repressor-Aktivität aufhebt (Hirano et al., 2008). Entsprechend der Reaktion der Linie RGAp:*GFP-RGA*, in der GFP an den N-Terminus des DELLA-Proteins RGA fusioniert ist (Navarro et al., 2008), wurde die Degradation von RGA nach GA-Applikation oder *P. indica*-Behandlung bzw. Kontroll-Behandlung beobachtet und vergleichend analysiert. Als Marker diente dabei die Stärke des GFP-Signals (vgl. aufgeführte mikroskopische Aufnahmen, Abb. 3.5-4). Die Stärke des GFP-Signals korrelierte hierbei mit dem Abbau des DELLA-Proteins RGA in Wurzelspitzen bzw. gebildeten Seitenwurzelspitzen.

Hierbei wurden Lateralwurzeln von weniger als 200 µm, und welche, die mehr als 200 µm in Länge hatten, berücksichtigt (vgl. Abb. 3.5-4). In zwei unabhängigen Experimenten zeigte sich hierbei, dass die Besiedlung durch *P. indica* 7 dai eine zur GA-Applikation vergleichbar

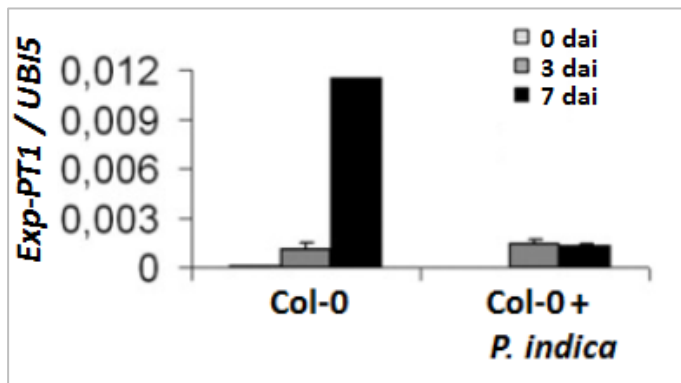
starke Degradation von RGA hervorruft (7 dai; Lateralwurzeln < 200 µm). In mit *P. indica* behandelten Wurzeln konnte 3 dai (biotrophe Besiedlungsphase) diese Intensität nicht beobachtet werden. Zusammenfassend impliziert dieses Experiment, dass *P. indica* einen Einfluss auf die GA-Signalgebung bzw. GA-Produktion in Wurzeln zu späteren Zeitpunkten (7dai; Zelltod-assoziierte Besiedlung) ausübt (vgl. Abb. 3.5-4).

Um dieses Ergebnis zu bekräftigen, wurde die Expression des GA-responsiven Gens *Exp-PT1*, welches durch GA supprimiert wird, untersucht (vgl. Abb. 3.5-5). In mit *P. indica* besiedelten Col-0 Wurzeln konnte eine deutliche Supprimierung von *Exp-PT1* 7 dai detektiert werden.



**Abb. 3.5-4: Der Einfluss von *P. indica* auf die GA-Signalgebung.**

14 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen der Linie RGAp:*GFP-RGA* wurden mit *P. indica* inokuliert, Kontroll-behandelt oder mit 10 µM GA<sub>3</sub> behandelt. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde 3 und 7 dai in Wurzelspitzen mit einer Länge kleiner als 200 µm bzw. grösser als 200 µm bestimmt und gezählt. Dabei wurde die GFP-Fluoreszenz zwischen stark über mittel bis schwach unterschieden (vgl. oben aufgeführte, mikroskopische Aufnahmen). Abgebildet ist der Mittelwert zweier unabhängiger Experimente mit Angabe des Standardfehlers. Teilstrich = 30 µm.



**Abb. 3.5-5: Expression des GA-responsiven Gens *Exp-PT1* in *P. indica* besiedelten Wurzeln.**

21 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps Col-0 wurden mit *P. indica* inokuliert oder Kontroll-behandelt. Die Wurzeln wurden nach 0, 3 und 7 Tagen geerntet. Mittels qRT-PCR wurde die Expression des Gens *Exp-PT1* bestimmt. Zur Normalisierung wurde das Referenzgen *AtUbiquitin 5 (UBQ 5)* verwendet. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers eines Experimentes. Die Experimente wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt.

### 3.5.4 *P. indica*-Besiedlung und Genexpression in GA-Mutanten

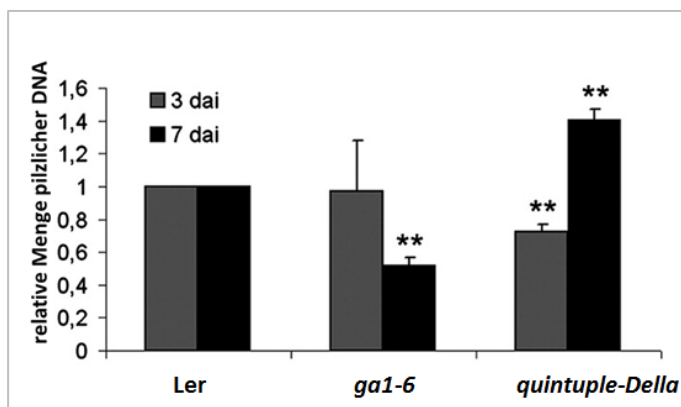
Auf Grundlage der oben beschriebenen Ergebnisse wurde die Besiedlung von *P. indica* in GA-Signal- bzw. Biosyntheseweg-Mutanten untersucht. Zur Analyse des Einflusses von GA auf die Besiedlung wurde die GA-Synthesemutante *gal-6* (*GA requiring 1-6*), welche in der Synthese von *ent*-Kaurensäure gestört ist, verwendet. Die Mutante produziert jedoch noch geringe Mengen an GA, weshalb sie einen abgeschwächten Zwergwuchs in Blatt-, Stängel- und Wurzelwachstum zeigt als andere GA-Synthesemutanten (Wilson et al., 1992).

Zudem wurde die GA-Signalwegmutante *quintuple-DELLA* miteinbezogen, in welcher alle fünf *Arabidopsis*-DELLA-Proteine fehlen, und die deshalb eine konstitutive GA-Signalgebung zeigt (Achard et al., 2008). Die Ergebnisse aus dieser Studie sind in Abbildung 3.5-6 zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass *gal-6* eine zum Wildtyp reduzierte Wurzelbesiedlung 7 dai aufweist. Im Gegensatz dazu fand sich für die *quintuple-DELLA* Mutante eine verringerte Besiedlung 3 dai, jedoch eine erhöhte Besiedlung 7 dai.

Zusätzlich wurde der Einfluss von GA in einem weiteren Versuchsansatz auf Abwehrreaktionen wie den *oxidative burst* und die *flg22*-induzierte Wachstumsinhibierung in den GA-Mutanten untersucht. *P. indica* konnte sowohl den *flg22*-induzierten *oxidative burst* als auch die *flg22*-induzierte Wachstumsinhibierung in den GA-Mutanten unterdrücken (Daten nicht gezeigt). Nachfolgend wurde die Expression von SA- und JA-responsiven Genen in den GA-Mutanten untersucht. Die Transkriptionskinetik in Abbildung 3.4-7 verdeutlicht, dass die Expression des Salizylsäure-abhängigen Markergens *CBP60g* in mit *P. indica* besiedelten *quintuple-DELLA*-Wurzeln 3 und 7 dai induziert war, während dies in *gal-6* eine

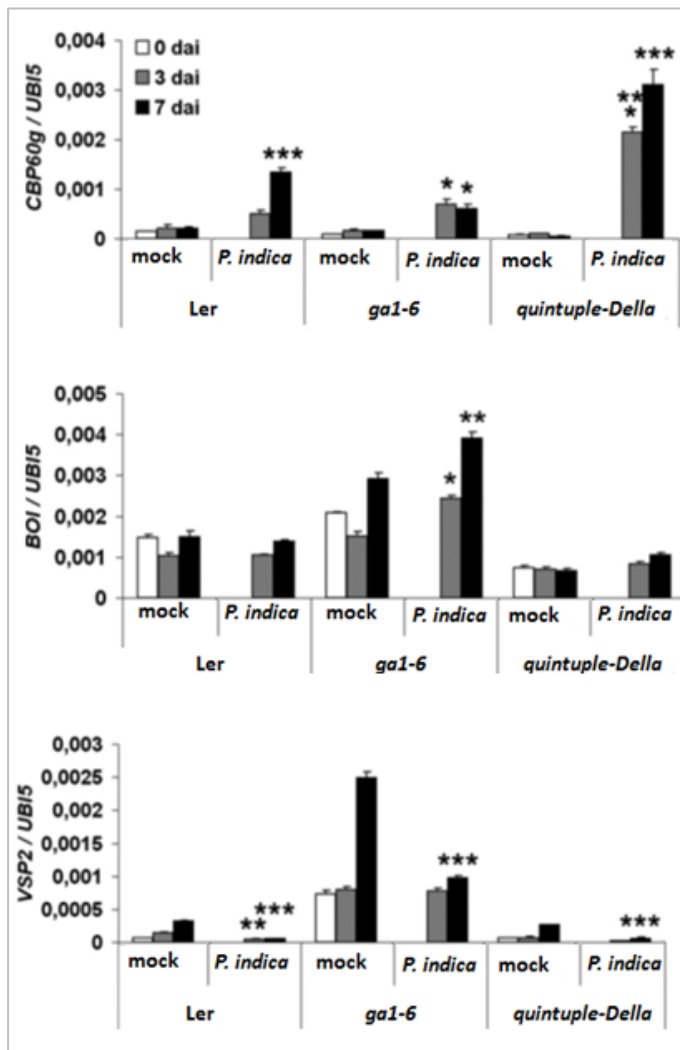


geringere Induktion 3 und 7 Tage nach Inokulation zeigte. Im Falle vom JA-Markergen *VSP2* ließ sich ein entgegengesetztes Expressionsmuster nachweisen. Hierbei war in *quintuple-DELLA* und *Ler* eine deutliche Repression (3 dai; 7 dai) zu verzeichnen, während das Gen zwar eine deutlich höhere Expressionsniveau in *gal-6* zeigte, war dies in besiedelten Wurzeln 7 dai supprimiert (vgl. Abb. 3.5-7). Da die Expressionsdaten zunächst nicht im Einklang mit den Besiedlungsdaten standen, wurde die Expression von *BOI* hinzugezogen. *BOI* (*botrytis susceptible1 interactor*) wurde als eine RING-E-3 Ligase identifiziert, welche als negativer Zelltodregulator agiert und durch GA negativ reguliert wird (Luo et al., 2010). Aus Abb. 3.4-7 wird deutlich, dass eine verstärkte *BOI*-Expression in *gal-6* verglichen zu *LER* und *quintuple-DELLA* stattfindet. Diese Expression in *gal-6* wird noch verstärkt während der Besiedlung mit *P. indica* (3 dai; 7 dai). Interessanterweise wurde die *BOI*-Expression in *quintuple-DELLA* während der Besiedlung mit *P. indica* supprimiert. Dies legt nahe, dass Zelltodregulationen in der *quintuple-DELLA*-Mutante gefördert werden und damit die erhöhte SA-Abwehr am Beispiel der *CBP60g*-Expression überschreibt, was eine verbesserte Besiedlung 7 dai erklären könnte.



**Abb. 3.5-6: Stärke der *P. indica*-Besiedlung in GA-Mutanten relativ zum Wildtyp LER.**

21 Tage alte Pflanzen der *Arabidopsis*-Mutanten *gal-6* und *quintuple-DELLA* und ihr entsprechender Wildtyp *Ler* wurden mit *P. indica* inokuliert und die Wurzeln nach 3 und 7 Tagen geerntet. Zur Quantifizierung der Besiedlungsstärke wurde das Verhältnis von pilzlicher zu pflanzlicher DNA in den entsprechenden Wurzelproben mittels qRT-PCR bestimmt. Verwendet wurden Primer spezifisch für die ist-Sequenz von *P. indica* und *AtUbiquitin 5 (UBQ 5)*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.  $P < 0,05$  (\*), Studentischer *t*-Test.



**Abb. 3.5-7: Expression von SA- und JA-responsiven Genen in *P. indica* besiedelten Wurzeln der *ga1-6* und *quintuple-DELLA*-Mutanten.**

21 Tage alte Pflanzen der *Arabidopsis*-Mutanten *ga1-6* und *quintuple-DELLA* sowie des Wildtyps Ler wurden mit *P. indica* inokuliert oder Kontroll-behandelt. Die Wurzeln wurden anschließend nach 0, 3 und 7 Tagen geerntet. Mittels qRT-PCR wurde Expression der Gene *CBP60g*, *VSP2* und *BOI* bestimmt. Abgebildet sind die relativen Expressionswerte, bestimmt durch die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Zur Normalisierung wurde das Referenzgen *AtUbiquitin 5 (UBQ 5)* verwendet. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers eines Experimentes. Die Ergebnisse wurden in drei weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt. Für die Bestimmung signifikanter Unterschiede wurden die relativen Expressionswerte zu individuellen Zeitpunkten zwischen Col-0/ Kontrolle und Col-0/*P. indica* oder *ga1-6*/Kontrolle mit *ga1-6*/*P. indica* oder *quintuple-DELLA*/Kontrolle sowie *quintuple-DELLA*/*P. indica* verrechnet.  $P < 0.05$  (\*), 0.01 (\*\*), und 0.001 (\*\*\*)

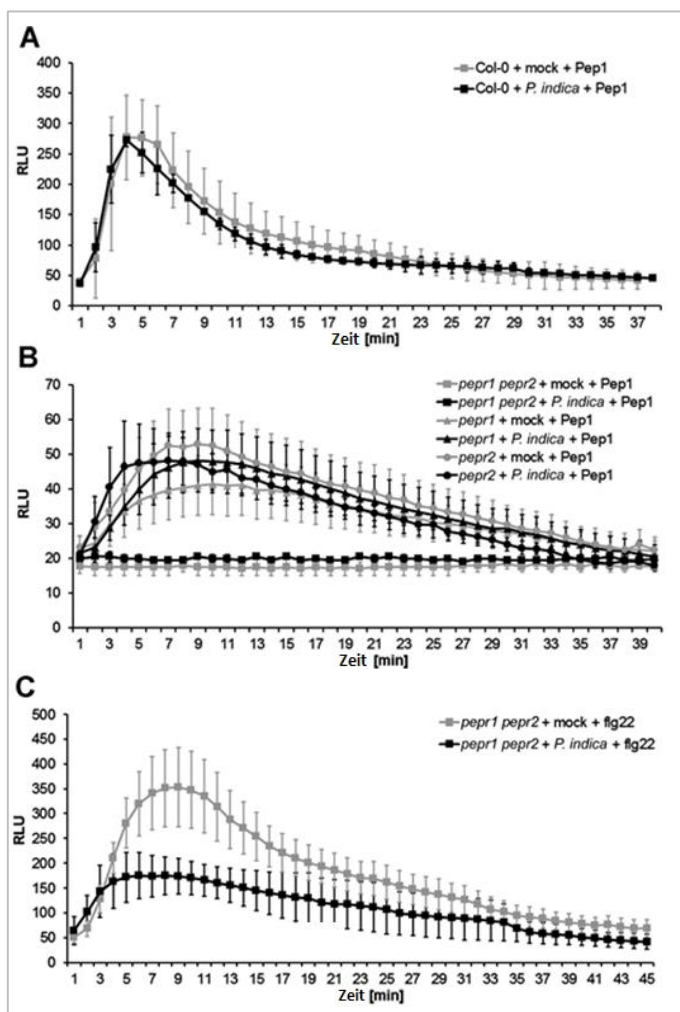
### 3.6 Die Rolle der Pep1-assoziiertes Abwehr während der Besiedlung durch *P. indica*

Neben den von Mikroben kommenden MAMPs kann die Abwehr auch von pflanzeneigenen Molekülen ausgelöst werden. Dies geschieht über die Entstehung wirtseigener Moleküle, der sogenannten Schaden assoziierten molekularen Strukturen (*damage associated molecular patterns*, DAMPs; Boller & Felix, 2009), welche dann von entsprechenden Plasmamembran-lokalisierten Rezeptoren registriert werden und dabei pflanzliche Abwehrreaktionen auslösen, die dem der MAMP-induzierten Abwehr gleicht (vgl. Kap. 1.1.2.2). So wird z. B. nach Verwundung, Methyljasmonat, SA aber auch flg22-Behandlung in *Arabidopsis* das Gen *PROPEP1* induziert (Huffaker et al., 2006). Das eigentliche DAMP besteht aus dem C-terminalen Teil des korrespondierenden Proteins von *PROPEP1* und wird nach der Synthese in den Apoplast sekretiert und als *AtPep1* bezeichnet. Die Untersuchung von *AtPep1*, sollte in einem weiteren Projekt dieser Arbeit Aufschluss über Abwehrantworten der Wurzel auf DAMPs, und die Fähigkeit von *P. indica*, diese zu unterdrücken, liefern. Die erhaltenen Ergebnisse sollten anschließend mit dem MAMP-System verglichen werden. Die Untersuchungen umfassten dabei Besiedlungsstudien und Bestimmung des *oxidative burst*, die Regulation der Expression von Abwehrgenen im Wildtyp, den Nachweis von phosphorylierten MAPKs in Wurzeln nach *AtPep1*-Elizitierung sowie die Wachstumsinhibierung von Keimlingen durch *AtPep1*-Behandlung. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur Charakterisierung der durch *AtPep1* induzierten Reaktionen und deren Beeinflussung durch *P. indica* dargelegt.

#### 3.6.1 Analyse des Pep1-induzierten *oxidative burst* in *P. indica* besiedelten Wurzeln

Es wurde der Frage nachgegangen, ob eine Besiedlung durch *P. indica* einen Pep1-induzierten *oxidative burst* beeinflusst und welche Auslöser hierbei eine Rolle spielen könnte. Dazu wurden unbesiedelte und mit *P. indica* besiedelte Wurzelsegmente des Wildtyps Col-0 mit Pep1 elizitiert und anschließend evaluiert. Dabei zeigte sich, dass eine Elizitierung mit Pep1 in mit *P. indica* besiedelten und in unbesiedelten Wurzeln zu einem starken ROS-Anstieg führte. Die Ergebnisse machen deutlich, dass der Pep1-induzierte *oxidative burst* in Col-0 Wurzeln durch *P. indica* nicht unterdrückt wurde (vgl. Abb. 3.6-1 A). Der Pep1-induzierte *oxidative burst* wurde auch in den Rezeptor-Mutanten *pepr1* und *pepr2* sowie in der Doppelmutante *pepr1/pepr2* (*Pep receptor 1/2*) untersucht. Dabei zeigte sich trotz geringerer Amplituden, dass die Einfachmutanten noch sensitiv auf eine Behandlung mit Pep1 reagierten, unabhängig ob die Wurzeln von *P. indica* besiedelt waren oder nicht (Abb. 3.6-1 B).

