

***Piriformospora indica*: Systemische Resistenz, Wachstumseffekte und Wechselwirkungen in der Wurzel**

Molekularbiologische und morphologische Analysen
der Interaktion des Endophyten
mit
Gerste (*Hordeum vulgare*) und
Arabidopsis thaliana

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

durchgeführt am
Institut für Phytopathologie
und Angewandte Zoologie

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Alexandra Molitor

Gießen, Mai 2009

Dekanin: Prof. Dr. Ute Leonhäuser
1. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel
2. Gutachter: Prof. Dr. Aart van Bel

... denn ich wollte es wissen!

FÜR MEINE ELTERN

TEILE DIESER ARBEIT SIND ODER WERDEN VERÖFFENTLICHT

VERÖFFENTLICHT:

STEIN E¹, **MOLITOR A**¹, KOGEL KH & WALLER F. (2008). Systemic resistance in Arabidopsis conferred by the mycorrhiza fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiol.* 49:1747-1751.

¹ gemeinsame Erstautorenschaft

MOLITOR A & KOGEL KH. (2009). *Piriformospora indica* triggered systemic resistance. *Plant Signaling Behavior*. 4:215-216. (Article Addendum)

FELLE H, WALLER F, **MOLITOR A**, KOGEL KH. The mycorrhiza fungus *Piriformospora indica* induces fast root surface pH signalling and primes systemic alkalisation of the leaf apoplast upon powdery mildew infection. *Mol Plant Microbe Interact.* in Druck.

EINGEREICHT:

KHATABI B, **MOLITOR A**, KANNANGARA G, LINDERMAYR C, DURNER J, VON WETTSTEIN D, KOGEL KH & SCHAEFER P. A simplified transcript-based subtractive hybridization assay identifies ethylene as compatibility factor in mutualistic plant root-*Piriformospora indica* symbioses. *Mol Plant Microbe Interact.* eingereicht.

IN VORBEREITUNG:

MOLITOR A, PONS J, KOGEL KH & WALLER F. Barley transcriptome analysis after powdery mildew attack reveals priming of PR genes as a mechanism of mycorrhiza-induced systemic resistance. Manuskript in Vorbereitung.

ZECHMANN B, **MOLITOR A**, KOGEL KH, SCHÄFER P. The biotrophic and cell death-dependent lifestyle of the mutualistic basidiomycete *Piriformospora indica* in Arabidopsis – an ultrastructural survey. Manuskript in Vorbereitung.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	MUTUALISTISCHE PFLANZE-PILZ BEZIEHUNGEN	1
1.1.1	Grundlagen mutualistischer Interaktionen zwischen Pflanzen und Mykorrhizapilzen.	3
1.1.2	<i>Piriformospora indica</i>	4
1.2	PFLANZE-PATHOGEN-BEZIEHUNGEN	7
1.2.1	Wirts- und Nichtwirtsresistenz.....	7
1.2.2	Pflanzliche Resistenz- und Abwehrmechanismen.....	8
1.2.3	Das pflanzliche Immunsystem: Feinderkennung.....	11
1.3	SYSTEMISCH INDUZIERTER RESISTENZ	13
1.3.1	Auslöser und Signalwege induzierter systemischer Resistenz	15
1.3.2	<i>Priming</i> : Grundlage induzierter Resistenz	17
1.4	MEHLTAU – EINE AGRONOMISCH RELEVANTE PFLANZENKRANKHEIT.....	18
1.4.1	Entwicklung von <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> auf Gerste	19
1.4.2	Entwicklung von <i>Golovinomyces orontii</i> auf <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	24
2.1	PFLANZENMATERIAL UND ANZUCHTBEDINGUNGEN	24
2.1.1	<i>Hordeum vulgare</i> (Gerste).....	24
2.1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.2	KULTIVIERUNG UND ERHALTUNG VERWENDETER PILZSTÄMME.....	27
2.2.1	<i>Piriformospora indica</i>	27
2.2.2	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> A6 (<i>Bgh</i>).....	27
2.2.3	<i>Golovinomyces orontii</i>	28
2.2.4	<i>Fusarium graminearum</i>	28
2.3	INOKULATION VON PFLANZENWURZELN MIT <i>P. INDICA</i>	28
2.3.1	Inokulation mit einer Chlamydosporenlösung.....	28
2.3.2	Inokulation mit Myzel.....	29
2.4	PATHOGENINOKULATION UND BONITIERUNG DES BEFALLS	29
2.4.1	Inokulation und Bonitierung des Befalls von <i>Arabidopsis</i> mit <i>G. orontii</i>	29
2.4.2	Inokulation und Resistenztests von Gerste mit <i>Bgh</i>	30
2.4.3	Inokulation von Gerstewurzeln mit <i>Fusarium</i>	30
2.5	FIXIER- UND FÄRBEMETHODEN.....	31
2.5.1	Fixierung und Entfärbung von Pflanzenmaterial.....	31
2.5.2	Färbung pilzlicher Strukturen.....	31

2.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN.....	32
2.6.1	DNA-Extraktion.....	32
2.6.2	RNA-Extraktion.....	33
2.6.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA- und DNA-Proben.....	34
2.6.4	cDNA-Synthese.....	34
2.6.5	Standard Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
2.6.6	Quantitative Real-Time PCR (qPCR).....	35
2.6.7	<i>E. coli</i> -Transformation.....	36
2.6.8	Plasmidisolierung und Sequenzierung.....	37
2.7	TRANSIENT INDUCED GENE SILENCING (TIGS)	37
2.7.1	Klonierung der RNAi-Konstrukte	37
2.7.2	Partikelbombardement	40
2.8	UNTERSUCHUNG SYSTEMISCHER UND LOKALER EFFEKTE IM SYSTEM <i>H. VULGARE</i> - <i>P. INDICA</i>	41
2.8.1	Analyse <i>P. indica</i> -induzierter morphologischer Veränderungen.....	41
2.8.2	Transkriptomanalyse von Gerstenblättern.....	42
2.8.2.1	Anzucht und Inokulation des Pflanzenmaterials für die Arrayanalysen	42
2.8.2.2	Synthese von biotinmarkierter cRNA und Hybridisierung der Mikroarrays	43
2.8.2.3	Auswertung und Überprüfung der Mikroarrayexperimente.....	43
2.8.3	Mehltau kinetiken	44
2.8.4	Analyse des Einflusses von <i>P. indica</i> in einer <i>NPR1</i> -RNAi-Gerstenlinie.....	45
2.8.5	Resistenztests mit in Hydrokultur angezogenen Pflanzen	45
2.9	UNTERSUCHUNG SYSTEMISCHER UND LOKALER EFFEKTE IM SYSTEM <i>P. INDICA</i> – <i>A. THALIANA</i>	46
2.9.1	Analyse des Einflusses von <i>P. indica</i> auf das Wurzelwachstum	46
2.9.2	Quantifizierung der Wurzelbesiedlung mit <i>P. indica</i> in Arabidopsis.....	46
2.9.2.1	Quantifizierungsversuche im Sand:Oil Dri [®] -Gemisch (Topfkultur).....	47
2.9.2.2	Quantifizierungsversuche unter sterilen Bedingungen auf Agarplatten.....	47
2.9.3	Analyse <i>P. indica</i> -induzierter systemischer Resistenz in Arabidopsis.....	48
2.9.4	Expressionsstudien ausgewählter Gene in Arabidopsisblättern.....	48
2.10	PRIMERSEQUENZEN.....	49
3	ERGEBNISSE	51
3.1	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN INDUZIERT DURCH <i>P. INDICA</i>	51
3.1.1	Einfluss von <i>P. indica</i> auf die Morphologie und Entwicklung von Gerste	51
3.1.2	Einfluss von <i>P. indica</i> auf die Wurzelmorphologie von Arabidopsis	56

3.2	TRANSKRIPTOMANALYSE <i>BGH</i> -INOKULierter GERSTENBLÄTTER	58
3.2.1	<i>Bgh</i> -regulierte Gene.....	59
3.2.2	<i>P. indica</i> -regulierte Gene.....	61
3.3	DETAILLIERTE ANALYSE DER <i>P. INDICA</i> -INDUZIERTEN SYSTEMISCHEN RESISTENZ IN GERSTE	67
3.3.1	Analyse des Expressionsmusters zeitgleich durch <i>P. indica</i> und <i>Bgh</i> induzierter Gene	67
3.3.2	Analyse des Einflusses von <i>P. indica</i> auf das Expressionsmuster von <i>BCI-7</i> und <i>HSP17.9</i>	70
3.3.3	Analyse des Einflusses ausgewählter Kandidaten auf die <i>Bgh</i> -Penetrationsrate	72
3.3.3.1	Analyse des Einflusses von Contig23097_at auf die <i>Bgh</i> -Penetrationsrate	72
3.3.3.2	Analyse des Einflusses von Conti23773_at auf die Penetrationsrate	74
3.3.4	Analyse der Rolle von NPR1 bei den durch <i>P. indica</i> induzierten Wachstums- und Resistenzeffekten in Gerste.....	76
3.3.5	Analyse der Resistenzinduktion durch abgetötetes <i>P. indica</i> -Myzel	78
3.3.6	Analyse potenzieller Auslöser der <i>P. indica</i> -induzierten Resistenz	79
3.4	ANALYSE <i>P. INDICA</i> -INDUZIERTER SYSTEMISCHER RESISTENZ IN ARABIDOPSIS	83
3.4.1	Analyse der durch <i>P. indica</i> induzierten systemischen Resistenz im Wildtyp und in verschiedenen Signalwegmutanten	83
3.4.2	Systemischer Einfluss von <i>P. indica</i> auf die Genexpression im Blatt.....	86
3.5	ABHÄNGIGKEIT DER WURZELBESIEDLUNG DURCH <i>P. INDICA</i> VOM WIRTSGENOTYP	88
3.5.1	Quantifizierung der Besiedlung durch <i>P. indica</i> 14 Tage nach Inokulation.....	88
3.5.2	Zeitabhängige Quantifizierung der Besiedlung durch <i>P. indica</i>	90
4	DISKUSSION	92
4.1	DER EINFLUSS VON <i>P. INDICA</i> AUF DIE MORPHOLOGIE UND DAS WACHSTUM SEINER WIRTS-PFLANZE: HINTERGRÜNDE UND ZUSAMMENHÄNGE	92
4.2	<i>P. INDICA</i> -INDUZIERTER SYSTEMISCHER RESISTENZ	100
4.2.1	<i>P. indica</i> -induzierte systemische Resistenz in Gerste.....	100
4.2.2	<i>P. indica</i> -induzierte systemische Resistenz in Arabidopsis.....	108
4.2.3	ISR-ähnliche Mechanismen und <i>Priming</i> als Grundlage der durch <i>P. indica</i> induzierten Resistenz.....	113
4.2.4	Etablierung der systemisch durch <i>P. indica</i> induzierten Resistenz: lokale und systemische Auslöser	115
4.3	„BALANCIERTER ANTAGONISMUS“: WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PFLANZLICHER ABWEHR UND PILZLICHERN KOMPATIBILITÄTSFAKTOREN	119
4.4	GESAMTBILD, ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN	127

5	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	129
5.1	ZUSAMMENFASSUNG.....	129
5.2	SUMMARY	131
6	QUELLENVERZEICHNIS	133
6.1	VERZEICHNIS DER WICHTIGSTEN INTERNETSEITEN	133
6.2	LITERATURVERZEICHNIS	133
7	ANHANG.....	153
7.1	SEQUENZEN UND VEKTORKARTEN.....	153
7.1.1	Sequenzen und Primer der RNAi-Konstrukte.....	153
7.1.2	Vektorkarten.....	154
7.2	TRANSKRIPTOMANALYSE.....	155
7.2.1	GC-RMA-Liste <i>P. indica</i> -regulierter Gene ohne Stressfaktor	155
7.2.2	GC-RMA-Liste <i>P. indica</i> -regulierter Gene nach <i>Bgh</i> -Inokulation.....	159
7.3	AUFLISTUNG DER QPCR-ERMITTELTEN EXPRESSIONSWERTE AUS GERSTE.....	161
7.4	DATENZUSAMMENSTELLUNG KONIDIOPHOREN PRO MYZEL	170
7.5	AUFLISTUNG DER QPCR-ERMITTELTEN EXPRESSIONSWERTE AUS ARABIDOPSIS....	170
7.6	EXPRESSIONSWERTE DER QUANTIFIZIERUNG VON <i>P. INDICA</i> IN ARABIDOPSIS	171
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	172
	DANKSAGUNG.....	173

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Aminosäure(n) (<i>amino acid(s)</i>)
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
Amp	Ampicillin
BABA	β -aminobutyric acid
BCI	<i>barley chemically induced</i>
Bgh	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i> (Echter Gerstenmehltau)
bp	Basenpaare
BTH	Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-S-methylester
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
cIR	chemisch induzierte Resistenz
Clm	Chloramphenikol
CM	komplexes (<i>complex</i>) Medium
cv.	Sorte, Kultivar (Cultivar)
dai	Tage nach Inokulation (<i>day(s) after inoculation</i>)
DCINA	2,6-Dichlorisonikotinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESH	SekundärhYPhe (<i>elongated secondary hyphae</i>)
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
ET	Ethylen
f.sp.	forma specialis
hai	Stunden nach Inokulation (<i>hour(s) after inoculation</i>)
HAU	Haustorium
HR	Hypersensitivitätsreaktion
IAA	Indol-3-Essigsäure (<i>indol acetic acid</i>)
IPAZ	Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IR	induzierte Resistenz
ISR	induzierte systemische Resistenz (<i>induced systemic resistance</i>)
JA	Jasmonat (<i>jasmonic acid</i>)
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
LB	Luria Bertani
LRR	<i>leucin-rich-repeat</i>
MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
NPLZ	nicht penetrierte lebende Zelle
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGPF	wachstumsfördernde Pilze (<i>plant growth promoting fungi</i>)
PGPR	wachstumsfördernde Rhizobakterien (<i>plant growth promoting rhizobacteria</i>)
PR	<i>pathogenesis related</i> (Pathogenese-bedingt)

PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
qPCR	quantitative Real-Time PCR
RCI	<i>rice chemically induced</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoff Arten (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-Reaktion	reverse Transkriptase-Reaktion
SA	Salizylsäure
SAR	systemisch ausgelöste Resistenz (<i>systemic aquired resistance</i>)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WCI	<i>wheat chemically induced</i>

1 EINLEITUNG

Die Versorgung einer sich rasch vergrößernden Weltbevölkerung mit ausreichend Nahrungsmitteln als auch rein ökonomische Interessen machen es notwendig, dass die Produktivität in der Landwirtschaft nicht durch negative abiotische (z. B. Trockenheit, Salzstress) oder biotische Faktoren (Insekten, Pflanzenkrankheiten) in Mitleidenschaft gezogen wird. Vor allem die Ausbreitung phytopathogener Organismen in Kulturpflanzen, u. a. bedingt durch die Entwicklung neuer Resistenzen, kann zu erheblichen agronomischen Schäden durch einen Ausfall der gesamten Pflanze oder aber zu einer verminderten Menge bzw. Qualität des Erntegutes führen. Ein Lösungsansatz zum Schutz von Pflanzen gegen abiotischen als auch biotischen Stress ist die Besiedlung mit sich positiv für die Pflanze auswirkenden Mikroorganismen oder Pilzen, wie z. B. dem im Rahmen dieser Arbeit im Fokus stehenden Endophyten *Piriformospora indica*. Die Analyse derartiger natürlicher Symbiosen und die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen und Signalwege bietet zudem die Möglichkeit, neue Ansatzpunkte zur Eindämmung von Pathogenen und für den nachhaltigen Pflanzenschutz zu gewinnen.

1.1 MUTUALISTISCHE PFLANZE-PILZ BEZIEHUNGEN

Intensive und oftmals lange andauernde Interaktionen zwischen verschiedenen Organismenarten werden als Symbiosen (griechisch: sym = „mit“ und biosis = „lebend“) bezeichnet. In seiner breitesten Definition umfasst der Begriff sowohl mutualistische (beiderseitiger Vorteil), kommensale (einseitiger Vorteil ohne negative Effekt auf den Interaktionspartner) als auch parasitäre (einseitiger Vorteil, negative Effekte auf den Interaktionspartner) Wechselwirkungen (LEWIS, 1985; REDMAN et al., 2001). Die strikte Einordnung eines Mikroorganismus in eine der drei Kategorien ist jedoch oftmals nicht möglich, da ein und derselbe Organismus je nach Wirt und äußeren Umständen mutualistisch bis parasitär sein kann (REDMAN et al., 2001). Unabhängig von der Art der Symbiose spricht man von einer kompatiblen Interaktion, wenn ein Mikroorganismus es schafft, eine Pflanze erfolgreich zu besiedeln und sich auf ihr zu vermehren. Ist dies nicht der Fall, wird die Interaktion als inkompatibel bezeichnet (SCHLÖSSER, 1997).

Mutualistische Beziehungen zwischen Pflanzen und Pilzen können sich in verschiedensten Pflanzenorganen ausbilden. So können z. B. Stängel und Früchte von Gräsern durch samenbürtige Endophyten besiedelt werden (SCHARDL et al., 2004). Eine der am besten untersuchten und bei bisher 80 % der untersuchten Pflanzenarten und 92 % der Familien anzutreffende mutualistische Interaktion ist jedoch die Ausbildung von

Mykorrhiza (WANG & QIU, 2006). Als Mykorrhiza (griech: "Pilzwurzel") werden Assoziationen zwischen Pflanzen und Pilzen bezeichnet, die das corticale Wurzelgewebe des Wirts besiedeln. Der Begriff geht auf den Botaniker A. B. Frank (1885) zurück, der die Vergesellschaftung von Bodenpilzen mit verschiedenen Baumarten entdeckte. Diese Art von Symbiose zeichnet sich i. d. R. durch einen bidirektionalen Austausch von pflanzlichen Kohlenstoffprodukten gegen Mineralstoffe aus dem Boden über den Pilz aus (MARSCHNER & DELL, 1994). Nicht alle Mykorrhiza sind jedoch rein mutualistisch (BRUNDRETT, 2004).

Entsprechend des Besiedlungsmusters werden die drei Haupttypen Ekto-, Endo- und Ektendomycorrhiza (PEYRONEL et al., 1969) unterschieden, die sich jedoch noch weiter unterteilen lassen. HARLEY & SMITH (1983) führten ein Klassifikationssystem ein, welches zusätzlich zu den drei Haupttypen noch arbutoide, monotropoide und orchidoide Mykorrhiza unterscheidet.

(1) Bei Ektomykorrhiza umschließt ein pseudoparenchymatisches Hyphengeflecht eine morphologisch stark veränderte Kurzwurzel als „Pilzmantel“ (Hartig'sches Netz). In den Wurzeln dringen die Pilzhyphe interzellulär meist nur in das äußere Rindengewebe bis maximal zur Endodermis vor. Sie umhüllen die Rindenzellen, deren Zellwände nicht sekundär verdickt werden. Die auffälligen Strukturen sind an Kurzwurzeln u. a. bei Nadel- und Laubbäumen, wie z. B. Fichte, Kiefer und Lärche bzw. Birke, Buche und Eiche sichtbar (BRUNDRETT, 2004; NULTSCH, 1996).

(2) Endomykorrhiza zeigen sowohl inter- als auch intrazelluläres Wachstum und bilden teilweise verzweigte Arbuskeln oder elliptische, blasenförmige Vesikel in Rindenzellen aus. Hierbei lassen sich verschiedene Assoziationstypen unterscheiden. Nicht septierte Glomeromycota (SCHÜßLER et al., 2001) bilden die Gruppe der am weitesten verbreiteten, Arbuskeln bildenden, obligat biotrophen **arbuskulären Mykorrhiza (AM)**. AM sind bis heute in weltweit etwa 70-90 % aller Pflanzenarten (PARNISKE, 2008) und auch in Assoziation mit Horn- und Lebermoosen, Bärlap und Farnen gefunden worden (RUSSELL & BULMAN, 2004). Eine weitere Form der Endomykorrhiza stellt die **ericoide Mykorrhiza** dar, die in Assoziation vor allem mit Pflanzen der Ordnung *Ericales* auftritt (STRAKER, 1996). Ascomyceten umhüllen hier die Wurzeln mit einem lockeren Myzel und wachsen in einzelne Wurzelrindenzellen ein, wo sie umfangreiche Knäuel, jedoch keine Arbuskeln ausbilden. Unter den Begriff **orchidoide Mykorrhiza** fallen Assoziationen zwischen Orchideen und Mykorrhizapilzen aus der Gruppe der Basidiomyceten. Sie stellen einen Sonderfall dar, da der pilzliche Partner keine Kohlenstoffverbindungen erhält, sondern solche im Gegenteil über intrazelluläre Hyphenknäuel an die in jungen Entwicklungs-

stadien chlorophylllosen Orchideen abgibt. Die Pilze der orchidoiden Mykorrhiza gehören oftmals zur Formgattung *Rhizoctonia* und können mit anderen Pflanzen auch als Pathogene interagieren (BRUNDRETT et al., 2004; RASMUSSEN et al., 2009).

(3) Ektendomykorrhiza bilden Strukturen sowohl von Ekto- als auch von Endomykorrhiza aus und werden teilweise zu den Ektomykorrhiza gezählt (BRUNDRETT, 2004). Das Hartig'sche Netz ist meist weniger stark ausgebildet, die Hyphen können jedoch Rindenzellen penetrieren. **Arbutoide Mykorrhiza** sind eine Sonderform der Ektendomykorrhiza innerhalb von autotrophen Pflanzen der Unterfamilie Arbutoideae (Ericaceae, z. B. Erdbeerbaum). Multiple Hyphen penetrieren hier die epidermalen Zellen des Hartig'schen Netzes (BRUNDRETT, 2004). **Monotropoide Mykorrhiza** finden sich in der Familie der Monotropaceen (Ordnung Ericales) und umfassen eine kleine Gruppe chlorophyllfreier, myco-heterotropher Pflanzen (z. B. Fichtenspargel/*Monotropa hypopitys*). Individuelle Hyphen penetrieren in dieser Art der Interaktion rhizodermale Zellen und ähnlich der orchidoiden Mykorrhiza ernähren sich die heterotrophen Pflanzen auf Kosten der Mykorrhizapilze (BRUNDRETT, 2004). Hier liegt somit eine ausbeutende Form von Mykorrhiza vor, wie sie von BRUNDRETT (2004) definiert wurde.

Auf die Grundlagen mutualistischer Interaktionen zwischen Pflanzen und Mykorrhizapilzen im Allgemeinen und speziell auf den zu den Sebacinales gehörenden Wurzelendophyten *Piriformospora indica* wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.1.1 GRUNDLAGEN MUTUALISTISCHER INTERAKTIONEN ZWISCHEN PFLANZEN UND MYKORRHIZAPILZEN

Mutualistische Interaktionen von Pilzen und Pflanzen in der Wurzel beruhen vor allem auf einer verbesserten Aufnahme von Mineralstoffen aus dem Boden im Austausch gegen Kohlehydrate (BAGO et al., 2003; MARSCHNER & DELL, 1994; PFEFFER et al., 1999). Für die verbesserte Mineralstoffaufnahme spielt vor allem die Oberflächenvergrößerung durch ein teilweise extensives Hyphennetzwerk und Veränderungen der physikalischen Eigenschaften der Rhizosphäre, d. h. dem unmittelbar durch eine lebende Wurzel beeinflussten Raum im Boden, eine Rolle. Hierdurch wird u. a. die Weiterleitung von Nährstoffen mit geringer Diffusionsrate aus entfernten Bereichen hin zur Pflanze ermöglicht (HARRISON, 1999). Vor allem die Weiterleitung von Phosphaten, die oftmals das Pflanzenwachstum limitieren, ist hier bedeutsam (HARRISON, 1999). Weiterhin verbessern AM die Aufnahme von Stickstoff (CRUZ et al., 2007) und erhöhen die Salz- und Trockenstresstoleranz (FENG et al., 2002). An der Ausbildung dieser Effekte sind teilweise spezifische Veränderungen in der Genexpression der Pflanze beteiligt. So konnte in AM-besiedelten

Wurzeln u. a. eine spezifische Expression von Phosphattransportern, H⁺-ATPasen und eine verstärkte Expression von Aquaporinen festgestellt werden (BUCHER, 2007; KRAJINSKI et al., 2000; 2002). Zudem kann sich die Besiedlung der Wurzeln mit Mykorrhizapilzen auf den Hormonhaushalt der Pflanzen auswirken (ALLEN et al., 1980; 1982; LUDWIG-MÜLLER, 2000).

Aus agronomischer Sicht zeichnet sich die pflanzliche Mykorrhizierung neben einem verstärkten Wachstum der Pflanzen und einhergehenden Ertragssteigerungen (AZCÓN-AGUILAR et al., 1996; AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1997) durch eine Beeinflussung der Pathogenresistenz aus. So kann die Mykorrhizierung eine erhöhte lokale und systemische Resistenz vor allem gegen die Wurzeln aber auch die Blätter angreifende phytopathogene Bakterien, Pilze und Insekten bedingen (CORDIER et al., 1998; GANGE, 2006; LIU et al., 2007; POZO et al., 2002). In anderen Fällen ist jedoch auch von einer erhöhten Suszeptibilität vor allem gegen biotrophe Blattpathogene berichtet worden (DEHNE, 1982; GERNNS et al., 2001; SHAUL et al., 1999).

1.1.2 *PIRIFORMOSPORA INDICA*

Piriformospora indica wurde 1997 aus der Spore eines AM-Pilzes (*Glomus mossae*) aus der Rhizosphäre der Sträucher *Prosopis juliflora* und *Zizyphus nummularia* in der indischen Thar Wüste isoliert (VERMA et al., 1998). Ultrastrukturanalysen der Hyphen (enthalten dolipore Septen) und molekulare Sequenzvergleiche der 18S-RNA oder der nuklearen rDNA-Sequenz für die 5'-terminale Domäne der ribosomalen Großen Unter-einheit (nucLSU) erlaubten eine Klassifizierung von *P. indica* in die Klasse B der Ordnung der Sebacinales (Hymenomyceta, Basidiomycota; VERMA et al., 1998; WEISS et al., 2004). In dieser Klasse zeigt *P. indica* eine enge Verwandtschaft zu der Mehrheit der *Sebacina vermifera*-Isolate. Sebacinales finden sich in Assoziation mit verschiedensten Pflanzenarten, sind weltweit in temperierten, subtropischen und tropischen Regionen anzutreffen und bilden eine sehr heterogene Gruppe bezüglich der ausgebildeten Mykorrhizatypen. Neben autotrophen orchidoiden Mykorrhiza (*Sebacina vermifera*) finden sich in dieser ericoide (z. B. assoziiert mit Salal, *Gaultheria shallon*) und jungermannoide Mykorrhiza (Lebermoos-Mykorrhiza) sowie Ektendomykorrhiza (SELOSSE et al., 2007; WEISS et al., 2004). Für einige Vertreter der Sebacinales konnte zudem eine enge Assoziation mit Bakterien unterschiedlichster Gattungen nachgewiesen werden (SHARMA et al., 2008). Im Falle von *P. indica* zeigte sich hierbei eine enge Verbindung mit dem α -Proteobakterium *Rhizobium radiobacter*.

Das Wirtsspektrum von *P. indica* in höheren Landpflanzen umfasst eine breite Anzahl sowohl mono- als auch dikotyler Pflanzen, z. B. Orchideen (*Dactylorhiza* spp.) Gräser (Poaceae; z. B. Gerste, Mais, Reis, Weizen) und auch die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (ab hier: Arabidopsis) (BLECHERT et al., 1999; PESKAN-BERGHÖFER et al., 2004; VARMA et al., 1999; VERMA et al., 1998; WALLER et al., 2005). Zusätzlich ist *P. indica* axenisch auf komplexem Medium kultivierbar (VERMA et al., 1998).

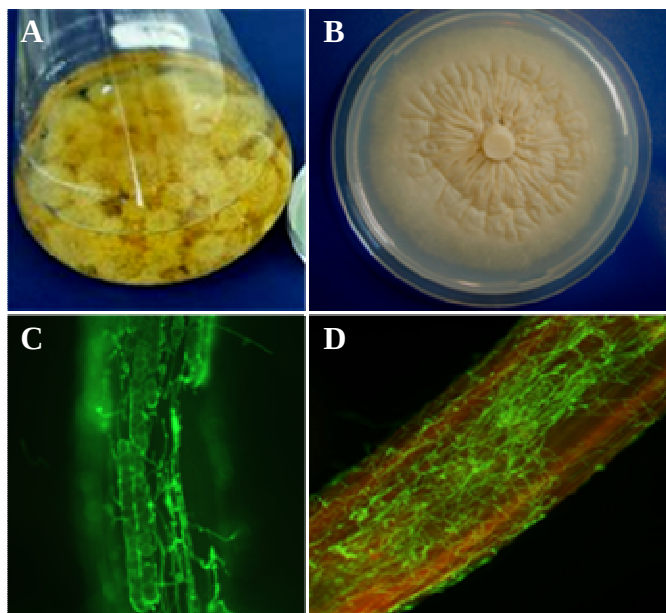


Abb. 1.1-1: *Piriformospora indica*. Wachstum des Pilzes in axenischer Kultur (A, B) und in Pflanzenwurzeln (C, D). (A) Anzucht in flüssigem bzw. (B) auf agarhaltigem Komplexmedium. (C) Sporenbildung in Gerstenwurzeln. (D) Aufsicht auf ein stark besiedeltes Wurzelstück von Arabidopsis. Die Färbung des Pilzes in C und D erfolgte mit WGA Alexa Fluor® 488. Die Wurzel in D wurde durch Kongorot angefärbt. Bild A verändert nach Achatz, 2006.

Die Besiedlung von Pflanzenwurzeln durch *P. indica* beschränkt sich auf die Rhizodermis und das Rindengewebe, wobei inter- und intrazellulär i. d. R. unseptierte Hyphen mit dünnen Zellwänden und einem Durchmesser von 0,7-3,5 μm ausgebildet werden (VERMA et al., 1998). An Hyphenspitzen können sich aus dünnwandigen Vesikeln birnenförmige Chlamydosporen (16-25 μm Länge, 10-17 μm Breite) mit 8-25 Nuklei abschnüren, die sich sowohl extrazellulär auf der Wurzeloberfläche als auch intrazellulär einzeln oder in Gruppen finden (VERMA et al., 1998). Eine Quantifizierung von *P. indica* in verschiedenen Wurzelabschnitten von Gerste zeigte zudem, dass vor allem älteres Gewebe (Wachstums- und Differenzierungszone) im Vergleich zum meristematischen Gewebe der Wurzelspitze kolonisiert wird (DESHMUKH et al., 2006). Kongruent hierzu zeigten sich in der „älteren“ Differenzierungszone inter- als auch intrazelluläre Hyphen und intrazelluläre Chlamydosporen, während in der Wachstumszone zumeist nur interzelluläre Hyphen vorzufinden waren. DESHMUKH und Kollegen (2006) entdeckten zudem,

dass sowohl die Kolonisierung als auch die Sporulation mit dem Zelltod einzelner, penetrierter Wurzelzellen zusammenhängt, obwohl die Kolonisierung ohne Nekrotisierung des Gewebes einhergeht. Im gleichen Zusammenhang konnten sie nachweisen, dass das zelluläre Wachstum von *P. indica* in Gerste mit einer verminderten Expression des Zelltodinhibitors *BAX Inhibitor-1 (HvBI-1)* einhergeht. Gleichzeitig war das pilzliche Wachstum in *HvBI-1* überexprimierenden transgenen Gerstepflanzen inhibiert.