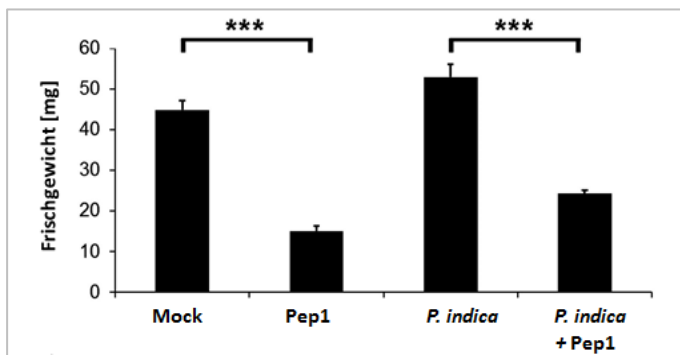
In der Doppelmutante *pepr1/pepr2* konnte nach Pep1-Elizitierung kein Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, weder in unbesiedelten noch in besiedelten Wurzeln, detektiert werden (vgl. Abb. 3.6-1 B). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit Studien aus Blättern (Krol et al., 2010). Anschließend und als interne Kontrolle wurde der *oxidative burst* in der Doppelmutante nach flg22-Elizitierung überprüft. Dabei konnte eine starke H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in der unbesiedelten Kontrollvariante nach flg22-Behandlung beobachtet werden, während in mit *P. indica* besiedelten Wurzeln dieser Effekt fast vollständig unterdrückt war (vgl. Abb. 3.6-1 C). Daraus wird deutlich, dass *P. indica* die Pep1-induzierten Abwehrreaktionen, gemessen am Beispiel des *oxidative burst*, nicht unterdrücken bzw. umgehen kann.



**Abb. 3.6-1: Quantifizierung des Pep1-induzierten *oxidative burst* in *Arabidopsis*-Wurzeln.**

Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in mit *P. indica* besiedelten und unbesiedelten Wurzelsegmenten von Col-0 (A), *pepr1*, *pepr2* und *pepr1 pepr2* Mutanten (B) nach Zugabe von 1  $\mu$ M Pep1 sowie in der *pepr1 pepr2*-Mutante nach Zugabe von 1  $\mu$ M flg22 (C). Die Messungen wurden über einen Zeitraum 38-45 Minuten durchgeführt und die Ergebnisse sind in relativen Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) angegeben. Aus vier Einzelmessungen wurden Mittelwerte berechnet und die Standardabweichung bestimmt. Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Folgeexperimenten bestätigt.

In einem Folgeexperiment wurde der Einfluss von *P. indica* auf die Keimlingsentwicklung in Gegenwart von Pep1 getestet. Die Auswertungen dieser Daten zeigte, dass eine Pep1-Behandlung zu einer Wachstumsinhibierung der Keimlinge führt, was sich in einem verringerten Frischgewicht widerspiegelte und somit bereits veröffentlichte Ergebnisse bestätigt (Krol et al., 2010). Eine Pep1-Zugabe zu mit *P. indica* besiedelten Wurzeln führte ebenso dazu, dass die Gesamtpflanzen sensitiv auf die Behandlung reagierten. Das Keimlingswachstum entsprach etwa dem der unbesiedelten Pep1-behandelten Kontrolle (vgl. Abb. 3.6-2). Die dargestellten Resultate zeigen, dass *P. indica* die Pep1-induzierte Hemmung des Keimlingswachstums nicht aufheben kann.

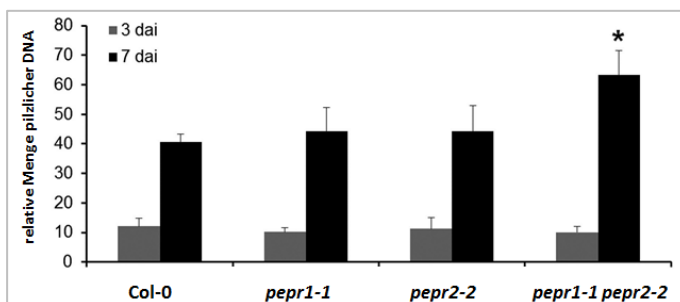


**Abb. 3.6-2: Hemmung des Keimlingswachstums in Col-0 in der Gegenwart von Pep1.**

14-Tage alte *Arabidopsis*-Keimlinge des Wildtyps Col-0 wurden mit *P. indica* inokuliert oder Kontrollbehandelt. 10 Tage nach Pep1- oder Kontrollbehandlung wurde das Frischgewicht der Pflanzen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.  $P < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.6.2 Quantifizierung der Besiedlung durch *P. indica* in *pepr*-Mutanten

Auf diesem Ergebnis aufbauend wurden Besiedlungsstudien von *pepr*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mittels qPCR durchgeführt. Die Einzelmutanten *pepr1* und *pepr2* zeigten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 keinen Unterschied in der Besiedlungsstärke (vgl. Abb. 3.6-3). Die bestehende redundante Funktion zwischen *pepr1* und *pepr2* wurde in der Doppelmutante *pepr1/pepr2* aufgezeigt und aufgehoben, was sich in einer verstärkten Besiedlung (7dai) durch *P. indica* widerspiegelte. Dies belegt somit, dass Pep1-induzierte DTI (DAMP-triggered immunity) die Wurzelbesiedlung durch *P. indica* reguliert.



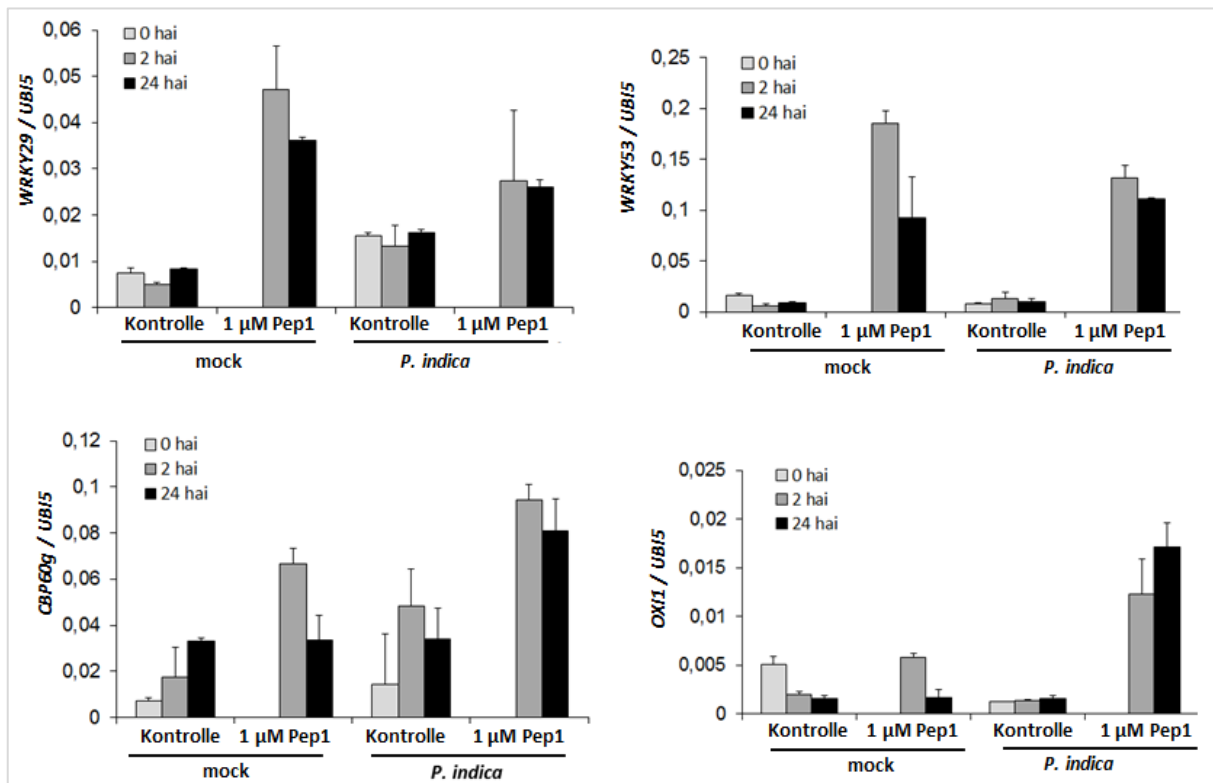
**Abb. 3.6-3: Besiedlung der *pepr*-Mutanten durch *P. indica*.**

21 Tage alte Pflanzen der *pepr*-Mutanten *pepr1*, *pepr2* und *pepr1/pepr2* und des entsprechenden Wildtyps Col-0 wurden mit *P. indica* inokuliert und nach 3 und 7 Tagen geerntet. Zur Quantifizierung der Besiedlungsstärke wurde das Verhältnis von pilzlicher zu pflanzlicher DNA in den entsprechenden Wurzelproben mittels qRT-PCR bestimmt. Verwendet wurden Primer spezifisch für die *ITS*-Sequenz von *P. indica* und *AtUbiquitin 5 (UBQ 5)*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.  $P < 0,05$  (\*).

### 3.6.3 Expression von Abwehrgenen in *P. indica* besiedelten Wurzeln nach Pep1-Elizitierung

Nachfolgend sollte analysiert werden, ob sich die Abwehrprozesse in mit *P. indica* besiedelten Wurzeln nach Pep1-Elizitierung von den Reaktionen auf das klassische MAMP flg22 unterscheiden (vgl. Abb. 3.6-4). Hierzu wurde die Expression von Markergenen (vgl. Kap. 3.2.4) vergleichend evaluiert. Die vier verschiedenen Wurzelbehandlungen (Kontrolle, Pep1, *P. indica* und *P. indica* + Pep1) wurden nach 0 h, 2 h und 24 h geerntet. Mittels qPCR wurden Expressionskinetiken von *OXII*, *WRKYs*, *SID2* und *CBP60g* erstellt.

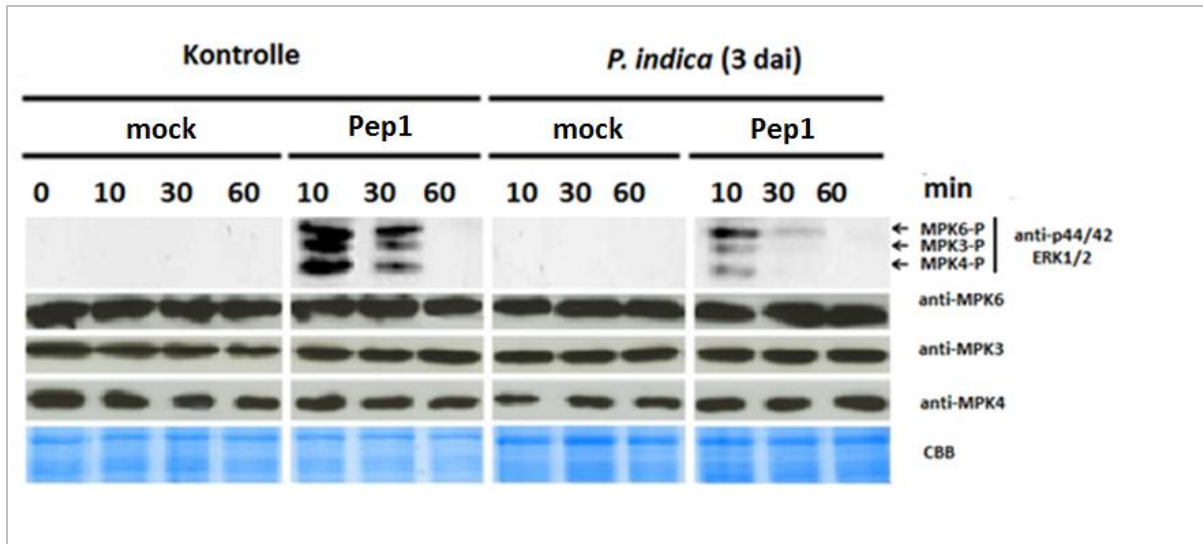
Wie Abbildung 3.5-4 verdeutlicht, erfolgte nach Pep1-Behandlung eine rasche Induktion aller getesteten Gene - unabhängig von einer Besiedlung durch *P. indica*. Im Fall von *OXII* und *CBP60g* konnte nach Pep1-Behandlung sogar eine stärkere Induktion in den von *P. indica* besiedelten Wurzeln detektiert werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit flg22 aus Kapitel 4 zeigen diese Untersuchungen, dass *P. indica* die Pep1-induzierte Expression der hier untersuchten Gene nicht supprimiert.



**Abb. 3.6-4: Expression der Pep1-induzierten Gene in *P. indica*-besiedelten und Pep1-behandelten Wurzeln.** 21 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps Col-0 wurden mit *P. indica* inokuliert bzw. Kontroll-behandelt und drei Tage später mit 1 µM Pep1 inokuliert oder Wasser (Kontrolle) behandelt. Die Wurzeln wurden nach 0 h, 2 h und 24 h der Kontrolle/Pep1-Behandlungen geerntet. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der Gene *OX11*, *WRKYs* und *CBP60g* bestimmt. Abgebildet sind die relativen Expressionswerte, bestimmt durch die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Zur Normalisierung wurde das Referenzgen *AtUbiquitin 5 (UBQ 5)* verwendet. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers eines Experimentes. Die Ergebnisse wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt.

### 3.6.4 Phosphorylierung von MAPKs nach Pep1-Elizitierung in *P. indica* besiedelten Wurzeln

Da in mit *P. indica* inokulierten *Arabidopsis*-Pflanzen nach Pep1-Elizitierung eine besonders starke Induktion von Genen, die mit Stress oder Abwehr assoziiert sind, beobachtet wurde, sollte hier anschließend das Phosphorylierungsmuster der MAPKs MPK6, MPK3 und MPK4 betrachtet werden. Zum Nachweis von aktivierten MAPKs wurden Western-Blots mit einem Antikörper, der nur an das phosphorylierte TEY-Motiv in phosphorylierten MAPKs bindet, verwendet (vgl. Kap. 3.2.9). In Abbildung 3.6-5 ist deutlich zu erkennen, dass in mit *P. indica* besiedelten Wurzeln und anschließender Elizitierung mit Pep1 eine Phosphorylierung der MAPKs erfolgte. Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen somit, dass die Besiedlung mit *P. indica* keinen Einfluss auf die Pep1-Induzierung der MAPKs ausübt.



**Abb. 3.6-5: MAPKs-Aktivierung in Col-0 Wurzeln.**

21 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen des Wildtyps Col-0 wurden zunächst mit *P. indica* inokuliert bzw. Kontroll-behandelt und drei Tage später mit 1  $\mu$ M Pep1 oder Wasser (Kontrolle) behandelt. Die Wurzeln wurden 0, 10, 30 und 60 min nach der Mock/Pep1-Behandlungen geerntet. Nach der Extraktion der jeweiligen Gesamtproteine wurde ein Western-Blot durchgeführt, bei dem ein Antikörper gegen phosphorylierte MAPKs (anti-phospho p44/42 MAPK) verwendet wurde. Spezifische Antikörper gegen MPK6, MPK3 und MPK4 zeigen, dass keine Behandlung zu einer veränderten Synthese dieser Proteine führte. Im unteren Bereich ist jeweils der Comassie-gefärbte Proteinblot dargestellt.



## 4 Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit befasste sich mit der mutualistischen Interaktion von *Arabidopsis thaliana* mit dem endophytischen Pilz *Piriformospora indica*. Sie trug dazu bei, die Besiedlungsstrategie des Pilzes aufzudecken. Weiterhin konnte die Arbeit aufzeigen, dass *P. indica* mit einem Immunsystem auf der Ebene der MAMP-triggered immunity (MTI) konfrontiert ist und diese sehr effizient unterdrückt. Ergänzende molekulare, biochemische und zytologische Studien der *Arabidopsis-P. indica* Interaktion nach Elizitierung mit diversen MAMPs konnte aufzeigen, in welcher Breite *P. indica* abwehrbezogene Signalwege beeinflusst. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aufgedeckt, dass Abwehrkomponenten der Wurzel mit den bereits bekannten des Blattes teilweise identisch sind. Auch die Analyse der Pep1-induzierten DAMP-triggered immunity in Wurzeln konnte eine Überlappung zu der im Blatt bereits beschriebenen aufzeigen. Hierbei wurde deutlich, dass *P. indica* keinen Einfluss auf die ausgelösten Abwehrreaktionen auf Basis der DAMP-triggered immunity als Teil der MTI verübt.

### 4.1 Die mutualistische Symbiose von *Arabidopsis*-Wurzeln mit *P. indica*

Die erstellten zytologischen Studien in *Arabidopsis* ergaben ein detailliertes Bild vom zeitlichen Verlauf der Wurzelbesiedlung mit *P. indica*. Ähnlich wie in der Interaktion mit Gerste (Deshmukh et al., 2006; Schäfer et al., 2009) zeigte der Pilz nach Chlamydosporenkeimung zunächst ein extrazelluläres Wachstum auf der Wurzeloberfläche (~ 1 day after inoculation, dai). Im weiteren Verlauf begann die Penetration der Wurzelzellen, wobei die Hyphen lebende Epidermis- und Kortexzellen besiedelten (~ 3 dai). Diese Besiedlungsphase konnte als eine biotrophe Besiedlungsphase charakterisiert werden (Jacobs et al., 2011). Im weiteren Verlauf der Besiedlung (> 3 dai) kam es zu vermehrten Zelltodreaktionen besiedelter Zellen. Diese Besiedlungsphase wurde als eine Zelltod-assoziierte Besiedlungsphase charakterisiert (Qiang et al., 2012). Auf diese Phase folgte schließlich die Chlamydosporenbildung, welche extrazellulär (7 dai) sowohl an der Wurzeloberfläche als auch intrazellulär (14 dai) zu finden waren. Somit konnten die Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM)-Studien eine zweiphasige Besiedlungsstrategie des Pilzes identifizieren. Die erste Phase beinhaltet die biotrophe und intrazelluläre Besiedlung, die mit einer Invagination der Plasmamembran einhergeht und somit einen engen Kontakt der Interaktionspartner erfordert. Hierbei wurden selten zelluläre Abwehrreaktionen gefunden, wie beispielsweise Zellwand-Appositionen oder eine hypersensitive Reaktion (HR)

wie es in der Interaktion mit biotrophen Blattpathogenen als Folge einer Abwehrreaktion auftreten kann (Thordal-Christensen et al., 1997; Hückelhoven & Kogel, 2003; Lipka et al., 2005). Die zweite Besiedlungsphase ist mit einer Zelltodreaktion als Folge der Besiedlung durch *P. indica* assoziiert. Die Zelltodreaktion beschränkte sich jedoch nur auf die zuvor biotroph besiedelten Zellen, da angrenzende Nachbarzellen diese Symptome nicht aufzeigten. Des Weiteren konnte der Zelltod als Folge einer Abwehrreaktion im Rahmen der pflanzlichen Immunantwort (ETI) auf den Pilz durch folgende Charakteristika/Phänotypen ausgeschlossen werden: Das Fehlen einer Autofluoreszenz besiedelter Zellen (7dai), was auf die Bildung phenolischer und antimikrobieller Substanzen zurückzuführen ist (Hammond-Kosack und Jones, 1996; Heath, 2000) und das Fehlen von Kallose und Lignin-Depositionen, was typisch für die Induktion einer hypersensitiven Reaktion (HR) ist (Schulze-Lefert, 2004). Weiterhin hat der Zelltod keine einschränkende Wirkung auf die Besiedlung und das transzelluläre Wachstum des Pilzes (vgl. Abb. 3.1-2). Zudem wird angenommen, dass *P. indica* tote Zellen für seine intrazelluläre Sporenbildung benötigt (Qiang et al., 2012b). Der Besiedlungs-assoziierte Zelltod scheint vielmehr ein Teil einer konservierten Besiedlungsstrategie zu sein, da gleiches in Gerste und *Arabidopsis* auftritt und für eine erfolgreiche Wurzelbesiedlung erforderlich ist (Deshmukh et al., 2006; Qiang et al., 2012a). Weitere Studien dazu wurden in einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe Schäfer angefertigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass *P. indica* eine Störung in der Funktionalität des ERs (Endoplasmatisches Retikulum) induziert, begleitet von einem vakuolären Kollaps, was ein Zelltodprogramm auslöst. Die Hemmung der ER-Funktion könnte dazu führen, dass Proteine, die wichtig zur Etablierung der MTI sind, wie z. B. PR-Proteine oder PRRs wie EFR1, nicht mehr korrekt synthetisiert werden. Dadurch könnte der Pilz eine erhöhte Wurzelkompatibilität in seinen Wirten erreichen (Qiang et al., 2012a)

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Analyse der von *P. indica* induzierten Abwehrsuppression in Wurzeln, welche ausschlaggebend für sein breites Wirtsspektrum sein könnte. Da der Pilz lebende Zellen besiedelt, kann mit den Vorergebnissen der zytologischen Studien geschlossen werden, dass *P. indica* in der Lage ist, Abwehrreaktion zu unterdrücken bzw. die pflanzliche Abwehr so zu steuern, dass die Etablierung und Erhaltung der biotrophen Interaktion möglich wird. Da detaillierte Untersuchungen über Abwehrprozesse in Pflanzenwurzeln fehlen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Wurzel-Immunantwort auf der Ebene der MAMP-triggered immunity (MTI) untersucht werden.

#### 4.2 *P. indica* unterdrückt die MAMP-triggered immunity (MTI)

Die MTI wird nach der Rezeptor-vermittelten Erkennung von MAMPs wie z. B. flg22, elf18 und Chitin durch die Aktivierung ähnlicher bzw. identischer Signalwege gewährleistet (Boller & Felix, 2009; Monaghan & Zipfel, 2012). Hierbei kommt es in Blättern zu einer (Co)-Aktivierung wichtiger Signalkomponenten wie Ionenkanalaktivierungen,  $Ca^{2+}$ -Ströme, MAPKs, CDPKs und anderer messbarer Prozesse wie des *oxidative burst*, der Ethylenbiosynthese und der späteren Deposition von Kallose (Zipfel et al., 2006; Altenbach & Robatzek, 2007; Kudla et al., 2010; Rodriguez et al., 2010; Rushton et al., 2010; Park et al., 2012). Da die MAMPs nicht Blattpathogen-spezifisch erkannt werden, sondern ihre PRRs *FLS2*, *EFR* und *CERK1* auch in Wurzeln ubiquitär exprimiert werden (Robatzek et al., 2006; Ranf et al., 2011), sollten konservierte Abwehrkomponenten zwischen Blättern und Wurzeln bestehen. Ungeachtet dessen, dass Wurzeln im Boden ständig mit Mikroorganismen interagieren müssen, und auch in der pathogenen Interaktion die Wurzelzone als Eintrittsstelle dienen kann, ist die MAMP-induzierte Abwehr der Wurzeln weitgehend unerforscht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in der Wurzel ausgelöste Abwehrreaktion auf diverse MAMPs auf der Basis der MTI stattfindet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bestehende Signalkomponenten im flg22 ausgelösten Signaltransduktionsweg, wie die Bildung von ROS, Phosphorylierung der MPKs und die Aktivierung nachfolgender Antworten wie Induzierung von Abwehrgenen, zwischen Blättern und Wurzeln konserviert sind. Darauf aufbauend konnte demonstriert werden, dass diese frühen Signalwegkomponenten in Gegenwart von *P. indica* sehr effizient unterdrückt werden (vgl. Abb. 3.2-1 - 3.2-9). Auch später messbare Abwehrantworten, wie die Deposition von Kallose und die Beeinträchtigung des Keimlingswachstums als Antwort von MAMP-Langzeitbehandlung, werden durch den Pilz nicht gebildet bzw. aufgehoben (vgl. Abb.3.2-7). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Millet und Kollegen (2011) wurde eine gewebespezifische Abwehrreaktion der Wurzel auf diverse MAMPs auf Basis der Kallosedeposition dargestellt. Hierbei wurde berichtet, dass Peptidoglykan und flg22 eine Kallosebildung in der Elongationszone (Streckungszone), Chitin dagegen eine durchweg starke Kallose-Akkumulation in der gesamten Wurzel auslöst. Es wurde geschlussfolgert, dass die Perzeption von diversen MAMPs in der Wurzel verschiedenen Zonen unterliegt, um effektiver auf verschiedene Mikroben reagieren zu können. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Gewebe-unspezifische Funktion von Abwehr- und Erkennungsbereichen (Jacobs et al., 2011). Dies steht im Einklang zu Studien von Jeworutzki und Kollegen (2010). Hier konnte eine flg22-Elizitierung in Wurzelhaarzellen (Bereich der

Differenzierungszone) eine Membrandepolarisation mit Ionenkanalaktivierung hervorrufen, abhängig von einem funktionalen FLS-Rezeptorprotein (Jeworutzki et al., 2010). Da die *FLS2*-Expression an der gesamten Wurzel zu finden ist (Robatzek et al., 2006), lässt sich somit auch der in der vorliegenden Arbeit gefundene Kallosephänotyp in allen Wurzelzonen in Gegenwart von flg22 erklären (vgl. Abb.3.2-4). Die Besiedlung durch *P. indica* konnte die flg22-induzierte Kallosebildung fast vollständig unterdrücken. Des Weiteren war auffällig, dass *P. indica* die flg22-induzierte Kallosebildung nicht nur im besiedelten Wurzelgewebe, der Wachstumszone (Differenzierungszone), sondern auch im nicht besiedelten Gewebe wie der Elongations- und meristematischen Zone aufhob. Als Auslöser der durch *P. indica* aufgehobenen Kallosebildung könnten vom Pilz exudierte diffuse Metabolite in Frage kommen und damit die verbundene Inhibierung von Kallose in der gesamten Wurzel. So produziert und nutzt z.B. *P. syringae* das Phytotoxin Coronatin (COR), einen multifunktionalen „Modulierer“ der pflanzlichen Immunität (Melotto et al., 2006; Uppalapati et al., 2008; Geng et al., 2012). Dabei greift COR in den sekundären Metabolismus ein, wie u.a. in die Glukosinolatbiosynthese (Geng et al., 2012), welche bekannt ist, die flg22-induzierte Kalloseproduktion zu steuern. Dabei ist MYP51 als Transkriptionsfaktor für die Generierung der Indol-Glukosinolate (Gigolashvili et al., 2007; Clay et al., 2009) verantwortlich und zusammen mit der hydrolitischen Aktivität des Myroniase-Enzyms PEN2 und der Kallose-Synthase PMR4 ausschlaggebend ist (Bednarek et al., 2009; Clay et al., 2009). Eine Inhibierung der Kallosesynthese in Wurzeln und Keimblättern und eine SA-unabhängige Supprimierung der *MYP51*-Expression durch COR konnte gezeigt werden (Millet et al., 2010; Geng et al., 2012). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine starke *MYP51*-Expression in flg22-behandelten Wurzeln beobachtet, welche durch *P. indica* in Gegenwart von flg22 unterdrückt war (vgl. Abb. 3.2-8). Bekannt ist, dass frühe Signalkomponenten wie der durch RBOHD gebildete *oxidative burst* spätere Antworten wie Kallosedeposition als Antwort auf flg22 mitsteuert (Zhang et al., 2007; Galletti et al., 2008). Durch eine Quantifizierung des *oxidative burst* in mit *P. indica* besiedelten *Arabidopsis*-Wurzeln des Wildtyps Col-0 wurde eine fast vollständige Unterdrückung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion nach Zugabe von flg22 und elf18 detektiert. Auch bei Elizitierung mit einem pilzlichen MAMP in Form des hier getesteten Chitinoktamers konnte eine Unterdrückung aufgedeckt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien aus Gerste (Khatabi et al., 2012). Hierbei wurde gezeigt, dass eine Besiedlung durch *P. indica* den *oxidative burst* in Gerste fast vollständig unterdrückt. Auch die Untersuchungen an *Arabidopsis*-Wurzeln nach Zugabe eines Zellwandextrakts (ZWE) von *P. indica* konnten keine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion nachweisen

(Vaderserry et al., 2009). Zusätzlich wurde die Expression von *OXII* (*oxidative burst dependent kinase 1*) untersucht, welche vom RBOHD-gebildeten *oxidative burst* aktiviert wird und schließlich verschiedene nachfolgende Reaktionen im Signaltransduktionsweg verbindet (Rentel et al., 2004; Peterson et al., 2009). Eine fehlende *OXII*-Regulation konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit in mit *P. indica* besiedelten Wurzeln in Gegenwart von flg22 festgestellt werden. Aufgrund der Tatsache, dass *OXII* nach Behandlung mit MAMPs oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert wird (Rentel et al., 2004; Peterson et al., 2009), stützt die oben beschriebenen Resultate, dass *P. indica* mit der frühe ROS-Signalgebung interferiert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien von Drzewiecki (2009), bezüglich der Regulation von *OXII* in der frühen *Arabidopsis-P. indica* Interaktion. Nichtsdestotrotz werden auch andere, nicht RBOHD-abhängig gesteuerte Signalwege durch *P. indica* unterdrückt. So auch die Phosphorylierung der MAPKs in mit *P. indica* besiedelten Wurzeln in Gegenwart von flg22, die Expression von Abwehr- und Stress-bezogenen Genen und die durch flg22- oder elf18-induzierte Keimlingsinhibierung. Nach flg22-Erkennung kommt es zu einer frühen Aufteilung der Signalwege, die der FLS2-Aktivierung nachgelagert sind. Es erfolgt eine zeitige Phosphorylierung der MAPKs, unabhängig von den Signalen des *oxidative burst*, welche in den Kern transloziert werden, gefolgt von einer direkten oder indirekten Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, welche das Signal in die Transkription von Abwehr-assoziierten Genen einleiten (Asai et al., 2002; Rodriguez et al., 2010; Ranf et al., 2011; Macho et al., 2012). Eine flg22-Elizitierung konnte eine schnelle transiente Phosphorylierung der drei Proteinkinasen MPK6/3/4 im sogenannten *activation loop* aufzeigen, welche in mit *P. indica* behandelten Wurzeln nicht stattfand. Auch die flg22-vermittelte Induktion der Transkriptionsfaktoren der WRKY-Familie, welche durch MAPKs initiiert werden (Asai et al., 2002), wurde in mit *P. indica* besiedelten Wurzeln unterdrückt. Die generelle Suppression der getesteten Abwehrkomponenten beeinflusst sowohl die frühen flg22-induzierten Antworten wie den *oxidative burst* und MAPKs sowie Abwehr- und Stress-bezogene Gene, aber auch spätere Abwehrantworten wie die Deposition von Kallose und die Einstellung des Keimlingswachstums in Gegenwart von flg22 oder elf18. Durch die Breite der hier gefundenen Abwehrsuppression, welche auch in verschiedenen subzellularen Bereichen angesetzt sind, kann davon ausgegangen werden, dass *P. indica* mit der basalen Abwehr an einem frühen Schritt interferiert. Die Unterdrückung der MTI in Blättern gilt als allgemeines Kennzeichen erfolgreicher Kolonisierung durch Pathogene (He et al., 2007; Nicaise et al., 2009). Konsistent zu dieser Betrachtungsweise konnte die vorliegende Studie aufzeigen, dass die Strategie, die MAMP-induzierte Abwehr zu unterdrücken, auch in Wurzeln für eine

erfolgreiche Besiedlung genutzt wird. Dabei wird angenommen, dass *P. indica* zahlreiche Effektorproteine während der frühen biotrophen Besiedlungsphase zur Überwindung der Wurzel-Immunität einsetzt (Klute, 2011). Tatsächlich konnten neuere Studien aufzeigen, dass symbiotische Pilze sich ähnlichen Mechanismen und Strategien bedienen wie viele pathogene biotrophe Mikroorganismen, z.B. durch die allgemeine Vermeidung der Erkennung oder durch Sekretion von symbiotischen Effektormolekülen mit Abwehr-supprimierender Wirkung (Poza & Azcon-Aguilar, 2007; Martin et al., 2008; Bonfante & Genre 2010; Klopffholz et al., 2011). Die Signalkaskade der basalen Abwehr beginnt nach MAMP-Erkennung durch die jeweiligen PRR-Rezeptoren (Boller & Felix, 2009; Nicaise et al., 2009). Als eine Strategie nutzen biotrophe und hemibiotrophe Mikroorganismen Effektorproteine mit dem Ziel, bspw. direkt mit den Immunrezeptoren zu interagieren. Unter diesen Effektoren befindet sich auch AvrPto aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*). Dieser membranlokalisierte Effektor ist in der Lage, an die Kinasedomäne von FLS2, EFR und BAK1 zu binden, deren Kinaseaktivität zu hemmen und damit die Signaltransduktion der MTI zu unterdrücken (Shan et al., 2008; Xiang et al., 2008). Der Effektor AvrPtoB aus *P. syringae* besitzt wiederum E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität und markiert den Rezeptor für den proteasomalen Abbau, wodurch die Initiierung der MTI verhindert wird (Abramovitch et al., 2006; Göhre et al., 2008). Auch der Chitinrezeptor CERK1 aus *Arabidopsis* wird von AvrPtoB ubiquitiniert und dadurch der Abbau dieses Rezeptors induziert (Gimenez-Ibanez et al., 2009). Das in der *Arabidopsis-P. indica*-Interaktion eine Inhibierung von Immunrezeptoren stattfindet, die die supprimierende Immunreaktionen erklären könnte, ist unwahrscheinlich. Hiergegen spricht eine verschlechterte Besiedlung, begleitet von einer Hyperaktivierung der Abwehr in der *pub22/23/24* Mutante. Die U-Box E3-Ligasen PUB22, PUB23 und PUB24 sind bekannt, als negative Regulatoren in der MAMP-vermittelten Signaltransduktion oberhalb der MAPK-Signalkomponenten in Blättern aber unterhalb der MAMP Rezeptoren zu agieren (Trujillo et al., 2008). Demnach zeigen Pflanzen mit mutierten *pub22-24*-Genen zum Teil verstärkte Reaktionen der MTI nach der Erkennung von diversen MAMPs, was auf ihre Beteiligung an der Verarbeitung Rezeptor-vermittelter Signale hindeutet (Trujillo et al., 2008). Denkbar wäre, dass *P. indica* die Aktivität der E3-Ligasen stabilisiert, in einem ähnlichen Mechanismus wie es für Avr3a aus *P. infestans* gezeigt wurde (Bos et al., 2009; 2010). Wiederum können Effektoren ganz gezielt auf verschiedenen Ebenen in die MTI eingreifen. So dephosphoryliert z. B. der Effektor HopA11 aus *Pst* die MPK-Kinasen MPK3 und MPK6 und beeinflusst die nachgeschaltete transkriptionelle Aktivität von Abwehrgenen (Zhang et al., 2007). *P. syringae* HopM und AvrE manipulieren den Vesikeltransport ihrer Wirtszellen.