Die Besiedlung von Pflanzen durch *P. indica* geht mit einer Reihe i. d. R. positiver Effekt auf den Wirt einher, wie z. B. einer erhöhten Biomasseproduktion und einer allgemein erhöhten Stresstoleranz. Sowohl in Leguminosen, diversen medizinisch und ökonomisch relevanten Pflanzen (z. B. Gerste) als auch der Modellpflanze Arabidopsis konnte ein gesteigertes Wachstum und eine erhöhte Biomasseproduktion nachgewiesen werden (PESKAN-BERGHÖFER et al., 2004; PHAM et al., 2004b; RAI et al., 2001; VARMA et al., 1999). In Gerste konnten zudem verbesserte Ernteerträge und eine schnellere Entwicklung beobachtet werden. Im Gegensatz zu ähnlichen, durch AM vermittelten Effekten waren die durch *P. indica* induzierten Wachstumsveränderungen in dieser Pflanze zudem unabhängig von zeitgleichem Pathogenbefall oder dem Phosphat- und Stickstoffangebot (ACHATZ et al., eingereicht).

Eine gesteigerte Stresstoleranz aufgrund der Besiedlung durch *P. indica* findet sich sowohl gegenüber abiotischen als auch biotischen Faktoren. So sind z. B. in Zellkultur angezogene Pflanzen resistenter gegen Stress, dem sie beim Umsetzen in Topfkultur ausgesetzt werden (DRUEGE et al., 2007; SAHAY & VARMA 1999; 2000). Zudem konnte in Gerste eine erhöhte Salztoleranz festgestellt werden, die u. a. auf einem Anstieg der Konzentration an Antioxidantien und einer erhöhten Aktivität antioxidativ wirksamer Enzyme in der Wurzel basiert (BALTRUSCHAT et al., 2008; WALLER et al., 2005). Auch kolonisierte Arabidopsispflanzen weisen eine erhöhte Trockenstresstoleranz auf (SHERAMETI et al., 2008a). Eine erhöhte Resistenz gegen biotischen Stress kann durch *P. indica* lokal als auch systemisch induziert werden. In Gerstenwurzeln wurde nachweislich die Ausbreitung der nekrotrophen bzw. hemibiotrophen Pathogene *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* und *Cochliobolus sativus* gehemmt (DESHMUKH & KOGEL, 2007; SCHÄFER et al., 2007; WALLER et al., 2005). Auch Weizenpflanzen zeigten in Gewächshausversuchen eine erhöhte Resistenz gegen *F. culmorum* als auch gegen *Pseudocercospora herpotrichoides* (*Tapesia yallundae*) (SERFLING et al., 2007). Systemische Resistenzeffekte zeigten sich in Gerste- bzw. Weizenblättern durch eine erhöhte Resistenz gegen die biotrophen Blatt-

pathogene *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* bzw. f. sp. *tritici* (SERFLING et al., 2007; WALLER et al., 2005).

1.2 PFLANZE-PATHOGEN-BEZIEHUNGEN

In kompatiblen Wirt-Pathogen-Beziehungen, wenn ein Pathogen den Wirt erfolgreich besiedelt und sich auf ihm vermehrt, wird der Wirt als suszeptibel und das Pathogen als virulent bezeichnet (SCHLÖSSER, 1997). Einen Sonderfall stellt hier die Toleranz von Pflanzen gegenüber Pathogenen dar. Bei diesem Typ der Wechselwirkung, der oft bei Viren auftritt, verursacht der Befall keine starken Krankheitssymptome, obwohl sich das Pathogen in gleichem Maße wie in nicht toleranten Pflanzen vermehrt (AGRIOS, 1997). Im Falle einer inkompatiblen Wechselwirkung, wenn das Eindringen oder die weitere Vermehrung des Mikroorganismus erfolgreich verhindert wird, ist der Wirt resistent und das Pathogen avirulent. Diese Art von Wechselbeziehung zeichnet den Großteil an Interaktionen zwischen Pflanzen und phytopathogenen Mikroorganismen aus (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Hierbei werden verschiedene Resistenztypen unterschieden, (1) die Nichtwirtsresistenz, (2) die rassenspezifische, qualitative Resistenz und (3) die rassenspezifische, quantitative Grundresistenz. Im Folgenden werden diese Typen kurz charakterisiert, um anschließend auf die pflanzlichen Resistenz- und Abwehrmechanismen sowie die Grundlagen der Pathogenerkennung einzugehen.

1.2.1 WIRTS- UND NICHTWIRTSRESISTENZ

Die **Nichtwirtsresistenz** oder Basisinkompatibilität ist eine der am weitesten verbreiteten Arten der Resistenz von Pflanzen gegenüber Mikroorganismen (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Sie zeichnet sich dadurch aus, dass alle Ökotypen einer Pflanzenart gegen alle Rassen eines potenziell pathogenen Mikroorganismus resistent sind (HÜCKELHOVEN, 2007). Wesentliche Gründe, warum Pflanzen gegenüber den meisten potenziellen Pathogenen eine Nichtwirtsresistenz zeigen, sind die physiologischen Ansprüche des Pathogens, die die Wirtspflanze nicht erfüllt (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003), und die oft hochwirksamen präformierten und induzierten chemischen, enzymatischen und strukturellen Abwehrmechanismen der Pflanze (Details siehe Kap. 1.2.2). In der Koevolution von Pflanze und Phytopathogen kann diese Resistenz jedoch von Erregern durchbrochen werden, was zu einer Basiskompatibilität führt. Dabei gelingt es dem Pathogen, die Grundlagen der Nichtwirtsresistenz zu umgehen oder zu unterdrücken.

Im Falle einer Basiskompatibilität können sich in Pflanzen evolutiv erneut Resistenzen entwickeln, man spricht von der **Wirtsresistenz**. Hierbei wird zwischen der rassen- oder sortenunspezifischen (horizontalen oder quantitativen) und der rassen- oder sortenspezifischen (vertikalen oder qualitativen) Resistenz unterschieden, wobei eine klare Trennung der zugrundeliegenden Merkmale nicht immer möglich ist (POLAND et al., 2008). Die quantitative Resistenz ist gegenüber allen Rassen eines Erregers aktiv, der die Basisresistenz überwindet. Aufgrund ihres oftmals polygenen Charakters stellt sie einen relativ dauerhaften, meist jedoch keinen vollständigen Schutz dar (PARLEVLIET, 2002). Die rassenspezifische, qualitative Resistenz wird dagegen monogen vererbt und beruht auf engen Wechselbeziehungen zwischen Wirts- und Erregergenotyp, dem Zusammentreffen eines Resistenzgens auf Seiten der Pflanze mit einem korrespondierenden Avirulenzgen des Pathogens (Gen-für-Gen Modell von FLOR 1955; 1971). Dabei stellt das Resistenzgenprodukt oftmals einen Rezeptor dar, der direkt oder indirekt mit dem Avirulenzgenprodukt (spezifischer Elizitor) interagiert und dadurch eine Resistenzantwort auslöst (Details siehe Kap. 1.2.3). Vor allem Hypersensitivitätsreaktionen (HRs, vgl. Kap. 1.2.2) sind typisch für die qualitative, R-Protein vermittelte Resistenz (EICHMANN & HÜCKELHOVEN, 2008). Qualitative Resistenz kann aber auch auf der Detoxifizierung pilzlicher Toxine (JOHAL & BRIGGS, 1992) oder der Modulation der Abwehrantwort hin zu erhöhter Penetrationsresistenz (z. B. *mlo* in Gerste; BÜSCHGES et al., 1997) beruhen. Diese qualitative Resistenz ist in der Regel vollständig. Der monogene Ursprung bedingt allerdings oftmals eine nur geringe Dauerhaftigkeit in der agronomischen Anwendung. Dies zeigt z. B. der neueste Ausbruch eines gegen relevante R-Gene resistenten Weizen-Schwarzrost-Erregers (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici* Ug99) (STOKSTAD, 2007).

Die für die Ausbildung von Resistenzen grundlegenden Abwehrstrategien der Wirts- und Nichtswirtsresistenz können zum Teil überlappen (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003) und werden im folgenden Kapitel näher beschrieben.

1.2.2 PFLANZLICHE RESISTENZ- UND ABWEHRMECHANISMEN

Grundsätzlich kann schon das Fehlen struktureller oder physiologischer Faktoren, die es dem Pathogen erlauben einen potenziellen Wirt zu erkennen, eine kompatible Wirt-Parasit-Interaktion verhindern (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Ist dies nicht der Fall, können weitere Resistenz- und Abwehrmechanismen in Pflanzen präformiert (konstitutiv) vorliegen oder auch erst nach einem Befall induziert werden.

Präformierte Abwehrmechanismen stellen eine der ersten Linien in der Pflanzenabwehr (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Hierzu zählen mechanische und strukturelle

Barrieren (Kutikula, Zellwände, Haare) oder biochemische und enzymatische Komponenten wie toxisch wirksame Sekundärmetabolite [Phytoanticipine: Terpene (z. B. Saponin), Phenole (z. B. Cumarine), stickstoffhaltige Verbindungen (z. B. Alkaloide, cyanogene Glycoside)] und antimikrobiell wirksame Proteine (z. B. Defensine, Chitinasen, Glukanasen) (HEATH, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2000). Werden diese präformierten Barrieren z. B. durch die Expression detoxifizierender Enzyme überwunden (PAPADOPOULOU et al., 1999), stehen der erfolgreichen Besiedlung eines Wirtes durch ein Pathogen **induzierte Abwehrmechanismen** entgegen, die ebenfalls wieder struktureller, chemischer und enzymatischer Art sein können (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Hierzu zählen u. a. auch bestimmte Transkripte von Genen, deren korrespondierende Proteine kurze Zeit später nachweisbar sind. Diese werden als *defense related proteins* bezeichnet und umfassen u. a. die aus derzeit 17 Familien bestehende Untergruppe der PR-(*pathogenesis-related*) Proteine (Übersicht in VAN LOON et al., 2006). In dieser finden sich lytische Enzyme wie β -1,3 Glukanasen (PR-2) und Chitinasen (PR-3, PR-4, PR-8 und PR-11), thaumatinähnliche Proteine (PR-5), Proteaseinhibitoren (PR-6), Endoproteasen (PR-7), ligninformende Peroxidasen (PR-9), RIPs (Ribosomen inhibierende Proteine, PR-10), Defensine (PR-12), Thionine (PR-13), LTPs (Lipid-Transfer-Proteine, PR-14), Oxalatoxidasen (PR-15, PR-16) als auch Proteine noch unbekannter Funktion (PR-1, PR-17). Für PR-1 konnte zudem eine direkte Beteiligung an der Penetrationsresistenz gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* mittels RNA-Interferenz (RNAi) gezeigt werden (SCHULTHEISS et al., 2003b). Der Erfolg der induzierten Abwehr hängt jedoch oftmals von der Geschwindigkeit und der Stärke ab, mit der die Erkennung des Pathogens und die Mobilisierung der Abwehr in der Pflanze ablaufen (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003; VON RÖPENACK et al., 1998). Zudem können präformierte als auch induzierte Abwehrmaßnahmen bereits ein Eindringen des Pathogens in den Wirt (Penetrationsresistenz) oder aber erst dessen Weiterentwicklung (Post-Penetrationsresistenz) verhindern.

Eine **Penetrationsresistenz** kann auf mindestens drei Wegen erreicht werden, durch (1) eine lokale Verstärkung der Zellwand (Papillenbildung), (2) die Inhibierung Zellwand abbauender Enzyme des Pathogens z. B. durch Änderungen des pH-Wertes im Apoplasten oder (3) die Absonderung antimikrobieller Substanzen, die zum Absterben des Pathogens führen (Übersicht in HÜCKELHOVEN, 2007). Zu letzteren zählen induzierte Phytoalexine, konstitutive Phytoanticipine und antimikrobiell wirksame Proteine, die z. B. die pilzliche Zellwand oder Membranintegrität zerstören.

Eine Verstärkung der Zellwand findet sowohl in kompatiblen als auch inkompatiblen Pflanze-Pilz-Interaktionen statt. Sie wird vor allem durch die Lignifizierung und Ablagerung von Zellwandmaterial sowie die Akkumulation hydroxyprolinreicher Glykoproteine und weiterer phenolischer Komponenten erreicht (BECHINGER et al., 1999; KELLER et al., 1996; VON RÖPENACK et al., 1998). Viele dieser Substanzen formen komplexe Polymere und können gegenseitig Quervernetzungen eingehen (BRISSON et al., 1994), wobei vor allem H_2O_2 eine entscheidende Rolle einnimmt. Das Vorliegen von H_2O_2 in Zellwandauflagerungen ist ein biochemischer Marker, der nichtpenetrierte von penetrierten Zellen in der Interaktion von Gerste mit *Blumeria graminis* unterscheidet (HÜCKELHOVEN et al., 1999; 2000; TRUJILLO et al., 2004). Ob ein Pathogen jedoch durch eine Papille gestoppt wird, hängt in entscheidendem Maße von der Geschwindigkeit, mit der diese gebildet wird, und der Stärke der Quervernetzungen ab (ASSAAD et al., 2004; VON RÖPENACK et al., 1998).

Eine Möglichkeit, die weitere Ausbreitung von Pathogenen nach erfolgreicher Penetration zu verhindern (**Post-Penetrationsresistenz**), ist eine Hypersensitivitätsreaktion (HR) der befallenen Zelle oder des umgebenden Gewebes (KOMBRINK & SCHMELZER, 2001). Eine HR geht mit der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffintermediaten (*reactive oxygen species*, ROS), antimikrobiellen Proteinen und Phytoalexinen einher und endet in einem lokalem Zelltod, womit zumindest (hemi-)biotrophen Pathogenen die Nahrungsgrundlage entzogen wird (GREENBERG & YAO, 2004). In Interaktionen mit nekrotrophen Pathogenen, denen tote Zellen als Ernährungsgrundlage dienen, ist die Rolle einer HR nicht vollständig geklärt. Hier könnten durch den Zelltod freigesetzte toxische Substanzen z. B. aus der Vakuole zu einer erfolgreichen Bekämpfung des Pathogens beitragen (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996). Vor allem scheint hier jedoch der richtige Zeitpunkt der HR für eine erfolgreiche Abwehr ausschlaggebend zu sein (HÜCKELHOVEN, 2007).

Die transiente Akkumulation von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROS, *reactive oxygen species*), der „oxidative burst“, ist eine relativ frühe Antwort der Pflanze auf Pathogene oder Elizitoren (JABS et al., 1997; THORDAL-CHRISTENSEN et al., 1997). Zu den wichtigsten ROS zählen Hydroxylradikale ($\text{OH}^\bullet$), Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), von denen nur letzteres relativ stabil ist (VRANOVA et al., 2002). Diese können extrazellulär mit Hilfe von NADPH-Oxidasen, Peroxidasen, Aminoxidasen und Oxalatoxidasen gebildet werden (Übersicht in HÜCKELHOVEN, 2007). Neben der Beteiligung an der HR-Ausbildung und der Vernetzung von Zellwandkomponenten

(siehe oben) wird ROS funktionell eine direkte toxische Wirkung auf Pathogene und eine Rolle als Signalmoleküle zugesprochen (JAPS et al., 1997; TORRES et al., 2002). Andererseits gibt es auch Berichte über antagonistische Wirkungen von ROS auf Zelltodreaktionen (TORRES et al., 2005) und dass die Akkumulation bestimmter ROS mit einer erfolgreichen Besiedlung einhergeht. So findet sich bei einer erfolgreichen Penetration von Gerstезellen durch *Blumeria graminis* eine Akkumulation von O_2^- vor allem im Bereich des sich entwickelnden Haustoriums (HÜCKELHOVEN & KOGEL, 1998; HÜCKELHOVEN & KOGEL, 2003). In vielen Fällen scheint es, das ROS zwar an Abwehrreaktionen beteiligt, allein für eine erfolgreiche Abwehr jedoch nicht ausreichend und synergistische Effekte mit anderen Signalmolekülen wie NO essenziell für ihre Funktion sind (HÜCKELHOVEN, 2007).

Die zwei Hauptwege, die zur Erkennung eines Pathogenbefalls als Grundvoraussetzung für die Induktion entsprechender Abwehrreaktionen führen, sind die im nächsten Kapitel beschriebenen PAMP- und R-Gen vermittelten Signalwege.

1.2.3 DAS PFLANZLICHE IMMUNSYSTEM: FEINDERKENNUNG

Induzierte Abwehrmechanismen beruhen u. a. auf der Fähigkeit von Pflanzen „selbst“ von „nicht-selbst“ unterscheiden und somit potenzielle Angreifer registrieren und darauf reagieren zu können. Hierzu bedient sich die Pflanze eines zweigeteilten Erkennungssystems (JONES & DANGL, 2006), wobei der eine Teil auf bestimmte, auf vielen Klassen von Mikroorganismen weit verbreitete Molekülepitope und der andere direkt bzw. indirekt auf spezifische Virulenzfaktoren reagiert.

Der erste Teil beruht hierbei auf der Erkennung der invarianten, nur langsam evolvierenden Epitope innerhalb mikrobieller oder vom Pathogen abstammender Moleküle (PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns* bzw. MAMPs: *microbe-associated molecular patterns*) mittels entsprechender Rezeptoren (PRRs: *pattern-recognition receptors*; Übersicht in JONES & DANGL 2006; SCHWESSINGER & ZIPFEL, 2008). Beispiele bakterieller MAMPs sind bakterielle Lipopolysaccharide oder Flagellin. Pilzliche MAMPs sind z. B. Endopolygalacturonasen, Xylanasen und Zellwandkomponenten wie Chitin oder Elicitin (z. B. Pep-13 aus *Phytophthora sojae*) (z. B. BRUNNER et al., 2002; GAULIN et al., 2006; NÜRNBERGER & LIPKA, 2005; POINSSOT et al., 2003; SCHWEIZER et al., 2000). Die aus Arabidopsis bekannten Rezeptoren für die bakteriellen MAMPs Flagellin (flg22) und den Elongationsfaktor Ef-Tu, FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2, CHINCHILLA et al., 2006) und EF-TU RECEPTOR (EFR, ZIPFEL et al., 2006), gruppieren beide in die Klasse der *leucine-rich repeat receptor-like* Kinasen (LRR-RLK). PRRs pilzlicher PAMPs sind u. a. aus Tomate (LeEIX1 und -2, RON & AVNI, 2004) und Reis (CEBiP, KAKU et al., 2006)

bekannt. CEBIP ist ein transmembranes *chitin oligosaccharide elicitor binding protein*, während *LeEIX1* und -2 LRR-haltige Glykoproteine auf der Zelloberfläche kodieren. Die der PAMP/MAMP-Erkennung nachfolgenden Signaltransduktionswege sind bisher nicht vollständig geklärt. Im Falle von *flg22* spielen jedoch nachgeordnete mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden eine Rolle. Zusätzlich wird auch Pflanzenhormonen wie Salizylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Stickoxid (NO) eine Funktion bei der Signalweiterleitung zugesprochen (NÜRNBERGER & LIPKA, 2005).

Die zweite Säule des pflanzlichen Immunsystems basiert auf der Erkennung eines Avirulenzgenproduktes (Avr, Effektor) eines bestimmten Pathogens durch ein korrespondierendes Resistenzgenprodukt (R-Gen) in der Pflanze (Gen-für-Gen Modell, Flor, 1955; 1971). Viele R-Gene kodieren für NB-LRR Proteine mit einer charakteristischen Nukleotidbindestelle (NB) und C-terminalen, leucinreichen Domänen (leucine-rich repeats LRRs). Bekannte bakterielle Effektoren sind z. B. AvrPto, AvrPtoB, AvrE und HopPtoM aus *P. syringae*, die in der Lage sind, Calloseablagerungen und die Expression für die Papillenbildung essentieller Gene im Wirt zu unterdrücken (DEBROY et al., 2004; DE TORRES et al., 2006; HAUCK et al., 2003). Eine direkte Interaktion von Avr- und R-Proteinen konnte in vielen Systemen jedoch nicht festgestellt werden (DANGL & JONES, 2001). Auf dieser Beobachtung bauen die *Guard*-Hypothese (DANGL & JONES, 2001; VAN DER BIEZEN & JONES, 1998) und das weiterentwickelte *Decoy*-Modell (VAN DER HOORN & KAMOUN, 2008) auf. In beiden Fällen wird davon ausgegangen, dass das R-Protein in bestimmten Fällen nicht den Effektor (das Avr-Protein) an sich erkennt, sondern die Kombination aus dem Interaktions- oder Zielpartner des Effektors und dem Effektor selbst. In der *Guard*-Hypothese wird daher ein für die Virulenz des Pathogens essentielles Zielproteins des Effektors durch das R-Protein überwacht. Im Falle des *Decoy*-Modells handelt es sich dagegen bei dem vom R-Protein überwachten Interaktionspartner des Effektors um ein Imitat eines für die Virulenz wichtigen Zielproteins. Dieses Imitat geht nach dem Modell zwar eine Interaktion mit dem Avr-Protein ein, hat jedoch keinen Einfluss auf die Pathogenfitness. Durch die Überwachung eines Imitates wird ein gegensätzlicher Selektionsdruck vermieden, wie er auf einem für die Virulenz essentiellen Zielprotein in der *Guard*-Hypothese lastet. Dieser gegensätzliche Selektionsdruck ergibt sich beim Vorliegen eines R-Gen Polymorphismus in einer Population, d. h. wenn einige Individuen das respektive R-Gen besitzen, andere jedoch nicht. Ohne R-Gen wirkt die Selektion in diesem Fall hin zu einer verminderten Bindeaffinität des Zielgens zum Effektor. Bei Vorliegen eines R-Gens wird dagegen eine erhöhte Bindeaffinität selektiert (VAN DER HOORN & KAMOUN, 2008).

Der evolutive Wettlauf, der sich aus dem ständigen Bemühen des Pathogens, Erkennungsmaßnahmen zu unterdrücken oder zu umgehen, und dem Ziel des Wirtes, dies zu verhindern, ergibt, lässt sich am besten durch ein vierphasiges Zick-Zack-Modell beschreiben (JONES & DANGL, 2006). In Phase I werden PAMPs durch entsprechende PRRs registriert, was zu einer PAMP-vermittelten Immunisierung führt. Nur Pathotypen, die wirksame Effektoren zur Unterdrückung der PAMP-vermittelten Immunität entwickeln, können die Pflanze erfolgreich besiedeln (Phase II). Es liegt eine effektorvermittelte Suszeptibilität vor. Die Selektion wirkt im Wirt nun dahin, dies zu umgehen. In Phase III wird somit ein bestimmter Effektor durch ein neu entstandenes R-Protein im Wirt registriert, was wiederum eine, diesmal effektorvermittelte, Immunität bedingt. Folgend erzeugt die natürliche Selektion wiederum einen Druck auf das Pathogen dahingehend, die effektorvermittelte Immunität zu umgehen. Dies kann dadurch erfolgen, dass der erkannte Effektor verändert oder weitere Effektoren zur Unterdrückung der Abwehr herangezogen werden. Ist dies der Fall (Phase IV), liegt erneut eine durch Effektoren vermittelte Suszeptibilität vor, die wiederum die Selektion neuer oder veränderter R-Proteine induziert. Es resultiert eine andauernde Koevolution von R-Genen und Pathogeneffektoren, die auch durch populationsdynamische Prozesse und von mit den entsprechenden R-Genen und Effektoren einhergehenden Fitnesskosten für den Wirt respektive das für Pathogen beeinflusst wird (JONES & DANGL, 2006).

Die durch die Erkennung von Pathogenen ausgelösten Abwehrmaßnahmen können sich dabei nicht nur auf lokale Bereiche beschränken, sondern die Information kann auch zu vorbeugenden Abwehrmaßnahmen in entfernten Bereichen führen. Auf diese systemisch induzierte Resistenz wird im folgenden Kapitel eingegangen.

1.3 SYSTEMISCH INDUZIERTER RESISTENZ

Eine erhöhte Resistenz oder Abwehrbereitschaft gegen pathogene Mikroorganismen oder Insekten kann in Pflanzen lokal als auch systemisch durch verschiedene Auslöser biotischer, chemischer oder mechanischer Natur induziert werden. Ausgehend vom primären Stimulus und den nachfolgenden Reaktionen werden daher mehrere Klassen induzierter Resistenz unterschieden, die unten kurz ausgeführt sind. Anschließend wird in diesem Kapitel vor allem auf die beteiligten Signalwege und Mechanismen eingegangen, die während der durch nützliche Mikroorganismen induzierten systemischen Resistenz eine Rolle spielen.

Wundinduzierte Resistenz: Verwundung, mechanisch oder z. B. durch Insektenfraß, bedingt neben lokalen auch systemische Veränderungen. Ein gut untersuchtes Beispiel sind wundinduzierte Proteinaseinhibitoren (PIs) aus Tomate, die als Hemmer des Insektenverdauungsapparates wirken (RYAN, 2000). Vor allem JA und Methyljasmonat (MeJA) scheinen an der Weiterleitung des Wundsignals beteiligt zu sein (FARMER & RYAN, 1992), aber auch Ethylen (ET), Abscisinsäure (ABA) und elektrische Signale wirken sich synergistisch oder antagonistisch hierauf aus (Übersicht in HOWE, 2004). Durch mechanische Verwundung und Insektenfraß induzierte Gene überlappen jedoch nicht vollständig und können sich grundsätzlich unterscheiden (REYMOND et al., 2000). Auch bei durch beide Varianten beeinflussten Transkripten lassen sich zumindest hinsichtlich der Expressionsstärke Unterschiede feststellen. So wird der Transkriptionsfaktor HAHB4 aus der Sonnenblume sowohl durch mechanische als auch insektenbedingte Verwundung systemisch und lokal induziert, das durch das Insekt ausgelöste Signal ist jedoch um einiges stärker (MANAVELLA et al., 2008).

Chemisch induzierte Resistenz (cIR): Exogen zugeführte Pflanzenhormone oder Chemikalien wie z. B. (Me-)JA, SA, dessen Analoga BTH (Bion[®], Benzo[1,2,3]-thiadiazol-7-carbothioicacid) und DCINA (2,6-Dichlorisonicotinsäure) oder die nicht-proteinogene Aminosäure BABA (β -Aminobutyricacid) können die Resistenz gegen bestimmte Pathogene erhöhen (JAKAB et al., 2001; KOGEL & LANGEN, 2005). Die Applikation derartiger Substanzen geht i. d. R. mit der Induktion eines spezifischen Sets an Genen einher, wobei sich diese in Abhängigkeit vom untersuchten Pflanzentyp unterscheiden können. Durch BTH induzierte cIR in Getreide bedingt in Weizen, Gerste und Reis jeweils die Expression einer bestimmten Gruppe heterologer Gene [(WCI-Gene, *wheat chemical induced* (GÖRLACH et al., 1996); BCI-Gene, *barley chemical induced* (BEßER et al., 2000); RCI-Gene, *rice chemical induced* (SCHAFFRATH et al., 2000)]. Homologe zu in Arabidopsis oder anderen dikotylen Pflanzen durch BTH induzierten Genen, z. B. PR-Gene, finden sich darunter jedoch kaum (MALECK et al., 2000; MOLINA et al., 1999). Die Expression bestimmter PR-Gene (vor allem PR-1, -2 und -5) ist in Getreide daher im Gegensatz zu Arabidopsis kein aussagekräftiger cIR-Marker (MOLINA et al., 1999).

Systemisch erworbene Resistenz (systemic acquired resistance, SAR): SAR bezeichnet eine erhöhte systemische Resistenz gegen ein breites Spektrum an Pathogenen, die durch lokalen Pathogenbefall oder durch Elizitoren induziert wird (MISHINA & ZEIER, 2007; ROSS, 1961; RYALS et al., 1996). Auf molekularer Ebene geht SAR mit der lokalen und

systemischen Induktion spezifischer, an der Abwehr und der Sekretion von Proteinen beteiligter Gene (z. B. *PR*-Gene, *BiP2*) einher (WANG et al., 2005a). Diese Transkriptionsveränderungen werden zumindest in dikotylen Pflanzen durch SA vermittelt und beruhen u. a. auf der Aktivierung und folgenden Kerntranslokation des Regulatorproteins NPR1 [Nonexpressor of pathogenesisrelated (PR) genes 1, auch NIM1] (DURRANT & DONG, 2004; GAFFNEY et al., 1993; KINKEMA et al., 2000). In monokotylen Pflanzen sind bisher nur wenige und zum Teil widersprüchliche Information über pathogeninduzierte SAR vorhanden (KOGEL & LANGEN, 2005). Auch die Rolle von SA, die z. B. in Reis und Kartoffel bereits konstitutiv hoch konzentriert vorliegt (COQUOZ et al., 1995; SILVERMAN et al., 1995; YU et al., 1997), ist bisher nicht vollständig geklärt. In Kartoffel scheint es, dass nicht höhere SA-Konzentrationen, sondern eine erhöhte Sensitivität für dieses Hormon für die Etablierung von SAR ausschlaggebend ist (YU et al., 1997).

Induzierte systemische Resistenz (ISR): Der Begriff ISR wird im Allgemeinen für systemische Resistenzeffekte verwendet, die durch apathogene, wurzelbesiedelnde Rhizobakterien in mono- als auch dikotylen Pflanzen induziert werden (DE VLEESSCHAUWER, 2006; 2008; VAN LOON et al., 1998). Phänotypisch ähnelt ISR SAR, indem auch hier systemische Resistenz gegen eine Vielzahl biotischer und abiotischer Stressfaktoren ausgelöst wird. Zudem spielt auch NPR1 während der ISR eine Rolle (PIETERSE et al., 1998). Die erfolgreiche Resistenzinduktion gegen ein spezifisches Pathogen und die dabei beteiligten Signalwege hängen jedoch sowohl vom Rhizobienisolat als auch dem Wirt ab. Zusätzlich können zudem auch andere nützliche Mikroorganismen, z. B. Mykorrhiza und weitere Pilze, ISR-ähnliche Reaktionen auslösen (IAVICOLI et al., 2003; KNOESTER et al., 1999; PIETERSE et al., 1996; SEGARRA et al., 2009; VAN WEES et al., 2008).

Auf bekannte spezifische und konservierte Signalwege der ISR wird in den folgenden Abschnitten vertiefend eingegangen.