Dieser wird u. a. auch benötigt, um zellwandassoziierte Verteidigungsstrukturen wie Kallose-Ablagerungen zu etablieren (Nomura et al., 2006). Der Effektor SP7 des Mykorrhiza Pilzes *Glomus intraradices* interagiert im Zellkern mit dem Transkriptionsfaktor ERF19 (ERF; *ethylene responsive factor*), um die Abwehr zu unterwandern (Kloppholz et al., 2011). Der Pilz *Sclerotinia sclerotiorum*, welcher für sein extrem weites Wirtsspektrum bekannt ist, nutzt beispielsweise die Sekretion von Oxalsäure, um den *oxidative burst* zu unterdrücken. Des Weiteren wird Oxalsäure eine inhibierende Rolle in der frühen PRR-Erkennung zugesprochen, wobei Oxalsäure eine modellierende Funktion bei der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Kinase BIK1 (*Botrytis-induced kinase 1*) hat (Williams et al., 2011). BIK1 gilt als ein Regulatorprotein, der mit FLS2 und BAK1 in einem konstitutiven Komplex besteht, ohne vorangegangenen Stimulus verhindert, dass Signalwege aktiviert werden (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2010). Ein weiterer Mechanismus, um die MTI zu umgehen, wird von Pathogenen aber auch symbiontischen Bakterien genutzt. Hierbei werden extrazelluläre Polysaccharide sekretiert um apoplastische  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu binden, um somit den zytosolischen Einstrom und die damit verbundene Initiierung von frühen Abwehrsignalkomponenten der Wirte zu verhindern (Aslam et al., 2008). Ob während der frühen Besiedlung durch *P. indica* Veränderungen des zytosolischen Kalziumspiegels für die Aktivierung von nachfolgenden Signalkomponenten wie die Akkumulation aktiver Sauerstoffspezies, die Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen und die Induzierung von Abwehrgenen verantwortlich ist, müssen zukünftige Experimente prüfen. Möglich wäre, dass *P. indica* eine Vielzahl von Effektoren zu Beginn der Interaktion sekretiert, welche verschiedene Signalkomponenten gezielt ausschalten und die MAMP-basierte Abwehr zum Erliegen bringt. Alternativ wäre es möglich, dass *P. indica* einen Knotenpunkt in der Signalkaskade unterhalb der PRRs angreift. Dieser könnte in verschiedenen Pflanzenarten konserviert sein, da die in dieser Arbeit gefundene Abwehrsuppression in *Arabidopsis*, der in Gerste ähnelt (Schäfer et al., 2009; Khatabi et al., 2012). Der molekulare Mechanismus zwischen der Aktivierung von PRRs und der sich anschließende intrazellulärer Signalweiterleitung ist noch ungeklärt (Monaghan & Zipfel, 2012; Park et al., 2012). Daher kann die Identifizierung weiterer früh in der Signalkaskade agierender Proteine, welche durch *P. indica* gezielt verändert werden, zur Aufklärung der immunassoziierten Signalgebung beitragen. Die Identifizierung von neuen Effektoren und ihren Angriffspunkten ist eine Methode, welche dazu beiträgt, Effektorproteine als Werkzeuge zur Aufklärung und Umsteuerung zellulärer Prozesse in Pflanzen zu verwenden, um bestehende Lücken in der Signaltransduktion zu entschlüsseln (Zipfel, 2009; Nicaise et al., 2009). Mittels der YSST (*yeast signal sequence trap*)-Methode

konnten in der Arbeit von Klute (2011) putative Effektoren von *P. indica* auf Basis von funktionalen Signalpeptiden identifiziert werden. Anschließend funktionale Studien konnten jedoch keinen Zusammenhang in ihrer Rolle zur Überwindung der Wurzel-Immunität aufzeigen. Das erst kürzlich publizierte Genom und Transkriptom des Pilzes konnte eine Vielzahl von putativen Effektoren (10% der in *P. indica* induzierten Gene während der Besiedlung von Gerstenwurzeln) aufdecken (Zuccaro et al., 2011). Mit der Aufklärung und Verfügbarkeit des Genoms und dem zusätzlich etablierten System zur stabilen Transformation des Pilzes (Zuccaro et al., 2009; Hilbert et al., 2012) ist eine starke Basis für die zukünftige Charakterisierung weiterer sekretierter *P. indica*-Effektoren geschaffen worden, um deren Mechanismen zur Beeinflussung der pflanzlichen Abwehr aufklären zu können. Basierend auf den aufgeführten Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die hier gefundene, breite Abwehrsuppression eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Besiedlung darstellt. Da eine Abwehrsuppression in *Arabidopsis* und Gerste (Khatabi et al., 2012) stattfindet, ist es als Teil seiner Besiedlungsstrategie anzusehen, welche das breite Wirtsspektrum von *P. indica* erklären könnte.

#### **4.3 Die MAMP-triggered immunity kann die Wurzelbesiedlung durch *P. indica* hemmen**

Die MTI als eine erste Ebene der pflanzlichen Immunität ist in ihrer Effektivität und Bedeutsamkeit für die Abwehr diverser Pathogene unerlässlich (Zipfel, 2008; Boller & Felix; Nicaise et al., 2009). Dies konnte mit verschiedenen Rezeptormutanten wie *FLS2* (Gomez-Gomez et al., 1999; Zipfel et al., 2004), *EFR* (Zipfel et al., 2006), *Cerkl* (Miya et al., 2007) oder auch durch einen familienübergreifenden Transfer von Rezeptorkinasen wie z. B. *AtEFR* in Tabakblätter demonstriert werden (Lacombe et al., 2010). Die Relevanz der MTI wird durch die Identifikation von zahlreichen Effektorproteinen bestätigt, welche gezielt in die Rezeptorerkennung oder Signalweiterleitung der MTI eingreifen (Schwessinger & Zipfel, 2008; Zipfel, 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnten ausgelöste Abwehrreaktionen auf Basis der MTI in Wurzeln aufgezeigt werden, welche sich gleicher konservierter Signalwege bedienen wie jene, die aus umfangreich vorhandenen Studien aus Blättern bekannt sind (Boller & Felix, 2009; Nicaise et al., 2009). Eine Besiedlung mit *P. indica* führte zu einer breiten Abwehrsuppression wichtiger Signalkomponenten. Daher wurde weiter der Frage nachgegangen, ob eine bereits stimulierte Abwehr die Besiedlung und die Etablierung der Interaktion beeinträchtigt. Kongruent zu dieser Hypothese konnte aufgezeigt werden, dass



eine durch flg22 vorausgegangene Aktivierung der Abwehr eine Kolonisierung durch den Wurzelendophyten beeinträchtigt (vgl. Abb. 3.3-1). Dies zeigt auf, dass sein Besiedlungserfolg von der Unterdrückung der Wurzel-MTI abhängig ist. Dieses Ergebnis ist auch im Einklang mit Ergebnissen aus *Lotus japonicus*. In diesem Fall hatte eine vorangegangene flg22-induzierte Abwehr in *Lotus japonicus*-Wurzeln einen negativen Einfluss auf die spätere Interaktion mit seinem Symbionten *Sinorhizobium meliloti*, was sich in einem geringen Nodulationsvermögen widerspiegelte (Lopez-Gomez et al., 2012). Für die MAMPs flg22 und elf18 konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine Vorbehandlung von *Arabidopsis*-Pflanzen eine Resistenz-induzierende Wirkung gegenüber späteren Behandlungen mit *P. syringae* ausübt (Zipfel et al., 2004, 2006; Tsuda et al., 2009). Ein ähnlicher Effekt wurde auch für die Vorbehandlung mit einem DAMP, einem aus der Zellwand freigesetzten Oligogalacturonid (OGA), beschrieben. Diese DAMP-induzierte Abwehr konnte spätere Infektionen mit *Botrytis cinerea* reduzieren (Ferrari et al., 2007; Denoux et al., 2008). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit geben weiterführende Belege, dass eine Wurzel-Immunantwort auf der Ebene der MTI in ihrer Effizienz ausreicht, um die Besiedlung von Mikroorganismen zu bremsen. Weiterführende Besiedlungsstudien mit verschiedenen *Arabidopsis*-Mutanten, welche eine veränderte Signalgebung in der MTI aufzeigen, konnten dies weiter bekräftigen (vgl. Abb. 3.3-2). Die *cerk1-2* (*chitin elicitor receptor kinase 1-2*)-Mutante ist in der Erkennung des pilzlichen MAMPs Chitin und damit in der Chitin-induzierten Abwehr kompromittiert und verhält sich folglich gegenüber pilzlichen Pathogenen deutlich suszeptibler (Miya et al., 2007). Auch bei der Besiedlung durch *P. indica* wurde eine signifikant stärkere Besiedlung dieser Mutante beobachtet. Zudem wurde die Dreifachmutante *pub22/23/24* (PUBs; *U-box-typ E3 Ubiquitin Ligase*) verwendet, die nach MAMP-Elizitierung eine konstitutive Abwehr in Blättern aufzeigt (Trujillo et al., 2008). Hierbei wurde eine signifikant reduzierte Besiedlung durch *P. indica* gefunden. Die verminderte Besiedlung durch *P. indica* korrelierte dabei mit einer erhöhten Expression von Stress- und Abwehrgenen, wie den SA-Markergenen (*SID2*; *CBP60g*), MAPKs-aktivierten WRKYs, Indolglukosinolat-assoziierten Abwehrgenen (*MYP51*) und dem mit oxidativem Stress assoziierten *OXII*. Zusätzlich konnte der flg22-induzierte *oxidative burst* in *pub22/23/24* durch *P. indica* nicht unterdrückt werden. Dies legt nahe, dass die Besiedlungsstrategie von *P. indica* wesentlich darin besteht, die Abwehrreaktionen aktiv zu unterdrücken und nicht zu umgehen wie z. B. durch allgemeine Vermeidung einer Erkennung. Da Pflanzen mit mutierten *pub22-24*-Genen eine verstärkte Abwehrreaktion nach MAMP-Erkennung zeigen (Trujillo et al., 2008), induziert somit die Erkennung von *P. indica* eine zu

Pathogen/MAMP-Erkennung vergleichbare Abwehrreaktionen. Dies lässt vermuten, dass die Pflanze eingangs nicht zwischen mutualistischen und pathogenen MAMPs diskriminiert. Die beobachtete Hyperaktivierung der MTI auf Basis der hier getesteten Stress- und Abwehrgene und dem flg22-induzierten *oxidative burst* hebt das allgemeine Suppressionsphänomen durch *P. indica* auf. Die Funktion der PUBs als negative Regulatoren in der MTI unterliegen dem Mechanismus der Verarbeitung und Repremierung von Rezeptor-vermittelten Signalen (Trujillo et al., 2008; Furlan et al., 2012). Für die E3 Ligasen PUB12 und PUB13 konnte kürzlich die Übertragung von Ubiquitin nach flg22-Erkennung auf FLS2 nachgewiesen werden, was den Abbau von FLS2 einleitet. Entsprechend zeigen *pub12/13* Doppelmutanten nach flg22-Elizitierung keinen Abbau von FLS2 und erhöhte Resistenz gegenüber *Pst* DC3000, was eine mögliche regulatorische Rolle im FLS-Abbaus aufzeigt (Lu et al., 2011). Ob ein gleicher Mechanismus bei anderen interagierenden PRRs, wie beispielsweise EFR, vorliegt, muss noch untersucht werden. Nicht geklärt ist, ob eine Ligase-vermittelte Ubiquitinierung von PRRs schlicht ihren Abbau markiert oder aber auch mit der Internalisierung der Rezeptoren im Zusammenhang steht. Derzeit ist ebenso offen, ob der Mechanismus der Ubiquitinierung letztendlich die Proteinmenge reguliert und somit eine schnelle Rückführung an die Plasmamembran einleiten könnte (Furlan et al., 2012; Marino et al., 2012). Der genaue Mechanismus, den die zur PUB-Gruppe gehörenden PUB22, PUB23 und PUB24 zur negativen Regulation der MTI-vermittelten Signaltransduktion verwenden, ist noch relativ unbekannt. Stegmann und Kollegen (2012) konnten kürzlich das Protein Exo70B2 als ein Substrat der PUBs identifizieren. Zusätzlich stellte sich Exo70B2 als ein positiver Regulator der MTI heraus. *exo70B*-Mutanten zeigten stark beeinträchtigte Abwehrantworten nach Zugabe diverser MAMPs, gemessen am *oxidative burst*, an der Phosphorylierung der MPKs 3/4/6 und an der Aktivierung nachfolgender Abwehrantworten (z.B. Induktion von Abwehrgenen). Demzufolge ist Exo70B2 ein wichtiger Bestandteil, der für eine vollständige Aktivierung der MTI-Signalkaskade benötigt wird. Ferner konnte demonstriert werden, dass die PUB22-vermittelte Ubiquitinierung den proteasomalen Abbau von Exo70B2 einleitet und unabdingbar für die Abschwächung und Regulierung der MAMP-induzierten Signaltransduktion ist (Stegmann et al., 2012). Möglicherweise spiegeln verstärkte Abwehrreaktionen in der *pub22/23/24*-Mutante nach MAMP-Erkennung (Trujillo et al., 2008; Lu et al., 2011; Furlan et al., 2012) bzw. während der Besiedlung mit *P. indica* eine verstärkte Signalweiterleitung nicht endozytierter Rezeptoren wider. Alternativ wäre auch eine verstärkte Neusynthese von PRRs infolge einer Besiedlung durch den Pilz möglich. Weitere negative Regulatoren, welche in Abwesenheit von MAMPs als Immunsuppressoren

agieren sind noch weitgehend unbekannt (Monaghan & Zipfel, 2012; Schwessinger & Ronald, 2012; Stegmann et al., 2012). Somit wären negative Regulatoren in jedem Abschnitt der Signalkaskade ein potentielles Ziel für *P. indica*, um die Abwehr außer Kraft zu setzen. Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass *P. indica* als Mutualist ähnlich wie Pathogene von der Pflanze erfasst wird. Da *P. indica*, ungeachtet seines Status als Mutualist, Chitin in seiner Zellwand trägt, kann davon ausgegangen werden, dass die Pflanze auf Basis der PRRs-Erkennung keine Diskriminierung zwischen Pathogenen und Mutualisten vollzieht. Daraus ergibt sich, dass die Besiedlungsstrategie des Pilzes hauptsächlich darauf aufgebaut ist, die Wurzelabwehr aktiv zu unterdrücken und nicht ausschließlich durch die Maskierung eigener MAMPs zu umgehen. Ein solcher Mechanismus wurde durch die Identifizierung von LysM-Effektoren der Pathogene *Cladosporium fulvum* und *Magnaporthe oryzae* demonstriert, welche die Aktivierung von Chitin-induzierter Abwehr umgehen (de Jong et al., 2010; Mentlak et al., 2012; Gust et al., 2012). Hierbei konnte eine parallele flg22-Elizitierung jedoch die Immunaktivierung induzieren (de Jong et al., 2010).

#### **4.4 Der Einfluss Phytohormon-basierter Abwehr auf die Wurzelbesiedlung durch *P. indica***

##### **4.4.1 *P. indica* nutzt den JA-Signalweg um Immunantworten zu unterdrücken**

Das pflanzliche Abwehrsystem, bestehend aus MTI und ETI, ist durch verschiedene Phytohormone, die als primäre Botenstoffe dienen, vernetzt (Tsuda & Katagiri, 2010; Pieterse et al., 2012). Sie können einerseits in die induzierte Abwehr involviert sein, dienen aber auch der Etablierung verschiedener Resistenzformen (Pieterse et al., 2009; Pieterse et al., 2012). Dabei wird die Synthese der Phytohormone ET, JA und SA während der MTI genutzt, um die MAMP-induzierte Abwehr zu verstärken und mitzusteuern (Mishina & Zeier, 2007; Tsuda et al., 2009; Clay et al., 2009; Mersmann et al., 2010). Ihr gemeinsames Zusammen- und Entgegenwirken, der sogenannte *signaling cross-talk*, kann als weitere Instanz in der pflanzlichen Immunantwort verstanden werden (Tsuda et al., 2009; Katagiri & Tsuda, 2010; Pieterse et al., 2009). Dabei ermöglicht dieser *cross-talk* der Pflanze, auf wechselnde Bedingungen oder abgestimmt auf den Lebensstil des eindringenden Pathogens effizient zu reagieren und dabei Energie und Ressourcen zu schonen (Pieterse et al., 2012). Solche Überschneidungen im Hormonnetzwerk werden von Pathogenen wiederum genutzt, um die Balance zum eigenen Vorteil umzusteuern und z. B. Einfluss auf die MTI auszuüben (Navarro et al., 2008; Millet et al., 2010; Verhage et al., 2010; El Oirdi et al., 2011).

Darauf aufbauend wurde als ein weiterer Teil dieser Arbeit überprüft, ob die Signalwege der Phytohormone an der Limitierung von *P. indica* in Wurzeln beteiligt sind. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Besiedlungsstudien mit ausgesuchten Hormon- und Signalwegmutanten (vgl. Kap. 3.5) konnten dabei eine Parallele zwischen der in Blättern bekannten durch JA, SA und Glukosinolat regulierten Immunantwort (Laurie-Berry et al., 2006; Melotto et al., 2008; Clay et al., 2009; Tsuda et al., 2009) und der in Wurzeln ausgelösten Immunantwort belegen. Dabei zeigte sich, dass Mutanten mit einer verminderten SA- und Glukosinolat-assoziierten Abwehr stärker durch *P. indica* besiedelt werden als Mutanten mit verminderter JA-assoziiertes Abwehr. Die Besiedlungsstudien demonstrieren damit, dass eine SA- und Glukosinolat-basierte Abwehr wichtig für die Limitierung von *P. indica* in Pflanzenwurzeln ist. JA hingegen unterstützt die Besiedlung von Wurzeln durch *P. indica*. Daraufhin wurde überprüft, ob ein verändertes Hormongleichgewicht in JA-Mutanten die Fähigkeit von *P. indica* beeinträchtigt, die MTI zu beeinflussen. Speziell die antagonistische Wirkung zwischen den JA- und SA-Signalwegen war Gegenstand vieler Studien (Spoel & Dong, 2008; Bari & Jones, 2009; Pieterse et al., 2009; Thaler et al., 2012). In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen konnte in der JA-Signalwegmutante *jin1* eine verstärkte Expression von SA- und Glukosinolat-assoziiertes Abwehr aufgezeigt werden (vgl. Abb. 3.5-3). Da der Mutualist *P. indica* seine Wirte mit initialer biotropher Wachstumsphase kolonisiert, ist anzunehmen, dass hierbei eine verstärkte Sensibilität auf eine SA-aktivierte Abwehr besteht. Die verstärkte Expression von SA-responsiven Genen und die parallel verlaufende Suppression JA-responsiver Gene in *jin1* könnte damit eine Erklärung für die im Vergleich zum Wildtyp geringere Besiedlung der Mutante durch *P. indica* sein.

In Wildtyp-Pflanzen können durch Stimulierung des JA-Signalwegs Abwehrreaktionen, die durch SA reguliert werden, unterdrückt werden (Nickstadt et al., 2004). Als ein Resultat dieser antagonistischen Regulation werden in JA-Signalweg-Mutanten SA-abhängige Abwehrreaktionen nicht mehr unterdrückt, was zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber SA-sensitiven Mikroorganismen führt (Nickstadt et al., 2004; Pieterse et al., 2009). Dass ein intakter JA-Signalweg für eine erfolgreiche Infektion durch *Pst* DC3000 notwendig ist, konnten Studien aus Blättern ausführlich belegen (Nickstadt et al., 2004; Brooks et al., 2005; Laurie-Berry et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor MYC2/JIN1 (*JIN1*; *jasmonate insensitive 1*) agiert als positiver Regulator von verschiedenen JA-responsiven Genen (Lorenzo et al., 2004). Ein *knockout* von *MYC2/JIN1* führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Pst* DC3000, was auf einer erhöhten Akkumulation von SA und einer verstärkten SA-abhängigen Abwehr beruht (Laurie-Berry et al., 2006). Damit kann *MYC2/JIN1* als Modulierer im SA-JA

Antagonismus angesehen werden, der benötigt wird, um eine SA-assoziierte Abwehr zu supprimieren (Bari & Jones, 2009; Pieterse et al., 2009). Das solche Wechselwirkungen im Hormonnetzwerk auch von mutualistischen Mikroorganismen zu einer Umsteuerung genutzt werden, um eine Interaktion zu etablieren, ist bereits beschrieben worden (Gutjahr & Paszkowski, 2009; Klopffholz et al., 2011; Pieterse et al., 2012). Ähnlich wie bei *Rhizobien* spp. kann eine aktivierte SA-Abwehr eine inhibierende Wirkung auf das frühe Wachstum und die Initiale Wurzelbesiedlung von AM-Pilzen ausüben (Medina et al., 2003; Riedel et al., 2008; Gutjahr & Paszkowski, 2009; de Roman et al., 2011). Dabei wird angenommen, dass für eine Etablierung der AM-Symbiose der JA-Signalweg genutzt wird, um der inhibierenden SA-Abwehr entgegenzusteuern (Pozo & Azcon-Aguilar, 2007; Gutjahr & Paszkowski, 2009; Jung et al., 2012). Deshalb wurde überprüft, ob *P. indica* den JA-Signalweg benötigt, um Einfluss auf die MTI zu nehmen. Hierbei zeigte sich, dass der Mechanismus der Unterdrückung des flg22-induzierten *oxidative burst* einen intakten JA-Signalweg der Pflanze benötigt, da dieser in besiedelten *jin1-1* und *jar1-1* durch *P. indica* nicht unterdrückt wurde (vgl. Abb.3.5-2). Zusammenfassend betrachtet, könnte der Verlust der Fähigkeit, den flg22-induzierten *oxidative burst* in beiden JA-Mutanten und die erhöhte Expression von SA- und Glukosinolat-assoziiierter Abwehr in *jin1-1* darauf hindeuten, dass *P. indica* die Aktivierung des JA-Signalwegs nutzt, um den SA-Signalweg und damit eine SA-assoziierte Abwehr zu umgehen.

#### **4.4.2 Die durch *P. indica* induzierte GA-Signalgebung beeinflusst die Balance zwischen JA und SA-aktiverter Abwehr**

Weiterhin können auch andere Phytohormone Einfluss auf das Rückgrat des pflanzlichen Immunsystems nehmen (Navarro et al., 2008; Robert-Seilaniantz et al., 2011; Pieterse et al., 2012). Kürzlich konnte von Navarro und Kollegen (2008) die Verbindung zwischen dem GA-Signalweg und dem SA-JA-Signalweg hergestellt werden. Hierbei konnte den DELLA-Proteinen, deren primäre Rolle die negative Regulation des GA-Signalwegs ist, auch ein Einfluss auf die Balancierung der SA- und JA-Signaltransduktion zugeschrieben werden (Navarro et al., 2008). Das Genom von *Arabidopsis* kodiert für fünf homologe DELLA-Proteine (GAI, RGA, RGL1, RGL2 und RGL3), die überlappende, aber auch unterschiedliche Funktionen ausüben. Hierbei nimmt RGA (*repressor of gal-3*) eine vorherrschende Stellung als Repressor des Streckungswachstums ein. Studien mit einem RGA-GFP-Fusionsprotein konnten aufzeigen, dass unter geringer GA-Konzentrationen DELLA-Proteine im Zellkern akkumulieren (Siverstone et al., 2001). Aufgehoben wird ihre Repressor-Aktivität durch die

Anwesenheit von GA, welches den Abbau dieser Proteine durch das 26S-Proteasom fördert und so den GA-Signalweg aktiviert. Zuvor inhibierte Transkriptionsfaktoren (PIFs; *phytochrome interacting factors*) leiten schließlich die Expression GA-abhängiger Gene ein (Sun et al., 2010; Achard & Genschik, 2009; Schwechheimer & Willige, 2009; Gallego-Bartolomé et al., 2011; Gao et al., 2011). So ist in der *quadruple-DELLA* Mutante, der vier von fünf bekannten DELLA-Proteinen fehlen und die einen konstitutiven GA-Signalgebungs-Phänotyp zeigt, eine Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen und eine Anfälligkeit gegenüber nekrotrophen Pathogenen vorhanden (Navarro et al., 2008). Gleiches trifft auch in Gerste zu, wobei hier nur ein vermittelndes DELLA-Protein bekannt ist (Saville et al., 2012). Ebenso konnten in *Arabidopsis* erhöhte endogene SA-Mengen und eine verstärkte Induktion SA-assoziiierter Abwehr nach Infektion mit *Pst* DC3000 demonstriert werden (Navarro et al., 2008). Währenddessen ist die Induktion JA/ET-assoziiierter Abwehr verzögert. Die Aufdeckung des genauen Mechanismus dieses *cross-talks* zwischen GA und JA/SA ergab kürzlich, dass DELLA-Repressoren auch mit anderen Proteinen interagieren und so deren Aktivität inhibieren (Wager & Browse, 2012). Dazu zählt auch die Bindung an das Protein JAZ1 (*jasmonate ZIM-domain protein*), welches als negativer Regulator des JA-Signalwegs dient (Peng et al., 2009; Hou et al., 2011; Zhang et al., 2011). Durch diese kompetitive Bindung zwischen DELLA/JAZ1 wird ein positiver Einfluss auf den JA-Signalweg ausgeübt. Der durch GA eingeleitete Abbau von DELLA-Proteinen entlässt JAZ1 und fördert damit wieder seine ursprüngliche Repressor-Aktivität auf den JA-Signalweg. Folglich wird durch GA der JA/SA Metabolismus umgelegt hin zu einem verstärkten SA-Signalweg und letztlich zu einer erhöhten Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen (Navarro et al., 2008; Hou et al., 2011).

Im Zusammenhang mit der Wechselwirkung der JA-GA-SA-Hormonsignalwege wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von GA für die Besiedlung und Wurzelabwehr miteinbezogen. Hierbei zeigte sich, dass die GA-Biosynthesemutante *gal-6* eine reduzierte Wurzelbesiedlung zu 7 dai aufweist. Im Gegensatz dazu fand sich für die GA-Signalwegmutante *quintuple-DELLA* eine verringerte Besiedlung zu 3 dai, jedoch eine erhöhte Besiedlung zu 7 dai (vgl. Abb. 3.5-6). In Analogie zu den bekannten Ergebnissen von Navarro et al. (2008), konnten auch in der hier vorliegenden Arbeit vergleichbare Expressionsmuster auserwählter SA- und JA-responsiver Gene in den GA-Mutanten gefunden werden. Während eine SA-Abwehr in besiedelten *quintuple-DELLA* induziert war (3 dai; 7 dai), war eine JA-Abwehr deutlich supprimiert (3 dai; 7 dai). In *gal-6* fand sich der entgegengesetzte Fall (vgl. Abb. 3.5-7). Die geringe Besiedlung von *quintuple-DELLA* zu 3

dai (biotrophe Besiedlungsphase) kann durch eine induzierte SA-Abwehr erklärt werden. Dass trotz der verstärkten SA-Abwehr eine im Vergleich zum Wildtyp verbesserte Besiedlung in *quintuple-DELLA* zu 7 dai (Zelltod-assoziierte Besiedlungsphase) gefunden wurde, stand zunächst im Widerspruch hierzu. Neben dem GA-Signalweg wird auch die JA-Signaltransduktion sowie die Toleranz gegenüber abiotischem Stress wie Salz und Kälte in Abhängigkeit von den DELLA-Proteinen reguliert (Navarro et al., 2008; Achard et al., 2008; Hou et al., 2011). Zusätzlich agieren DELLA-Proteine als positive Regulatoren für die Expression von ROS-Detoxifizierungsenzymen nach biotischer oder abiotischer Stresseinwirkung. Eine Stress-induzierte Stabilisierung von DELLA-Proteinen bewirkt damit einen zügigen ROS-Abbau und verzögert den darauf folgenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Zelltod (Achard et al., 2008; Gadjev et al., 2008). Folglich werden Pflanzen allgemein resistenter gegen Stress und aufgrund einer verminderten ROS-Akkumulation auch resistenter gegen einen Pathogen-induzierten Zelltod (Achard et al., 2008; Saville et al., 2012). Die verstärkte Anfälligkeit der *quadruple-DELLA* gegenüber *B. cinerea* basiert auch auf erhöhter ROS-Akkumulation, Zelltodförderung und damit wird die Etablierung nekrotropher Pathogene begünstigt (Achard et al., 2008; Saville et al., 2012). Gleiche Mechanismen in der Regulation von Zelltodreaktionen vermittelt das DELLA-Protein in Gerste. Hierbei zeigten *DELLA loss of function* Linien sich hypersensitiv bezüglich des Zelltods. Es konnte eine fast vollständige Resistenz gegenüber dem biotrophen Blattpathogen *Blumeria graminis* und eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem nekrotroph lebenden Halmbrucherreger *Oculimacula acufiformis* beobachtet werden (Saville et al., 2012). Hieran anschließend konnte kürzlich *BOI (botrytis susceptible1 interactor)*, eine RING-E3-Ligase, identifiziert werden, welche als negativer Zelltodregulator agiert und durch GA negativ reguliert wird (Luo et al., 2010). Dabei hat BOI eine Rolle bei der Regulierung von bestimmten Zelltodtypen. BOI wird z. B. benötigt, um einerseits einen Toxin-induzierten, aber auch den durch virulente *Pst* DC3000 ausgelösten Zelltod einzuschränken. Das Protein hat aber keine Funktion in der durch avirulente *Pst* DC3000 ausgelösten ETI-assoziierten HR (Luo et al., 2010). Übereinstimmend hiermit konnte in der GA-Synthesemutante *gal-3* eine verstärkte *BOI* Expression aufgezeigt werden (Luo et al., 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass eine verstärkte *BOI*-Expression in *gal-6* verglichen zu LER und *quintuple-Della* stattfindet (vgl. Abb. 3.5-7). Die Expression in *gal-6* wurde während der Besiedlung mit *P. indica* noch verstärkt (3 dai; 7 dai). Interessanterweise ist die *BOI*-Expression in *quintuple-Della* während der Besiedlung mit *P. indica* supprimiert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Zelltodregulationen in der *quintuple-Della* Mutante gefördert werden und damit die erhöhte SA-Abwehr am Beispiel der

*CBP60g*-Expression überschreibt, was zu einer verbesserten Besiedlung zu 7 dai führen könnte. Die Vermutung, dass *P. indica* einen Einfluss auf die GA-Signalgebung oder GA-Produktion ausübt, um den Abbau von DELLA-Proteinen einzuleiten und zugleich einen inhibierenden Einfluss auf die Regulierung von apoptotischen Enzymen wie *BOI* zu haben und damit erhöhte Wurzelkompatibilität zu erzeugen, kann in Betracht gezogen werden. Wie aus Abb. 3.4-4 ersichtlich, konnte eine Besiedlung durch *P. indica* zu 7 dai (Zelltod-assoziierte Besiedlungsphase) einen starken Abbau des DELLA-Proteins RGA, hervorrufen. Zudem konnte die reduzierte Besiedlung von *gal-6* zu 7 dai, in welcher die GA Synthese gehemmt ist, auf eine verstärkte *BOI*-Expression zurückgeführt werden. Weiterhin lassen Mikroarrayanalysen aus Gerste vermuten, dass die Besiedlung durch *P. indica* einen Einfluss auf die Gibberellin-Biosynthese in Wurzeln haben könnte (Schäfer et al., 2009).

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Ergebnisse in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Schäfer und Kollegen (2009), dass sowohl in Gerste als auch in *Arabidopsis* GA als modulierender Faktor des Pilzwachstums angesehen werden kann. In Anlehnung an Achard et al. (2008) konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine direkte Verbindung zwischen GA-Signalgebung über DELLA-Proteine und der Regulation der SA- oder JA-abhängigen Abwehr gezeigt werden. Weiterhin decken diese Ergebnisse eine weitaus komplexere Funktion von GA auf, wobei die Balancierung des JA/SA-Metabolismus nur eine Facette darstellt. Das negative Zelltodregulatoren wie *BOI* zu einer Resistenz gegenüber *B. cinerea* und einer Toleranz gegen Salzstress beitragen, ähnlich wie DELLA-Proteine, und ihre Funktion dabei über den GA-Signalweg mitgesteuert werden, wurde bereits demonstriert (Lou et al., 2010). In der Studie von Lou und Kollegen (2010) konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die GA-vermittelte Suppression von *BOI* mit einer Degradation der DELLA-Proteine verknüpft ist oder andere regulierende Faktoren wirken.

Insgesamt betrachtet konnte in der Zelltod-assoziierten Besiedlungsphase (7 dai) eine Degradation des DELLA-Proteins in der Linie *RGAp:GFP-RGA* beobachtet werden und Expressionsstudien einen Hinweis auf verstärkte GA-Synthese zu diesem Zeitpunkt liefern. Trotz erhöhter SA-Abwehr war die *quintuple-Della*-Mutante anfälliger gegenüber *P. indica* während der Zelltod-assoziierten Besiedlungsphase, was auf eine erhöhte Zelltodförderung durch Aufhebung der *BOI*-Expression schließen lässt. Aufzuklären bleibt, in welchem Umfang eine Stabilisation der DELLA-Proteine und GA zur Regulation von Zelltodreaktionen der Pflanze während der Besiedlung mit *P. indica* beitragen.



#### 4.5 *P. indica* kann Pep1-induzierte Immunantworten nicht unterdrücken

Neben den von Mikroben abstammenden MAMPs kann die Abwehr auch von pflanzeigenen Molekülen induziert werden. Dies geschieht über die Entstehung wirtseigener Moleküle, der sogenannten *damage associated molecular patterns* (DAMPs; Boller & Felix, 2009, vgl. Kap.1.1.2.2). Typischerweise entstehen DAMPs im Apoplast und die bekanntesten Beispiele sind Zellwandfragmente, Cutinmonomere oder auch Peptide, die durch die Wirkung von Pathogenen entstehen können (Boller & Flury, 2012). Diese endogenen Moleküle erlauben der Pflanze eine indirekte Wahrnehmung eines Pathogens, da DAMPs von ihren entsprechenden PRRs registriert werden. Infolgedessen werden anschließend pflanzliche Abwehrreaktionen ausgelöst, die dem der MAMP-induzierten Abwehr gleichen, da beide Strukturen einen *oxidative burst*,  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, Anstieg der Ethylen-Konzentration, Phosphorylierung von MAPKs und Expression von Abwehrgenen induzieren (Brutus et al., 2010; Krol et al., 2010; Postel et al., 2010; Schulze et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010; Stegmann et al., 2012). Dabei wird angenommen, dass zusätzlich zum Frühwarnsystem zur Erkennung von MAMPs das DAMP-System allein einer zusätzlichen Signalverstärkung innerhalb der MTI dient (Krol et al., 2010; Yamaguchi & Huffaker, 2011; De Lorenzo et al., 2011). Der genaue Zusammenhang ist, trotz gleicher messbarer *outputs* zwischen der MAMP- und der DAMP-Signalweiterleitung, jedoch ungeklärt (Boller & Flury, 2012).

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die DAMP-induzierte Abwehr der Wurzel untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien sollten anschließend mit denen des MAMP-Systems vergleichend betrachtet werden. Hierzu wurde ein aus *Arabidopsis* stammendes Peptid, Pep1, verwendet. Das eigentliche DAMP, Pep1, besteht aus dem C-terminalen Teil eines zytoplasmatischen Proteins, PROPEP1, und wird nach Prozessierung und Sekretion im Apoplast von seinen korrespondierenden PRRs PEPR1 und PEPR2 (PEPR; *PEP receptor*) erkannt (Yamaguchi et al., 2006, 2010; Krol et al., 2010). In *Arabidopsis* existieren 5 Paraloge von AtPep1, bekannt als AtPep2-6, welche alle durch ihre entsprechenden Proproteine codiert werden, bekannt als PROPEP2-6 (Huffaker et al., 2006). Die hier beschriebenen Untersuchungen umfassten dabei Besiedlungsstudien von *pepr*-Mutanten, Bestimmung des *oxidative burst*, die Regulation der Expression von Abwehrgenen im Wildtyp, den Nachweis phosphorylierter MAPKs in Wurzeln nach AtPep1-Elizitierung sowie die Wachstumsinhibierung von Keimlingen durch AtPep1-Behandlung.

Die hierbei erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass eine Pep1-induzierte Abwehr auch in Wurzeln ausgelöst wird, welche den Reaktionen aus Blättern gleicht (Krol et al., 2010). Im starken

Gegensatz hierzu stand jedoch, dass die ausgelösten Abwehrreaktionen auf Basis der MAMP-triggered immunity (MTI) durch *P. indica* unterdrückt sind (vgl. Ergebnisse aus Kap. 3.2.1 - 3.2.5), während gleiche Signalkomponenten in der DAMP-triggered immunity (DTI), ausgelöst durch Pep1 induziert sind. So wird der Pep1-induzierte oxidative burst durch *P. indica* in Col-0 Wurzeln nicht unterdrückt (vgl. Abb. 3.6-1A). Auch die Rezeptor-Mutanten *pepr1* und *pepr2* zeigten sich sensitiv gegenüber Pep1-Behandlung, unabhängig davon ob die Wurzeln von *P. indica* besiedelt waren oder nicht. Lediglich die Doppelmutante *pepr1/pepr2* verzeichnete keinen Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, weder in unbesiedelten noch in besiedelten Wurzeln (vgl. Abb. 3.6-1C). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit Studien aus Blättern (Krol et al., 2010) und demonstrieren, dass auch in Wurzeln ausschließlich die PEPR1- und PEPR2-Rezeptoren für die Pep1-Erkennung zuständig sind. Dabei wird deutlich, dass *P. indica* keinen Einfluss auf die frühe ROS-Signalgebung nach Pep1-Elizitierung ausübt. Auch eine Pep1-induzierte Hemmung des Keimlingswachstums konnte in Gegenwart von *P. indica* nicht aufgehoben werden (vgl. Abb. 3.6-2). Des Weiteren wurde ein rascher Anstieg in der Expression von Abwehr- und Stress-assoziierten Genen nach Pep1-Behandlung in Wurzeln demonstriert. Hierbei konnte eine deutliche Überschneidung, aktiviert durch MAMPs und DAMPs, anhand des gefundenen Expressionsprofils nach *flg22* (vgl. Abb. 3.2-8) und Pep1-Behandlung (vgl. Abb. 3.6.4) aufgezeigt werden. Im Gegensatz zur *flg22*-induzierten Expression zeigten jedoch die Untersuchungen, dass *P. indica* die Pep1-induzierte Expression der hier untersuchten Gene nicht supprimieren konnte, sondern teilweise verstärkte.