1.3.1 AUSLÖSER UND SIGNALWEGE INDUZierter SYSTEMISCHER RESISTENZ

Mögliche Auslöser induzierter Resistenz in Pflanzen sind MAMPs (Def. s. Kap. 1.2.3) nützlicher bakterieller oder pilzlicher Mikroorganismen. Bisher am besten untersucht sind die bakteriellen MAMPs apathogener *Pseudomonas* spp. In Analogie zu Flagellin und Lipopolysacchariden (LPS) pathogener *Pseudomonas* spp. (vgl. Kap. 1.2.3), induzieren Zelloberflächenkomponenten apathogener *P. fluorescens*-Stämme wie WCS417r oder WCS374 Resistenz in Arabidopsis, Tomate und Bohne, wobei jedoch einzelne MAMPs oftmals nicht allein für die Resistenzinduktion ausschlaggebend sind, sondern

hier mehrere Faktoren redundant zusammen wirken (Übersicht in BAKKER et al., 2007). Auch durch bakterielle Mikroorganismen produzierte Fe^{3+} -spezifische Chelatoren (Siderophore), antibiotische Substanzen (z. B. DAPG: 2,4-Diacetylphloroglucinol) und volatile Stoffe, wie z. B. 2,3-Butanediol zweier *Bacillus* spp., können ISR auslösen (z. B. IAVICOLI et al., 2003; MEZIANE et al., 2005; ONGENA et al., 2007; RYU et al., 2004; TRAN et al., 2007). Ein beschriebener pilzlicher MAMP ist der sekretierte hydrophobinähnliche Elizitor Sm1 von *Trichoderma virens* bzw. dessen Homolog Epl1 aus *Hypocrea atroviride* (die telomorphe Form von *Trichoderma atroviride*). Beide lösen in monomerer Form in Mais systemisch Resistenz gegen *Colletotrichum graminicola* aus (DJONOVIC et al., 2007; VARGAS et al., 2008).

Auf der Pflanzenseite werden die an der induzierten Abwehr beteiligten Komponenten durch ein Netzwerk untereinander kommunizierender Signalkaskaden kontrolliert, in dem u. a. die Pflanzenhormone JA, ET, SA oder ABA involviert sein können. Bisher am besten beschrieben sind die Signalwege, die an der durch *P. fluorescens* WCS417r in *Arabidopsis* induzierten Resistenz beteiligt sind. In diesem Fall basiert die induzierte Resistenz auf einem SA-unabhängigem, jedoch von JA- und ET-Signalwegkomponenten sowie NPR1 abhängigem Signalweg (PIETERSE et al., 1996; 1998). Hierbei werden nicht direkte Veränderungen in der Produktion bzw. Akkumulation, sondern eine verstärkte Sensibilität der Pflanze gegenüber diesen Hormonen für die Resistenzeffekte verantwortlich gemacht (PIETERSE et al., 2000). Auch durch Wurzelbesiedlung mit dem Bodenzpilz *Trichoderma asperellum* induzierte Resistenz gegen das bakterielle Pathogen *P. syringae*, den biotrophen Oomyceten *Hyaloperonospora parasitica* und den nekrotrophen Pilz *Plectosphaerella cucumerina*, beruht auf einer von JA, ET und NPR1 abhängigen verstärkten Abwehr (SEGARRA et al., 2009). Eine Abhängigkeit der ISR vom ET-Signalweg ist jedoch nicht in jedem Fall gegeben, wie das Beispiel der durch *Pseudomonas fluorescens* CHA0-vermittelten ISR zeigt (IAVICOLI et al., 2003). Zudem gibt es Berichte über eine SA-Abhängigkeit von ISR oder ISR-ähnlichen Reaktionen in Pflanzen (AUDENAERT et al., 2002; TJAMOS et al., 2005). Ein weiterer Faktor, der an der Etablierung von ISR in *Arabidopsis* beteiligt sein kann, ist der wurzelspezifische Transkriptionsfaktor (TF) MYB72, der *in vitro* mit dem EIN3-like TF EIL3 interagiert (VAN DER ENT et al., 2008). VAN DER ENT und Kollegen (2008) schließen aus ihren Ergebnissen, dass erst die Interaktion zwischen diesen Komponenten die Einleitung der ISR ermöglicht und die Funktion von MYB72 oberhalb des Ethylensignalweges in der Wurzel liegt.

Im Gegensatz zu SAR geht ISR vor Einwirken eines Stressfaktors meist ohne oder nur mit einer geringen Veränderung auf der Transkriptomebene einher (ALFANO et al., 2007; LIU et al., 2007; VERHAGEN et al., 2004; WANG et al., 2005b). Ein gemeinsames Merkmal vieler ISR-Antworten ist jedoch die verstärkte und schnellere Induktion spezifischer Gene nach Pathogenbefall (VAN WEES et al., 1999; VERHAGEN et al., 2004). Dieses Phänomen ist unter dem Begriff „*Priming*“ oder „Potenzierung“ bekannt (CONRATH et al., 2002; 2006) und kann sich auch auf weitere Abwehrreaktionen wie eine verstärkte Callose-deposition beziehen. „*Priming*“ als Grundlage induzierter Resistenz wird im kommenden Abschnitt näher beleuchtet.

1.3.2 PRIMING: GRUNDLAGE INDUZierter RESISTENZ

Der Begriff *Priming* beschreibt die Konditionierung von Pflanzen durch einen primären Stimulus in der Art, dass sie nachfolgend auf biotischen oder abiotischen Stress lokal oder systemisch mit einer schnelleren und/oder stärkeren Abwehr reagieren (CONRATH et al., 2002). Als *Priming*-Stimulus können hierbei (nekrotrophe) Pathogene, Elizitoren, Verwundung, Chemikalien aber auch die Besiedlung mit nützlichen Mikroorganismen fungieren (Übersicht in GOELLNER & CONRATH, 2008). Die diesem Phänomen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch weitgehend ungeklärt und die an der verstärkten Abwehrantwort beteiligten Signalwege und Gene variieren in Abhängigkeit vom *Priming*-Stimulus und Stressfaktor. Rhizobakterien-vermittelte ISR in *Arabidopsis* geht oftmals mit einer verstärkten Expression JA/ET-responsiver Gene und einer verstärkten Callosedeposition einher, woran NPR1 und der wurzelspezifische Transkriptionsfaktor MYB72 beteiligt sind (AHN et al., 2007; VAN DER ENT et al., 2008). *Paenibacillus alvei* K165 induziert dagegen eine verstärkte SA-assoziierte Abwehr gegen *Verticillium dahliae* (TJAMOS et al., 2005). Die durch BABA-Applikation verstärkte *PR-1*-Induktion in *Arabidopsis* gegen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 oder *Botrytis cinerea* benötigt ebenfalls SA und NPR1, während die verstärkte Papillenbildung bei Befall durch *Plectosphaerella cucumerina* von ABA abhängig ist (TON & MAUCH-MANI, 2004; ZIMMERLI et al., 2000; 2001). Neben Bakterien und Chemikalien können auch Pilze *Priming* induzieren. So geht die durch *Trichoderma asperellum* T203 in Gurke systemisch induzierte Resistenz mit einer potenzierten PR-Genexpression nach Pathogenbefall einher (SHORESH et al., 2005). Auch die Kolonisierung von Tomatenwurzeln durch Mykorrhizapilze löst einen systemischen Schutz gegen *Phytophthora parasitica* in nicht mykorrhizierten Wurzelabschnitten aus, der mit einer verstärkten Akkumulation von PR-Proteinen assoziiert ist (POZO et al., 2002).

Die oftmals fehlende sichtbare Veränderung auf Transkriptomebene durch den *Priming*-Stimulus vor Pathogenbefall (VAN WEES et al., 2008) lässt die Frage offen, wie der „geprimte“ Status in Pflanzen gehalten wird. Eine Möglichkeit ist die Akkumulation oder posttranslationale Modifikation von Zellkomponenten mit entscheidenden Funktionen während der Signaltransduktion oder Amplifikation (CONRATH et al., 2006). Diesbezüglich konnte kürzlich die Beteiligung von bestimmten MAP-Kinasen an der Etablierung von *Priming* gezeigt werden (BECKERS et al., 2009).

1.4 MEHLTAU – EINE AGRONOMISCH RELEVANTE PFLANZENKRANKHEIT

Zu den agronomisch relevanten Phytopathogenen gehören unter anderem Echte Mehltaupilze der Klasse der Ascomyceten (Schlauchpilze). Bisher bekannt sind etwa 700 Mehltaupilze, die etwa 7600 Angiospermenarten besiedeln können. Darunter z. B. der Mehltaupilz des Getreides *Blumeria graminis* oder der Weinrebe, *Uncinula necator* (RIDOUT, 2009). Kompatible Mehltauarten von Arabidopsis, z. B. *Golovinomyces orontii*, haben vor allem durch den Modellcharakter der Pflanze Aufmerksamkeit erhalten (RIDOUT, 2009). Als obligat biotrophe Parasiten benötigen Echte Mehltaupilze zum Wachstum und zur Vermehrung Wirtszellen lebender Pflanzen, auch wenn sich der größte Teil der Entwicklung, d. h. Hyphenwachstum und Sporulation, außerhalb der Pflanzenzellen auf der Blattepidermis abspielt. Zur Nahrungsaufnahme etabliert der Pilz ein Ernährungsorgan innerhalb von Epidermiszellen, das Haustorium, indem er die pflanzliche Zellwand mit einem Penetrationskeil durchbricht. Hierzu dient vermutlich eine Kombination aus hydrostatischem Druck und dem Ausscheiden eines Cocktails lytischer Enzyme (PRYCE-JONES et al., 1999). Die Plasmamembran der Wirtszelle bleibt dabei intakt. Sie wird jedoch eingestülpt, in ihrer Fläche, ihrer Zusammensetzung und ihrem Aufbau verändert und daher als extrahaustoriale Membran bezeichnet (KITA et al., 1981; KOH et al., 2005). Visuell zeichnet sich Mehltau durch ein weißes, pelziges Pilzgeflecht auf Blättern, Halmen und Ähren aus. Im späteren Befallsstadium chlorotisieren und nekrotisieren die befallenen Blätter, wobei an den Penetrationsstellen „grüne Inseln“ zunächst stehen bleiben können (RIDOUT, 2009). Folgend wird die Interaktion zwischen Gerste und dem Echten Gerstenmehltau *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* als eines der Untersuchungsobjekte dieser Arbeit näher beschrieben. Abschließend wird kurz auf den Entwicklungszyklus von *Golovinomyces* auf Arabidopsis eingegangen, da auch dieser im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

1.4.1 ENTWICKLUNG VON *BLUMERIA GRAMINIS* F.SP. *HORDEI* AUF GERSTE

Die Interaktion zwischen Gerste (Abt. Spermatophyta/ Unterabt. Magnoliophyta/ Kl. Liliopsida/ Ord. Poales/ Fa. Poaceae/ *Hordeum vulgare* L.) und Mehltau hat neben der agronomischen Relevanz Modellcharakter in der molekularen Pflanzenphysiologie, da sich das diploide Gerstengenom - trotz seiner 5,4 Milliarden Basen - im Vergleich zum hexaploiden Weizen leichter analysieren lässt (GRANER & ALTSCHMIED, 2001). Gerste wird heute als Sommer- und Wintergerste in allen gemäßigten Zonen bis in den hohen Norden angebaut, stellt nur geringe Ansprüche an Boden und Temperatur und wird hauptsächlich als Nahrungsmittel (Brot, Graupen, Grütze), Futtergetreide (Geflügel- und Schweinemast) sowie zur Bierproduktion genutzt.

Der **Echte Gerstenmehltaupilz** (R. Fungi/ Abt. Ascomycota/ Kl. Leotiomycetes/ Ord. Erysiphales/ Fa. Erysiphaceae/ Ga. *Blumeria*/ *Blumeria graminis* (DC.) Speer f.sp. *hordei*, *Bgh*) ist ein obligat biotropher Ektoparasit der Gerste mit extremer Wirtsspezifität. Die Verbreitung im Frühling erfolgt über asexuelle Konidien, während im Sommer zur Überbrückung der Vegetationsruhe bis zur Wintersaat bräunliche Kleistothecien gebildet werden, in denen Ascosporen heranreifen. Durch Quellung werden im späten Herbst bzw. im Frühjahr die Kleistothecien gesprengt und die Ascosporen aktiv ausgeschleudert. Durch Ausfallgetreide („Grüne Brücke“) kann *Bgh* aber auch in seiner asexuellen Form direkt das Wintergetreide besiedeln (GLAWE, 2008 und Referenzen).

Der vegetative Entwicklungszyklus beginnt innerhalb von Minuten nach dem Auftreffen einer Konidie auf einem Gerstenblatt mit der Sekretion von Enzymen auf die Blattoberfläche. Diese bereiten möglicherweise die Infektion und die Entwicklung des Pathogens vor (CARVER et al., 1999). Innerhalb von ein bis zwei Stunden keimt die Konidie aus und es bildet sich ein primärer Keimschlauch (*primary germ tube*, PGT). Dieser dient vor allem der Wirtserkennung, als Haftorgan und eventuell zur Wasseraufnahme, jedoch nicht der Penetration (EDWARDS, 2002; KUNOH et al., 1979). Die unterhalb des PGT liegende Epidermiszelle reagiert auf diesen mit einer Zytoplasmaaggregation und der Bildung einer Papille (CLARK et al., 1993). Ein derartiger PGT findet sich nur bei *Blumeria graminis*, während die folgenden Prozesse bei allen Mehltauarten sehr ähnlich ablaufen (GLAWE, 2008; RIDOUT, 2009). Etwa zwei bis drei Stunden nach der Keimung bildet die Konidie einen sekundären Keimschlauch, dessen Ende sich zu einem Appressorium differenziert (vgl. Abb. 1.4-2). Mit Hilfe eines Penetrationskeils, der sich etwa 10-12 h nach dem ersten Kontakt am Appressorium ausbildet, lytischen Enzymen wie Kutinasen und Zellulasen zur Zellwandschwächung und mechanischem Druck versucht der

Pilz die pflanzliche Zellwand zu durchstoßen (CLARK et al., 1993; PRYCE-JONES et al., 1999). Sowohl in resistenten als auch in anfälligen Linien kommt es an dieser Stelle auf der Pflanzenseite zu einer Verstärkung der Zellwand (Papillenbildung), einer Akkumulation von H_2O_2 an der Angriffsstelle und zur Produktion von PR-Proteinen. Die Ausprägung dieser Abwehrmaßnahmen ist in suszeptiblen Linien jedoch geringerer und tritt verzögert auf (CLARK et al., 1993; HÜCKELHOVEN & KOGEL, 1998; 2003; PETERHÄNSEL et al., 1997). Demnach sind vor allem die Geschwindigkeit und die Stärke der Abwehrmaßnahmen ausschlaggebend für die Etablierung einer Penetrationsresistenz.

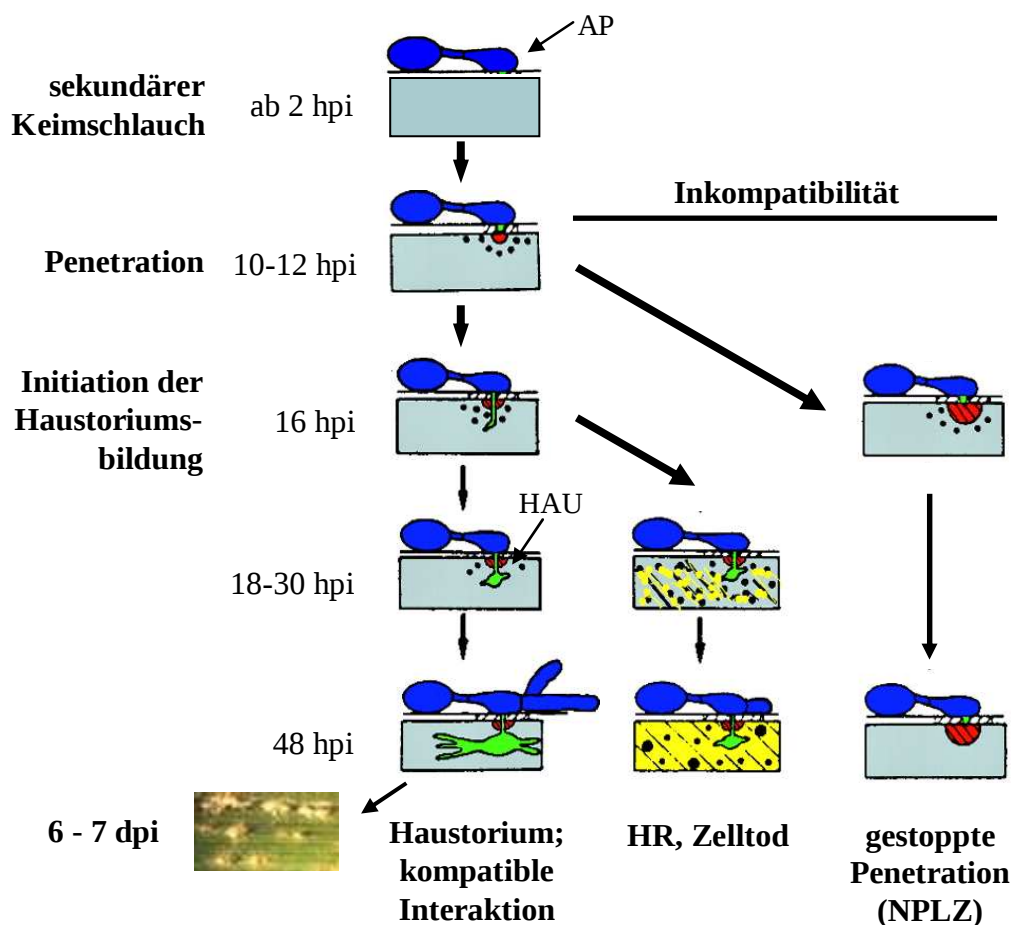


Abb. 1.4-2: Vereinfachte schematische Darstellung der Entwicklung kompatibler und inkompatibler Interaktionen von *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) auf Gerste (*H. vulgare*). Die Entwicklung von *Bgh* auf Gerste kann schon vor der Penetration z. B. durch eine effektive Papille oder danach durch einen lokalen Zelltod aufgrund einer HR gestoppt werden (inkompatible Interaktionen). In einer kompatiblen Interaktion ist *Bgh* fähig, ein Haustorium auszubilden und seine Entwicklung zu vollenden. AP = Appressorium; HAU = Haustorium; NPLZ = nicht penetrierte lebende Zelle; Darstellung verändert nach HÜCKELHOVEN et al., 1999.

Schlägt ein erster Penetrationsversuch fehl, entwickelt sich ein zweites oder sogar ein drittes Appressorium durch Verzweigungen des sekundären Keimschlauches (THORDAL-CHRISTENSEN et al., 1999). Generell verfügt jede Gerstenpflanze über eine unterschiedlich stark ausgeprägte, rassenunspezifische Penetrationsresistenz gegen *Bgh* von ca. 30-50 % (HÜCKELHOVEN et al., 1999). Bei erfolgreicher Penetration initiiert *Bgh* innerhalb der nächsten vier Stunden die Bildung eines Haustoriums mit fingerförmigen Ausläufern, letztere ein Charakteristikum der Gattung *Blumeria* (RIDOUT, 2009). Auch an dieser Stelle kann die Weiterentwicklung des Mehltaus abgewehrt werden. Dies erfolgt, indem entweder die penetrierte Zelle oder größere Bereiche des unterhalb dieser liegenden Mesophylls mit einem programmierten Zelltod dem Pilz die Ernährungsgrundlage entziehen (BOYD et al., 1995; HÜCKELHOVEN et al., 1999). Ist dies nicht der Fall, entwickelt der Pilz Sekundärhyphen, die sich weiter verzweigen, ihrerseits in Wirtszellen eindringen und Sekundärhaustorien bilden (CLARK et al., 1993; RIDOUT, 2009). Nach vier bis acht Tagen bildet *Bgh* extrazelluläre Konidienträger (Konidiophore), die Sporenketten mit jeweils etwa acht Konidien hervorbringen. Stets die oberste Konidie reift aus, löst sich ab und wird durch den Wind verbreitet (RIDOUT, 2009).

Aus Gerste gegen Mehltau bekannte Resistenzgenprodukte kodieren u. a. der *Mla*-Lokus (*mildew locus a*, 240 kbp; WEI et al., 1999), das semidominant vererbte Resistenzgen *Mlg* (GÖRG et al., 1993; SCHIFFER et al., 1997) und der *mlo*-Lokus (STOLZENBURG et al., 1984). Der *Mla*-Lokus umfasst insgesamt 11 Resistenzgene vom NBS-LRR-Typ, die vor allem HR-Resistenzphänotypen vermitteln und hierzu oftmals auf das RAR1 Protein (*required for Mla-specified resistance*) angewiesen sind (z. B. *Mla 12*, nicht jedoch *Mla1* oder *Mla7*) (FREIALDENHOVEN et al., 1994; SCHULZE-LEFERT & VOGEL, 2000; TORP & JØRGENSEN, 1986; ZHOU et al., 2001). Die *Mlg* vermittelte Resistenz gegen *Bgh* der Rasse A6 ähnelt der chemisch durch DCINA induzierten Resistenz hinsichtlich einer großen Zahl effektiver Papillen und einer nachfolgenden frühen Einzelzell-HR (KOGEL et al., 1994). Im Fall von *MLO* wird angenommen, dass es sich um einen generellen Repressor von Abwehrreaktion handelt (BÜSCHGES et al., 1997). Der *mlo* Lokus bedingt in dafür homozygoter Gerste eine vollständige und sehr stabile Penetrationsresistenz gegen fast alle natürlichen Mehltaurassen, einhergehend mit einer im Vergleich zum Wildtyp schnelleren und stärkere Akkumulation von H₂O₂, PR-Genen und Phytoalexinen (HÜCKELHOVEN et al., 1999; PETERHÄNSEL et al., 1997; STOLZENBURG et al., 1984; VON RÖPENACK et al., 1998). Im Mesophyllgewebe unterhalb attackierter Epidermiszellen erfolgt zudem ca. 60 Stunden nach Inokulation zusätzlich eine Zelltodreaktion (PIFFANELLI et al., 2002). Zugleich

verursacht *mlo* eine erhöhte Anfälligkeit gegen hemibiotrophe und nekrotrophe Pilze wie *Bipolaris sorokiniana* und *Magnaporthe grisea* (JAROSCH et al., 1999; KUMAR et al., 2001).

1.4.2 ENTWICKLUNG VON *GOLOVINOMYCES ORONTII* AUF *ARABIDOPSIS THALIANA*

Für *Arabidopsis* sind mindestens drei Mehltauarten beschrieben, die diese Pflanze erfolgreich besiedeln: *Golovinomyces* (syn. *Erysiphe*) *cichoracearum*, *Golovinomyces orontii* und *Golovinomyces cruciferarum* (VOGEL & SOMERVILLE, 2002). Eine genauere Analyse des Keimungs- und Besiedlungsprozesses von *G. cichoracearum* UCSC1, einem nahen Verwandten von *G. orontii* (ADAM et al., 1999), wurde u. a. von ADAM & SOMERVILLE (1996) durchgeführt. Konidien dieses Pathogens sind demnach ovoid-ellipsoid und bilden auf suszeptiblen Linien wie dem Ökotyp Col-0 nach 1-2 Stunden an einem Ende einen Keimschlauch aus. Wie bei *Bgh* reagiert die Pflanze hierauf mit der Ausbildung einer Papille, wobei diese das weitere Wachstum des Pilzes jedoch nur selten stoppt (ADAM & SOMERVILLE, 1996). Ausgehend vom primären Keimschlauch dringt der Pilz nach etwa fünf Stunden mit einem Penetrationskeil durch die pflanzliche Zellwand und nach etwa neun Stunden kommt zur Ausbildung eines ovalen Haustoriums. Oftmals bildet sich innerhalb der ersten 24 Stunden bereits ein zweiter Keimschlauch am gegenüberliegenden Ende der Spore. In den folgenden drei bis vier Tagen verlängern und verzweigen sich die Hyphen des primären als auch des sekundären Keimschlauches und bilden Haustorien in weiteren Zellen. Zudem beginnt die Ausbildung von Konidienträgern (Konidiophoren) mit Konidienketten ($n = 3-5$). Nach ca. fünf Tagen sind die sich bildenden Kolonien als weißer Belag sichtbar und erste Konidien schnüren sich nach etwa sieben Tagen ab. Auf der Pflanze lassen sich in den ersten 10-12 Tagen nach Inokulation keine bzw. kaum mit bloßem Auge sichtbare Abwehrreaktionen (Chlorosen oder Nekrosen) beobachten (ADAM & SOMERVILLE, 1996). Es kommt jedoch folgend zu früher auftretenden Seneszenzerscheinungen wie sich ausbreitenden Chlorosen, Dehydrierung und Nekrosenbildung.

Abwehrmaßnahmen von *Arabidopsis* gegen Mehltau beruhen auf SA-abhängigen Mechanismen, die in infizierten Blättern das Wachstum virulenter Mehlt austämme zumindest limitieren (DEWDNEY et al., 2000; REUBER et al., 1998). Derartige, die Fitness des Pilzes negativ beeinflussende Reaktionen, sind hier jedoch nicht mit Zelltodreaktionen assoziiert (CHANDRAN et al., 2009).

1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit war es zum einen, die molekularen Grundlagen der durch den Endophyten *Piriformospora indica* induzierten systemischen Resistenz gegen Echte Mehltäupilze aufzuklären und daran beteiligte Signalwege zu identifizieren. Des Weiteren sollten auch der Einfluss des Endophyten auf die morphologische Entwicklung seiner Wirte analysiert und die Besiedlung der Pflanzenwurzel genauer charakterisiert werden. Dies sollte erlauben, Aufschlüsse über die Etablierung der hier vorliegenden Symbiose zu erhalten. Hauptuntersuchungsobjekt für diese Fragestellungen sollte die Interaktion von *P. indica* mit Gerste darstellen, zusätzlich jedoch auch die Interaktion in *Arabidopsis* näher betrachtet werden. Letzteres sollte zum einen erlauben, die für diese Pflanze im größeren Maßstab vorhandenen Informationen und Mutantenlinien zu nutzen. Zudem sollte so ermöglicht werden, die Effekte von *P. indica* in einer monokotylen und einer dikotylen Pflanze direkt zu vergleichen.

Die Identifikation der molekularen Grundlagen der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz in Gerste sollte durch eine Transkriptomanalyse mit Hilfe des Affymetrix Barley1 GeneChip[®] erfolgen. Der mögliche Einfluss hierbei identifizierter, durch *P. indica* regulierter Gene auf die *Bgh*-Penetrationsrate sollte im Anschluss durch TIGS (*transient induced gene silencing*) ermittelt werden. Weiterhin galt es, die Resistenzinduktion von *P. indica* gegen den biotrophen Mehltäupilz *Golovinomyces orontii* in *Arabidopsis* zu etablieren. Dies sollte folgend genutzt werden, um an der Resistenzausprägung beteiligte Signalwege durch die spezifische Analyse von Mutanten identifizieren zu können. Gleichzeitig sollte auch in *Arabidopsis* überprüft werden, ob sich die Besiedlung mit *P. indica* systemisch auf das Expressionsmuster ausgewählter Gene auswirkt. Der Einfluss von *P. indica* auf die Spross- und Wurzelentwicklung sollte zeitlich als auch in Abhängigkeit von der eingesetzten Inokulationsdichte durch Wachstumsstudien eruiert werden. Um für die Besiedlung durch den Endophyten und die Interaktion in der Wurzel notwendige Signalkomponenten identifizieren zu können, sollte zudem die Besiedlung verschiedener Phytohormonmutanten von *Arabidopsis* mit *P. indica* analysiert werden.

Im größeren Zusammenhang betrachtet, sollten sowohl die molekularbiologischen als auch die morphologischen Studien dazu beitragen, Erkenntnisse über die bei der Besiedlung und der Beeinflussung der Pflanze durch *P. indica* zugrunde liegenden Mechanismen und Signalwege zu erhalten, um neue Ansatzpunkte zur Eindämmung von Pathogenen für den nachhaltigen Pflanzenschutz zu identifizieren.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Die während der Erstellung dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Labormaterialien wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland (D)), Sigma-Aldrich (München, D), Roth (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D) und Difco Laboratories (Heidelberg, D) bezogen. Verbrauchsmaterialien lieferten Sarstedt (Nürnberg, D) und Greiner (Solingen, D). Die Herkunft der verwendeten Geräte und die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Nährmedien sind bei der Beschreibung der jeweiligen Methoden angegeben.

2.1 PFLANZENMATERIAL UND ANZUCHTBEDINGUNGEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl mit Gerste (*Hordeum vulgare*) als auch mit *Arabidopsis thaliana* (kurz: Arabidopsis) gearbeitet.

2.1.1 HORDEUM VULGARE (GERSTE)

Für die hier durchgeführten Experimente wurden sowohl Gerstensamen der Sorten Golden Promise und Pallas (Vermehrung IPAZ, Gießen, D oder IPK, Gatersleben, D) sowie transgene *NPR1*-RNAi-Pflanzen (Hintergrund: Golden Promise; zur Verfügung gestellt von G. Langen und V. Babaeizad) verwendet. Diese wurden oberflächensterilisiert (2 min 70 % Ethanol; 1,5 h 6 % Natriumhypochlorid; 4 h waschen in Wasser mit mindestens dreimaligem Wasserwechsel) und für mindestens 3 Tage auf mit 1 mM CaSO_4 befeuchtetem Filterpapier in einer feuchten Kammer vorgekeimt. Die weitere Anzucht erfolgte je nach Versuchsziel steril in Gläsern auf $\frac{1}{2}$ -MS-Agar (0.4 % Gelrite, $\frac{1}{2}$ Konzentration MS-Salze (MURASHIGE & SKOOG, 1962, Sigma-Aldrich), in Topfkultur in Erde (Terreau Professional GEPAC Einheitserde Typ ED73) bzw. einem 2:1 Seramis:Oil Dri[®]-Gemisch (Seramis, Masterfoods, Verden, D; Oil Dri[®], Damolin, Mettmann, D) oder in hydroponischer Kultur (vgl. Kap. 2.8.5, Tabelle 2.1-1). Die in Seramis:Oil Dri[®] getopften Pflanzen wurden einmal nach zwei Wochen mit einer 0,5 %-igen Nährstofflösung gedüngt (20 ml/Topf; Wuxal Top N, Schering, N/P/K: 12/4/6), während das Medium hydroponisch angezogener Pflanzen alle drei Tage gegen frisches ausgewechselt wurde. Unabhängig von den Substratbedingungen erfolgte die Anzucht in Phytokammern bei 18/22 °C, 60 % relativer Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16 h mit einer Photonenfluxdichte von ca. 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. Als Lampen dienten im Verhältnis 4:1 Osram L30W/830 Lumilux Warmwhite und Osram L30 W77 Fluora.