Weitere Parallelen zwischen der MAMP- und DAMP-Perzeption und der sich anschließenden Signalwege konnten die Phosphorylierungsstudien der Proteinkinasen in Wurzeln in Gegenwart von *flg22* (vgl. Abb. 3.2-9) und Pep1 (vgl. Abb. 3.6-5) aufzeigen. Sowohl eine *flg22*- als auch eine Pep1-Elizitierung verursachte eine sehr schnelle transiente Phosphorylierung MPK 3/4/6 in einem Umfang ähnlich wie schon aus Blättern bekannt (Ranf et al., 2011; Stegmann et al., 2012). Hierbei zeigte sich, dass *P. indica* Einfluss auf die Inaktivierung der durch *flg22* angeregten MAPKs hat, jedoch die durch Pep1 angeregte Phosphorylierung der MAPKs nicht blockiert. Dass die DTI Einfluss auf die Limitierung des Pilzwachstums ausübt, konnte durch Besiedlungsstudien der *pepr*-Rezeptormutanten bestätigt werden. Die Einzelmutanten *pepr1* und *pepr2* zeigten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 keinen Unterschied in der Besiedlungsstärke (vgl. Abb. 3-6-3). Die duale Funktion der zwei Rezeptoren wurde in der Doppelmutante *pepr1/pepr2* aufgezeigt und aufgehoben, was sich in einer verstärkten Besiedlung (*7 dai*) durch *P. indica* widerspiegelte. Die biologische Relevanz der DTI im Falle einer Infektion durch diverse Pathogene konnte in anderen Studien belegt

werden. Studien von Huffaker und Kollegen (2006) demonstrierten in *PROPEP1*-Überexpressionslinien, dem *Precursor*-Gen von Pep1, eine verstärkte Resistenz gegenüber dem Wurzelpathogen *Pythium irregulare*. Ebenso zeigten Pep1-vorbehandelte Col-0 Pflanzen eine Immunisierung gegenüber nachfolgender Infektion mit *Pst* (Yamaguchi et al., 2010). Bislang gibt es keine Studien die belegen, inwieweit die Pep1-Rezeptoren PEPR1 und PEPR2 bedeutsam für die Abwehr von diversen Pathogenen sind (Boller & Flury, 2012). Mit den Besiedlungsstudien der *pepr*-Mutanten innerhalb dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass auch die DAMP-Signalwege dazu beitragen, mutualistische Pilze wie *P. indica* zu begrenzen. Ergänzend konnte belegt werden, dass MAMPs und DAMPs gleiche Abwehrreaktionen in Wurzeln induzieren, die mit der Bildung von ROS, der Phosphorylierung der MAPKs und der Aktivierung nachfolgender Antworten wie Induzierung von Abwehrgenen einhergeht. Dabei wird in gegenwärtigen Studien angenommen, dass nach Rezeptor-vermittelter Stimulierung durch MAMPs nachgeschaltete Signalweiterleitungen früh in einen einzigen Signalweg übergehen, basierend auf gemeinsam aktivierten Signalwegkomponenten (Krol et al., 2010; Postel et al., 2010; Ranf et al., 2011; Boller & Flury, 2012). Interessanterweise benötigt der PEPR1/2 aktivierte Signalweg, ebenso wie FLS2 und EFR, die Interaktion mit BAK1 (Postel et al., 2010; Schulze et al., 2010). Obwohl überlappende Abwehrreaktionen infolge einer MAMP- und DAMP-induzierten Abwehr stattfinden, sprechen die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht schlichtweg dafür, dass MAMP- und DAMP-Signalwege mechanistisch und funktional redundant wirken. Im Gegensatz zu FLS2 und EFR besitzt PEPR1/2 neben einer zytosolischen Kinase-Domäne auch eine GC-(Guanylat-Zyklase)-Domäne und seine GC-Aktivität nach Pep1-Elizitierung konnte *in vivo* erfolgreich nachgewiesen werden (Ma et al., 2012). Die Erkennung von Pep1 hat zur Folge, dass über PEPRs GC-Aktivität cGMP aus GTP generiert wird. cGMP gilt als *second messenger* für die Aktivierung von Spannungs-unabhängigen Kanälen, welche als zyklisch-Nukleotid-aktivierte Kanäle (CNGC; *cyclic nucleotide gated channels*) bezeichnet werden. cGMP-aktivierte CNGCs leiten anschließend einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über die Plasmamembran ein, was zu einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt. Obwohl ein *in vivo*-Nachweis von PEPR-generiertem cGMP und seiner direkten Interaktion mit CNGC-Kanälen noch aussteht (Qi et al., 2009; Ma et al., 2012) kann davon ausgegangen werden, dass nach Pep1-Stimulierung die rasche Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  ins Cytosol über die cGMP-Generierung der Rezeptoren stattfindet und nachgelagerte Signalkaskaden durch diesen Mechanismus aktiviert werden (Qi et al., 2009; Ma et al., 2012). Pflanzen mit mutierter GC-Domäne zeigten keine Pep1-induzierte Abwehr (Ma et al., 2012). Ein zweiter

hervortretender Unterschied aus der Studie von Ma und Kollegen (2012) zwischen flg22/FLS- und Pep1/PEPR-Signalwegen konnte aufzeigen, dass der Pep1-Signalweg vornehmlich extrazelluläres (apoplastisches)  $\text{Ca}^{2+}$  dem nachgelagerten Signalweg beisteuert, der flg22-Signalweg hingegen vornehmlich intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  (Vakuole) nutzt. Das Unvermögen von *P. indica*, frühe Signalkomponenten nach Pep1-Elizitierung zu blockieren, jedoch gleiche Signalkomponenten nach MAMP-Elizitierung (elf18, flg22 oder Chitin) zu unterdrücken, spricht auch in der vorliegenden Arbeit dafür, dass Unterschiede nach MAMP und DAMP-Perzeption auf der Ebene der PRRs bestehen. Diese Abweichung in der MAMP- und DAMP-Signalkaskade sind wahrscheinliche Ursache dafür, dass *P. indica* effektiv eine flg22-induzierte Abwehr nicht jedoch die Pep1-induzierte Abwehr ausschalten kann. Des Weiteren wird dem PEPR-System eine besondere Rolle in der Signalverstärkung im Kontext der pflanzlichen Abwehr zugeschrieben (Ryan et al., 2007; Yamaguchi et al., 2010; Yamaguchi & Huffaker, 2011). Neben einem unabhängigen Signalweg, um  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle zu leiten, ist die Tätigkeit von beiden Rezeptoren PEPR1 und PEPR2 entscheidend für die Auslösung einer DTI und damit wichtig für die Hinderung von Pathogenen (Yamaguchi et al., 2010), aber auch *P. indica* (vgl. Abb. 3-5-3). Das Vorhandensein zweier Pep-Rezeptoren basiert demnach nicht auf schlichter Redundanz sondern vielmehr auf einer Funktion der Signalverstärkung während der MTI. Transkriptionell werden *PEPR1* und *PEPR2* infolge einer Verwundung, MeJA, MAMP- und Pep-Elizitierung, jedoch nicht nach MeSA induziert (Yamaguchi et al., 2010; Krol et al., 2010). Die aus *Arabidopsis* bekannten *PROPEP*-Gene (*PROPEP1-6*) werden ebenfalls unterschiedlich reguliert. Während *PROPEP2* und *3* durch MeSA stark induziert werden, weisen sie auch die höchste Expression nach pilzlicher, bakterieller Besiedlung bzw. Behandlung mit Oomyzeten- oder MAMPs auf. Die Expression von *PROPEP1*, *2* und *4* wird durch MeJA und Ethylen induziert (Huffaker et al., 2006; Huffaker & Ryan, 2007; Krol et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010). Zusätzlich wird die Expression von *PROPEP1-6* durch die Pep-Peptide selbst induziert, wobei die Expression von *PROPEP1* nur durch Pep1 hochreguliert und *PROPEP2* und *3* durch alle Peps induziert werden. Im Gegensatz hierzu werden *PROPEP4* und *5* generell schwach induziert (Huffaker & Ryan, 2007). Wie Peps von ihren *Precursor*-Genen abgespalten und aus der Zelle transportiert werden, um von ihren extrazellulären PRRs erkannt zu werden, ist jedoch ebenso unbekannt wie ihre individuelle Funktion *in vivo* (Yamaguchi & Huffaker, 2011; Boller & Flury, 2012). Wahrscheinlich agieren Peps oberhalb der Hormon-Signalwege, da Hormonmutanten darin beeinträchtigt sind, Markergene wie *PR1* oder *PDF1.2* nach Pep-Behandlung zu regulieren (Huffaker et al., 2006). Gegenwärtig wird das Pep/PEPR-System als Signalverstärker

während der MTI angesehen (Yamaguchi & Huffaker, 2011; Boller & Flury, 2012). Da die Erkennung von MAMPs, neben der Expression von Abwehrgenen, auch die Expression von *PROPEPs* induziert, können Peps nach ihrer Prozessierung eine verstärkte Synthese weiterer Peps einleiten, da sie neben der allgemeinen Expression von Abwehrgenen auch ihre eigenen *Precursor*-Gene und die ihrer PEPR-Rezeptoren regulieren. Damit wird ein positiver Rückkopplungsmechanismus zur Signal-Verstärkung und Signal-Aufrechterhaltung geschaffen (Huffaker & Ryan, 2007; Yamaguchi & Huffaker, 2011). Die Einbindung von Hormon-Signalwegen in Regulierungsmuster der PEPR-Rezeptoren und der *PRROPEPs* kann als zusätzliche Signal-Verstärkung im DAMP-Signalweg verstanden werden. Möglicherweise spielt neben einem unabhängigen  $Ca^{2+}$ -Signalweg in der DAMP-induzierten Abwehr auch die verstärkte Akkumulation von Phytohormonen eine Rolle, welche das Unvermögen von *P. indica*, die Abwehr zu supprimieren, erklären könnte. Beispielsweise sind *PROPEP2* und *3* am stärksten nach Pathogenen wie *B. cinerea*, *P. infestans* und *P. syringae* reguliert. Da *PROPEP2* sowohl durch SA als auch JA induziert wird, bedeutet das im Umkehrschluss, dass Pep2 auch beide Signalwege verstärkt induziert (Huffaker et al., 2006; Huffaker & Ryan, 2011). Eine Pep1-Behandlung von mit *P. indica* besiedelten Wurzeln würde damit auch zur Neusynthese von *PROPEP1*, *2* und *3* führen, da diese auch durch Pep1 induziert werden (Huffaker et al., 2006). Inwieweit ein Hormonungleichgewicht in mit *P. indica* besiedelten Wurzeln in Gegenwart von Pep1 entsteht, müssen zukünftige Experimente prüfen.

Das aus Mais bekannte Homolog *ZmPROPEP1* ist nach Behandlung mit dem nekrotrophen Pilz *Colletotrichum heterostrophus* sowie JA- oder *ZmPep1*-Applikation induziert. *ZmPep1*-behandelte Maisblätter induzieren infolge eine *de novo* Biosynthese und Akkumulation von JA und Ethylen. Ergänzend zeigten Expressionsstudien, dass *ZmPep1*-behandelte Blätter, ohne vorangegangene Pathogen-Einwirkung, eine starke Induktion von antifungalen Proteinen einleiten, wie beispielsweise von Endochitinase A und *PR4*-Genen. Interessanterweise wird die Produktion von sekundären Metaboliten wie Benzoxazinoiden stimuliert, welche die Regulierung von Kallose-Depositionen in Mais regulieren (Huffaker et al., 2011; Ahmad et al., 2011). *Colletotrichum* spp. sind bekannt, ähnlich wie *P. indica*, die Abwehr während ihrer transienten biotrophen Besiedlungsphase zu supprimieren (Münch et al., 2008; Kleemann et al., 2012). Trotz allem kann eine *ZmPep1*-induzierte Abwehr in Maisblättern die Ausbreitung und Symptomentwicklung durch *C. graminicola* und *C. heterostrophus* drastisch reduzieren (Huffaker et al., 2011). Ob eine ähnliche Abwehrform infolge einer Pep1-Behandlung in *Arabidopsis* unterliegt, müssen zukünftige, breitere Expressionsstudien prüfen. Weiterhin müsste eine genauere Analyse der Expression des

*PROPEPs* während der Besiedlung mit *P. indica* erfolgen. Insgesamt zeigen die Resultate, dass *P. indica* die frühen Signalkomponenten (MAPKs, *oxidative burst*) infolge einer Pep1-Elizitierung nicht blockiert, jedoch gleiche Signalkomponenten nach MAMP-Elizitierung (elf18, flg22 oder Chitin) unterdrückt. Dies lässt Unterschiede im MAMP- und DAMP-Signalweg erkennen. Dass Pflanzen über ein Set an *PROPEPs* verfügen, welche verschiedenartig reguliert werden, verdeutlicht, dass hier ein Mechanismus bewahrt wird, um auf verschiedene Pathogene oder Mutualisten effizient zu reagieren.

## 5 Zusammenfassung/Summary

### 5.1 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit befasste sich mit der mutualistischen Interaktion des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* mit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Da *P. indica* die Fähigkeit besitzt, entfernt verwandte Pflanzenarten zu besiedeln, deutet dies darauf hin, dass der Pilz über effektive Strategien zur Überwindung der Pflanzenabwehr verfügt. Zunächst sollte die Besiedlungsstrategie des Pilzes aufgedeckt werden. Anhand zytologischer Studien von mit *P. indica* besiedelten *Arabidopsis*-Wurzeln konnte eine präzise abgestimmte, zweiphasige Besiedlungsstrategie des Pilzes nachgewiesen werden. Diese beinhaltet eine initiale biotrophe, gefolgt von einer Zelltod-assoziierten Phase. Da *P. indica* lebende Zellen besiedelt, welche jedoch kaum Abwehrreaktionen aufzeigen, war es zusätzlich mein Ziel, die allgemeinen Mechanismen der Unterdrückung der Wurzelabwehr durch *P. indica* zu erfassen. Dabei konnte demonstriert werden, dass *P. indica* mit einem Immunsystem auf der Ebene der MAMP-triggered immunity (MTI) konfrontiert ist und dieses effizient unterdrückt. Darüber hinaus ergaben weiterführende Studien mit *Arabidopsis*-Mutanten, welche eine veränderte Signalgebung der MTI haben, dass *P. indica* vom pflanzlichen Immunsystem erkannt wird und eine zu Pathogenen vergleichbare Abwehrreaktion aktivieren kann. Dies lässt vermuten, dass die Pflanze eingangs nicht zwischen mutualistischen und pathogenen Mikroben diskriminiert. *P. indica* bedient sich somit ähnlichen immunosuppressiven Mechanismen und Strategien, wie viele biotrophe Pathogene, um Wurzel-Kompatibilität herzustellen. Die hier demonstrierte Fähigkeit von *P. indica*, frühe Abwehrsignalkomponenten zu manipulieren, bestimmt somit auch seinen Besiedlungserfolg. Die Effektivität in der Abwehrsuppression in *Arabidopsis* könnte auch sein breites Wirtsspektrum erklären. Die angewendeten molekularen und biochemischen Studien zur *Arabidopsis*-*P. indica* Interaktion nach Elizitierung mit diversen MAMPs konnten ferner eine Überlappung zwischen der Organisation von Blatt- und Wurzelabwehr offenlegen und deutlich machen, dass die bestehenden Signalkomponenten in Blättern und Wurzeln teilweise konserviert sind.

Weiterhin konnte auch die Analyse der DAMP-triggered immunity in Wurzeln eine Überlappung zu der im Blatt bereits beschriebenen aufzeigen. Hierbei wurde deutlich, dass *P. indica* keinen Einfluss auf DAMP aktivierte Abwehrreaktionen hat. Diese Resultate lassen bestehende Unterschiede in der MAMP- und DAMP-Signalkaskade vermuten. Zusätzlich wurde der Einfluss der durch Phytohormonen gesteuerten Abwehrsignalgebung auf das Wachstum von *P. indica* untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass das pflanzliche

Hormonsystem die Balance der Besiedlung trotz immunsupprimierender Wirkung des Pilzes kontrolliert. Eine Salizylsäure (SA)- und Glukosinolat-basierte Abwehr der Pflanze ist dabei wichtig und effizient, um das Wachstum von *P. indica* zu limitieren. Der Jasmonat (JA)-Signalweg hingegen unterstützt die Besiedlung von Wurzeln durch *P. indica*. Dieser nutzt die Aktivierung des JA-Signalweges, um frühe Abwehrreaktionen (*oxidative burst*) zu unterdrücken. Außerdem ergaben die durchgeführten Studien Hinweise darauf, dass *P. indica* den JA-Signalweg eventuell benötigt, um SA-assoziierte Abwehr zu unterdrücken.

## 5.2 Summary

The basidiomycete *Piriformospora indica* colonizes roots of a multitude of plants. The wide host range of *P. indica* implicates that the fungus has developed effective strategies to overcome plant innate immunity. The aim of this study was to analyze the colonization strategy of the fungus in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Cytological studies uncovered a well-orchestrated colonization of *Arabidopsis* roots by *P. indica*. Here the colonization pattern of *P. indica* can be mainly divided in an initial biotrophic growth phase and a later cell death-associated colonization phase. Because *P. indica* is colonizing living root cells without any defense reactions, it can be suggested that *P. indica* actively suppresses root innate immunity. Therefore it was a second goal of my project to characterize the immune suppressing ability of *P. indica* within its host *Arabidopsis*. The results of my work give evidence that *P. indica* is confronted with a functional root immune system which is efficiently suppressed by the fungus. More specifically, it could be demonstrated that mutualists like *P. indica* and pathogens are recognized by the root immune system in the same manner. Hence, probably no discrimination occurs between mutualists and pathogens. Therefore, the colonization success of *P. indica* rather reflects its efficient strategy, to deactivate plant innate immunity and thereby achieving root compatibility. This indicates that a mutualistic colonization success, like a pathogenic colonization success, is dependent on immune suppression strategies. It might further explain its wide host range. Molecular and biochemical studies dealing with *P. indica*-colonized *Arabidopsis* roots triggered by various MAMPs furthermore revealed comparative insight into the organization of root and leaf immunity. These studies uncover an overlap between root and leaf MAMP-triggered immunity (MTI) and provide evidence that signaling processes are at least partially conserved between leaves and roots. Similar overlaps between root and leaf immune responses were found after the investigation of DAMP-triggered immunity (DTI) which represents a significant part of plant immunity. However, in contrast to various MAMP-induced immune



reactions, *P. indica* was unable to block DAMP-triggered immunity. The failure to block DAMP-activated immune responses suggests differences between the early MAMP and DAMP immune signaling cascade.

Finally, the hormone-regulated plant immune signaling network was analyzed concerning its involvement in the restriction and control of *P. indica* growth. Besides *P. indica*'s immunosuppressing ability it could be demonstrated that the plant restrains its ability to activate certain MTI pathways to control root colonization. Thereby it was discovered, that salicylic acid (SA) signaling and glucosinolate metabolism restrict root colonization, whereas jasmonate (JA) signaling supports fungal growth. In more detail, especially JA signaling seems to be influenced and required by *P. indica* to suppress early MTI responses (e.g. oxidative burst). Further evidence is given that *P. indica* recruits the JA-signaling pathway to negatively cross-communicate with the late SA-mediated defense responses and affects the outcome of the immune response for its own need.

---

## Literaturverzeichnis

Abramovitch, R. B., Anderson, J. C., Martin, G. B. (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 601-611.

Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X., Harberd, N.P. (2007) DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* 143: 1163–1172.

Achard, P., Renou, J-P., Berthomé, R., Harberd, N.P., Genschik, P. (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biol* 2: 656-660.

Achard, P., Genschik, P. (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* 60: 1085–109.

Ahmad, S., Van Hulten, M., Martin, J., Pieterse, C.M., Van Wees, S.C.M., Ton, J. (2011) Genetic dissection of basal defence responsiveness in accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 34: 1191–1206.

Alfano, G., Lewis-Ivey, M.L., Cakir, C., Bos, J.I.B., Miller, S.A., Madden, L.V., Kamoun, S., Hoitink, H.A.J. (2007) Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathol* 97: 429–437.

Altenbach, D., Robatzek, S. (2007) Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 1031-1039.

Anderson, J.C., Bartels, S., Gonzalez Besteiro, M.A., Shahollari, B., Ulm R. (2011) Arabidopsis MAP Kinase Phosphatase 1 (AtMKP1) negatively regulates MPK6-mediated PAMP responses and resistance against bacteria. *Plant J* 67: 258–268.

Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M. (2005) The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J* 24: 2579–2589.

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

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

Aslam, S.N., Newman, M.A., Erbs, G., Morrissey, K.L., Chinchilla, D., Boller, T., Jensen, T.T., De Castro, C., Ierano, T., Molinaro, A., Jackson, R.W., Knight, M.R., Cooper, R.M. (2008) Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr Biol* 18: 1078-1083.

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

- Baltruschat, H., 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.
- Bar, M., Sharfman, M., Ron, M., Avni A. (2010) BAK1 is required for the attenuation of ethylene-inducing xylanase (Eix)-induced defense responses by the decoy receptor LeEix1. *Plant J* 63: 791–800.
- Bari, R., Jones, J.D.G. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69: 473–488.
- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A. (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 323: 101–106.
- Bent, A.F., Mackey, D. (2007) Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* 45: 399–436.
- Bittel, P., Robatzek, S. (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 10: 335–341.
- Boller, T., He, S.Y. (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324: 742–744.
- 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.
- Boller, T., Flury, P. (2012) Peptides as danger signals: MAMPs and DAMPs. *Signaling and Communication in Plants* 16: 163–181.
- Bonfante, P., Genre, A. (2010) Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun* 1: 1–11.
- Bos, J.I.B., Chaparro-Garcia, A., Quesada-Ocampo, L.M., McSpadden, Gardener, B.B., Kamoun, S. (2009) Distinct amino acids of the *Phytophthora infestans* effector AVR3a condition activation of R3a hypersensitivity and suppression of cell death. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 269–281.
- Bos, J.I.B., Armstrong, M.R., Gilroy, E.M., Boevink, P.C., Hein, I., Taylor, R.M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R.R., Harrower, B., Dixelius, C., Bryan, G., Sadanandom, A., Whisson, S.C., Kamoun, S., Birch, P.R.J. (2010) *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 9909–14.

- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng S.H., Sheen, J. (2010) Differential innate immune signalling via Ca(2+) sensor protein kinases. *Nature* 464: 418-422.
- Brodersen, P., Petersen, M., Bjorn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M.A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J., Mundy, J. (2006) Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J* 47: 532–546.
- 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: 629–39.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., Nürnberger, T. (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO J* 21: 6681–6688.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., De Lorenzo, G. (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 9452–9457.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of of plant Physiologists, Rockville, Maryland pp.1102-1156.
- Chabaud, M., Genre, A., Sieberer, B.J., Faccio, A., Fournier, J., Novero, M., Barker, D.G., Bonfante, P. (2011) Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca<sup>2+</sup> spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytol* 189: 347-355.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G. (2006) The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* 18: 465-476.
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S., Kemmerling, B. (2009) One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Sci* 14: 535-541.
- 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-U412.
- Christensen, M. J., Bennett, R. J. Schmid, J. (2002) Growth of *Epichloë/ Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. *Mycological Research* 106: 93-106.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., Ausubel, F.M. (2009) Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immuneresponse. *Science* 323: 95–101.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F, Newman, M.A., Pieterse, C.M., Poinssot, B., Pozo, M.J. (2006) Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1062–1071.

- Corradi, N., Bonfante, P. (2012) The Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Origin and Evolution of a Beneficial Plant Infection. *PLoS Pathog* 8: e1002600.
- Cui, H., Xiang, T., Zhou, J.M. (2009) Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. *Cell Microbiol* 11: 1453–1461.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M., Bolwell, G.P. (2012) The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern triggered immunity. *Plant Cell* 24: 275–287.
- de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H., Thomma, B.P. (2010) Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329: 953–955.
- De Lorenzo, G., Brutus, A., Savatin, D.V., Sicilia, F., Cervone, F. (2011) Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *FEBS Lett* 585: 1521-1528.
- de Roman, M., Fernandez, I., Wyatt, T., Sahrawy, M., Heil, M., Pozo, M. J. (2011) Elicitation of foliar resistance mechanisms transiently impairs root association with arbuscular mycorrhizal fungi. *J Ecol* 99: 36-45.
- Dempsey, D.A., Klessig, D.F. (2012) SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci* 17: 538-545.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F.M., Dewdney J. (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Mol Plant* 1: 423–445.
- Deshmukh, S., Hüchelhoven, 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*, 49: 18450–18457.
- Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I., Hirt, H. (2007) Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* 318: 453–456.
- Dodds, P.N., Rathjen, J.P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11: 539–48.
- Durrant, W.E., Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42, 185–209.
- Eaton, C.J., Cox, M.P., Ambrose, B., Becker, M., Hesse, U., Schardl, C.L., Scott, B. (2010) Disruption of signaling in a fungal-grass symbiosis leads to pathogenesis. *Plant Physiol* 153: 1780–1794.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., Kiss, G. B. (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-966.

- El Oirdi, M., El Rahman, T. A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M. C., Daayf, F., Vojnov, A., Bouarab, K. (2011) *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell* 23: 2405–2421.
- 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: 265–276.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., Dewdney, J. (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology* 144: 367–379.
- Finlay, R.D. (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59: 1115–1126.
- Fliegmann, J., Mithofer, A., Wanner, G., Ebel, J. (2004) An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J Biol Chem* 279: 1132–1140.
- Fliegmann, J., Montel, E., Djulic, A., Cottaz, S., Driguez, H., Ebel, J. (2005) Catalytic properties of the bifunctional soybean beta-glucan-binding protein, a member of family 81 glycoside hydrolases. *FEBS Lett* 579: 6647–6652.
- Flückiger, R., De Caroli, M., Piro, G., Dalessandro, G., Neuhaus, J.M., Di Sansebastiano, G.P. (2003) Vacuolar system distribution in Arabidopsis tissues, visualized using GFP fusion proteins. *J Exp Bot* 54: 1577–1584.
- Frost, C.J., Mescher, M.C., Carlson, J.E., De Moraes, C.M. (2008) Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiology* 146: 818–824. *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 146: 1293–1304.
- Fu, Z, Q, Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N. (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486: 228–232.
- Furlan, G., Klinkenberg, J., Trujillo, M. (2012) Regulation of plant immune receptors by ubiquitination. *Front Plant Sci* 3: 238
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F.M., De Lorenzo, G., Ferrari, S. (2008) The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 148: 1695–1706.
- Gao, Q-M., Venugopal, S., Navarre, D., Kachroo, A. (2011) Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins. *Plant Physiology* 155: 464–76.

- García Garrido, J.M., Ocampo, J.A. (2002). Regulation of plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot* 53: 1377-1386.
- Gadjev, I., Stone, J.M., and Gechev, T.S. (2008). Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *Int Rev Cell Mol Biol* 270: 87–144.
- Geng, X., Cheng, J., Gangadharan, A., Mackey, D. (2012) The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of *Arabidopsis* defense. *Plant Cell* 24: 4763-74.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E.G., Marín, J.A., Prat, S., Blázquez, M.A., Alabadí, D. (2010) Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol* 27: 1247-1256.
- Gao, X.H., Xiao, S.L., Yao, Q.F., Wang, Y.J., Fu, X.D. (2011) an updated Ga signaling ‘relief of repression’ regulatory model. *Mol Plant* 4: 601–606.
- Gigolashvili, T., Berger, B., Mock, H. P., Müller, C., Weisshaar, B., Flügge, U. I. (2007) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 50: 886–901.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., Rathjen, J.P. (2009) AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr Biol* 19: 423–429.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43: 205–227.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Métraux, J.P., Zhu, T., Katagiri, F. (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J* 34: 217–228.
- Gómez-Gómez, L., Boller, T. (2000). FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 5: 1003-1011.
- Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J. W., Robatzek, S. (2008) Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* 18: 1824-1832.
- Gomez-Gomez, L., Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* 7: 251-256.
- Grant, M., Lamb, C. (2006) Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol* 9: 414–420.
- Grant, M.R., Jones, J.D.G. (2009) Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 324: 750–752.

- Gust, A.A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H.M., Nürnberger, T. (2012) Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends Plant Sci* 17: 495-502.
- Gutjahr, C., Paszkowki, U. (2009) Weights in the balance: JA and SA signaling in root-biotroph interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 763-772.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J. (1996) Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hann, D.R., Rathjen, J.P. (2010) The long and winding road: virulence effector proteins of plant pathogenic bacteria. *Cell Mol Life Sci* 67: 3425–3434.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Sheen, J. (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125: 563–575.
- He, P., Shan, L., Sheen, J. (2007) Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell Microbiol* 9: 1385-1396.
- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M.E., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., Rathjen, J.P. (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 12217-12222.
- Hilbert, M., Voll, M.L., Sharma, M., and Zuccaro A. (2012) Indole derivative production by the root endophyte *Piriformospora indica* is not required for growth promotion but for biotrophic colonization of barley roots. *New Phytol* 196: 520-34.
- Hirano, K., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M. (2008) GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends Plant Sci* 13: 192–199.
- Hou, X., Lee, L.Y.C., Xia, K., Yen, Y., Yu, H. (2010) DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* 19: 884–94.
- Howe, G.A. (2004) Jasmonates as signals in the wound response. *J Plant Growth Regul* 23: 223–237.
- Huffaker, A., Pearce, G., Ryan, C.A. (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 10098–10103.
- Huffaker, A., Ryan, C. A. (2007) Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci, USA* 104: 10732–10736.
- Huffaker, A., Dafoe, N.J., Schmelz, E.A. (2011) ZmPep1, an ortholog of *Arabidopsis* elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance. *Plant Physiol* 155: 1325–1338.



- Hückelhoven, R. (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* 45: 101-127.
- Hückelhoven, R., Kogel, K-H. (2003) Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216: 891–902.
- Indrasumunar, A., Kereszt, A., Searle, I., Miyagi, M., Li, D., Nguyen, C.D.T., Men, A., Carroll, B.J., Gresshoff, P.M. (2010) Inactivation of duplicated *Nod factor receptor 5 (NFR5)* genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Cell Physiol* 51: 201-214.
- Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., Petutschnig, E., Likpa, V., Kogel, K-H., and Schäfer, P. (2011) Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of Arabidopsis roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiol* 156: 726-740.
- Jelenska, J., Van Hal, J.A., Greenberg, J.T. (2010) *Pseudomonas syringae* hijacks plant stress chaperone machinery for virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 13177–82.
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J.T., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R., Becker, D. (2010) Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant J* 62: 367-378.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- Joo, S., Liu, Y., Lueth, A., Zhang, S. (2008) MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J* 54: 129–140.
- Jung, S.C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J.A, Pozo, M.J.(2012) Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *J Chem Ecol* 38: 651-64.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Taklo, K., Minami, E., Shibuya, N. (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 11086–11091.
- Katagiri, F., Tsuda, K. (2010) *Mol Plant Microbe Interact* 23: 1531:1536.
- Karandashov, V., Bucher, M. (2005) Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci* 10: 22-29.
- Khatabi, B., Molitor, A., Lindermayr, C., Pfiffi, S., Durner, J., von Wettstein, D., Kogel, K-H., Schäfer, P. (2012) Ethylene Supports Colonization of Plant Roots by the Mutualistic Fungus *Piriformospora indica*. *PLoS ONE* 7: e35502. doi: 10.1371.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L.J., Takahara, H., Neumann, U., Ver Loren van Themaat, E., O'Connell, R.J. (2012) Sequential Delivery of Host-Induced Virulence Effectors by Appressoria and Intracellular Hyphae of the Phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog* 8: e1002643. doi:10.1371/journal.ppat.1002643.

- Kloppholz, S., Kuhn, H., Requena, N. (2011) A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr Biol* 21: 1204-1209.
- Kogel, K.H., Franken, P., Hückelhoven, R. (2006) Endophyte or parasite – what decides? *Curr Opin Cell Biol* 9: 358–363.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F.C., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* 147: 1358–1368.
- Krol E., Mentzel T., Chinchilla D., Boller T., Felix G., Kemmerling B., Postel S., Arents M., Jeworutzki E., Al-Rasheid K.A., Becker D., Hedrich R. (2010) Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue At-PEPR2. *J Biol Chem* 285: 13471-13479.
- Klute, A. (2011) Detection and characterization of secreted proteins from *Piriformospora indica* during *Arabidopsis* roots colonization. Dissertationsschrift. Justus-Liebig Universität, Giessen.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G. (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16: 3496-3507.
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P., Staskawicz, B., Jones, J.D., Zipfel, C. (2010) Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat Biotechnol* 28: 365-369.
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251–275.
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H., Kunkel, B.N. (2006) The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 789–800.
- Lee, J., Rudd, J.J., Macioszek, V.K., Scheel, D. (2004) Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley. *J Biol Chem* 279: 22440–22448.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S., Schulze-Lefert, P. (2005) Pre- and postinvasion defences both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310: 1180-1183.
- Liu, J., Blaylock, L.A., Endre, G., Choc, J., Town, C.D., Vanden Bosch, K.A., Harrison, M.J. (2003) Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* 15: 2106–2123.

- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D., Harrison, M.J. (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J* 50: 529 – 544.
- Liu, Y., Zhang, S. (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 3386–3399.
- Livak, K.J., Schmittgen, K.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Lohmann, G. V., Shimoda, Y., Nielsen, M. W., Jorgensen, F. G., Grossmann, C., Sandal, N., Sorensen, K., Thirup, S., Madsen, L. H., Tabata, S., Sato, S., Stougaard, J., Radutoiu, S. (2010) Evolution and regulation of the *Lotus japonicus* LysM receptor gene family. *Mol Plant-Microbe Interact* 23: 510-521.
- Lopez-Gomez, M., Sandal, N., Stougaard, J., Boller, T. (2012) Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *J Exp Bot* 63: 393-401.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165–178.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., Solano, R. (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 1938–1950.
- Lu, D.P., Wu, S.J., Gao, X.Q., Zhang, Y.L., Shan, L.B., He, P. (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *PNAS USA*, 107: 496–501.
- Lu, D., Lin, W., Gao, X., Wu, S., Cheng, C., Avila, J., Heese, A., Devarenne, T.P., He, P., Shan, L. (2011) Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science* 332: 1439–1442.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J.r.m., Flors, V., Mauch-Mani, B., Ton, J. (2011) Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *Mol Plant-Microbe Interact* 24: 183-193.
- Luo, H., Laluk, K., Lai, Z., Veronese, P., Song, F., Mengiste, T. (2010) The Arabidopsis Botrytis Susceptible1 Interactor defines a subclass of RING E3 ligases that regulate pathogen and stress responses. *Plant Physiol* 154: 1766–1782.
- Ma, Y., Walker, R.K., Zhao, Y., Berkowitz, G.A. (2012) Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation and downstream immune signaling in plants. *Proc Natl Acad Sci, USA* doi: 10.1073/pnas.1205448109.
- Macho, A.P., Boutrot, F., Rathjen, J.P., Zipfel, C. (2012) Aspartate oxidase plays an important role in Arabidopsis stomatal immunity. *Plant Physiol* 159: 1845-56.

- Madsen, E.B., Antolí'n-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J., Vieweg, S., Broghammer, A., Krusell, L., Radutoiu, S., Jensen, O.N., Stougaard, J., and Parniske, M. (2011) Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signaling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J* 65: 404–417.
- 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: 637-640.
- Maillet, F., Poinso, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E.A., Driguez, H., Bécard, G., Dénarié, J. (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58-63.
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., Zhang, S. (2011) Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 1639–1653.
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., Pauly, N. (2012) A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci* 17: 9-15.
- Martin, F., Aerts, A., Ahren, D., Brun, A., Danchin, E.G.J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Martin, F.; Aerts, A.; Ahren, D.; Brun, A.; Danchin, E. G. J.; Duchaussoy, F.; Gibon, J.; Kohler, A.; Lindquist, E.; Pereda, V.; Salamov, A., Shapiro, H. J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buee, M., Brokstein, P., Canback, B., Cohen, D., Courty, P. E., Coutinho, P. M., Delaruelle, C., Detter, J. C., Deveau, A., DiFazio, S., Duplessis, S., Fraissinet-Tachet, L., Lucic, E., Frey-Klett, P., Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P. J., Jain, P., Kilaru, S., Labbe, J., Lin, Y. C., Legue, V., Le Tacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., Niculita-Hirzel, H., Oudot-Le Secq, M. P., Peter, M., Quesneville, H., Rajashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., Kues, U., Lucas, S., Van de Peer, Y., Podila, G. K., Polle, A., Pukkila, P. J., Richardson, P. M., Rouze, P., Sanders, I. R., Stajich, J. E., Tunlid, A., Tuskan, G., Grigoriev, I. V. (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452: 88–92.
- Medina, H.M.J., Gagnon, H., Piché, Y., Ocampo, J.A., García Garrido, J.M., Vierheilig, H. (2003) Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Sci* 164: 993–998.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298–300.
- 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.
- Melotto, M., Underwood, W. He, S.Y. (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol* 46: 101–122.

- Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B.P., Talbot, N.J. (2012) Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *PLoS Pathog* 24: 322-335.
- Mersmann, S., Bourdais, G., Rietz, S. and Robatzek, S. (2010) Ethylene signalling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiol* 154: 391-400.
- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D., Ausubel, F.M. (2010) Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell* 22: 973-990.
- Mishina, T.E., Zeier, J. (2007) Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J* 50: 500-513.
- Mithöfer, A., Fliegmann, J., Neuhaus-Url, G., Schwarz, H., Ebel, J. (2000) The hepta- $\beta$ -glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biol Chem* 381: 705-713.
- 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: 19613-19618.
- Molitor, A., Zajic, D., Voll, L.M., Pons-Kuhnemann, J., Samans, B., Kogel, K-H., Waller, F. (2011) Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and *Piriformospora indica*-mediated systemic induced resistance to powdery mildew. *Mol Plant Microb Interact* 24: 1427-1439.
- Monaghan, J., Zipfel, C. (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* 15: 349-357.
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N. Deising, H.B. (2008) The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *J Plant Physiol* 165: 41-51.
- Nakagawa, T., Kaku, H., Shimoda, Y., Sugiyama, A., Shimamura, M., Takanashi, K., Yazaki, K., Aoki, T., Shibuya, N., Kouchi, H. (2011) From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J* 65: 169-180.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, 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.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., Jones, J.D. (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* 135: 1113-1128.