Tabelle 2.1-1: Nährstoffzusammensetzung in der Hydrokultur

	1000*Stammlösung	Endkonzentration Nährlösung
Makroelemente		
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	1 M	4 mM N
K ₂ SO ₄	0,5 M	1 mM K
KH ₂ PO ₄	0,2 M	0,2 mM K; 0,2 mM P
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,6 M	0,6 mM Mg
CaCl ₂	0,5 M	5 mM Ca
Fe-EDTA	0,2 M	0,2 mM Fe
Mikroelemente		
H ₃ BO ₃	1 mM	1 µM
MnSO ₄ *H ₂ O	0,5 mM	0,5 µM
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,5 mM	0,5 µM
CuSO ₄	0,3 mM	0,3 µM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,01 mM	0,01 µM

2.1.2 ARABIDOPSIS THALIANA

Arabidopsissamen wurden vor Verwendung stets oberflächensterilisiert (Inkubation der Samen für 15 min in 3 % Natriumhypochlorid-Lösung, 3x waschen mit autoklaviertem Wasser). Zur Anzucht wurden die Samen steril auf ½ MS⁺-Agar ausgelegt, für 48 h bei 4°C gelagert und anschließend für 7-14 Tage in einer Phytokammer angezogen: 8 h Licht (fluorescent cool white, Toshiba FL40SSW/37, ca. 180 µmol/(m²*s) Photonenfluxdichte)/ 16 h Nacht, 22°C/18°C, 60% relative Feuchtigkeit. Je nach Versuchsziel (vgl. Kap. 2.9) verblieben die Pflanzen nachfolgend in Sterilkultur auf agarhaltigem Medium oder wurden in eine 1:1 (v:v) Sand:Topferde-Mischung (Nährstoffkonzentration der Erde = N:P:K = 150:150:250 mg/L) bzw. ein 1:1 Sand:Oil Dri[®]-Gemisch (Quartzsand 0.1-0.5 mm; Oil Dri[®] Damolin, Mettmann, D) umgesetzt. Die Anzuchtsbedingungen blieben gleich.

½ MS-Agar

0,26-4 % Gelrite-Agar

½ Konzentration MS-Salze (MURASHIGE & SKOOG, 1962, Sigma-Aldrich)

½ MS⁺-Agar

0,26-4 % Gelrite-Agar

½ Konzentration MS-Salze (MURASHIGE & SKOOG, 1962, Sigma-Aldrich)

1% Saccharose

0,01% Casaminosäuren

Tabelle 2.1-2: Liste verwendeter Arabidopsis-Linien

NASC = Nottingham Arabidopsis Stock Center; Teile der Informationen entstammen der TAIR-Datenbank (www.arabidopsis.org). NTS = Nukleustranslokationssignal

Linie	Bezeichnung, Kurzbeschreibung	Bezugsstelle	Literaturquelle
Columbia (Col-0)	Wildtyp	NASC N1092	
coi1-16	<i>coronatine-insensitive1</i> , F-Box-Protein mit Missense-Mutation, COI1: zentrale Komponente des JA-Signalweges	B. Hause, Leibniz-Insitut für Pflanzenbiochemie, Halle, D	CHINI et al., 2007; ELLIS & TURNER, 2002
ctr1-1	<i>constitutive tripple response1-1</i> , CTR1: negativer Regulator des ET-Signalweges	NASC N8057	KIEBER et al., 1993
dnd1	<i>death, no defence1</i> , Mutation im Stopcodon des <i>cyclic nucleotide-gated ion channel</i> AtCNGC2, konstitutiver SAR-Phänotyp mit konstitutiv erhöhten SA-Konzentrationen, zeigt Gen-für-Gen-Abwehr ohne HR	NASC N6523	BALAGUE et al., 2003; GENDER et al., 2008; YU et al., 1998; 2000
ein2-1	<i>ethylene-insensitive2-1</i> , EIN2: Komponente des ET-Signalweges unterhalb von CTR1, nicht benötigt für flg22 induzierte Resistenz	NASC N8844	GUZMAN & ECKER, 1990; ZIPFEL et al., 2004
eto1-1	<i>ethylene overproducer1</i> , ETO1: negativer Regulator von ACS5, einem Enzym der Ethylenbiosynthese	NASC N3072	GUZMAN & ECKER, 1990; YOSHIDA et al., 2005
eto3	<i>ethylene overproducer 3</i> , erhöhte Stabilität von ACS9	NASC N8060	CHAE et al., 2003; WOESTE et al., 1999
etr1-3	<i>ethylene receptor1-3</i> , ETR1: membranständiger Etylenrezeptor	NASC N3070	BLEECKER et al., 1988
jar1-1	<i>jasmonate-resistant1-1</i> , JAR1: JA-Amino-Synthetase, Teil des JA-Signalweges	NASC N8072	STASWICK et al., 1992; STASWICK & TIRYAKI, 2004
jin1 Alias myc2	<i>jasmonate-insensitive1</i> , MYC2: Transkriptionsfaktor, erhöhte Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene	NASC N1517005	BERGER et al., 1996; LORENZO et al., 2004
joe1	<i>jasmonate overexpressing1</i> , JOE1: Lokus involviert in verstärkter JA-Signalgebung	NASC N57949	JENSEN et al., 2002
NahG	Überexpression einer SA-Hydroxylase (hydrolysiert SA zu Catechol), keine SA-Akkumulation nach Stimulus	Yves Marco, Toulouse, Frankreich	GAFFNEY et al., 1993; LAWTON et al., 1995
npr1 Alias nim1	<i>nonexpressor of PR-Genes1</i> , NPR1: ankyrinhaltiges Regulatorprotein npr1-1 : Nullmutante (Missense-Mutation, Histidin 334), minimale SAR- und SA-induzierte PR-Genexpression npr1-3 : Deletion von 194 Aminosäuren der NTS, cytosolische Funktion teilweise erhalten, reduzierte PR-Genexpression	NASC N3726 (<i>npr1-1</i>) N3802 (<i>npr1-3</i>)	CAO et al., 1994; 1997; DONG, 2004; GLAZEBROOK et al., 1996; 2003; LEON-REYES et al., 2009
pad3-1	<i>phytoalexin deficient3-1</i> , PAD3: P450 Monooxygenase zur Umwandlung von Dihydrocamalexinsäure zu Camalexin	NASC N3805	ZHOU et al., 1999
sid2-2 Alias ics1 , eds16-1	<i>SA induction-deficient2-2</i> , Mutation in der Isochorismatsynthase I, verringerte SA-Akkumulation und PR-Genexpression, erhöhte Suszeptibilität gegen <i>P. syringae</i>	Ausubel F. M., Dep. of Genetics, Massachusetts General Hospital, USA	DEWDNEY et al., 2000; NAWRATH & Métraux, 1999; WILDERMUTH et al., 2001

2.2 KULTIVIERUNG UND ERHALTUNG VERWENDETER PILZSTÄMME

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem mutualistischen Endophyten *Piriformospora indica* sowie den Pflanzenpathogenen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* A6, *Golovino-mycetes orontii* und *Fusarium graminearum* gearbeitet.

2.2.1 *PIRIFORMOSPORA INDICA*

Bei den hier durchgeführten Versuchen standen zwei Isolate von *P. indica* zur Verfügung, wobei i. d. R. das Isolat *P. indica*-DSM11827 aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, D, eingesetzt wurde. Für die Transkriptom-analyse in Gerste (vgl. Kap. 2.8.2) und die Resistenztests in Arabidopsis (vgl. Kap. 2.9.3) wurde jedoch *P. indica*-JE1, zur Verfügung gestellt von Dr. Ralph Ölmüller, Jena, D, verwendet. Beide Isolate stammen vom Ursprungsisolat aus der indischen Thar-Wüste von 1997 (VERMA et al., 1998). Chlamydosporen der Isolate wurden bei -80 °C als Glycerolstock gelagert und zum Erstellen von Masterplatten - durch Ausstreichen von Glycerolstockkultur auf eine Agarplatte - genutzt. Diese Masterplatten dienten als Ausgangs-material zur Anzucht größerer Mengen an Pilz für die hier durchgeführten Versuche. Die Kultivierung erfolgte in flüssigem bzw. auf mit Agar versetztem modifiziertem *Aspergillus* Minimalmedium (*complex medium*, CM, verändert nach PHAM et al., 2004a) bei Raumtemperatur (RT) für sechs bis acht Wochen.

CM-Medium (modifiziertes *Aspergillus* Minimalmedium)

Zusammensetzung (1 l)	20 x Salzlösung	Mikroelemente
20 x Salzlösung	120 g NaNO ₃	6 g MnCl ₂ x 4H ₂ O
20 g Glucose	10,4 g KCl	1,5 g H ₃ BO ₃
2 g Pepton	10,4 g MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,65 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O
1 g Hefe-Extrakt	30,4 g KH ₂ PO ₄	750 mg KI
1 g Casamino-acid	ad 1 l H ₂ O _{dest}	2,4 mg Na ₂ Mo ₄ x 2H ₂ O
1 ml Mikroelemente		130 mg CuSO ₄ x 5H ₂ O
950 ml dest. Wasser		ad 1 l H ₂ O _{dest}
optional: 15g Agar-Agar		

2.2.2 *BLUMERIA GRAMINIS* F. SP. *HORDEI* A6

Der hier verwendete Echte Gerstenmehltau *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* A6 (*Bgh*) stammt ursprünglich von Dr. J. H. Jørgensen, Agricultural Research, Risø National Laboratory, Roskilde, Dänemark. Zur Erhaltung des Mehлтаus wurden sechs Tage alte Gerstenpflanzen der Sorte Golden Promise mit Konidien des Pathogens bestäubt. Nach weiteren sieben bis acht Tagen bildeten sich auf diesen Pflanzen frische Konidien, die erneut zur Vermehrung oder für die hier durchgeführten Versuche verwendet wurden.

2.2.3 *GOLOVINOMYCES ORONTII*

Der Arabidopsismehltau *Golovinomyces orontii* wurde von Ralph Panstruga, MPI Köln, D, zur Verfügung gestellt. Die Erhaltung und die Bereitstellung des Mehltaus für Versuche erfolgten durch ständige Neuinokulation von vier Wochen alten, in Erde angezogenen hypersuszeptiblen *pad4-1* Arabidopsispflanzen (REUBER et al., 1998) mit frischen Konidien des Pathogens. Hierzu wurden mit einem feinen Pinsel Konidien von befallenen auf neue Pflanzen übertragen.

2.2.4 *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Hier verwendet wurde der *Fusarium graminearum* Stamm 1003, zur Verfügung gestellt von Wilhelm Schäfer (Hamburg, D). Die Vermehrung erfolgte durch Tropfen einer Sporenlösung (50.000 Sporen/ml, 5 Tropfen pro Agarplatte mit d = 9 cm) auf SNA-Agar (*slight nutrient agar*) und weiterer Kultivierung bei RT. Neu gebildete Konidien konnten nach 7-10 Tagen abgeschwemmt und zur Inokulation genutzt bzw. zur Erhaltung bei -80 °C gelagert werden.

SNA-Agar (1 l)

1 g KH₂PO₄
 1 g KNO₃
 0,5 g MgSO₄ x 7 H₂O
 0,5 g KCl
 0,2 g Glucose
 0,2 g Saccharose
 14 g Agar-Agar

2.3 INOKULATION VON PFLANZENWURZELN MIT *P. INDICA*

Die Inokulation von Gerste oder Arabidopsiswurzeln mit *P. indica* erfolgte entweder mit einer Chlamydosporensuspension oder mit zerkleinertem Myzel. Um Pflanzen mit abgetötetem Pilz zu inokulieren wurde das Pilzmaterial für 30 Minuten autoklaviert.

2.3.1 INOKULATION MIT EINER CHLAMYDOSPORENLÖSUNG

Um Pflanzenwurzeln mit einer Chlamydosporenlösung von *P. indica* zu inokulieren wurden selbige von 6-8 Wochen alten, mit *P. indica* bewachsenen Agar-Platten mit einer 0,05 %-igen Tween 20-Lösung abgeschwemmt, durch Miracloth filtriert (22-25 µm Maschenweite, Merck Chemical Ltd, Nottingham, England) und durch dreimaliges Zentrifugieren (3000g, 7 min) und jeweils erneutes Suspendieren in Tween-Lösung aufgereinigt. Wenn nicht anders angegeben wurde eine Konzentration von 500.000 Sporen/ml verwendet. Die Inokulation erfolgte durch direkte Inkubation der Pflanzen in dieser Lösung

(10 min bis 2 h) oder durch die Zugabe einer definierten Menge der Lösung auf das bzw. in das Substrat der entsprechenden Pflanzen (Details siehe Einzelversuche).

2.3.2 INOKULATION MIT MYZEL

Für eine Inokulation mit Myzel wurde der Pilz in Flüssigmedium für 6-8 Wochen aerob schüttelnd angezogen, das Myzel gründlich mit Wasser gewaschen, anschließend in einem Mixer homogenisiert und je nach Versuch auf eine Konzentration von 1,5 bis 3 g Pilz pro 20 ml Wasser eingestellt. In dieser Myzelsuspension wurden vorgekeimte Gerstenkeimlinge für 2 Stunden inokuliert und anschließend in Sand:Seramis getopft (vgl. Kap. 2.1.1).

2.4 PATHOGENINOKULATION UND BONITIERUNG DES BEFALLS

2.4.1 INOKULATION UND BONITIERUNG DES BEFALLS VON ARABIDOPSIS MIT *G. ORONTII*

Inokulation von Arabidopsis mit *G. orontii*

Die Inokulation von Arabidopsispflanzen mit Mehltau erfolgte durch Sprühinokulation. Zur Herstellung der Inokulationslösung wurden Mehltaukonidien stark mit *G. orontii* infizierter Arabidopsisblätter mit 0.02 % Tween 20-Lösung abgewaschen und die Lösung auf 5×10^4 Konidien*ml⁻¹ eingestellt. Diese Lösung wurde direkt auf die zu inokulierenden Pflanzen gesprüht. Die Inokulationsdichte betrug hierbei 4 bis 6 Konidien pro mm² und wurde mittels einer neben den besprühten Pflanzen ausgelegten Fuchs-Rosenthal Zählkammer überprüft.

Bonitierung des Befalls mit *G. orontii*

Das Pathogenwachstum wurde mikroskopisch durch Auszählen von Konidiophoren pro Myzel 5 dai und durch die Bestimmung der Anzahl neu gebildeter Konidien pro Blattfrischgewicht (10 dai) evaluiert. Zum Zählen der Konidiophoren pro Myzel wurden die Blätter 5-6 Tage nach der Inokulation zunächst fixiert und entfärbt (Ent-/ Färbemethoden siehe Kap. 2.5). Anschließend wurden die Pilzstrukturen mittels essigsaurer Tinte angefärbt und mikroskopisch im Durchlicht (Halogenlampe, 12 V, 100 W, Axioplan 2 Imaging-Gerät, Zeiss, Oberkochen, D) ausgewertet. Zum Bestimmen der Anzahl neu gebildeter Konidien wurden ausgewählte Blätter abgeschnitten, ihr Gewicht bestimmt, die Konidien durch starkes Schütteln der Blätter in einem definiertem Volumen 0,01 %iger Tween-Lösung abgewaschen und ihre Anzahl mit einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt.

2.4.2 INOKULATION UND RESISTENZTESTS VON GERSTE MIT *BLUMERIA GRAMINIS* F. SP. *HORDEI* A6 (BGH)

Inokulation von Gerstenpflanzen mit *Bgh*

Zur gleichmäßigen Inokulation ganzer Gerstenpflanzen mit *Bgh* wurde ein Inokulationsturm verwendet. Versuchspflanzen wurden in den Turm gestellt und durch Abpusten von *Bgh*-infizierten Pflanzen mit deutlichen Konidienträgern (Pusteln) über ihnen (Abstand ca. 60 cm) mit dem Pathogen infiziert. Eine gleichmäßige Verteilung der Konidien wurde durch eine rasche Verwirbelung der Luft im Turm mit Hilfe eines Stück Pappe und anschließender kurzer Wartezeit (ca. 2 min) gewährleistet. Die Inokulationsdichte wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer überprüft und betrug zwischen 100-140 Sporen/mm². Bis zur Ernte verblieben die inokulierten Pflanzen wie unter 2.1.1 beschrieben.

Bestimmung der Resistenz von Gerste gegen *Bgh* (Blattsegmenttest)

Zur Bestimmung der Mehlttauresistenz unterschiedlich behandelter Gerstenpflanzen (vgl. Kap. 2.8.2ff) wurden Blattsegmenttests durchgeführt. Dazu wurden die jüngsten voll entwickelten Blätter entsprechender Pflanzen ca. 2 cm vom Halm entfernt abgetrennt und 7 cm große Fragmente mit der adaxialen Seite nach oben auf Wasseragarplatten (0,75 % Agar-Agar, 0,02 % Benzimidazol) ausgelegt. Jeweils 24 bis 36 Blätter pro Variante wurden gemeinsam unter einem Inokulationsturm wie oben beschrieben mit *Bgh*-Konidien inokuliert (ca. 8-12 Sporen/mm²) und nach sechs Tagen die Anzahl gebildeter Pusteln auf den mittleren 5 cm pro Blatt mit Hilfe eines Stereomikroskops ausgezählt.

2.4.3 INOKULATION VON GERSTENWURZELN MIT *FUSARIUM*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur mit abgetöteten Sporen von *F. graminearum* gearbeitet. Die Pilzsporen wurden von 14 Tage alten *Fusarium*-Agarplatten (vgl. 2.2.4) mit Tween-Wasser (0,05 %) abgeschwemmt, über 4-lagige Mullbinden filtriert und anschließend durch dreimaliges Zentrifugieren (5 min, 3000 g) und jeweils erneutes Suspendieren in Tween-Wasser gewaschen. Das Abtöten der Sporen erfolgte durch 30-minütiges Autoklavieren der auf 150.000 Sporen/ml eingestellten Sporensuspension.

2.5 FIXIER- UND FÄRBEMETHODEN

2.5.1 FIXIERUNG UND ENTFÄRBUNG VON PFLANZENMATERIAL

Die Fixierung und Entfärbung von pflanzlichem Blatt- und Wurzelmaterial erfolgte in Fixierlösung bestehend aus Ethanol (80 % v:v), Chloroform (20 % v:v) und 1,5 g/l Trichloressigsäure.

2.5.2 FÄRBUNG PILZLICHER STRUKTUREN

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

Die Färbung pilzlicher Zellwände durch WGA Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Karlsruhe, D) wurde genutzt, um Pilzmaterial an und in Wurzeln sichtbar zu machen. Fixierte Wurzeln (vgl. Kap. 2.5.1) wurden zunächst für 2 Minuten in 10 % Kaliumhydroxid gekocht und anschließend mit 1 x PBS-Puffer gewaschen, bis sich wieder ein neutraler pH-Wert von ca. 7-7,5 eingestellt hatte. Folgend wurden die Wurzeln in der Färbelösung für 3 x 1 Minute in einem Vakuum und noch 10-30 weitere Minuten bei RT inkubiert. Um pflanzliche Zellwände besser sichtbar zu machen, wurde der Färbelösung Kongorot (Endkonzentration: 10 µg/ml) zugefügt. Für die Fluoreszenzbeobachtungen wurde ein Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, D) mit einer Anregungs- bzw. Detektionswellenlänge von 470/20 nm bzw. 505–530 nm verwendet.

Färbelösung

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

1 x PBS-Puffer (pH 7,4)

0,2 g KCl
0,2 g KH₂PO₄
1,15 g Na₂HPO₄
mit H₂O_{dest} auf 1 l auffüllen

Färbung mit essigsaurer Tinte und Calcofluor

Die Färbung pilzlicher Strukturen auf Pflanzenblättern mittels essigsaurer Tinte und Calcofluor erfolgte direkt vor der Mikroskopie. Für die Färbung mit Tinte wurde zuvor fixiertes Blattmaterial für 60-90 s in der Färbelösung (Blaue Tinte [Pelikan 3001, Pelikan, Hannover, D]: 25 % Essigsäure 1:9 [v:v]) inkubiert und anschließend kurz in Wasser geschwenkt. Bei der Färbung pilzlicher Strukturen mit Calcofluor (*Fluorescent Brightener* 28, Sigma) wurde das Material zuvor nicht fixiert, sondern direkt in der Färbelösung (0,3 % Calcofluor) für ca. 60 s inkubiert und anschließend zum Entfernen überschüssiger Farbe ebenfalls kurz in Wasser geschwenkt.

2.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN

2.6.1 DNA-EXTRAKTION

Die Extraktion genomischer DNA aus Pflanzenmaterial erfolgte i. d. R. nach der Methode von DOYLE & DOYLE (1990). Neben dieser Methode wurde auch eine CTAB-Methode eingesetzt. Dies diente der laborinternen Vereinheitlichung der Versuchsbedingungen für die in Kapitel 2.9.2.2 beschriebenen Experimente.

DNA-Extraktion nach DOYLE & DOYLE (1990)

Etwa 200 mg gemörstertes Pflanzenmaterial wurde mit 700 µl Doyle & Doyle-Lösung versetzt, durch leichtes vortexen vermischt und für 30 Minuten bei 65 °C inkubiert. Folgend wurde die Probe mit 700 µl 24:1 (v:v) Chloroform:Isoamylalkohol (CIA) versetzt, 5 Minuten geschwenkt, anschließend zentrifugiert (15 min, 10.000 rpm, RT) und die wässrige, obere Phase in ein neues Gefäß überführt. Zu dieser wurden noch einmal 600 µl CIA pipettiert und der Aufreinigungsschritt wie zuvor wiederholt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von Salzen (60 µl 1,5 M Ammoniumacetat und 50 µl 2,5 M Natriumacetat) sowie 500 µl Isopropanol für 20-30 Minuten auf Eis ausgefällt, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die getrocknete DNA wurde in TE-Puffer mit 0,2 µg RNase A bei 37 °C für 30 Minuten gelöst, kurz abzentrifugiert und in ein frisches Gefäß überführt.

Doyle & Doyle-Extraktionspuffer:

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)
20 mM EDTA (pH 8,0)
1,4 M NaCl
2 % CTAB
1 % Na₂S₂O₅
0,2 % β-Mercaptoethanol (frisch hinzufügen)

TE-Puffer

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

DNA-Extraktion nach der CTAB-Methode

Bei dieser Methode wurden 200-300 mg gemörstertes Material mit 900 µl vorgewärmtem (65 °C) CTAB-Extraktionspuffer vermischt, 60-90 Minuten bei 65 °C im Wasserbad inkubiert und nach kurzem Abkühlen (4-5 min) mit 450 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Nach 5-10 Minuten schwenken und nachfolgender Zentrifugation (15 min, 10.000 rpm, RT) wurde die obere Phase abgenommen und der Aufreinigungsschritt wiederholt. Anschließend wurde die obere Phase in ein neues Gefäß mit 3 µl RNase A (10 mg/ml) überführt, 30 Minuten inkubiert (RT), mit 600 µl Isopropanol vorsichtig vermischt und erneut für 20 Minuten inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde durch

Zentrifugation pelletiert (30 min, 13.000 rpm, RT) und anschließend zunächst mit WASH 1 (75 % Ethanol, 0,2 M Natriumacetat) und folgend mit WASH 2 (75 % Ethanol, 10 mM Ammoniumacetat) für jeweils 20 Minuten aufgereinigt. Das luftgetrocknete Pellet wurde abschließend in 30-50 µl TE-Puffer (s. o.) gelöst.

CTAB-Extraktionspuffer

100 mM Tris (pH 7,5)
700 mM NaCl
50 mM EDTA (pH 8,0)
1 % CTAB₂
140 mM β-Mercaptoethanol

Anmerkung:

Diesen Puffer stets frisch ansetzen und CTAB sowie β-Mercaptoethanol erst nach Erwärmen auf 65°C zugeben.

2.6.2 RNA-EXTRAKTION

Vor der Extraktion von Gesamt-RNA aus Blattmaterial wurde dieses in flüssigem Stickstoff gemörstert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte nach LOGEMANN et al. (1987) oder durch Verwendung von TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, D). Mögliche DNA-Kontaminationen wurden unabhängig von der Extraktionsmethode mittels DNaseI-Behandlung mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, D) nach Angaben des Herstellers verdaut.

Extraktion von Gesamt-RNA nach LOGEMANN et al. (1987)

Für das Protokoll nach LOGEMANN et al. (1987) wurden ca. 200 mg gemörstertes Material mit 1,5 ml RNA-Extraktionspuffer versetzt, gut durchmischt und anschließend 200 ml Chloroform hinzugegeben.

RNA-Extraktionspuffer

38 ml Phenol in gesättigtem Puffer
11,82 g Guanidin-Thiocyanat
7,60 g Ammonium-Thiocyanat
3,34 ml Natriumacetat [3 M]
5 ml Glycerol
ad 100 ml H₂O_{DEPC}

H₂O_{DEPC} (DEPC-Wasser)

H₂O_{dest} + 0,1 % [v:v] DEPC
(Diethylpyrocarbonat)

Die Lösung 2 h rühren, über Nacht bei 37 °C inkubieren und anschließend autoklavieren.

Nach erneutem Mischen wurden die Proben für 15 Minuten unter gelegentlichem vortexen auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min, 14.000 rpm, 4 °C). Die dabei entstandene obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, in einem weiteren Reinigungsschritt mit 850 µl Chloroform vermischt und wie zuvor zentrifugiert. Folgend wurde die obere Phase mit 5 M Lithiumchlorid im gleichen Volumen versetzt und zur Fällung der RNA über Nacht bei -20 °C gelagert. Im Anschluss wurde die RNA durch Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm, 4 °C) pelletiert, das Pellet 2 x mit 900 µl 70 % Ethan-

ol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Um möglicherweise vorhandene verunreinigende Polysaccharide abzutrennen wurde die RNA-Lösung erneut für 10 Minuten bei 14.000 rpm (4 °C) zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Extraktion von Gesamt-RNA mittels TRIzol-Reagenz

Für die Extraktion von RNA mit TRIzol wurde 1 ml TRIzol-Reagenz (Invitrogen) zu ca. 200-300 mg gemörsertem Pflanzenmaterial pipettiert, der Ansatz durch starkes Vortexen gut gemischt und für 2-3 Minuten bei RT inkubiert. Die Abtrennung von Proteinen und DNA erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Chloroform, kurzem aber starkem Schütteln, einer Inkubation von 2-3 Minuten bei RT und folgender Zentrifugation (20 min, 4 °C, 14.000 rpm). Aus dem wässrigen Überstand wurde anschließend die RNA mit 500 µl Isopropanol für 30 Minuten bei RT gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 14.000 rpm, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und für 5 Minuten bei 64°C gelöst.

2.6.3 KONZENTRATIONS- UND REINHEITSBESTIMMUNG VON RNA- UND DNA-PROBEN

Standardmäßige Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von DNA- und RNA-Proben erfolgten auf dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D).

Um die Qualität von RNA-Proben genauer zu überprüfen, wurden die Proben im Agilent 2100 Bioanalyser nach Anleitung (Agilent RNA 6000 Nano Kit Manual) analysiert (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Die im Bioanalyser verwendete „*Lab-on-a-chip*“-Technologie basiert auf dem Prinzip der Mikrofluidik, d. h. der Steuerung winziger Flüssigkeitsmengen in einem miniaturisiertem System. Durch den Bioanalyser wird die farbstoffmarkierte RNA kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und über einen Laser detektiert. Über die zum Bioanalyser gehörige Software werden zur Auswertung ein Elektropherogramm und hieraus eine Abbildung in Gelform erstellt.

2.6.4 cDNA-SYNTHESE

Zur Transkription von Gesamt-RNA in cDNA wurde die SuperScript II (SuperScriptII cDNA Synthesis Kit, Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Pro Reaktion wurden jeweils 0,5-1 µg Gesamt-RNA und sowohl 50 µM OligodT- als auch 50 ng Random-Hexamer-Primer eingesetzt. Nach erfolgter reverser Transkription wurde die RNA durch Zugabe von 2 u RNase H (Fermentas) pro Ansatz nach Angaben des Herstellers verdaut und jede Reaktion auf theoretische 2,5 ng/µl Eingangs-RNA eingestellt.

2.6.5 STANDARD POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die standardmäßige PCR wurden in einem Volumen von 25 µl mit 1,25 u DCSPol DNA-Polymerase (DNA Cloning Service, Hamburg, D), 2,5 µl 10 x Inkubationspuffers, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) und 10 pmol der entsprechenden Oligonukleotide durchgeführt. Als Template dienten DNA-Mengen zwischen 100 pg und 100 ng. Die Amplifikation wurde wie unten angegeben im T^{Professional}- oder T^{Personal}-Cycler (Biometra, Göttingen, D) bzw. im Thermocycler Perkin Elmer 2400 (Perkin Elmer, Boston, USA) durchgeführt.

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

Die Anlagerungstemperaturen (AT) für die verwendeten Primerpaare sind in Kapitel 2.10 angegeben. Wenn notwendig erfolgte eine Auftrennung der Amplifikate nach Zugabe von 10 x DNA-Ladepuffer mittels Gelelektrophorese in mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegelen (1,5-2 %-ige TBE-Gele, 0,7 Vol % Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml)). Die Visualisierung erfolgte auf einem UV-Transluminator (Fröbel-Labortechnik, Lindau, D) bei einer Wellenlänge von 312 nm. Zur Dokumentation wurde eine Videodokumentationsanlage (digitStore, INTAS, Göttingen, D) verwendet. Aufreinigungen von PCR-Reaktionen oder von aus dem Gel ausgeschnittenen Banden erfolgten mit Hilfe des Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega GmbH, Mannheim, D).

10 x TBE

900 mM Tris
900 mM Borsäure
25 mM EDTA
ad 1 l H₂O_{dest}, pH 8,0

10 x Probenpuffer

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

2.6.6 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) wurde zur Bestimmung des Verhältnisses von genomischer Pilz zu genomischer Pflanzen DNA in Wurzelproben und zur relativen Quantifizierung ausgesuchter Transkripte in cDNA-Proben verwendet. Pro Reaktion wurden 10 ng umgeschriebene Gesamt-RNA (cDNA) bzw. 40 ng genomische DNA in 15 µl oder 20 µl SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich) mit 350 nM Oligonukleotiden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Jede Probe wurde als Triplikat angesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem Cycler von Stratagene (Stratagene-

Mx3000P QPCR System Mx3000P; Stratagene Research, La Jolla, CA, USA) oder von Applied Biosystems (Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR, Applied Biosystems Inc., CA, USA) mit gleichen PCR-Programmen. Nach einem ersten Denaturierungsschritt (95 °C, 7 min) folgten 40 Amplifikationszyklen mit einer primerabhängigen Anlagerungstemperatur (AT, vgl. Kap. 2.10) und dem folgenden Programm: 95 °C 30 s, AT 30 s, 72 °C 30 s. Am Ende jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen und im Anschluss an die PCR eine Dissoziationskurve im Bereich von 60-95 °C in 0,5 °C-Schritten aufgezeichnet. Die Cyclethreshold (Ct)-Werte wurden von der zu den Instrumenten gehörigen Software bestimmt und die relativen Expressionswerte ($2^{-\Delta C_t}$) nach LIVAK & SCHMITTGEN (2001) berechnet. Als Referenzgen fungierten in Arabidopsis und Gerste i. d. R. jeweils ein konstitutiv exprimiertes Gen für Ubiquitin (Bezeichnung: UBQ5 (Arabidopsis), UBI60deg (Gerste)). In den im Rahmen dieser Arbeit erstellten Mehлтаukinetiken (vgl. Kap. 2.8.3) wurden zusätzlich noch zwei weitere Referenzgene, eins für die ribosomale 18 S-Untereinheit (18S-Primer) sowie eins für ein weiteres Ubiquitin (Primer HKG1), in die Berechnungen mit einbezogen. Die Sequenzen der verwendeten Primer finden sich in den Tabellen in Kapitel 2.10.

2.6.7 *E. COLI*-TRANSFORMATION

Hitzeschock-Transformation

Die Transformation von *E. coli*-Zellen erfolgte durch Hitzeschock. Hierzu wurden hitzekompetente DH5 α - oder Top10-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) auf Eis aufgetaut, 50-300 ng des zu klonierenden Plasmids zu den Zellen gegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s und ein schnelles Abkühlen auf Eis für 2 Minuten. Zur Regeneration der Zellen wurden 250 μ l SOC-Medium zu den Zellen gegeben, der Ansatz für 45 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit vom Konstrukt abhängigem Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen.

LB-Medium oder -Agar

10 g/L Trypton
5 g/L Hefeextrakt
10 g/L NaCl
optional: 15 g/L Agar-Agar

SOC-Medium

20 g/L Trypton
0,58 g/L NaCl
0,185 g/L KCl
2,03 g/L MgCl₂ $\times$ 7H₂O
2,46 g/L MgSO₄ $\times$ 7H₂O
3,6 g/L Glukose

Antibiotika

1 ml/L Ampicillin (100 mg/ml in H₂O)
1 ml/L Chloramphenicol (100 mg/ml in Ethanol)
1 ml/L Kanamycin (50 mg/ml in H₂O)

Herstellung hitzekompetenter DH5 α -Zellen

Zur Vermehrung hitzekompetenter DH5 α -Zellen wurden diese zunächst über Nacht in LB-Medium vermehrt und mit 1 ml dieser Kultur am nächsten Tag erneut 200 ml LB-Medium angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von 0,6 unter aeroben Bedingungen bei 37 °C angezogen [photometrische Messung (BioRad SmartSpecTM Plus Photometer) bei 600 nm; OD₆₀₀]. Danach wurden sie auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (10 min, 3.000 rpm, 4 °C) und anschließend in 80 ml TFB1-Medium aufgenommen. Nach 10 Minuten auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in 8 ml TFB2-Medium resuspendiert, in 200 μ l Aliquots portioniert und bei -80 °C gelagert.

TFB1-Medium: (steril filtriert)

100 mM RbCl
45 mM MnCl₂
35 mM Kaliumacetat
10 mM CaCl₂
0,5 mM LiCl
15 % (v:v) Glycerol
pH 5,8 (eingestellt mit Essigsäure)

TFB2-Medium: (steril filtriert)

75 mM CaCl₂
10 mM Na-MOPS (pH 7)
10 mM RbCl
15 % (v:v) Glycerol

2.6.8 PLASMIDISOLIERUNG UND SEQUENZIERUNG

Die Isolation von Plasmiden aus *E.coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe der Kits NucleoSpin[®] Plasmid bzw. Nucleobond[®] Ax von Macherey und Nagel (Düren, D) nach Angaben des Herstellers.

Sequenzierungen von Plasmiden oder PCR-Produkten wurden von der AGOWA GmbH, Berlin, D, vorgenommen.

2.7 TRANSIENT INDUCED GENE SILENCING (TIGS)

In Analogie zu SCHWEIZER et al., 1999 und DOUCHKOV et al., 2005 wurde mittels TIGS (*transient induced gene silencing*) untersucht, ob sich das Ausschalten bestimmter Gene durch RNAi auf die *Bgh*-Penetrationsrate in Gerste auswirkt. Zum Erstellen der dazu nötigen RNAi-Konstrukte wurden das Gateway-Klonierungssystem und die von DOUCHKOV et al., 2005 veröffentlichten Vektoren verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Eichmann, TU München, D).

2.7.1 KLONIERUNG DER RNAi-KONSTRUKTE

Die Erstellung der RNAi-Konstrukte im Gatewaysystem setzt zwei Klonierungsreaktionen voraus. Zunächst muss die gewünschte Sequenz in den „Eingangsvektor“ (hier:

pIPKTA38) kloniert werden. Dieser erlaubt nachfolgend den doppelten, komplementären Einbau der Sequenz in den „Zielvektor“ (hier: pIPKTA30N) über die Rekombinationsstellen (att-sites) der Vektoren in einem Schritt. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 2.7-1 vereinfacht dargestellt. Die dazugehörigen Vektorkarten finden sich im Anhang.

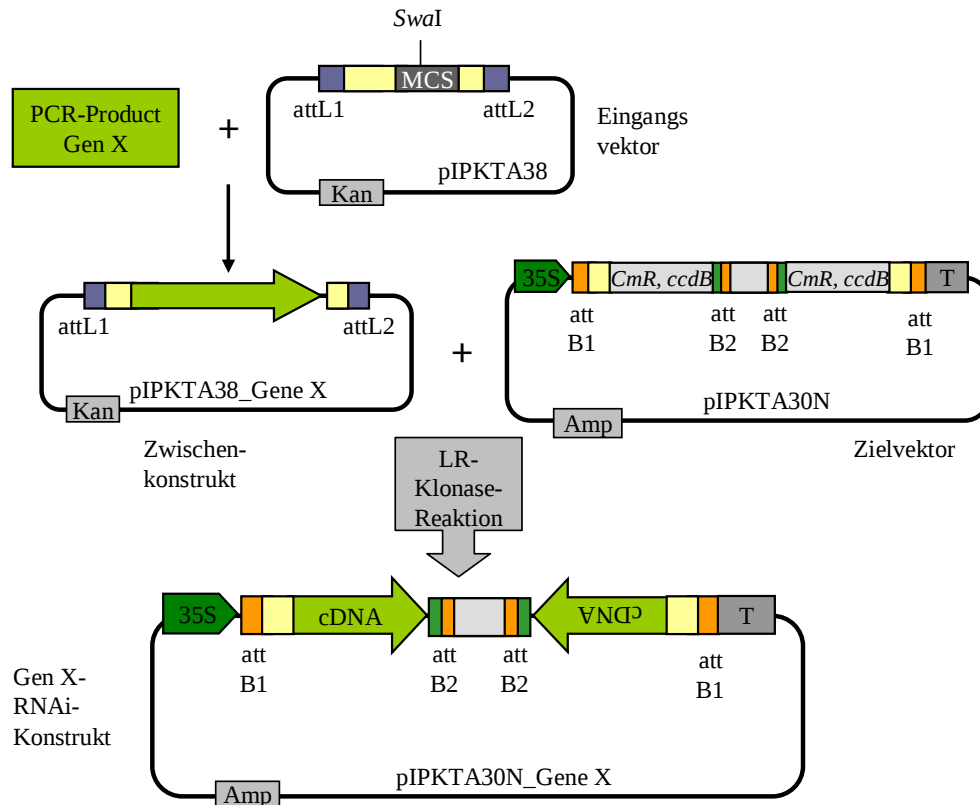


Abb. 2.7-1: Vereinfachte Darstellung der Klonierungsstrategie für ein RNAi-Konstrukt eines Gens X. Das nicht phosphorylierte PCR-Produkt eines Fragmentes X des zu untersuchenden Gens wird über die *SwaI*-Schnittstelle in den Eingangsvektor pIPKTA38 ligiert. Anschließend wird das PCR-Fragment doppelt in den Zielvektor pIPKTA30N durch eine LR-Klonasereaktion inseriert. Vereinfachte Darstellung nach DOUCHKOV et al., 2005. T = Terminator; 35S = CaMV 35S-Promotor; att = Rekombinationsstellen; Vektordetails siehe Vektorkarten im Anhang.

Ligation in den Eingangsvektor pIPKTA38

Bis zu 500 bp lange cDNA-Fragmente der auszuschaltenden Sequenzen (Sequenzen und Primer siehe Kap. 7.1) wurden durch Verwendung sequenzspezifischer Primer wie in Kapitel 2.6.5 angegeben mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt. Zur Amplifikation wurde, um glatte Enden zu erhalten, die *Pfu*-Polymerase (Promega GmbH) verwendet. Als Template diente cDNA aus den Mikroarrayexperimenten (vgl. Kap. 2.8.2). Ein Teil der aufgereinigten PCR-Fragmente wurde sequenziert (vgl. Kap. 2.6.8). Bestätigte die Sequenzierung die fehlerfreie Amplifikation des gewünschten Produktes, wurde dieses mittels T4-Ligase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) in die *SwaI*-Schnittstelle des

Vektor pIPKTA38 bei Raumtemperatur ligiert (1h oder über Nacht). Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wurde *SwaI* direkt zum Ligationsansatz gegeben. Durch eine Inkubation für 15 Minuten bei 65 °C wurde die Reaktion gestoppt, nochmals 5 U *SwaI* (in 5 µl des 1x Puffers O^+ von Fermentas) zum Ansatz hinzugefügt und dieser für 1 Stunde bei RT inkubiert, um religierte Plasmide zu eliminieren. Der Ansatz wurde anschließend in hitzekompetente DH5 α -Zellen transformiert und auf LB-Kanamycinplatten ausplattiert (vgl. Kap. 2.6.7). Die Orientierung der Fragmente im Vektor wurde durch Kolonie-PCR der Klone unter Verwendung eines vektor- und eines konstruktsspezifischen Primers ermittelt (Primersequenzen siehe Tabellen 2.7-1 und 7.1-1). Nur Klone mit *antisense* orientierten Fragmenten wurden weiter verwendet.

Ligationsansatz:

5 U *SwaI*,
 2,5 U T₄-DNA-Ligase
 10 x T₄-DNA-Puffer (+ NaCl, 50 mM End-Konzentration)
 150 ng pIPKTA38-Plasmid-DNA
 ca. 300 ng PCR-Fragment
 ad 10 µl H₂O_{dest}

LR-Reaktion

Der Transfer des cDNA-Fragmentes im Vektor pIPKTA38 in die RNAi-Kassetten des Zielvektors pIPKTA30N erfolgte durch genetische Rekombination in einer LR-Klonase-Reaktion (Nomenklatur "Gateway"-System) unter Verwendung des Invitrogen Gateway® LR-Clonase-Mix nach Angaben des Herstellers. In den LR-Klonase-Mix wurden 150 ng des Konstruktes pIPKTA38-GenX als auch des Zielvektors (pIPKTA30N) eingesetzt, der Ansatz über Nacht bei 25 °C inkubiert und anschließend zur Transformation hitzekompetenter Top10-Zellen (Invitrogen) verwendet. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte auf LB_{Amp}-Platten. Eine negative Selektion auf Zellen mit fragmentlosem pIPKTA30N erfolgte durch das *ccdB*-Killergen in der RNAi-Doppelkassette. Die richtige Orientierung der Fragmente im Zielvektor wurde durch Kolonie-PCR mit den Primerpaaren TA30NIntrI + reverser Konstruktprimer und TA30NInrII + reverser Konstruktprimer überprüft (Primersequenzen siehe Tabellen 2.7-1 und 6.1-1).

Tabelle 2.7-1: pIPKTA38 und pIPKTA30N spezifische Primer. AT = Anlagerungstemperatur

Bezeichnung	AT	Position	Sequenz
pIPKTA38 fwd	52	28 fwd	5'-AGCAGGCTTTAAAGGAACC-3'
pIPKTA38 rev	52	496 rev	5'-TGTACAAGAAAGCTGGGTCT-3'
TA30NIntrI	54	834 fwd	5'-GGATAGCCCTCATAGATAGAGTACTAACTAA-3
TA30NInrII	52	559 rev	5'-TCAAATTAAACAAATGCAGTATGAAGA-3'

2.7.2 TRANSIENTE TRANSFORMATION

Der Einfluss der erstellten RNAi-Konstrukte (vgl. Kap. 2.7.1) auf die *Bgh*-Penetrationsrate wurde mit Hilfe der biolistischen Transformation von Gerstenepidermiszellen ermittelt. Hierzu wurden Epidermiszellen 7 Tage alter Primärblätter der Sorte Pallas durch biolistisches Bombardement mit Wolframpartikeln (M17, 1,1 μm , BioRad, München, D), die ein Reportergenkonstrukt (*GFP* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotor) und das zu untersuchende RNAi-Konstrukt trugen, transformiert. Zur Vorbereitung der Partikel wurden 55 μg von diesen zweimal mit jeweils 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ und einmal mit 1 ml 100 % Ethanol gewaschen und danach pelletiert. Nach dem Trocknen wurden 2 ml 50 %-iges Glycerol hinzugegeben und die Partikel bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Vor jedem Gebrauch wurden die Wolframpartikel stark durchmischt und für zehn Minuten im Ultraschallbad sonifiziert. Zum Präzipitieren der Plasmid-DNA auf die Partikel wurden pro Schuss 12,5 μl der vorbereiteten Partikel mit 0,5 μg Reporterplasmid (pGY1-*GFP*) sowie 1 μg RNAi-Konstrukt bzw. Kontrollplasmid vermischt und tröpfchenweise unter vortexen 12,5 μl 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ pro Schuss hinzugegeben. Als Kontrollplasmid fungierte der leere Zielvektor pIPKTA30N. Der Ansatz wurde für ca. 10 Minuten auf Eis inkubiert, kurz zentrifugiert und so viel Überstand abgenommen, dass pro Schuss 6 μl verblieben.

Zum Beschuss wurden ca. 4 cm lange Gersten-Blattsegmente in Petrischalen (d = 6 cm) mit 0,5 % Wasseragar (Agar-Agar, Roth) ausgelegt. Pro Konstrukt wurden 8 Schalen mit jeweils 4 Blattsegmenten vorbereitet, die Segmente mittels einer Plastischablone fixiert und in einer Vakuumkammer unter den von SCHULTHEISS (2003a) optimierten Parametern (100 mbar Restdruck, 9 bar Heliumgasdruck) mit den Partikeln beschossen. Hierzu wurden auf einen an der Kammerdecke angebrachten *Macrocarrier* (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) die präparierten Partikel aufgeladen, durch eine Membranvakuumpumpe der Druck in der Kammer um 0,9 bar reduziert und die Partikel mit 9 bar Heliumgasdruck durch einen Diffusor (Nylonnetz, Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn, D) auf die Blätter geschossen. Der Abstand zwischen Diffusor und Blättern betrug 5 cm, der Abstand zwischen *Macrocarrier* und Diffusor 11 cm. Direkt nach der Entladung wurde die Kammer durch Belüften wieder auf normalen Druck gebracht. Die geschlossenen Petrischalen wurden folgend für 24-48 Stunden in einer Klimakammer (16 h Licht, 18/22 °C) inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Blätter in den Schalen mit *Bgh* inokuliert (150-200 Sporen/ mm^2 , vgl. Kap. 2.4.2) und für weitere 48 h wie zuvor inkubiert.

48 Stunden nach *Bgh*-Inokulation wurde die Entwicklung des Pathogens nach vorherigem Anfärben der pilzlichen Strukturen mit Calcofluor (vgl. Kap. 2.5.2) mikroskopisch ausgewertet. Die gefärbten Blätter wurden unter Fluoreszenzanregung (Quecksilberlampe, HBO 50 W, Osram) mit Hilfe eines *GFP*-Filters (Anregungsfilter 420 nm/ Farbteiler 493 nm/ Sperrfilter 505-530 nm) nach Zellen mit *GFP*-Fluoreszenz abgesucht. Interaktionen dieser Zellen mit dem Pilz wurden unter Verwendung des *GFP*-Filters, eines Calcofluorfilters (365 nm/ 395 nm/ 420 nm) bzw. des Durchlichts (Halogenlampe, 12 V, 100 W) charakterisiert. Unterschieden wurden penetrierte Zellen (Ausbildung eines Haustoriums) und Zellen mit einem gestoppten Penetrationsversuch (Papillenbildung unter dem Appressorium, kein Haustorium). Die Penetrationsrate wurde als Quotient der Summe der penetrierten Zellen und der Summe aller Interaktionsstellen berechnet.

2.8 UNTERSUCHUNG SYSTEMISCHER UND LOKALER EFFEKTE IM SYSTEM *H. VULGARE* - *P. INDICA*

2.8.1 ANALYSE *P. INDICA*-INDUZierter MORPHOLOGISCHER VERÄNDERUNGEN

Der Einfluss einer Besiedlung durch *P. indica* (hier: Isolat DCSM11827) auf das Wurzel- und Sprosswachstum in Gerste wurde in Abhängigkeit von der Besiedlungsstärke und dem Besiedlungszeitraum untersucht. In ersten Versuchen wurden dazu Gerstenkeimlinge mit unterschiedlichen Konzentrationen einer *P. indica* Chlamydosporensuspension (5.000 bis 1 Millionen Sporen/ml) inokuliert und folgend steril auf Agar in Gläsern angezogen (vgl. Kap. 2.1.1 und 2.3.1). Zur Inokulation wurden die Keimlinge für 30 s in eine entsprechende Sporenlösung getaucht und noch zusätzlich 1 ml der Lösung pro vier Keimlingen auf den Agar gegeben. 7 und 10 Tagen nach Inokulation wurde von den Pflanzen die Anzahl der gebildeten Seitenwurzeln bestimmt (Verzweigungen der primären und sekundären Keimwurzeln) und die DNA aus den Wurzeln nach DOYLE & DOYLE (1990) extrahiert (vgl. Kap. 2.6.1). Letztere wurde verwendet, um das Verhältnis von pflanzlicher zu pilzlicher DNA in den unterschiedlichen Proben zu bestimmen. Hierzu wurden 40 ng der extrahierten DNA pro Probe als Template in eine qPCR eingesetzt (vgl. Kap. 2.6.6). Als Primer dienten UBI60deg (Pflanzen-DNA) und Piri-ITS (Pilz-DNA) (Sequenzen siehe Tabellen Kap. 2.10, Berechnungen siehe Kap. 2.9.2).

Auf diesen Versuchen aufbauend erfolgte eine detaillierte Analyse des *P. indica* induzierten Wachstumseffektes in Topfkultur. Dazu wurden wiederum Gerstenkeimlinge mit verschiedenen Konzentrationen einer Chlamydosporenlösung inokuliert, diesmal jedoch in Sand:Seramis getopft und über einen Zeitraum von drei Wochen (7, 14 und 21

Tage nach Inokulation (dai)), die Parameter Länge und Gewicht von Spross und Wurzeln gemessen. Zusätzlich wurde die Anzahl an gebildeten Seitenwurzeln 7 dai ermittelt. Zur Inokulation wurden Sporenkonzentrationen in 10er Schritten von 3.000 bis 3 Millionen Sporen/ml verwendet und die Gerstenkeimlinge für eine Stunde darin geschwenkt. Die Anzucht der Pflanzen und die Inokulation mit *P. indica* erfolgten wie in Kapitel 2.1.1 und 2.3.1 angegeben. Die Effekte der Faktoren ‚Experiment‘, ‚Zeit‘ und ‚*P. indica* Inokulation‘ auf die Parameter Länge, Frischgewicht und Trockengewicht sowie die Interaktion dieser beiden Faktoren miteinander wurde in einer Varianzanalyse (ANOVA) unter Zuhilfenahme des General Linear Model (GLM) berechnet (SPSS, durchgeführt von F. Waller, Universität Würzburg, D).

2.8.2 TRANSKRIPTOMANALYSE VON GERSTENBLÄTTERN

Zur Detektion differenziell exprimierter Gene in Blättern *P. indica* besiedelter Gerstenpflanzen wurde der 22K Barley1 GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, USA) verwendet. Dieser Mikroarray wurde auf der Basis von 350.000 hochqualitativen ESTs aus 84 cDNA-Bibliotheken und zusätzlichen 1145 Gerste-Genom-Sequenzen aus der nicht redundanten Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) entworfen (CLOSE et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt drei unabhängige Mikroarrayexperimente (AE I bis III) durchgeführt und pro Experiment wurden jeweils 12 Arrays mit markierter cRNA hybridisiert. Das Material für die cRNA stammte aus Blattproben, geerntet zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation eines Teils der verwendeten Pflanzen mit Mehltau (12, 24 und 96 Stunden nach Inokulation (hai)). Zu jedem Erntezeitpunkt wurden dabei die folgenden vier Varianten unterschieden: (1) *P. indica* besiedelte und (2) nicht besiedelte Pflanzen (Kontrollen) ohne Mehltauinokulation sowie (3) *P. indica* besiedelte Pflanzen und (4) Kontrollen, die mit Mehltau inokuliert worden waren (vgl. Tabelle 3.2-1).

2.8.2.1 Anzucht und Inokulation des Pflanzenmaterials für die Arrayanalysen

Zur Anzucht des Pflanzenmaterials für die Arrayexperimente wurden vorgekeimte Gerstensamen (vgl. Kap. 2.1.1) der Sorte Golden Promise (Vermehrung IPK Gatersleben) für mindestens 2 Stunden in zerkleinertem Myzel von *P. indica*-JE1 (vgl. Kap. 2.3.2) bzw. in 0,05 % Tween-Wasser (Kontrollen) inkubiert. Darauf folgend wurden die Keimlinge in ein Seramis:Oil Dri®-Gemisch (2:1) getopft und unter den in Kapitel 2.1.1 angegebenen Bedingungen angezogen. Pro Topf (300 ml) wurden drei Keimlinge gesetzt und direkt auf die Keimlinge 20 ml á 2-3 g zerkleinertem *P. indica*-Myzel gegossen. 19 Tage später

wurde jeweils die Hälfte der Kontrollen bzw. mit *P. indica* kolonisierten Pflanzen mit *Bgh* inokuliert (vgl. Kap. 2.4.2). Zu den Zeitpunkten 12, 24 als auch 96 hpi wurde von 12-16 Pflanzen pro Variante jeweils das jüngste voll entwickelte Blatt (hier: zweites Sekundärblatt) abgeschnitten, diese vereinigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das so erhaltene Pflanzenmaterial wurde nur für die sich anschließenden Arrayhybridisierungen verwendet, wenn in dem entsprechenden Versuch eine eindeutige biologische Aktivität von *P. indica* bezüglich Wachstum und Resistenz gezeigt werden konnte. Dies wurde durch das Messen und Vergleichen der Sprosslänge und des Sprossgewichtes von Kontrollen und durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen bzw. durch einen Blattsegmenttest (vgl. Kap. 2.4.2) überprüft. Die einzelnen Proben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff gemörsert und bei -80 °C gelagert.

2.8.2.2 Synthese von biotinmarkierter cRNA und Hybridisierung der Mikroarrays

Die verwendeten Mikroarrays wurden mit biotinmarkierter cRNA aus den zu analysierenden Proben hybridisiert. Für die Herstellung biotinylierter cRNA wurde zunächst die Gesamt-RNA nach LOGEMANN et al. (1987) aus den gemörserten Blattproben (vgl. Kap. 2.8.2.1) extrahiert und durch DNaseI-Verdau von unerwünschter DNA befreit (vgl. Kap. 2.6.2). Die Kontrolle der RNA-Qualität erfolgte mit Hilfe des Bioanalyzers (vgl. Kap. 2.6.3). Anschließend wurden 5 µg der Gesamt-RNA für die Hybridisierung nach Anleitung im GeneChip® Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) vorbereitet. Hierzu wurde die RNA zunächst in doppelsträngige cDNA und nach einem Aufreinigungsschritt in mit Biotin markierte, komplementäre RNA (*complementary* RNA, cRNA) transkribiert. Anschließend wurde letztere aufgereinigt und mittels RNase fragmentiert. Abweichend vom Protokoll erfolgte der Aufreinigungsschritt vor der Fragmentierung mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Eine Überprüfung der Fragmentierung erfolgte auf dem Bioanalyzer. Die Hybridisierung des GeneChip® Barley Genome Arrays (49er Format) mit 15 µg der fragmentierten cRNA und das Einlesen der Signale in den Computer wurde nach Angaben des Herstellers (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) am Max Planck Institut in Marburg (AG Kämper) an der dortigen Affymetrix Fluidics Station durchgeführt.

2.8.2.3 Auswertung und Überprüfung der Mikroarrayexperimente

Die Hintergrundbereinigung und Normalisierung der aus den Hybridisierungen der Mikroarrays erhaltenen Probandaten erfolgte mittels des *Guanine-Cytosine Robust Multi-Array Analysis* (GC-RMA)-Algorithmus durch Jörn Pons, Universität Gießen, D.

GC-RMA ist eine Modifikation des *Robust Multiarray Analysis* (RMA)-Algorithmus und bezieht die Probensequenz auf dem Mikroarray mit in die Berechnungen der Expressionswerte ein. Die so erhaltenen, bereinigten Expressionswerte wurden mit Hilfe des *open-source* Softwareprojektes *Bioconductor* (Plattform R) weiter ausgewertet (www.bioconductor.org; Selektionskriterien siehe Ergebnisteil Kap. 3.2). Datensätze weiterer Mikroarrayexperimente und die Sequenzen der auf dem Array hybridisierten Proben sind öffentlich auf der *BarleyBase* unter www.plexdb.org zu finden. Eine Überprüfung der in den Arrayanalysen beobachteten Expressionsunterschiede für bestimmte Transkripte (Kandidaten) erfolgte mittels qPCR (vgl. Kap. 2.6.6). Hierzu erfolgte eine cDNA-Synthese (vgl. Kap. 2.6.4) mit der auch für die cRNA-Synthese der Mikroarrayexperimente verwendeten RNA.

2.8.3 MEHLTAUKINETIKEN

Um zeitlich detaillierte Transkriptionsmuster von Genen nach Mehltauinokulation zu erhalten, wurde innerhalb der ersten 24 Stunden nach *Bgh*-Inokulation im Abstand von 2 bis 4 Stunden Blattmaterial eingesammelt und weiter analysiert (vgl. Tabelle 2.8-1).

Tabelle 2.8-1: Erntezeitpunkte der Mehltaukinetiken I bis III

	Erntezeitpunkte nach Infektion mit <i>Bgh</i> [hai]
Kinetik I = Arrayexperiment III	0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 96 hai
Kinetik II	0, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 hai
Kinetik III	0, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 hai

In diesen Kinetiken wurden, wie in der Transkriptomanalyse (vgl. Kap. 2.8.2), die vier Varianten Kontrolle, Kontrolle plus *Bgh*, *P. indica* kolonisiert und *P. indica* kolonisiert plus *Bgh* unterschieden. Auch die Pflanzenanzucht, die Inokulation selbiger mit *P. indica* und *Bgh* und das Einsammeln der Proben erfolgte wie dort beschrieben (vgl. Kap. 2.8.2.1). Es wurde zudem darauf geachtet, dass die Zeitpunkte 12 und 24 Stunden nach Inokulation mit *Bgh* zur selben Tageszeit wie bei der Durchführung der Arrayexperimente lagen. Zudem wurden, ebenfalls wie bei der Transkriptomanalyse, nur Experimente weiter ausgewertet, die eine eindeutige biologische Aktivität von *P. indica* (Wachstumssteigerung und Resistenzinduktion) gezeigt hatten (vgl. Kap. 2.8.2.1). Die Proben der Zeitpunkte 12, 24 und 96 hai der Kinetik I waren zugleich die Proben der dritten Wiederholung der Mikroarrayexperimente (AE III) aus Kapitel 2.8.2. Die RNA-Extraktion aus den Proben mit TRIzol und die folgende cDNA Synthese erfolgten wie in Kapitel 2.6.2ff. beschrieben.

2.8.4 ANALYSE DES EINFLUSSES VON *P. INDICA* IN EINER *NPR1*-RNAi-GERSTENLINIE

Um die Beteiligung des transkriptionellen Regulators NPR1 an der durch *P. indica* vermittelten Resistenz in Gerste zu ermitteln, wurde die *Bgh*-Resistenz von *NPR1*-RNAi-Gerstenpflanzen mit und ohne *P. indica*-Kolonisierung der Wurzeln vergleichend evaluiert. Hierzu wurde drei Wochen nach Inokulation der Pflanzen mit *P. indica* ein Blattsegmenttest (vgl. Kap. 2.4.2) mit dem jüngsten, voll entwickelten Blatt durchgeführt. Die Inokulation der Gerstenkeimlinge mit *P. indica*-Myzel und die Anzucht der Pflanzen erfolgten wie in Kapitel 2.1.1 und 2.3.2 beschrieben. Verwendet wurde die noch segregierende T2-Generation der Linie E7L9, bereitgestellt von G. Langen und V. Babaeizad (IPAZ, Gießen). Eine Überprüfung der Keimlinge auf das Vorliegen der RNAi-Kassette im Genom erfolgte mit dem REDExtrakt-N-AmpTM Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich) und den Primern pGY1fwd2 und BamHI_{nr1}as (vgl. Tabelle 2.10.2) nach Angaben des Herstellers.

2.8.5 RESISTENZTESTS MIT IN HYDROKULTUR ANGEZOGENEN PFLANZEN

Um den systemischen Einfluss von *P. indica* noch während der ersten Interaktionsstadien zwischen dem Pilz und der Pflanze in der Wurzel zu analysieren, wurden Gerstenpflanzen in Hydrokultur angezogen. Dies ermöglichte eine einfache und stressfreie Inokulation der Wurzeln älterer (hier: 14 Tage alter) Gerstenpflanzen, die neben dem Keimblatt bereits ein weiteres, voll entwickeltes Blatt (in Analogie zu den Topfexperimenten) aufwiesen. Für diese Versuche wurden Gerstensamen der Sorte Golden Promise (Nachzucht Alter Steinbacher Weg, 2006) wie zuvor oberflächensterilisiert (siehe Kap. 2.1.1), in diesem Fall jedoch für 4 Tage (2,5 d Dunkelheit, 1,5 d Standardlichtbedingungen) auf mit 1 mM CaSO₄ getränktem Filterpapier in einer feuchten Kammer angezogen. Die Keimscheide der nach diesen 4 Tagen bereits grünen Keimlinge wurde folgend mit einem 1 cm breiten Schaumstoffstreifen umwickelt und anschließend in den Löchern der zu den Hydrokulturgefäßen gehörenden Gefäßdeckel befestigt. Pro Gefäß (V = 2,8 l) wurden 10 Keimlinge gesetzt. Das Nährmedium (vgl. Kap. 2.1.1) wurde durch Zufuhr von Druckluft über einen im Gefäß hängenden Schlauch ständig belüftet sowie alle drei Tage und am Abend vor der Inokulation ausgewechselt. Die Inokulation der Wurzeln erfolgte 10 Tage nach dem Einsetzen der Pflanzen in die Hydrokultur. Hierzu wurden alle Pflanzen eines Gefäßes gleichzeitig - immer noch im Deckel befestigt - für 10 Minuten in die entsprechende Inokulationslösung eingetaucht und anschließend zurück in die Hydrokultur transferiert. Zur Inokulation wurden entweder eine Tween 20-Lösung (0,05 %, Kontrolle), Bion[®] (40 mg/ml), lebende oder tote *P. indica* Chlamydosporen (150.000 Sporen/ml), tote

Fusariumsporen (*F. graminearum*; 150.000 Sporen/ml) oder eine N-Acetylchitooctaoase (0,1 μ M, folgend kurz: Chitinoktamer) eingesetzt. Drei Tage nach der Inokulation wurden die jüngsten, voll entwickelten Blätter abgeschnitten und die Mehltauanfälligkeit der einzelnen Varianten in einem Blattsegmenttest (vgl. 2.4.2) vergleichend evaluiert.