- Nicaise, V., Roux, M., Zipfel, C. (2009) Recent advances in plant-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors (PRRs) watch over and raise the alarm. *Plant Physiol* 150: 1638-47.
- Nickstadt, A., Thomma, B.P.H.J., Feussner, I., Kangasjarvi, J., Zeier, J., Loeffler, C., Scheel, D., Berger, S. (2004) The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Mol Plant Pathol* 5: 425–434.
- Nomura, K., DebRoy, S., Lee, Y.H., Pumplin, N., Jones, J., He, S.Y. (2006) A Bacterial Virulence Protein Suppresses Host Innate Immunity to Cause Plant Disease. *Science* 313: 220-223.
- Nürnberg, T., Brunner, F. (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* 5: 318-324.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198:249–266.
- Nürnberg, T., Kemmerling, B. (2006) Receptor protein kinases – pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci* 11: 519-22.
- Nürnberg, T., Lipka, V. (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol* 6: 335-345.
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78: 449–460.
- O'Brien, J.A., A. Daudi, P. Finch, V.S. Butt, J.P. Whitelegge, P. Souda, F.M. Ausubel G.P. Bolwell (2012) A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defence. *Plant Physiol* 158: 2013-2017.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G. (2008) Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by  $Ca^{2+}$  and phosphorylation. *J of Biol Chem* 283: 8885–8892.
- Op den Camp, R., Streng, A., De Mita, S., Cao, Q., Polone, E., Liu, W., Ammiraju, J.S., Kudrna, D., Wing, R., Untergasser, A., Bisseling, T., Geurts, R. (2011) LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science* 331: 909-912.
- Papadopoulou, K., Melton, R.E., Legett, M., Daniels, M.J., Osbourn, A.E. (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 12923-12928.
- Park, C-J., Cadell, D.F., Ronald, P. (2012) Protein phosphorylation in plant immunity: insights into the regulation of pattern recognition receptor-mediated signaling. *Front Plant Sci* doi: 10.3389/fpls.2012.00177.

- Parniske, M. (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* 6: 763-775.
- Pel, M.J.C. Pieterse, C.M.J. (2012) Microbial recognition and evasion of host immunity. *J Exp Bot* doi: 10.1093/jxb/ers262.
- Peng, J. R. (2009) Gibberellin and jasmonate crosstalk during stamen development. *J Integr Plant Biol* 51: 1064–1070.
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Metraux, J.-P. Broekaert, W.F. (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 2103–2113.
- Peškan-Berghöfer, T., Shahollari, B., Giang, P.H., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V., Varma, A.K. Oelmüller, R. (2004) Association of Piriformospora indica with Arabidopsis thaliana roots represents a novel system to study beneficial plant–microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmatic reticulum and at the plasma membrane. *Physiol Plant* 122: 465–477.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E. (2000) Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103: 1111–1120.
- Petersen, L.N., Ingle, R.A., Knight, M.R., Denby, K.J. (2009) OXI1 protein kinase is required for plant immunity against Pseudomonas syringae in Arabidopsis. *J Exp Bot* 60: 3727–3735.
- Pham, G.H., Singh, A., Malla, R., Kumari, M., Prasad, R., Sachdev, M., Rexer, K.H., Kost, G., Luis, P., Kaldorf, M., Buscot, F., Herrmann, S., Peskan, T., Oelmüller, R., Saxena, A.K., Declerck, S., Mittag, M., Stabentheiner, E., Hehl, S., Varma, A. (2004) Interaction of Piriformospora indica with diverse microorganisms and plants. In: Varma A, Abbot L, Werner D, Hamp R (eds) Plant surface microbiology, Springer, Berlin, pp. 237–264.
- Pieterse, C. M. J., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S. C. M. (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055.
- Pieterse, C.M.J., Van Loon, L.C. (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 7: 456–464.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M. (2009) Networking by small-molecules hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308–316.
- Pitzschke, A., Schikora, A., Hirt, H. (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 12: 421–426.
- Postel, S., Kemmerling, B. (2009) Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Semin Cell Dev Biol*. 9: 1025-31.

- Postel, S., Küfner, I., Beuter, C., Mazzotta, S., Schwedt, A., Borlotti, A., Halter, T., Kemmerling, B., Nürnberger, T. (2010) The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in Arabidopsis development and immunity. *Eur J Cell Biol* 89: 169–174.
- Pozo, M.J., Azcón-Aguilar, C. (2007) Unravelling mycorrhiza induced resistance . *Curr Opin Plant Biol* 10: 393 – 398.
- Pozo, M. J., Jung, S.C., López-Ráez, J.A., Azcón-Aguilar, C. Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defence mechanisms. *In: Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, 2nd Edition Springer-Verlag Heidelberg pp. 193-208.
- Pré, M., Atallah, M., Champion, A., Vos, M., Pieterse, C.M.J., Memelink, J. (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* 147: 1347–1357.
- Qi, Z., Verma, R., Gehring, C., Yamaguchi, Y., Zhao, Y.C., Ryan, C.A., Berkowitz, G.A. (2010) Ca(2+) signaling by plant Arabidopsis thaliana Pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca(2+) channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 21193–21198.
- Qiang, X., Zechmann, B., Reitz, M. U., Kogel, K-H., Schäfer, P. (2012a) The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes *Arabidopsis* roots by inducing an endoplasmic reticulum stress-triggered caspase-dependent cell death. *Plant Cell* 24: 794–809.
- Qiang, X., Weiss, M., Kogel, K-H., Schäfer, P. (2012b) *Piriformospora indica*- a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. *Mol Plant Pathol* 5: 508-518.
- Qiu, J-L., Zhou, L., Yun, B-W., Nielsen, H.B., Fiil, B.K., Petersen, K., MacKinlay, J., Loake, G.J., Mundy, J., Morris, P.C.(2008) Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol* 148: 212-222.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J. (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J., Scheel, D. (2011) Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant J* doi: 10.1111/j.1365–313X.2011.04671.
- Ranf, S., Wunnenberg, P., Lee, J., Becker, D., Dunkel, M., Hedrich, R., Scheel, D., Dietrich, P. (2008) Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca<sup>2+</sup> signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J* 53: 287-299.
- Redecker, D., Morton, J.B., Bruns, T.D. (2000) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol Phylogenet Evol* 14: 276-284.



- Redman, R.S., Dunigan, D.D., Rodriguez, R.J. (2001) Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? *New Phytol* 151:705-716.
- Ren, D., Liu, Y., Yang, K.-Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., Zhang, S. (2008) A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 5638–5643.
- Rentel, M.C., Knight, M.R. (2004) Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 135: 1471-1479.
- Robatzek, S., Bittel, P., Chinchilla, D., Kochner, P., Felix, G., Shiu, S.H., Boller, T. (2007) Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Mol Biol* 64: 539-547.
- Riedel, T., Groten, K., Baldwin, I.T. (2008) Symbiosis between *Nicotiana attenuata* and *Glomus intraradices*: ethylene plays a role, jasmonic acid does not. *Plant Cell Environ* 31: 1203-1213.
- Robatzek, S., Chinchilla, D., Boller, T. (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev* 20: 537–542.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., Jones, J. D. (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 49: 317–343.
- Rodriguez, M.C., Petersen, M., Mundy, J. (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61: 621-649.
- Rodriguez, R., Redman, R. (2008) More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *J Exp Bot* 59: 1109-1114.
- Rodriguez, R.J., Redman, R.S., Henson, J.M. (2004) The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 9: 261–272.
- Rodriguez, R.J., White, J.F., Arnold, A.E., Redman, R.S. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* 182: 314–330.
- Ron, M., Avni, A. (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* 16: 1604–1615.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F. G., Tör, M., de Vries, S., Zipfel, C. (2011) The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* 23: 2440–2455.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., Shen, Q.J. (2010) WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* 15: 247-258.

- Ryan, C.A., Huffaker, A., Yamaguchi, Y. (2007) New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cell Microbiol* 9: 1902–1908.
- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vögeli-Lange, R., Aeschbacher, R.A., Lang, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D.R., Böller, T. (2000) Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 763–777.
- Saville, R.J., Gosman, N., Burt, C.J., Makepeace, J., Steed, A., Corbitt, M., Chandler, E., Brown, J.K.M., Boulton, M.I., Nicholson, P. (2012) The ‘Green Revolution’ dwarfing genes play a role in disease resistance in *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. *J Exp Bot* 63: 1271–1283.
- Schäfer, P., Kogel, K.H. (2009) The sebacinoid fungus *Piriformospora indica*: an orchid mycorrhiza which may increase host plant reproduction and fitness. *The Mycota, Vol. 5, Plant Relationships*. H.B., Deising, K., Esser, eds. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 99-112.
- 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: 461–474.
- Schulz, B., Boyle, C. (2005) The endophytic continuum. *Mycol Res* 109: 661–687.
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G., Chinchilla, D. (2010) Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem* 285: 9444-94451.
- Schulze-Lefert, P., Panstruga, R. (2011) A molecular concept connecting nonhost-resistance and pathogen speciation. *Trends Plant Sci* 16: 117-125.
- Schwechheimer, C., Willige, B.C. (2009) Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr Opin Plant Biol* 12: 57–62.
- Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Scheikl, E., Teige, M., Doczi, R., Hirt, H., Schwanninger, M., Kant, M., Schuurink, R., Mauch, F., Buchala, A., Cardinale, F., Meskiene, I. (2007) The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2213-24.
- Schwessinger, B., Ronald, P. (2012) Plant innate immunity: Perception of conserved microbial signatures. *Annu Rev Plant Biol.* 63: 451–82.
- Schwessinger, B., Zipfel, C., 2008. *Curr Opin Plant Biol* 11: 389-395.
- Segarra, G., Van der Ent, S., Trillas, I., Pieterse, C. M. J. (2009) MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol* 11: 90–96.

- Segonzac, C., Feike, D., Gimenez-Ibanez, S, Hann, D.R., Zipfel, C., Rathjen, J.P. (2011) Hierarchy and Roles of Pathogen-Associated Molecular Pattern-Induced Responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* 156: 687-699.
- Segonzac, C., Zipfel, C. (2011) Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr Opin Microbiol* 14: 54-61.
- Serfling, A., Wirsal, 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.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.C., Nürnberger, T., Martin, G.B., Sheen, J. (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* 4: 17–27.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., Shibuya, N. (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J* 64: 204–214.
- Sieber, T.N. (2002) Fungal root endophytes In: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (eds) *The hidden half*. Dekker, New York, pp. 887–917.
- Silipo A., Erbs G., Shinya T., Dow J.M., Parrilli M., Lanzetta R., Shibuya N., Newman M.A., Molinaro A. (2010) Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology* 20: 406–419.
- Silverstone, A.L., Jung, H., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., Sun, T. (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* 13: 1555–1565.
- Smith, S.E., Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Cambridge, UK.
- Smith, S, E., Jakobsen, I., Grønlund, M., Smith, F.A. (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol* 3: 1050-105.
- Spoel, S.H., Johnson, J.S., Dong, X. (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci, USA* 104: 18842–18847.
- Spoel, S.H., Dong, X. (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* 3: 348–351.
- Stegmann, M., Anderson, R.G., Ichimura, K., Pecenkova, T., Reuter, P., Zarsky, V., McDowell, J.M., Shirasu, K., Trujillo, M. (2012) The Ubiquitin Ligase PUB22 Targets a Subunit of the Exocyst Complex Required for PAMP-Triggered Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 4703-4716.

- Stein, E., Molitor, A., Kogel, K.-H., Waller, F. (2008) Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiol* 49: 1747–1751.
- Stone, J.K., Polishook, J.D., White, J.R.J. (2004) Endophytic fungi. In: Mueller, G., Bills, G.F., Foster, M.S., eds. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Burlington, MA, USA, Elsevier, 241–270.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., Krysan, P.J. (2007) MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* 143: 661–669.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X. (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952–956.
- Tameling, W.I.L., Takken, F.L.W. (2008) Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur J Plant Pathol* 121: 243–255.
- Tena, G., Boudsocq, M., Sheen, J. (2011) Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Curr Opin Plant Biol* 14: 519–529.
- Thaler, J.S., Humphrey, P. S., Whiteman, N.K. (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* 17: 260–270.
- Thomma, B.P., Nurnberger, T., Joosten, M.H. (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23: 4–15.
- Thordal-Christensen, H. (2003) Fresh insight into processes of non host resistance. *Curr Opin Plant Biol* 6: 351–357.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* 11: 1187–1194.
- Torres, M.A., Jones, J.D., Dangl, J.L. (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141: 373–378.
- Trujillo, M., Ichimura, K., Casais, C., Shirasu, K. (2008) Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 18: 1396–1401.
- Tsuda, K., Katagiri, F. (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 13: 459–465.
- 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.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., Katagiri, F. (2009) Network Properties of Robust Immunity in Plants. *PLoS Genet* 5: e1000772.

- Underwood, W., Zhang, S., He, S.Y. (2007) The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 52: 658-672.
- Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B.N., Anand, A., Mysore, K.S., Bender, C.L. (2007) The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 955-965.
- Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Urbanczyk-Wochniak, E., Ishiga, T., Mysore, K.S., Bender, C.L. (2008) Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. tomato on tomato seedlings: Phenotypic and gene expression analyses of the virulence function of coronatine. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 383-395.
- Vadassery, J., Ranf, S., Drzewiecki, C., Mithofer, A., Mazars, C., Scheel, D., Lee, J., Oelmüller, R. (2009) A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *Plant J* 59: 193-206.
- Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J. (2009a) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochem* 70: 1581-88.
- Van der Ent, S., Van Hulten, M.H.A., Pozo, M.J., Czechowski, T., Udvardi, M.K., Pieterse, C.M.J., Ton, J. (2009b) Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and  $\beta$ -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytol* 183: 419-431.
- Van der Ent, S., Verhagen, B.W.M., Van Doorn, R., Bakker, D., Verlaan, M.G., Pel, M.J.C., Joosten, R.G., Proveniers, M.C.G., Van Loon, L.C., Ton, J. (2008) MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146: 293-1304.
- 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.M., Van der Ent, S., Pieterse, C.M.J. (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol* 11: 443-48.
- Verhage, A., van Wees, S.C.M., and Pieterse, C.M.J. (2010) Plant immunity: It's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiol* 154: 536-40.
- Verhagen, B. W. M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H. S., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J. (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 895-908.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K., 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* 90:896-903.

- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., Klessig, D.F. (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47: 177–206.
- Wager, A., Browse, J. (2012) Social network: JAZ protein interactions expand our knowledge of jasmonate signaling. *Front Plant Sci* doi: 10.3389/fpls.2012.00041.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodo, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, 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.
- Wang, D., Pajeroska-Mukhtar, K., Hendrickson Culler, A., Dong, X. (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* 17: 1784–1790.
- Weiss, M., Se losse, M.A., Rexer, K.H., Urban, A., Oberwinkler, F. (2004) *Sebacinales*: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycol Res* 108: 1003–1010.
- Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., Newman, M.A., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J.J., Cullimore, J.V., Jehle, A.K., Götz, F., Kulik, A., Molinaro, A., Lipka, V., Gust, A.A., Nürnberger T. (2011) *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 19824-19829.
- Wilson, R.N., Heckman, J.W., and Somerville, C.R. (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol* 100: 403–408.
- Williams, B., Kabbage, M., Kim, H-J., Britt, R., Dickman, M.B. (2011) Tipping the Balance: *Sclerotinia sclerotiorum* Secreted Oxalic Acid Suppresses Host Defenses by Manipulating the Host Redox Environment. *PLoS Pathog* 7: e1002107. doi:10.1371.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., Zhou, J. M. (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* 18:74-80.
- Yadav, V., Kumar, M., Deep, D.K., Kumar, H., Sharma, R., Tripathi, T., Tuteja, N., Saxena, A.K., Johri , A.K. (2010) A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. *J Biol Chem* 34: 26532–26544
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A. (2011) Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 14: 351–357.
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A.C., Tax, F.E., Ryan, C.A. (2010) PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 508–522.

- Yamaguchi, Y., Pearce, G., Ryan, C.A. (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 10104–10109.
- Zamioudis, C., Pieterse, C.M.J. (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant-Microbe Interact* 25: 139-150.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X., Zhou, J. M. (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* 1: 175–185.
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S. (2010) Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe* 7: 290-301.
- Zhang, Z.L., Ogawa, M., Fleet, C.M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J.O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., Sun, T.P. (2011) Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2160–2165.
- Zipfel, C. (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* 20: 10-16.
- Zipfel, C. (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 12: 414-420.
- Zipfel, C., Felix, G. (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* 8: 353-360.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., Felix, G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125: 749-760.
- Zipfel, C., Robatzek, S. (2010) PAMP-triggered immunity: veni, vidi, ...? *Plant Physiol* 154: 551-554.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G., Boller, T. (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* 428: 764-767.
- Zuccaro, A., Lahrmann, U., Güldener, U., Langen, G., Pfiffi, S., Biedenkopf, D., Wong, P., Samans, B., Grimm, C., Basiewicz, M., Murat, C., Martin, F., Kogel, K-H. (2011) Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathog* 7(10): e100229.
- 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: 543-550

## **Eidesstattliche Erklärung**

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.

---

Gießen, Datum

---

Sophie Jacobs



## Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und dessen Bemühungen.

Ein ganz besonders großer Dank geht an Prof. Dr. Patrick Schäfer, für dessen exzellente fachliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft, die vielen kreativen Ideen und seine persönliche Bereitschaft mich zu motivieren. Merci Paddy!

Weiterhin danke ich für die kompetente technische Unterstützung im täglichen Laboralltag: Rebekka Fensch, Christina Neumann, Dagmar Biedenkopf, Martina Claar sowie Elke Stein. Insbesondere danke ich hier Rebekka, dass ich mich immer auf sie verlassen durfte.

Danke auch an meine Bürokollegen Adam und Thimo, ich werde die lustigen Stunden mit Euch nicht vergessen.

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 ganz besonders Anna Klute und ihrer anpackenden und geduldigen Art! Merci Anna!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei Edith und Leni bedanken, die mich während meines Studiums sowie dieser Arbeit täglich unterstützt haben und auf die ich mich immer verlassen konnte.

DANKE