2.9 UNTERSUCHUNG SYSTEMISCHER UND LOKALER EFFEKTE IM SYSTEM *P. INDICA* – *A. THALIANA*

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden Wurzeln von Arabidopsispflanzen nur mit Chlamydosporen, nicht mit Myzel von *P. indica* inokuliert (vgl. Kap. 2.3.1). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte stets wie unter den in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Bedingungen.

2.9.1 ANALYSE DES EINFLUSSES VON *P. INDICA* AUF DAS WURZELWACHSTUM

Zur Analyse des Einflusses von *P. indica* auf den Phänotyp besiedelter Arabidopsiswurzeln wurden 7 Tage alte Keimlinge des Wildtyp Col-0 auf das obere Viertel von 12 x 12 cm Agarplatten mit 1/10 PNM-Medium umgesetzt. Die Wurzeln der Keimlinge wurden entweder mit 20 μ l 0,05 % Tween-Lösung behandelt (Kontrolle) oder mit 20 μ l einer Suspension von *P. indica* Chlamydosporen (5×10^5 Sporen $\cdot$ ml $^{-1}$) inokuliert. Die Lösungen wurden dazu direkt auf die Wurzeln getropft. Um ein planes Wachsen der Wurzeln über die Agarfläche zu erreichen, wurden die Platten in einem 30°-Winkel zur vertikalen Achse aufgestellt. Nach 7 Tagen wurden die Länge der Haupt- und Seitenwurzeln sowie die Anzahl der Seitenwurzeln (primäre Verzweigungen der Hauptwurzel) bestimmt.

1/10 PNM-Medium:

0,5 ml 1 M KNO₃
 1 ml KH₂PO₄-Stocklösung (5 g/ 100 ml)
 1 ml K₂HPO₄-Stocklösung (2,5 g/ 100 ml)
 2 ml 1 M MgSO₄ x 7H₂O
 0,2 ml 1 M Ca(NO₃)₂
 2,5 ml Fe-EDTA *
 0,025 g NaCl
 4 g Gelrite
 ad 1 l H₂O_{dest}

*** Fe-EDTA:**

2,5 g FeSO₄ x 7H₂O in 400 ml H₂O
 geben, 3,6 g Na₂EDTA zufügen,
 aufkochen, unter Rühren abkühlen
 und mit H₂O auf 450 ml auffüllen

2.9.2 QUANTIFIZIERUNG DER WURZELBESIEDLUNG MIT *P. INDICA* IN ARABIDOPSIS

Durch die Quantifizierung der Menge an *P. indica*-DNA in Arabidopsiswurzeln sollte überprüft werden, ob sich in verschiedenen Mutantenlinien Unterschiede bezüglich der Besiedlung relativ zum Wildtyp feststellen lassen. Die Anzucht der Pflanzen für diese Versuche erfolgte unter zwei verschiedenen Bedingungen: (1) semi-steril in einem

Sand:Oil Dri[®]-Gemisch (Topfkultur) oder (2) steril auf Agarplatten (vgl. Kap. 2.9.2.1 und 2.9.2.2). Die Besiedlungsstärke der Pflanzenwurzeln mit *P. indica* wurde in beiden Fällen mittels qPCR (vgl. Kap. 2.6.6) analysiert. Hierzu wurden pro Probe 40 ng genomische DNA, extrahiert aus den entsprechenden Wurzelproben, in einem 20 µl Ansatz eingesetzt. Primer für das Ubiquitin 5-Gen (UBQ 5) dienen der Amplifikation pflanzlicher DNA. Zur Amplifikation *P. indica* spezifischer DNA wurden Primer für die ITS (*intragenic transcribed spacer*)-Region eingesetzt, die eine spezifische Sequenz der pilzlichen DNA amplifizieren (DESHMUKH et al., 2006). Die Besiedlungsstärke relativ zum Wildtyp wurde aus den qPCR-Daten wie folgt berechnet: $2^{-dCt(Mutante)}/2^{-dCt(Wildtyp)}$. Der dCt-Wert ergibt sich hierbei aus der Differenz des Ct-Wertes für die ITS-Primer und für UBQ5. Die Sequenzen der verwendeten Primer finden sich in Kapitel 2.10.

2.9.2.1 Quantifizierungsversuche im Sand:Oil Dri[®]-Gemisch (Topfkultur)

Oberflächensterilisierte Arabidopsissamen wurden zunächst wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben für 14 Tage auf ½ MS⁺-Agar (0,25 % Gelrite) und anschließend einzeln in Töpfen mit einer 1:1 (v:v) Mischung von Oil Dri[®] und Quarzsand angezogen. Vor dem Umsetzen wurden die Wurzeln der Pflanzen für 2 h in einer Suspension aus *P. indica*-Chlamydosporen (500.000 Sporen/ml) inkubiert. Zusätzlich wurde 1 ml der Sporensuspension zu jedem Keimling auf das Substrat pipettiert. Zwei Wochen nach der Inokulation wurden die Wurzeln durch Waschen vom Substrat befreit und die genomische DNA nach der Methode von DOYLE & DOYLE (1990) extrahiert (vgl. Kap. 2.6.1). In jedem Experiment wurden pro Arabidopsisl Linie vier Pools aus jeweils 3-5 Pflanzen getrennt analysiert. Als Reinheitskontrolle diente ein Set an nicht mit *P. indica* infizierten Pflanzen. Zudem wurde die Besiedlung nach WGA-Färbung der Wurzeln (vgl. Kap. 2.5.2) mikroskopisch überprüft.

2.9.2.2 Quantifizierungsversuche unter sterilen Bedingungen auf Agarplatten

Die Quantifizierungsversuche unter sterilen Bedingungen auf agarhaltigem Medium sollten eine genauere zeitliche Analyse der Interaktion von *P. indica* in Arabidopsiswurzeln ermöglichen. Dazu wurden zunächst Arabidopsissamen wie oben, jedoch nur für eine Woche auf ½ MS⁺-Agar vorgekeimt. Von diesen Keimlingen wurden jeweils acht im Abstand von ca. 1 cm in das obere Viertel quadratischer 12 x 12 cm Platten auf ½ MS-Agar ohne jeglichen Zusatz von Zucker oder Casamino-säuren (vgl. Kap. 2.1.2), umgesetzt. Das obere Viertel des Agars dieser Platten wurde nach Aushärten zuvor entfernt, um den Pflanzen genügend Raum zum Wachsen zu geben. Die umgesetzten Keimlinge wurden für

zwei Wochen senkrecht stehend angezogen. Nach den zwei Wochen wurde jeweils 1 ml einer *P. indica*-Chlamydosporensuspension (500.000 Sporen/ml) gleichmäßig auf der Agarfläche verteilt. Pro Arabidopsislinie wurden 3, 7 sowie 14 Tage nach Inokulation Wurzelproben entnommen und hierzu je nach Verfügbarkeit Wurzeln von 2 bis 4 Platten vereint. Die DNA-Extraktion erfolgte nach der CTAB-Methode (vgl. Kap. 2.6.1).

2.9.3 ANALYSE *P. INDICA*-INDUZierter SYSTEMISCHER RESISTENZ IN ARABIDOPSIS

Zur Klärung der Frage, ob eine Besiedlung der Wurzeln mit *P. indica* in Arabidopsis einen systemischen Resistenzeffekt bedingt und welche Signalwege möglicherweise daran beteiligt sind, wurde das System *A. thaliana* - *G. orontii* verwendet. Es wurde die Stärke des Pathogenbefalls *P. indica* besiedelter und nicht besiedelter Pflanzen des Wildtyps Col-0 sowie diverser Mutantenlinien miteinander verglichen. Dazu wurden 14 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS⁺-Agar vorgekeimte Arabidopsispflanzen für 2 Stunden in einer Tween 20-Lösung bzw. einer *P. indica*-Chlamydosporenlösung (5×10^5 Sporen/ml) inokuliert und anschließend einzeln in Töpfe mit einer Sand:Topferde-Mischung gesetzt (vgl. Kap. 2.1.2 und 2.3.1). Nach weiteren 14 Tagen erfolgte eine Sprühinokulation mit *G. orontii* (4-6 Konidien/mm², vgl. 2.4.1). Die Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* wurde mikroskopisch mittels WGA-Färbung überprüft (vgl. 2.5.2) und das Pathogenwachstum, wie in Kapitel 2.4.1 angegeben, 5 und 10 dai evaluiert.

2.9.4 EXPRESSIONSSTUDIEN AUSGEWÄHLTER GENE IN ARABIDOPSISBLÄTTERN

Der Einfluss einer Besiedlung der Wurzeln mit *P. indica* auf das Expressionsmuster ausgewählter Gene im Blatt (*PR1*, *PR5*, *Lox2*, *VSP1*, *ERF1*) wurde mittels qPCR untersucht (vgl. Kap. 2.6.6). Hierzu wurden cDNA-Proben aus Blättern *P. indica* infizierter und nicht infizierter Col-0 Pflanzen vor, sowie 3 als auch 6 Tage nach Inokulation mit *G. orontii* vergleichend analysiert. Die Anzucht in einem Sand:Erde-Gemisch sowie die *P. indica*- und Mehltauinokulation der Pflanzen erfolgte wie unter 2.1.2, 2.3.1 und 2.4.1 beschrieben. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Blätter 5-10 (zählweise inklusive Keimblätter) von den Pflanzen abgetrennt, daraus die RNA nach LOGEMANN et al. 1987 extrahiert und in cDNA transkribiert (vgl. Kap. 2.6.2ff.). Die verwendeten Primersequenzen finden sich in Tabelle 2.10-1.

2.10 PRIMERSEQUENZEN

Tabelle 2.10-1: *A. thaliana*- (*At*-) und *P. indica*-spezifische Primer. AT: Anlagerungstemperatur

Bezeichnung, TAIR-Acession Nr.	AT; Produkt- länge (bp)	Rich- tung	Sequenz
<i>P. indica</i> ITS	60 °C 119 bp	Fwd	5'-CAACACATGTGCACGTCGAT-3'
		Rev	5'-CCAATGTGCATTTCAGAACGA-3'
<i>AtUBQ5</i> , AT3G62250	60 °C 105 bp	Fwd	5'-CCAAGCCGAAGAAGATCAAG-3'
		Rev	5'-ACTCCTTCCTCAAACGCTGA-3'
<i>AtPR1b</i> , AT2G14610	60 °C 77 bp	Fwd	5'-CCCACAAGATTATCTAAGGGTTTAC-3'
		Rev	5'-CCCTCTCGTCCCACTGCAT-3'
<i>AtPR5</i> , AT1G75040	60 °C 139 bp	Fwd	5'-ACAGGCTGCAACTTTGACG-3'
		Rev	5'-AGAAATCTTTGCCGCCATC-3'
<i>AtPdf1.2</i> , AT5G44420	60 °C 79 bp	Fwd	5'-CGGCAATGGTGGAAGCA-3'
		Rev	5'-CATGCATTACTGTTTCCGCAAA-3'
<i>AtVSP1</i> , AT5G24780	60 °C 112 bp	Fwd	5'-AAGCCAAACGGATCGAAGT-3'
		Rev	5'-AATCAGCCCATTGGTCTCC-3'
<i>AtLox2</i> , AT3G45140	60 °C 126 bp	Fwd	5'-TCGTGTTGGATTATCATGATTG-3'
		Rev	5'-CAACAGGCCTCAATGTGCT-3'
<i>AtErf1</i> , AT4G17500	60 °C 99 bp	Fwd	5'-GCCGTCTTCTTCGTCTTCC-3'
		Rev	5'-TTGACCGGAACAGAATCCA-3'

Tabelle 2.10-2: Gerstenspezifische Primer. Die Sequenzen zu den Contig- bzw. EST-Nummern finden sich unter www.plexdb.org; AT: Anlagerungstemperatur.

Bezeichnung/ Contig o. Singleton	AT, Produkt- länge (bp)	Rich- tung	Sequenz
Ubi60deg Barley1_01038	60 °C 263 bp	Fwd	5'-ACCTCGCCGACTACAACAT-3'
		Rev	5'-CAGTAGTGGCGGTGCAAGTG-3'
HKG1 Contig1094_s_at	60 °C 131 bp	Fwd	5'-GGCCTGTAAGTGCTTGGC-3'
		Rev	5'-CGCTAGACCACAACACAGTAGC-3'
18S-Primer	60 °C 161 bp	Fwd	5'-GCGAGCACCGACCTACTC-3'
		Rev	5'-GGACCGGAATCCTATGATGTT-3'
BCI-7 Contig34_s_at	60 °C 145 bp	Fwd	5'-ACTTCAGGAGCAACCGTGTC-3'
		Rev	5'-CGCGCACTAATTCATCCTTT-3'
HSP17.9 HY03K23u_at	60 °C 149 bp	Fwd	5'-CGCTCTTTTGTGCCTTTAGC-3'
		Rev	5'-TCACACTTTGGACTCGATGC-3'
HSP 70 Contig873_s_at	60 °C 126 bp	Fwd	5'-GGAGGTTGACTAAGCTGTTGC-3'
		Rev	5'-ACATGACACGACGACAAACG-3'
PR-1:Barley1_02210/ _02212	60 °C 150 bp	Fwd	5'-GGACTACGACTACGGCTCCA-3'
		Rev	5'-GGCTCGTAGTTGCAGGTGAT-3'
PR-2 Barley1_01637	60 °C 101 bp	Fwd	5'-TACTTCGCGTACCGTGACAA-3'
		Rev	5'-GTGTAGGTCAGCCCGTTGTT-3'
PR-5 Contig2787_s_at	60 °C 91 bp	Fwd	5'-GCCGACCAACTACTCAATGT-3'
		Rev	5'-AGGGCAGGTGAAGGTGCT-3'
Contig1071_s_at	60 °C 109 bp	Fwd	5'-AGGTCCCTGAGCCCATGT-3'
		Rev	5'-GTGCAGAGCAATGTCACGTA-3'
Contig11248_at	60 °C 95 bp	Fwd	5'-AAGGGAGAGGAGGAAGAG-3'
		Rev	5'-TGCTTGACATAACCATACACA-3'
Contig12473_at	60 °C 131 bp	Fwd	5'-CTGGCTGGGGAAGAACAAAC-3'
		Rev	5'-CCACATTATCAACCCTGAAGC-3'
Contig13265_at	60 °C 109 bp	Fwd	5'-GTCTGCGTGCTTCCTAAC-3'
		Rev	5'-CTTCTGGTCATTCTGTTTCC-3'

Contig14040_at	60 °C 158 bp	Fwd	5'-GGGAGAGGAGAGCGTATCG-3'
		Rev	5'-TCTGTGCTCCATTCTGTTCC-3'
Contig14311_at	60 °C 101 bp	Fwd	5'-CGTCATCCTCGTGCTCTACA-3'
		Rev	5'-AAGTCCTGGCATTCTGTTTCG-3'
Contig16151_at	60 °C 156 bp	Fwd	5'-TGGCGAACAAGAGCAAGAC-3'
		Rev	5'-TTGAATAGGCAGGTCGGAAG-3'
Contig21126_at	60 °C 89 bp	Fwd	5'-GGAATAGCAACGGTGAGGAG-3'
		Rev	5'-AGGCACACAAGCAACAACAG-3'
Contig22115_at	60 °C 138 bp	Fwd	5'-CATCATCTACGCTCGCTCTC-3'
		Rev	5'-GGGCAGGACAGACACAGG-3'
Contig22458_at	60 °C 123 bp	Fwd	5'-TGCCATTTTCATTTCATCAGC-3'
		Rev	5'-AACCCGACGTATCACAATCC-3'
Contig23097_at	57 °C 123 bp	Fwd	5'-CTACGAAACACGAAGCAAGG-3'
		Rev	5'-AGCACCATCCTCATCAACG-3'
Contig23773_at	60 °C 108 bp	Fwd	5'-CAGGTGCTGCTTCGTATGC-3'
		Rev	5'-ATTGGGTAACACCTTGACCG-3'
Contig2433_s_at	60 °C 103 bp	Fwd	5'-TGACCCCATTTACTACATCGC-3'
		Rev	5'-TGGAGTATCAAGAGAGCATGG-3'
Contig2474_at	60 °C 103 bp	Fwd	5'-AGGGCAACATGCTCAAGAAC-3'
		Rev	5'-GAGTGGTCGTCTCGATGT-3'
Contig3393_at	60 °C 102 bp	Fwd	5'-CGGCGGTCTACTTCTACG-3'
		Rev	5'-GCTTGGTCACATCCTTGG-3'
Contig3901_s_at	60 °C 102 bp	Fwd	5'-TGCGTACCTGACACATCCAT-3'
		Rev	5'-TGCTTGGGTCGTACAGTAG-3'
Contig4273_at	60 °C 99 bp	Fwd	5'-ACAAGAGACCTGCCCCGATAC-3'
		Rev	5'-TCACGCCGTCTATGGCTAGT-3'
Contig4707_at	60 °C 92 bp	Fwd	5'-ATCTCGTCGCTCCGTGTC-3'
		Rev	5'-AGCTCGCAGAACAACCTAGGA-3'
Contig5508_at	60 °C 98 bp	Fwd	5'-GGTAGAGAGGGACACGCAAA-3'
		Rev	5'-GCCATTTTCTTCCCAGTCTTT-3'
Contig7516_at	57 °C 105 bp	Fwd	5'-CGTAGCCAAGGATGTGTGC-3'
		Rev	5'-TCACATCTCGGTCTCATTCG-3'
Contig8678_s_at	60 °C 96 bp	Fwd	5'-AACGGGAAGGGAAGGGTAG-3'
		Rev	5'-CGAAGTAGTGAAGGCGATGA-3'
Contig8679_at	60 °C 126 bp	Fwd	5'-AACTTGTACCCTTCTTGCACA-3'
		Rev	5'-ATCCCTACACCCCTACCAA-3'
Contig9959_at	60 °C 113 bp	Fwd	5'-TGGTTCCCATTTGGTTCTGTT-3'
		Rev	5'-GCCAATTTCTCATCCTTTTCG-3'
HV_CEb0022J21r2_at	60 °C 112 bp	Fwd	5'-ACGCTCAACTTCGTCGTG-3'
		Rev	5'-TCCGATGCCCTCCTTATG-3'
HV03G03u_at	57 °C 161 bp	Fwd	5'-AACTCTCGTGCCAGATCC-3'
		Rev	5'-TTCCTCCCCAATCTTTTGC-3'
HVSMEI0007O17r2_at	57 °C 142 bp	Fwd	5'-GGCTCCACGTCAGGAATAAC-3'
		Rev	5'-CCGAAAAAGAACCAACCAAA-3'
HVSME0004L13r2_s_at	60 °C 147 bp	Fwd	5'-CCGGATAATCTTGTGTGTGCG-3'
		Rev	5'-AACCATTGCACTGAATAGCC-3'
HW08C04u_at	60 °C 134 bp	Fwd	5'-ATGCAGCTTGTTGAGATTGG-3'
		Rev	5'-GTGCCCTATTGCTTGACG-3'
HZ52M24r_s_at	60 °C 220 bp	Fwd	5'-AGCTTCCTCCATCACATTTCG-3'
		Rev	5'-ATGAGCCATTTCTTCCATGC-3'
pGY1fwd2	56 °C	Fwd	5'-CGTTCCAACCACGTCTTCAA-3'
BamHInpr1as	56 °C	Rev	5'-GGATCCTAGCAGCGATGTGAAG-3'

3 ERGEBNISSE

Die Besiedlung von Pflanzenwurzeln durch *P. indica* wirkt sich auf das Wachstum, die Entwicklung und den Ertrag, aber auch auf die Stress- und Pathogenanfälligkeit des Wirtes aus (z. B. PHAM et al., 2004a; 2004b; SCHÄFER & KOGEL, 2009; VARMA et al., 1999; WALLER et al., 2005). Einige der diesen Effekten zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen und zu entschlüsseln, war Ziel dieser Arbeit. Im Fokus stand hierbei vor allem die Identifizierung und Analyse transkriptioneller Veränderungen und beteiligter Signalwege während der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz in Gerste. Die Fähigkeit von *P. indica* Arabidopsis zu besiedeln machte es zudem möglich, auch in dieser Modellpflanze mit ihrem Repertoire an zugänglichen Informationen und Mutanten, Resistenzeffekte und den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Interaktion in der Wurzel zu analysieren. Neben diesen vor allem molekularbiologischen Studien wurde zusätzlich der direkte Einfluss des Endophyten auf die morphologische Entwicklung von Gerste in Abhängigkeit von der Zeit und der Inokulationsdichte genauer charakterisiert, um hieraus Rückschlüsse auf die Art der Interaktion zwischen den beiden Partnern ziehen zu können. Einige Versuche diesbezüglich wurden zum Vergleich ebenfalls in Arabidopsis durchgeführt.

Mit der Auswertung und Darstellung der in den morphologischen Studien gewonnenen grundlegenden Erkenntnisse wird hier begonnen (Kap. 3.1), gefolgt von den Ergebnissen hinsichtlich der molekularen Grundlagen der durch *P. indica* induzierten Resistenz in Gerste (Kap. 3.2 und 3.3) und Arabidopsis (Kap. 3.4). Abschließend werden die Ergebnisse bezüglich der Interaktion in der Wurzel präsentiert (Kap. 3.5).

3.1 MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN INDUZIERT DURCH *P. INDICA*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von *P. indica* auf das Wurzel- und Sprosswachstum in Gerste (Kap. 3.1.1) und auf die Wurzelentwicklung in Arabidopsis (Kap. 3.1.2) analysiert. Die Charakterisierung der morphologischen Einflüsse in Gerste erfolgte hierbei in Zusammenarbeit mit Sophie Jacobs im Rahmen ihrer Masterarbeit.

3.1.1 EINFLUSS VON *P. INDICA* AUF DIE MORPHOLOGIE UND ENTWICKLUNG VON GERSTE¹

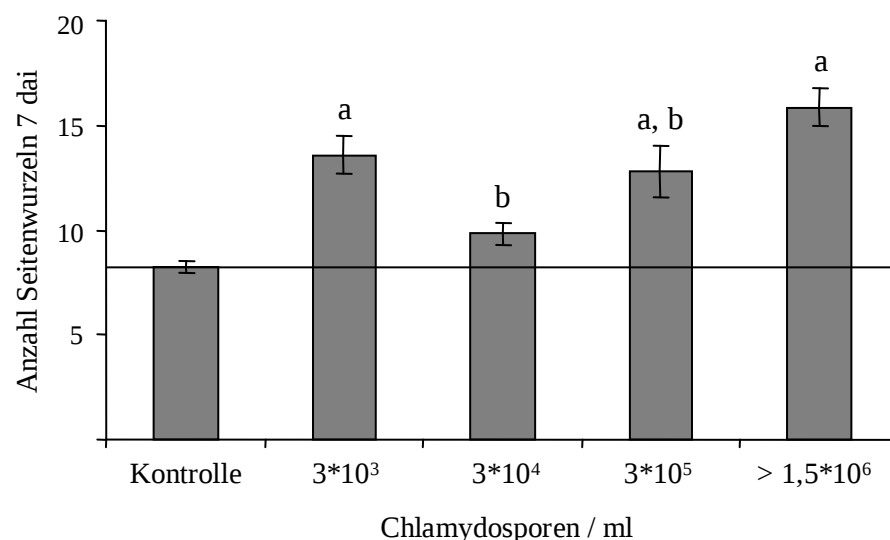
Der Einfluss von *P. indica* auf das Spross- und Wurzelwachstum von Gerste wurde einerseits zeitlich über drei Wochen und andererseits in Abhängigkeit von der Inokulationsdichte der Wurzeln mit dem Pilz genauer charakterisiert. Hierzu wurden drei Tage alte

¹ Im Text zu Mittelwerten angegebene Abweichungen geben den Standardfehler aus vier (7 und 14 dai-Werte) bzw. 3 (21 dai-Werte) unabhängigen Experimenten an. 51

Gerstenkeimlinge in unterschiedlich konzentrierten Lösungen mit Chlamydosporen von *P. indica* inokuliert und in ein Seramis:Oil Dri[®]-Gemisch getopft (Topfversuche) bzw. steril auf agarhaltigem Medium in Gläsern weiter angezogen (Glasversuche). Von den im Topf angezogenen Pflanzen wurden 7, 14 und 21 Tage nach der Inokulation (dai) vom Spross und der Wurzel die Parameter (1) Länge, (2) Frischgewicht und (3) Trockengewicht ermittelt. Zusätzlich wurde 7 dai die Anzahl an gebildeten Seitenwurzeln (Verzweigungen der primären und sekundären Keimwurzeln) bestimmt. Bei den auf Agar angezogenen Pflanzen wurden ebenfalls die sieben Tage nach Inokulation gebildeten Seitenwurzeln gezählt. Vor allem diente dieser Ansatz jedoch dazu, den Einfluss verschiedener Inokulationsdichten auf die Besiedlungsstärke mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) zu ermitteln. Hierbei zeigte sich, dass eine Erhöhung der Inokulationsdichte um den Faktor 10 im Bereich von 5.000 bis 500.000 Sporen/ml mit einer um den Faktor 1,3-1,8 erhöhten Besiedlungsstärke einherging. Dieses Bild zeigte sich 7 als auch 10 Tage nach Inokulation. Kongruent hierzu ließ sich mikroskopisch auch in den in Seramis:Oil Dri[®] angezogenen Pflanzen eine in Abhängigkeit von der Inokulationsdichte erhöhte Besiedlung feststellen (Daten Sophie Jakobs).

Die Auswertung der morphologischen Daten zeigte einen signifikanten Einfluss von *P. indica* auf die Anzahl der in Gerste gebildeten Seitenwurzeln, sowohl in den Topf- als auch in den Glasversuchen (vgl. Abb. 3.1-1 A und B). In beiden Fällen war unabhängig von der Inokulationsdichte die Anzahl an Seitenwurzeln in den durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen gegenüber den Kontrollen erhöht. Gleichzeitig wurde das Ausmaß der verstärkten Seitenwurzelbildung durch die Höhe des Inokulums beeinflusst. Wie aus Abbildung 3.1-1 A ersichtlich, riefen sowohl die niedrigste als auch die beiden höchsten Inokulationsdichten eine im Vergleich zu den Kontrollpflanzen signifikant um > 50 % erhöhte Anzahl an Seitenwurzeln hervor ($c(3 \cdot 10^3)$: 68 % **, $c(3 \cdot 10^5)$: 59 % *, $c(3 \cdot 10^6)$: 93 % ***; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Studentischer *t*-Test). Die mittlere Inokulationsdichte von $3 \cdot 10^4$ Sporen/ml zeigte ebenfalls eine im Vergleich zu den Kontrollen um 19 % signifikant erhöhte ($p < 0,05$), im Vergleich zu der niedrigsten und höchsten Inokulationsdichte jedoch signifikant geringere Anzahl an Seitenwurzeln ($p < 0,05$ bzw. 0,001). Dieses Muster, dass die Anzahl an Seitenwurzeln nicht linear mit der Inokulationsdichte zunahm, konnte nicht nur in den Topfversuchen, sondern auch bei den steril in Gläsern auf Agar angezogenen Pflanzen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.1-1 B).

A: Topfversuche



B: Glasversuche

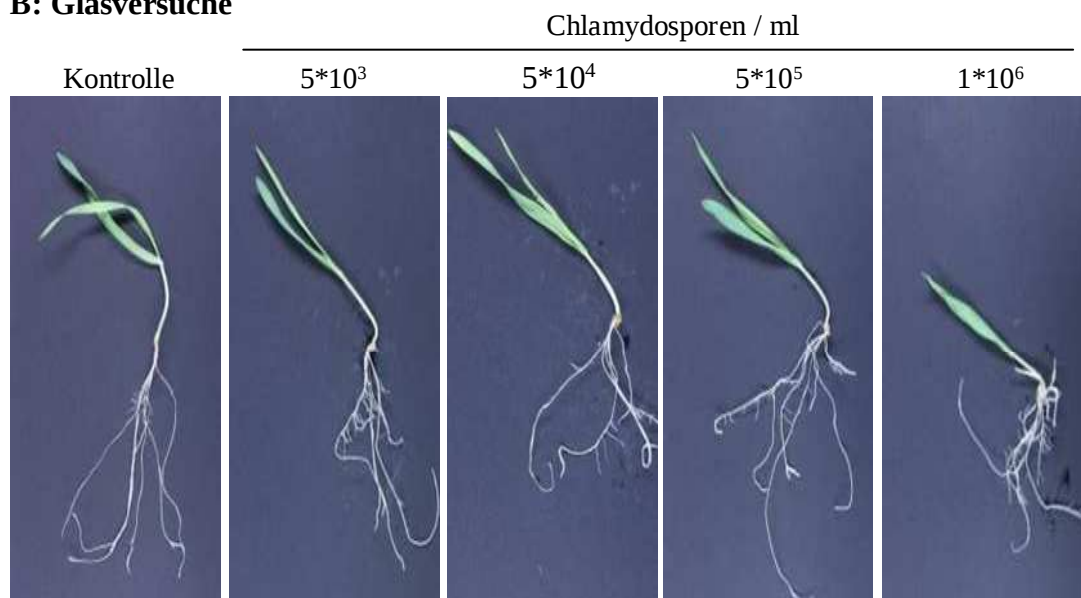


Abb. 3.1-1: *P. indica*-induzierte Seitenwurzelbildung in Gerste in Abhängigkeit von der Inokulationsdichte. (A) Anzahl an Seitenwurzeln in Mock-behandelten oder mit verschiedenen Konzentrationen an *P. indica*-Chlamydosporen inokulierten Gerstenkeimlingen 7 Tage nach Inokulation (dai). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einem Seramis:Oil Dri® (2:1)-Gemisch. Angabe des Mittelwertes mit Standardfehler ($n = 4$). Signifikanzberechnungen erfolgten durch einen Studentischen t -Test: $p < 0,05$. **(B)** Abbildungen repräsentativer Mock- bzw. mit verschiedenen Konzentrationen an *P. indica*-Chlamydosporen inokulierter Gerstenkeimlinge 7 dai. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte steril auf agarhaltigem Medium in Gläsern. Bilder übernommen von Sophie Jacobs.

Die Inokulation mit *P. indica*-Chlamydosporen wirkte sich bei den in Topfkultur angezogenen Pflanzen jedoch nicht nur auf die Bildung von Seitenwurzeln, sondern auch signifikant auf die Länge, das Frisch- und das Trockengewicht von Wurzel und Spross aus (vgl. Abb. 3.2-2, Varianzanalyse, GLM, $p < 0,05$). Zusätzlich waren für alle Parameter die Varianten Zeit und Experiment signifikant. Eine zwischen den verschiedenen Erntezeitpunkten diskriminierende Betrachtung zeigt zudem, dass ein positiver Einfluss von *P. indica* auf das Gewicht bei allen verwendeten Inokulationsdichten erst nach drei Wochen zutage trat. Dies wird in den Abbildungen 3.3-1 C-F, deutlich. Dort ist erkennbar, dass das Spross- und Wurzelgewicht der mit *P. indica* inokulierten Pflanzen (Trocken und Frischgewicht) zu den Zeitpunkten 7 dai und 14 dai keinen Unterschied zu den Kontrollen aufwies oder sogar eher verringert war. Drei Wochen nach Inokulation zeigten die mit den verschiedenen *P. indica*-Konzentrationen inokulierten Pflanzen dagegen ein erhöhtes Wurzelgewicht relativ zu den Kontrollen. Der größte Unterschied konnte bei Pflanzen inokuliert mit $3 \cdot 10^5$ Sporen/ml beobachtet werden. Hier war das Frisch- bzw. Trockengewicht um $47,8 \pm 14,5$ % bzw. $38,3 \pm 9,7$ % im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Den geringsten Anstieg zeigten mit $3 \cdot 10^6$ Sporen/ml inokulierte Pflanzen (Unterschied im Frisch- bzw. Trockengewicht: $12,4 \pm 5,1$ % bzw. $14,3 \pm 6,8$ %). Im Spross war ein Effekt auf die Biomasseakkumulation 21 dai für Pflanzen inokuliert mit einer Sporenkonzentration von $3 \cdot 10^3$ und $3 \cdot 10^5$ Sporen/ml zu erkennen. Hier zeigte sich ein erhöhtes Gewicht von $9,2 \pm 2,5$ % und $9,6 \pm 9,9$ % (Frischgewicht) sowie $10,3 \pm 8,2$ % und $18,0 \pm 9,9$ % (Trockengewicht). Das Verhältnis von Trocken- zu Frischgewicht in Spross und Wurzel wurde zu keinem der Zeitpunkte konsistent durch *P. indica* verändert (Daten nicht gezeigt).

Betrachtet man die Resultate zur Wurzellänge (vgl. Abb. 3.1-2 B), wird ein mit der Inokulationsdichte zunehmender, negativer Effekt des Endophyten auf diesen Parameter sichtbar (Abb. 3.1-2 B). So wiesen die mit der niedrigsten Inokulationsdichte von $3 \cdot 10^3$ Sporen/ml inokulierten Pflanzen 7 dai im Mittel um $6,1 \pm 2,6$ % längere Wurzeln als die Kontrollen auf, während die mit der höchsten Konzentration ($3 \cdot 10^6$ Sporen/ml) inokulierten Wurzeln signifikant um $11,4 \pm 1,5$ % ($p < 0,01$, Studentischer *t*-Test) verkürzt waren. Dieser Effekt verstärkt sich mit der Zeit. So waren 21 dai auch die Wurzeln der mit der geringsten Sporenkonzentration inokulierten Pflanzen tendenziell um $4,1 \pm 2,6$ % kürzer als die der Kontrollen und die höchste Inokulationsdichte bedingte eine Wurzelverkürzung von im Durchschnitt $22,3 \pm 8,2$ %. Die Verkürzung der mit der höchsten Sporenkonzentration inokulierten Pflanzen war hierbei signifikant höher als bei allen anderen Pflanzen zu-

sammen ($p < 0,05$, Varianzanalyse, GLM mit den Faktoren Zeit und *P. indica* als Haupteffekt und Interaktion).

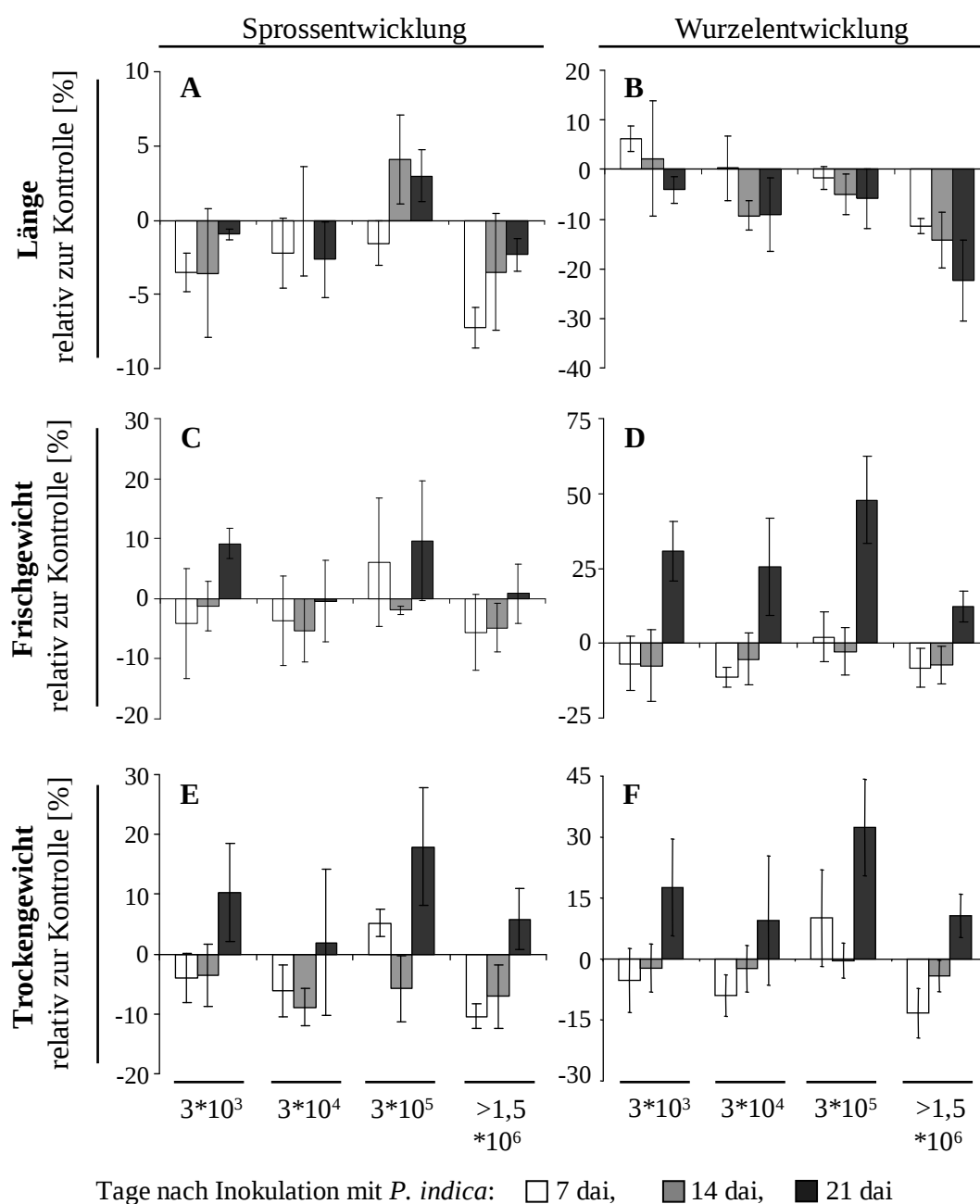


Abb. 3.1-2: Einfluss von *P. indica* auf das Wurzel- und Sprosswachstum in Gerste. Gemessen wurden - getrennt für den Spross (A, C, E) und die Wurzel (B, D, F) - die Parameter Länge (A, B), Frisch- (C, D) und Trockengewicht (E, F). Dargestellt sind die prozentualen Unterschiede zwischen *P. indica*-inokulierten und nicht -inokulierten Pflanzen zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tage nach der Inokulation (dai). Hierbei wurden Inokulationsdichten von $3 \cdot 10^3$ bis $3 \cdot 10^6$ unterschieden. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei (21 dai) bis vier unabhängigen Versuchen (7 und 14 dai) mit Angabe des Standardfehlers. Für alle Parameter konnte ein signifikanter Einfluss von *P. indica*, der Zeit und dem Experiment festgestellt werden (Varianzanalyse (ANOVA), General Linear Model (GLM)). Weiße Balken: 7 dai; hellgraue Balken: 14 dai; dunkelgraue Balken: 21 dai.

Der Spross durch *P. indica* besiedelter Pflanzen zeigte 7 dai im Vergleich zu den Kontrollen durchschnittlich ebenfalls keinen Unterschied oder eine geringere Länge (vgl. Abb. 3.1-2 A). Den stärksten Effekt zu diesem Zeitpunkt zeigte die höchste Inokulationsdichte ($3 \cdot 10^6$ Sporen/ml). In diesem Fall konnte eine signifikant verkürzte Sprosslänge von $7,3 \pm 1,4$ % festgestellt werden ($p < 0,05$; Einfacher *t*-Test). Im Gegensatz zur Wurzel nahm der negative Einfluss von *P. indica* auf die Sprosslänge über die drei Wochen betrachtet ab oder verkehrte sich sogar ins Gegenteil. Im Falle der Inokulationsdichte $3 \cdot 10^5$ Sporen/ml war der Spross ab 14 dai tendenziell um $4,1 \pm 3$ % länger als der der Kontrollpflanzen. Diese Konzentration zeigte somit den größten Einfluss auf die Sprosslänge.

Die in diesem Kapitel dargestellten Resultate zeigen, dass eine Kolonisierung von Gerstenwurzeln durch *P. indica* zu einer verstärkten Seitenwurzelbildung, verkürzten Hauptwurzeln und nach zwei Wochen zu einem verstärkten Wachstum der Wurzeln führt. Die Stärke der Seitenwurzelbildung und das Ausmaß der Verkürzung der Hauptwurzeln werden zudem von der Inokulationsdichte beeinflusst. Auch die Sprosslänge und das Sprossgewicht kolonisierter Pflanzen sind anfangs tendenziell geringer als in nicht kolonisierten Pflanzen. Dieser Unterschied nimmt mit der Zeit jedoch ab und verkehrt sich teilweise ins Gegenteil.

3.1.2 EINFLUSS VON *P. INDICA* AUF DIE WURZELMORPHOLOGIE VON ARABIDOPSIS

In Analogie zu Gerste wurde auch in Arabidopsis analysiert, inwieweit sich die Besiedlung durch *P. indica* auf die Morphologie der Wurzeln auswirkt. Hierzu wurden die Parameter Gesamt-, Haupt- und Seitenwurzellänge sowie die Anzahl gebildeter Seitenwurzeln (von der Hauptwurzel abgehende, primäre Verzweigungen) in *P. indica*- und Mock-inokulierten Pflanzen 7 dai miteinander verglichen. Die Gesamtwurzellänge ergab sich aus der Summe der Länge der Haupt- und aller Seitenwurzeln. Als Inokulationsdichte wurde die standardmäßig bei allen Versuchen mit Arabidopsis eingesetzte Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Sporen/ml verwendet.

Die durchgeführten Versuche zeigten, dass die Haupt- und Gesamtwurzellänge von durch *P. indica* besiedelten Pflanzen $86,5 \pm 2,6$ % bzw. $84,4 \pm 6,1$ % der Kontrollpflanzen betrug. Die Anzahl und durchschnittliche Länge der Seitenwurzeln *P. indica* besiedelter Pflanzen lag im Vergleich zu den Kontrollen bei $80,5 \pm 12,1$ % bzw. $107,6 \pm 12,6$ %. Abgesehen von den verkürzten Hauptwurzeln war keiner der Unterschiede signifikant ($p < 0,05$; Einfacher *t*-Test). Ein Einfluss auf den Spross, z. B. eine höhere Blattanzahl, zeigte sich unter diesen Versuchsbedingungen im Untersuchungszeitraum nicht (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.1-1: Einfluss von *P. indica* auf die Wurzelentwicklung in Arabidopsis 7 dai.

Parameter	<i>P. indica</i> relativ zur Kontrolle (K = 100 %)	Standardabweichung (STABWN)
Hauptwurzellänge	86,5 % *	± 2,6 %
Anzahl Seitenwurzeln	80,5 %	± 12,6 %
Länge der Seitenwurzeln	107,6 %	± 12,1 %
Gesamtlänge der Wurzel	84,4 %	± 6,1 %

* $p < 0,05$, Einseitiger *t*-Test

Kongruent zu den Ergebnissen aus Gerste (Kap. 3.1.1) konnte somit auch in mit *P. indica* inokulierten Arabidopsiswurzeln 7 dai eine signifikant verringerte Hauptwurzellänge festgestellt werden. Unterschiede in Anzahl und Länge der Seitenwurzeln zeigten sich dagegen nicht.

3.2 TRANSKRIPTOMANALYSE *BGH*-INOKULierter GERSTENBLÄTTER

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Analyse grundlegender molekularer Mechanismen während der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz gegen den Echten Gerstenmehltau *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*). Eine vergleichende Transkriptomanalyse der Blätter mit *P. indica* besiedelter und nicht besiedelter Gerste sollte Hinweise auf beteiligte Gene und Signalwege geben. Dazu wurden drei unabhängige Arrayexperimente (AE I bis III) mit jeweils 12 Mikroarrays (Affymetrix Barley1 *GeneChip*®) durchgeführt. Die 12 Mikroarrays wurden jeweils mit entsprechend aufgearbeiteter RNA aus Blättern durch *P. indica* besiedelter und nicht besiedelter Gerstenpflanzen, ohne und mit Mehltauinokulation, von drei Zeitpunkten nach der *Bgh*-Inokulation (12, 24, 96 hai) hybridisiert (hai: Stunden nach Inokulation mit *Bgh*; vgl. Tabelle 3.2-1). Dies ermöglichte neben der Analyse des systemischen Einflusses von *P. indica* auf die Transkription von Genen im Blatt die Identifizierung *Bgh*-regulierter Gene. Die Inokulation mit Mehltau erfolgte 19 Tage nach Kolonisierung der Wurzeln mit *P. indica*-Myzel und für die Analysen wurde jeweils nur das zu diesem Zeitpunkt jüngste, voll entwickelte Blatt (hier: das zweite Sekundärblatt) verwendet.

Tabelle 3.2-1: Schema der Probennahme während der Mikroarrayanalysen

Mehltau (<i>Bgh</i>)	keine Mehltaubehandlung = Mehltaukontrollen						Inokulation mit Mehltau = Proben + <i>Bgh</i>					
<i>P. indica</i> -Besiedlung	nein = Kontrollen (K)			ja = <i>P. indica</i> (P)			nein = K + <i>Bgh</i>			ja = P + <i>Bgh</i>		
Probennahme [hai mit <i>Bgh</i>]	12	24	96	12	24	96	12	24	96	12	24	96

Vor der Verwendung eines Sets an Blattmaterial für die Arrayanalysen wurde der *P. indica* induzierte Wachstums- und Resistenzeffekt in dem respektiven Experiment durch Messen der Parameter Sprosslänge und -gewicht bzw. durch einen Resistenztest (Blattsegmenttest, vgl. Kap. 2.4.2) überprüft. Nur Versuche, die eine signifikant erhöhte Biomasseakkumulation oder Längenzunahme und eine verstärkte *Bgh*-Resistenz in den mit *P. indica* kolonisierten Pflanzen zeigten, wurden weiter verwendet. Dies galt sowohl für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Arrayexperimente als auch für die Mehltaukinetiken (vgl. Kap. 3.3.1f). Die Ergebnisse der Überprüfung, sowohl für die Arrayexperimente (AE) als auch für die Kinetiken (K), sind in Tabelle 3.2-2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2-2: *P. indica* induzierter Wachstums- und Resistenzeffekt.

Angegeben ist der prozentuale Unterschied zwischen *P. indica*-besiedelten Pflanzen und Kontrollpflanzen. AE: Arrayexperiment; K: Kinetik.

Versuch	Unterschied <i>P. indica</i> zu Kontrolle [%]		
	Sprosslänge	Sprossgewicht	<i>Bgh</i> -Pusteln/Blatt
AE I	8,06*	19,30**	-43,60***
AE II	7,19*	16,49	-33,31*
AE III = K I	10,00***	44,00***	-59,46*
K II	15,13***	55,74***	-73,78**
K III	20,73***	28,12***	-62,09***

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Studentischer *t*-Test

3.2.1 *BGH*-REGULIERTE GENE

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Transkriptomanalyse galt vor allem dem Nachweis systemisch durch *P. indica* regulierter Gene in Gerste. Zugleich erlaubte der Versuchsansatz die Identifizierung direkt durch *Bgh* regulierter Gene, auf die zunächst kurz eingegangen werden soll. Als Selektionskriterium für *Bgh*-regulierte Gene wurde eine mindestens 2-fach differenzielle Regulation eines Contig bzw. Singleton, in allen drei Arrayexperimenten, zum gleichen Erntezeitpunkt beim Vergleich von *Bgh*-inokulierten zu nicht inokulierten Pflanzen gesetzt. Ein Contig (von: engl. *contiguous* = angrenzend, zusammenhängend) ist ein Set überlappender DNA-Stücke aus derselben genetischen Quelle und besteht z. B. aus dem Alignment mehrere EST-Sequenzen. Zur Vereinfachung werden Contigs und Singletons (z. B. eine einfache EST-Sequenz) auf dem Array im Folgenden als Gen oder Kandidat bezeichnet.

Bei Anwendung des definierten Selektionskriteriums auf die Arraydaten zeigte sich deutlich, dass vor allem zum Zeitpunkt der Penetration (12 hai) durch den *Bgh* Einfluss eine hohe Anzahl an Sequenzen differenziell reguliert wurde. So fanden sich in den Kontrollen, d. h. nicht mit *P. indica* inokulierten Pflanzen, zum 12 hai Zeitpunkt 1576 differenziell regulierte Gene. Zu den Zeitpunkten 24 bzw. 96 hai jedoch nur 754 bzw. 310 (vgl. Abb. 3.2-1). In *P. indica*-besiedelten Pflanzen zeigten nach der Inokulation mit *Bgh* 1294 (12 hai), 714 (24 hai) bzw. 151 (96 hai) Gene auf dem Mikroarray ein verändertes Expressionsmuster. Insgesamt betrachtet wurden in beiden Fällen zu allen drei Zeitpunkten mehr Gene induziert als reprimiert. Im Folgenden werden die nach der Inokulation mit *Bgh* differenziell exprimierten Gene als *Bgh*-reguliert klassifiziert, auch wenn die regulierende Wirkung möglicherweise auf der Seite der Pflanze lag. Die Schnittmenge der *Bgh*-regulierten Gene in durch *P. indica* besiedelten und nicht besiedelten Pflanzen insgesamt betrug 67 % (12 hai), 72 % (24 hai) bzw. 77 % (96 hai). Einzeln betrachtet für *Bgh*-induzierte und -reprimierte Gene betrug die Schnittmenge 24 hai und 96 hai jeweils ca.

70 %. Zum 12 hai Zeitpunkt wurden dagegen 90 % der *Bgh*-induzierten, jedoch nur 42 % der *Bgh*-reprimierten Gene, die sich in den durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen fanden, auf die gleiche Art auch in den Kontrollen durch *Bgh* reguliert. Gegensätzlich durch *Bgh* in Kontrollen oder durch *P. indica* besiedelten Pflanzen regulierte Gene fanden sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte.

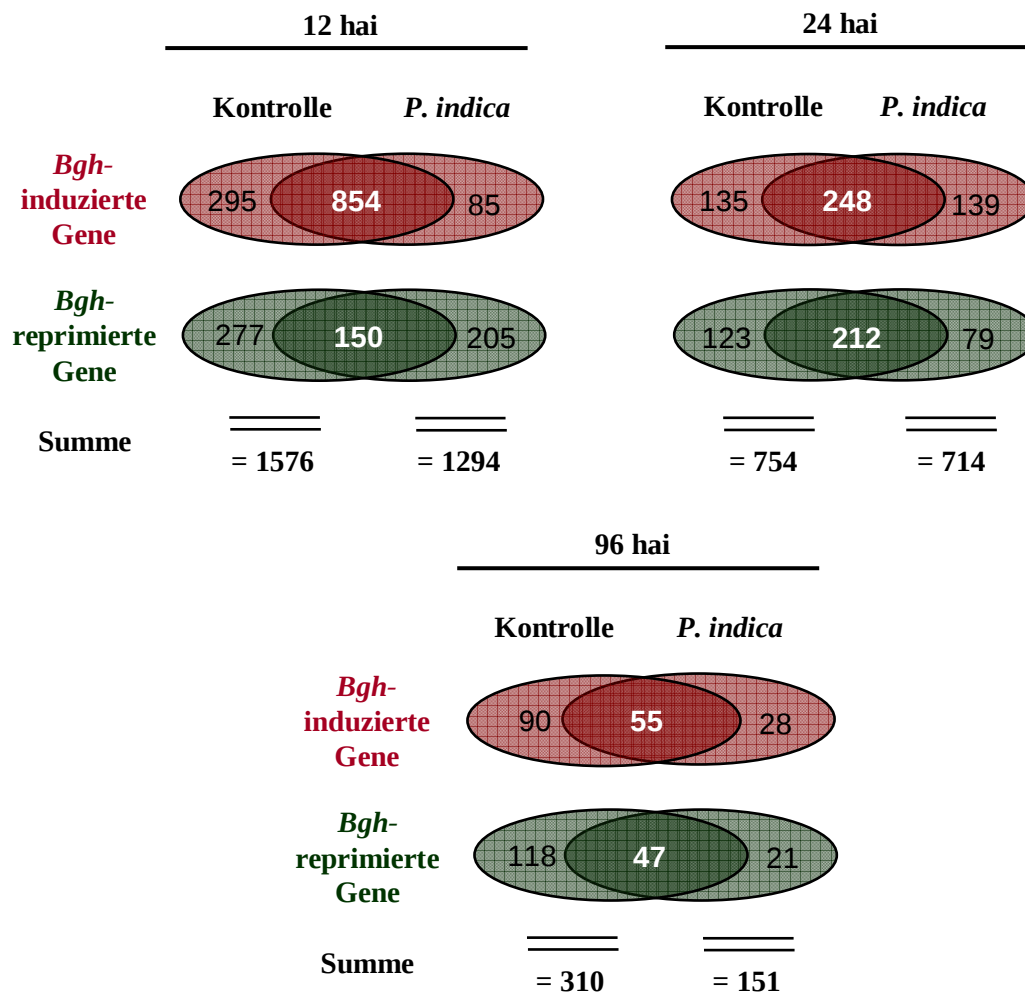


Abb. 3.2-1: Anzahl der 12, 24 und 96 Stunden nach *Bgh*-Inokulation in Gerstenblättern differenziell regulierten Gene. Die Daten beruhen auf einer Transkriptomanalyse (Affymetrix Barley1 GeneChip®) mit drei unabhängigen Versuchen. Angegeben ist zum einen die Anzahl *Bgh*-induzierter (hellrote Ovale) und *Bgh*-reprimierter Gene (hellgrüne Ovale), die sich nur in Pflanzen ohne (Kontrollen) oder nur in Pflanzen mit Besiedlung durch *P. indica* (*P. indica*) fanden. Des Weiteren ist die Anzahl an Sequenzen angeführt, die sowohl in Kontrollen als auch in *P. indica*-Pflanzen durch *Bgh* induziert bzw. reprimiert wurden (dunkelrot bzw. dunkelgrüner Teil der Ovale). Die Summe gibt die Gesamtzahl der durch *Bgh*-regulierten Gene für einen Zeitpunkt für die Kontrollen bzw. die durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen an. hai: Stunden nach *Bgh*-Inokulation.

Insgesamt betrachtet zeigte die erste Analyse der Arrayexperimente, dass vor allem zum Zeitpunkt der *Bgh*-Penetration (12 hai) eine hohe Anzahl an Genen im Gerstenblatt durch das Pathogen beeinflusst und der Hauptanteil der Gene induziert wird. Die transkrip-

tionellen Veränderungen in Kontrollpflanzen im Vergleich zu *P. indica*-besiedelten Pflanzen zeigen zudem eine deutliche Übereinstimmung, d. h. ein großer Anteil der nach *Bgh*-Inokulation induzierten oder reprimierten Gene ist in beiden Varianten zu finden. Zugleich konnten keine gegensätzliche durch *Bgh* regulierten Gene in Kontrollen und durch *P. indica* besiedelten Pflanzen identifiziert werden.

3.2.2 *P. INDICA*-REGULIERTE GENE

Ein vorrangiges Ziel der hier durchgeführten Transkriptomanalyse war die Identifizierung systemisch durch *P. indica* in Gerstenblättern induzierter transkriptioneller Veränderungen. Einerseits zielte die Analyse darauf ab, systemisch regulierte Gene nachzuweisen, deren Expression durch die Besiedlung mit dem Endophyten - ohne Pathogenstress - verändert wird (Vergleich Kontrolle (K) vs. *P. indica* (P)). Andererseits sollten zu den ausgewählten Zeitpunkten nach Mehltauinokulation speziell während dieses Pathogenstresses durch *P. indica* beeinflusste Gene identifiziert werden (Vergleich K + *Bgh* vs. P + *Bgh*). Das Selektionskriterium zur Identifizierung *P. indica*-regulierter Gene wurde in Analogie zu den ISR analysierenden Mikroarrayexperimenten von VERHAGEN et al., 2004 gewählt. Ein Contig bzw. ein Singleton (Def. s. oben) auf dem Mikroarray wurde als *P. indica*-reguliert eingestuft, wenn im direkten Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen in allen drei unabhängigen Experimenten eine mindestens 1,5-fach stärkere oder schwächere Expression in den mit dem Endophyten besiedelten Pflanzen, zu einem bestimmten Zeitpunkt festzustellen war.

Die auf Grundlage des oben definierten Kriteriums durchgeführte Analyse der Arraydaten für die nicht mit Mehltau behandelten Pflanzen ergab Hinweise auf Gene, deren Expressionsmuster speziell zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Kolonisierung mit *P. indica* systemisch beeinflusst wurden. Dies bedeutet, es konnten für die einzelnen Erntezeitpunkte aufgrund der Besiedlung durch *P. indica* differenziell exprimierte Gene identifiziert werden (vgl. Tabelle 7.2-1 im Anhang), die sich jedoch nicht in den Vergleichen zu den weiteren Untersuchungszeitpunkten fanden. Gene, die konsistent über einen größeren Zeitraum stärker oder schwächer in *P. indica*-kolonisierten Pflanzen exprimiert wurden, fanden sich somit nicht. Auch eine manuelle Überprüfung der Expressionswerte ausgewählter hormon- und pathogenresponsiver Gene in den Arraydaten (z. B. *PR*-Gene, *JA*- oder *ABA*-responsive Gene) zeigte keine konsistenten Expressionsunterschiede auf, die möglicherweise aufgrund der Selektionskriterien in der Gesamtanalyse übersehen worden waren. Kongruent hierzu zeigten diese auch keine differenzielle Expression durch die Kolonisierung mit *P. indica* bei einer Überprüfung in der qPCR (vgl. Kap. 3.3.1f bzw. Da-

ten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die durch *P. indica* verstärkte, makroskopisch beobachtete Mehlttauresistenz in den für die Transkriptomanalyse verwendeten Pflanzen (vgl. Tab. 3.2-2) nicht auf einem, auf der Genexpressionsebene sichtbaren, durchgehend aktiven Abwehrstatus beruhte.

Zur Identifikation der nach Mehlttauinokulation durch *P. indica* differenziell regulierten Gene wurden die Expressionswerte der Mikroarrays, die mit Proben *Bgh*-inokulierter Blätter von Kontrollen oder durch *P. indica* besiedelter Pflanzen hybridisiert worden waren, für die Zeitpunkte 12, 24 und 96 h einzeln miteinander verglichen. Diese drei Vergleiche ergaben eine Liste von 104 Kandidaten, die dem oben definierten Selektionskriterium entsprachen (vgl. Tabelle 7.2-2). Auf diese Liste wurde als weiteres Selektionskriterium angewandt, dass der mittlere Expressionsunterschied (FC, *fold change*) zwischen Kontrollen und durch *P. indica* besiedelten Pflanzen mindestens 2 betragen musste. Diesem Anspruch genügten für die Zeitpunkte 12, 24 bzw. 96 h 27, 11 bzw. 3 Gene (vgl. Tabelle 3.2-3). Zur Überprüfung der Aussagekraft der Transkriptomanalyse wurden die auf Grundlage der Arraydaten berechneten Expressionsunterschiede durch eine unabhängige Methode überprüft. Durch qPCR ließ sich hierbei in 27 von 36 überprüften Fällen (= 75 %) der Expressionsunterschied von mindestens 50 % verifizieren (vgl. Tabelle 3.2-3, Spalte 7). Unter Bezugnahme auf die in Kapitel 3.2.1 für eine *Bgh*-Regulation definierten Selektionskriterien ließen sich die Kandidaten in Tabelle 3.2-3 zwei unterschiedlichen Typen zuordnen: (1) Sequenzen, die nicht nur durch *P. indica*, sondern auch durch *Bgh* reguliert wurden (Vergleich K vs. K + *Bgh*) und (2) Sequenzen, die keine *Bgh*-Regulation in den Kontrollpflanzen aufwiesen. Zugleich durch *P. indica* und durch *Bgh* regulierte Kandidaten sind in Tabelle 3.2-3 orange (*Bgh*-induziert) bzw. grün (*Bgh*-reprimiert) hervorgehoben.

Tabelle 3.2-3: *P. indica*-regulierte Gene 12, 24 oder 96 h nach Inokulation von Gerstenpflanzen mit *Bgh*. Aufgeführt sind Gene, die in der Mikroarrayanalyse dem Selektionskriterium einer > 1,5-fach differenziellen Regulation in allen drei unabhängigen Experimenten zu einem der drei Untersuchungszeitpunkte entsprachen. Zu diesen angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede (FC) des Vergleichs *P* + *Bgh* vs. K + *Bgh* für die drei analysierten Zeitpunkte. Zu dem Zeitpunkt, an dem das jeweilige Gen dem Selektionskriterium entsprach, wurde der FC dunkelrot (stärkere Expression in *P. indica* kolonisierten Pflanzen) bzw. dunkelgrün (schwächere Expression in *P. indica* kolonisierten Pflanzen) hervorgehoben. Orange (*Bgh*-induziert) oder hellgrün (*Bgh*-reprimiert) hinterlegte Contigs bzw. Singletons wurden in den Kontrollen zusätzlich mindestens zu einem Zeitpunkt in allen drei Experimenten durch *Bgh* um den Faktor 2 reguliert (Vergleich K vs. K + *Bgh*). In Spalte 7 und 8 findet sich die Angabe, ob sich die auf Grundlage der Arrayexperimente berechneten Expressionsunterschiede in dem Probenmaterial dieser und weiterer unabhängiger Experimenten mittels qPCR bestätigen ließen. Die erste Zahl gibt hierbei die Anzahl an Bestätigungen, die zweite die Anzahl überprüfter Experimente an.

Tabelle 3.2-3: *P. indica*-regulierte Gene 12, 24 oder 96 h nach Inokulation von Gerstenpflanzen mit *Bgh*. Tabellenlegende siehe vorherige Seite. Sequenzinformationen finden sich unter www.plexdb.org. AE: Arrayexperiment; NB: nicht bestimmt; GE: gegensätzliches Ergebnis (n = 1); KU: kein Unterschied (n = 1); Exp.: Experiment; hai: Stunden nach *Bgh*-Inokulation.

			Arrayanalyse (x-fache Expression, FC)			qPCR-bestätigt (Anzahl Experimente)	
			<i>P + Bgh</i> vs. <i>K + Bgh</i>			AE	Zusatz Exp.
hai	Annotation (UniprotDesc)	Contig/ Singleton	12hai	24hai	96hai		
12 h ai	CI2D – <i>H. vulgare</i> (BCI-7)	Contig34_s_at	6,9	1,6	1,0	3/3	1/1
	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII (PR-2)	Contig1637_at	4,7	2,5	2,0	3/3	2/2
		Contig1637_s_at	3,2	1,6	1,9		
		HVSME0003C15r2_s_at	4,2	1,8	2,1		
	Pathogenesis-related protein PRB1-2- <i>H. vulgare</i>	Contig2212_s_at	3,2	1,6	1,5	3/3	2/2
		Contig2210_at	3,1	1,5	1,6		
	Thaumatococcus-like protein TLP5	Contig2787_s_at	4,2	1,7	1,4	3/3	2/2
	Heat shock protein 17.9	HY03K23u_at	3,1	0,8	1,0	2/3	2/2
	HSP cognate 70 kDa protein 2	Contig873_s_at	2,7	1,1	0,7	2/3	2/2
	Dormancy/auxin associated	Contig11248_at	2,0	1,2	0,8	2/2	1/1
	Auxin repressed	Contig7516_at	2,1	1,1	0,9	2/3	1/1
	Similar to ERD15, partial (21 %)	Contig4707_at	2,1	1,4	1,0	2/3	GE
		HVSME0004L13r2_s_at	2,4	1,1	1,0	3/3	1/1
	ATPase-like protein	HZ52M24r_s_at	2,4	0,9	1,0	0/3	NB
	Hydrolase, alpha/beta family	Contig5508_at	2,0	1,4	0,9	2/3	1/1
	Unknown protein	Contig22458_at	2,2	1,2	0,9	2/3	2/2
	Unknown protein	Contig2474_at	2,1	1,1	1,1	0/3	NB
	Unknown protein	Contig13265_at	2,0	1,0	0,9	1/3	NB
	Extracellular Calcium sensor	HVSME0006F05r2_at	2,0	1,3	1,0	NB	NB
	Unknown protein	Contig14040_at	-2,1	-1,0	-1,0	0/2	NB
	Band 3 anion transportprotein	Contig21126_at	-2,1	-0,9	-1,1	0/3	NB
	Unknown protein	Contig12473_at	-2,1	-1,1	-1,1	1/3	NB
	Similar to NRT1.2	HV_CEB0022J21r2_at	-2,2	-0,8	-0,8	0/2	NB
	Unknown protein	HW08C04u_at	-2,3	-1,0	-1,1	1/3	NB
	Unknown protein	Contig23097_at	-2,5	-1,0	-1,0	3/3	KU
	Unknown protein	HV03G03u_at	-3,0	-1,0	-1,0	0/3	NB
	Unknown protein	HVSMEI0007O17r2_at	-4,3	-1,0	-0,8	2/3	GE
24 h ai	Putative acid phosphatase	Contig2433_s_at	1,4	3,6	2,3	3/3	KU
	Glycine rich structural protein	Contig1071_s_at	1,8	2,8	1,5	3/3	KU
	Aspartatkinase-homoserine-dehydrogenase	Contig8679_at	1,7	2,4	1,1	3/3	KU
		Contig8678_s_at	1,8	2,4	1,5	3/3	KU
	Chlorophyll a-b binding protein	Contig1012_s_at	1,6	2,3	1,3	NB	NB
	CLC-Nt2 protein related	Contig16151_at	2,0	2,3	1,1	3/3	GE
	Fe/ascorbat oxidoreductase	Contig4273_at	1,4	2,1	1,0	3/3	KU
	Putative HGA1	Contig14311_at	-1,0	-2,1	-0,5	2/3	KU
	Cysteine proteinase, <i>H. vulgare</i>	Contig3901_s_at	-1,6	-2,2	-1,2	3/3	KU
	Suc:fruc 6-fructosyltransferase	HA11P12u_s_at	-2,0	-2,3	-1,0	3/3	1/1
96 h ai	Zincfingerprotein similar	Contig9959_at	-0,6	-2,3	-1,8	2/3	KU
	Putative NAM	Contig14026_at	-1,4	-1,1	2,3	NB	NB
	LHY protein (Zea mays)	Contig3873_at	-1,1	1,1	2,1	NB	NB
	Ser/thr- receptor kinase	Contig14243_at	1,5	1,3	-2,1	NB	NB

Der Anteil zugleich durch *Bgh* und *P. indica* regulierter Kandidaten der Gene in Tabelle 3.2-3 beträgt 58 %. Bei genauerer Betrachtung lassen sich diese in vier Kategorien einordnen: (I) durch Inokulation mit Mehltau in durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen stärker induzierte oder (II) weniger stark reprimierte Transkripte und (III) stärker in den Kontrollpflanzen durch Mehltau induzierte oder (IV) weniger stark reprimierte Transkripte. Beispielhaft für diese Kategorien sind in Abbildung 3.2-2 jeweils die Expressionsmuster für einen ausgewählten Kandidaten dargestellt. Die Zuordnung aller zugleich durch *P. indica* und durch *Bgh* regulierten Kandidaten aus der Tabelle 3.2-3 zu den vier Kategorien findet sich, zusammen mit dies verdeutlichenden Expressionsdaten aus der Mikroarrayanalyse, in Tabelle 3.2-4.

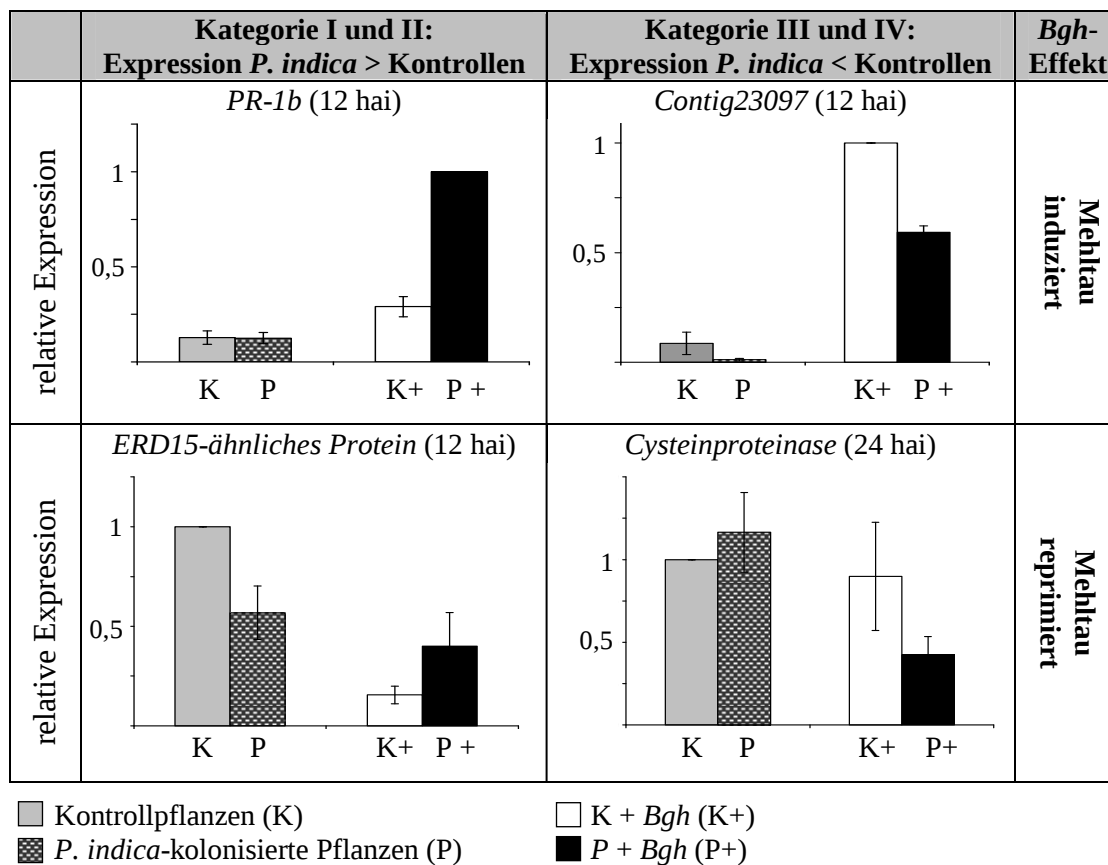


Abb. 3.2-2: Kategorien zugleich durch *Bgh* und durch *P. indica* regulierter Gene. Abgebildet ist jeweils das Expressionsmuster für einen repräsentativen Kandidaten aus der Transkriptomanalyse, dessen Expression nach Inokulation mit Mehltau sowohl durch *Bgh* als auch durch *P. indica* beeinflusst wurde, für die vier definierten Kategorien. In Klammern ist der Zeitpunkt nach *Bgh*-Inokulation angegeben, an dem sich dieses Muster zeigte. Die Daten beruhen auf den zur Bestätigung der Mikroarrayanalysen durchgeführten qPCR-Analysen. In die qPCR wurde dazu cDNA, erstellt aus den für die Arrayanalysen verwendeten RNA-Proben, als Template eingesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (n = 3) wieder. *PR-1b* = Contig2212_s_at und -2210_at; *ERD15-ähnlich* = Contig4704_at; *Cysteinproteinase* = Contig3901_at. Hellgrau: Kontrollen (K); dunkelgrau schraffiert: durch *P. indica* kolonisierte Pflanzen (P); weiß: K + *Bgh*; schwarz: P + *Bgh*.

Tabelle 3.2-4: Zeitgleich durch *P. indica* und durch *Bgh*-regulierte Gene. Details und Farbkodierung siehe Legende zu Tabelle 3.2-3. Angegeben ist der mittleren Expressionsunterschiedes der Vergleiche *P + Bgh* vs. *K + Bgh*, *K* vs. *K + Bgh* und *P* vs. *P + Bgh* für die Zeitpunkte 12, 24 und 96 hai. Die Spalte Kategorie gibt die Zuordnung der in Abbildung 3.2-2 dargestellten Kategorien wieder.

UniprotDesc-Annotation	Contig/ Singleton	Kategorie	Expressionsunterschied (MW der drei Arrayexperimente)								
			<i>P + Bgh</i> vs. <i>K + Bgh</i>			<i>K</i> vs. <i>K + Bgh</i>			<i>P</i> vs. <i>P + Bgh</i>		
			12 hai	24 hai	96 hai	12 hai	24 hai	96 hai	12 hai	24 hai	96 hai
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII (<i>PR-2</i>)	Contig1637_at	I	4,7	2,5	2,0	3,5	54,7	7,5	23,1	81,7	14,6
	Contig1637_s_at	I	3,2	1,6	1,9	5,4	78,3	22,6	12,8	117,8	45,3
	HVSME0003C15r2_s_at	I	4,2	1,8	2,1	4,4	54,2	12,0	22,5	90,3	25,6
Pathogenesis-related protein PRB1-2 (<i>PR-1b</i>)	Contig2212_s_at	I	3,2	1,6	1,5	4,8	136,4	157,0	7,9	293,4	247,4
	Contig2210_at	I	3,1	1,5	1,6	2,1	61,6	168,0	5,9	82,0	198,2
Thaumatin-like protein (<i>PR-5</i>)	Contig2787_s_at	I	4,2	1,7	1,4	3,2	52,9	42,0	10,8	104,1	52,4
Heat shock cognate 70 kDa protein 2 (<i>HSP70</i>)	Contig873_s_at	I	2,7	1,1	0,7	2,1	1,4	3,0	8,2	1,2	1,7
Fe/ascorbat oxidoreductase	Contig4273_at	I	1,4	2,1	1,0	33,9	25,3	24,2	49,1	28,5	15,4
Dormancy/auxin associated protein	Contig11248_at	II	2,0	1,2	0,8	-3,3	-1,3	1,0	-1,5	-1,3	-1,3
Similar to Dehydration-induced protein ERD15, partial (21 %)	Contig4707_at	II	2,1	1,4	1,0	-3,7	-2,1	-2,1	1,2	-2,2	-2,1
	HVSME0004L13r2_s_at	II	2,4	1,1	1,0	-4,3	-1,8	-2,6	-1,2	-2,0	-1,9
ATPase-like protein	HZ52M24r_s_at	II	2,4	0,9	1,0	-3,3	-1,0	-1,2	-1,5	-1,1	1,0
Hydrolase, alpha/beta fold family protein	Contig5508_at	II	2,0	1,4	0,9	-4,3	1,2	-1,0	-1,7	-1,1	1,0
Unknown protein	Contig22458_at	II	2,2	1,2	0,9	-6,0	-1,2	-1,3	-3,1	-0,8	-1,5
Putative acid phosphatase	Contig2433_s_at	II	1,4	3,6	2,3	-1,5	-3,3	1,4	1,0	-2,6	1,9
Chlorophyll a-b binding protein 3C, LHCII	Contig1012_s_at	II	1,6	2,3	1,3	-3,0	-15,9	-2,0	1,5	-12,2	-1,0
LHY protein (<i>Zea mays</i>)	Contig3873_at	II	-1,1	1,1	2,1	-1,3	-5,3	-10,7	-1,7	-3,3	-4,0
Unknown protein	Contig14040_at	III	-2,1	-1,0	-1,0	3,7	-1,4	-1,2	1,7	-1,5	-1,4
Similar to Nitrate transporter NRT1.2	HV_CEB0022J21r2_at	III	-2,2	-0,8	-0,8	177,3	1,4	9,1	84,0	1,7	10,9
Unknown protein	HW08C04u_at	III	-2,3	-1,0	-1,1	9,8	1,1	1,4	4,6	1,0	1,4
Unknown protein	Contig23097_at	III	-2,5	-1,0	-1,0	2,9	1,0	1,0	1,1	0,9	1,0
Unknown protein	HVSME10007O17r2_at	III	-4,3	-1,0	-0,8	6,9	1,0	1,1	1,7	0,9	1,4
Putative HGA1	Contig14311_at	III	-1,0	-2,1	-0,5	1,0	2,6	1,0	1,0	1,3	1,7
Ser/thr-specific receptor protein kinase-like	Contig14243_at	III	1,5	1,3	-2,2	-1,0	11,0	3,0	1,5	14,1	1,4
Cysteine proteinase precursor	Contig3901_s_at	IV	-1,6	-2,2	-1,2	-5,2	-3,1	-7,9	-8,4	-3,8	-5,6

Fasst man die Ergebnisse der Transkriptomanalyse zusammen, so konnten in Gerstenblättern einerseits direkt durch *Bgh* und andererseits systemisch durch *P. indica* regulierte Gene identifiziert werden. Ein systemischer Einfluss von *P. indica* auf die Genexpression ohne Pathogenstress zeigte sich hierbei nur speziell für bestimmte Zeitpunkte nach der Kolonisierung der Wurzeln mit dem Endophyten. Die Daten sprechen somit dafür, dass diese Gene nicht konsistent über einen längeren aber begrenzt für einen bestimmten Zeitraum stärker oder schwächer in mit *P. indica* kolonisierten Pflanzen exprimiert werden. Nach Inokulation der Pflanzen mit Mehltau konnten zu den Zeitpunkten 12, 24 und 96 h differenziell regulierte Gene identifiziert werden, die entweder eine Beeinflussung nur durch *Bgh*, nur durch *P. indica* oder durch *Bgh* und *P. indica* zeigen. Letztere wurden auf Grundlage ihres Expressionsmusters vier verschiedenen Kategorien zugeordnet. Im folgenden Kapitel wird u. a. auf einige dieser Kandidaten genauer eingegangen.

3.3 DETAILLIERTE ANALYSE DER *P. INDICA*-INDUZIERTEN SYSTEMISCHEN RESISTENZ IN GERSTE

Beruhend auf den Ergebnissen der Transkriptomanalyse (vgl. Kap. 3.2), wurde das zeitliche Expressionsmuster einiger der nach *Bgh*-Inokulation als *P. indica*-reguliert klassifizierten Gene genauer untersucht (Kap. 3.3.1 und 3.3.2). Von zwei ausgewählten Kandidaten wurde zudem der Einfluss auf die *Bgh*-Penetrationsrate mittels *transient induced gene silencing* (TIGS) analysiert (Kap. 3.3.3). Des Weiteren wurde die Beteiligung von NPR1 an der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz makroskopisch in einem Blattsegmenttest mit *NPR1*-RNAi-Gerste (Kap. 3.3.4) und die Möglichkeit einer Resistenzinduktion durch abgetöteten Pilz (Kap. 3.3.5) überprüft. Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, ob sich bereits drei Tage nach Inokulation von Gerstenwurzeln mit *P. indica* Resistenzeffekte nachweisen lassen und welche Auslöser hierbei eine Rolle spielen könnten (Kap. 3.3.6).

3.3.1 ANALYSE DES EXPRESSIONSMUSTERS ZEITGLEICH DURCH *P. INDICA* UND *BGH* INDUZIERTER GENE

Die mit Stress oder Abwehr assoziierten Gene *PR-1b*, *PR-2*, *PR-5*, ein cytosolisches *HSP70* (*heat shock protein*) und eine *Eisen/Ascorbat abhängige Oxidoreduktase* (Contig4273_at) bilden die Gruppe der im vorherigen Abschnitt 3.2.2 definierten Kategorie I-Kandidaten (vgl. Tabelle 3.2-4). Sie wurden in der Transkriptomanalyse (Kap. 3.2.2) vor allem 12 h, teilweise aber auch noch 24 h nach Mehltauinokulation in den durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen stärker durch *Bgh* induziert, als in den nicht mit dem Endophyten kolonisierten Kontrollen. Um ein genaueres Bild der Expression dieser Gene zu erhalten, wurden Mehлтаukinetiken im Zeitraum von 0 bis 24 h nach Inokulation mit *Bgh* erstellt. Die Daten bezüglich der Stärke der in diesen Versuchen durch *P. indica* induzierten Wachstums- und Resistenzeffekte finden sich in Tabelle 3.2-2. Abbildung 3.3-1 zeigt jeweils eine repräsentative Kinetik für *PR-1b*, *PR-2*, *PR-5* und das *HSP70*. Ein ähnliches Muster wurde für alle Gene noch zweimal gesehen. Eine Mittelwertbildung aus allen drei hier erstellten Kinetiken wurde nicht durchgeführt, da der Expressionsunterschied zwischen Kontrollen und durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen vergleichbar, die Stärke und der Zeitpunkt der mehltauinduzierten Transkriptakkumulation relativ zum Zeitpunkt 0 hat von Versuch zu Versuch jedoch schwankend war. Die Expressionswerte aller Versuche und die Angabe der daraus berechneten mittleren Expressionsunterschiede sind für die einzelnen Gene im Anhang (Kap. 7.3) zusammengestellt.

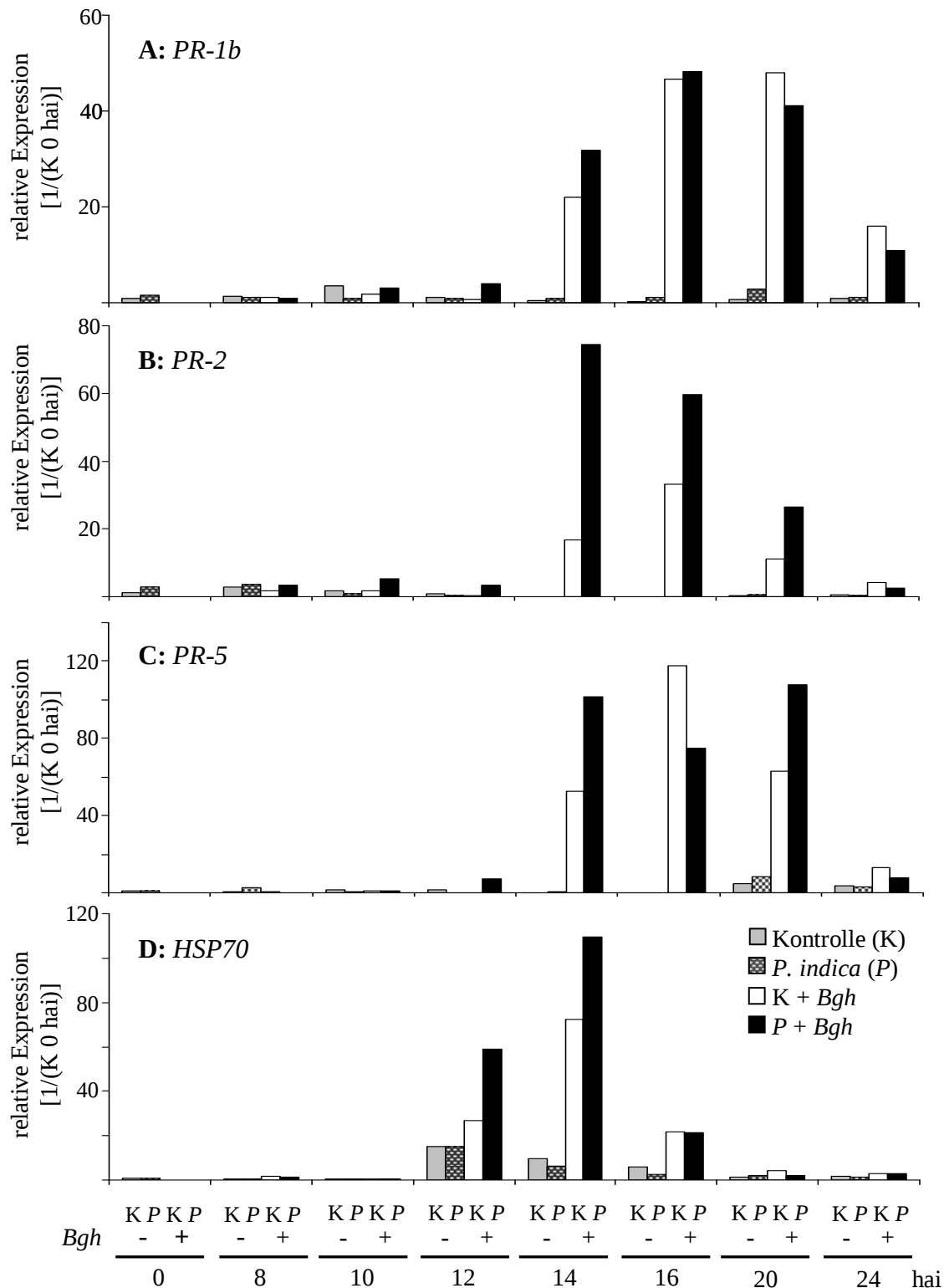


Abb. 3.3-1: Transkriptionskinetik mit Stress oder Abwehr assoziierter Gene nach Inokulation mit *Bgh* in Blättern durch *P. indica* besiedelter und nicht besiedelter Gerstenpflanzen. Für den Zeitraum von 0 bis 24 hai mit *Bgh* ist die durch qPCR ermittelte relative Expression der PR-Gene (A) *PR-1b*, (B) *PR-2* und (C) *PR-5* sowie (D) eines *HSP70* dargestellt. Abgebildet sind die Expressionswerte für *P. indica* besiedelte (P) und nicht besiedelten Pflanzen (Kontrollen, K) mit (+) und zum Vergleich ohne (-) *Bgh*-Inokulation relativ zum 0 hai-Wert der Kontrolle. Die Normalisierung der Daten erfolgte durch drei konstitutiv exprimierte Gene (*HKG1*, *UBI60deg*, *18S*). Hellgrau: Kontrollen (K); dunkelgrau schraffiert: *P. indica*-kolonisierte Pflanzen (P); weiß: K + *Bgh*; schwarz: P + *Bgh*.

Der Vergleich der Expressionswerte durch *P. indica* kolonisierter und nicht kolonisierter Pflanzen ohne Pathogenstress zeigte für keines der näher untersuchten Gene zu einem der Analysezeitpunkte einen deutlichen Expressionsunterschied (vgl. Abb. 3.3-1 A-D). Andererseits waren alle die in Abbildung 3.3-1 dargestellten Gene pathogenresponsiv, d. h. sie wurden durch Mehltau induziert. Im Fall der *PR*-Gene *PR-1b*, *PR-2* und *PR-5* (Abb. 3.3-1 A-C) war in den Kontrollen ein *Bgh*-induzierter Anstieg der Transkriptmenge ab 14 hai zu verzeichnen, der anschließend langsam wieder abnahm, aber auch 24 hai noch sichtbar war. In *P. indica*-kolonisierten Pflanzen führte die Inokulation mit *Bgh* ebenfalls zu einem Anstieg des Transkriptlevels für die drei *PR*-Gene. Im Gegensatz zu den Kontrollen war hier jedoch schon ein Anstieg ab 12 hai (*PR-1b* und *PR-5*) bzw. 10 hai (*PR-2*) zu erkennen. Zudem waren 14 hai die Transkriptmengen in durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen 1,4- (*PR-1b*), 4,5- (*PR-2*) oder 1,9-fach (*PR-5*) höher als in den Kontrollen. Zu den folgenden Zeitpunkten (16 und 20 hai) fand sich für *PR-1b* und *PR-5* kein bzw. kein konsistenter Unterschied in der Expression zwischen besiedelten und nicht besiedelten Pflanzen. Im Falle von *PR-2* lagen dagegen auch 16 hai (1,8-fach) und 20 hai (2,4-fach) noch höhere Transkriptmengen in durch *P. indica* besiedelten Pflanzen nach *Bgh*-Inokulation vor.

Das Hitzeschockprotein *HSP70* (Abb. 3.3-1 D) zeigte bereits zum Zeitpunkt 12 hai in Kontrollpflanzen eine leichte Mehltauinduktion, die sich bis 14 hai noch verstärkte. Zugleich war eine Induktion des Gens durch Licht zu beobachten. Im Laufe der hier durchgeführten Experimente begann der „Tag“ kurz nach der Probennahme des 10 hai Zeitpunktes, an dem kein bzw. kaum *HSP-70*-Transkript nachweisen ließ. Zum 12 hai Zeitpunkt, ca. 2 h nach Beginn der Lichtperiode, fand sich sowohl in Kontrollen als auch in durch *P. indica* besiedelten Pflanzen ohne *Bgh*-Inokulation ein Anstieg in der Transkriptmenge relativ zu den vorherigen Zeitpunkten. Diese reduzierte sich im Laufe des Tages wieder auf den Ausgangswert. Kongruent zum Ergebnis für die *PR*-Gene war die Transkriptmenge des *HSP70* nach Mehltauinokulation in den durch *P. indica* besiedelten Pflanzen um den Faktor 2,2 (12 hai) bzw. 1,5 (14 hai) stärker als in den Kontrollen. Zum Zeitpunkt 16 hai sank die Transkriptmenge des *HSP70* in allen Varianten wieder ab und sowohl 20 hai als auch 24 hai war keine Mehltauinduktion mehr erkennbar.

Die genauere zeitliche Analyse der Kandidaten des Typs I (vgl. Tabelle 3.2-4) im Zeitraum von 0 bis 24 Stunden nach *Bgh*-Inokulation zeigte somit, dass die vorherige Besiedlung der Wurzeln durch *P. indica* nicht nur eine stärkere, sondern vor allem eine schnellere Induktion dieser Gene im Blatt bedingt.

3.3.2 ANALYSE DES EINFLUSSES VON *P. INDICA* AUF DAS EXPRESSIONSMUSTER VON *BCI-7* UND *HSP17.9*

Neben zeitgleich durch *Bgh* und durch *P. indica* regulierten Genen finden sich in Tabelle 3.2-3 Kandidaten, die gemäß der Selektionskriterien in der Transkriptomanalyse keine Beeinflussung durch Mehltau, sondern nur durch *P. indica* zeigen. Von diesen wurden die zwei am stärksten durch *P. indica* differenziell exprimierten Gene genauer analysiert. Bei der ersten Sequenz handelte es sich um ein *CI2D*, ein *BCI-7* (*barley chemically induced 7*)-Homolog. Die zweite untersuchte Sequenz ist Homolog zu einem *HSP17.9*.

Ein repräsentativer zeitlicher Verlauf der Expression dieser Gene findet sich in Abbildung 3.3-2. Im Falle des *BCI-7* konnten in der qPCR für den 0 hai Zeitpunkt keine Ct-Werte ermittelt werden. Um eine einheitliche Darstellung zu ermöglichen, sind die Daten daher jeweils auf den 12 hai + *Bgh*-Wert der Kontrollpflanzen bezogen. Ein ähnliches Muster bezüglich des Einflusses von *P. indica* wurde für beide Gene in mindestens noch einer weiteren Kinetik beobachtet. Die Expressionswerte aller Versuche sowie die Angabe der daraus berechneten mittleren Expressionsunterschiede zwischen durch *P. indica* besiedelten und nicht besiedelten Pflanzen finden sich in Tabelle 7.3-1 E und F.

Die Transkriptionskinetik in Abbildung 3.3-2 A zeigt eine *Bgh*-vermittelte Induktion von *BCI-7* 10-12 hai in den durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen und 12 hai in den Kontrollpflanzen. Auf Grundlage der Selektionskriterien in der Transkriptomanalyse (Kap. 3.1.1: „mindestens 2-fache differenzielle Expression in allen Experimenten“) konnte dagegen 12 hai keine konsistente *Bgh*-Regulation dieses Gens gefunden werden. Bei genauerer Betrachtung aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsstudien mittels qPCR bestätigte sich in vier von fünf Versuchen 10 h oder 12 h nach Inokulation mit *Bgh* eine transiente Induktion von *BCI-7* in den Kontrollpflanzen (vgl. Tabelle 7.3-1 E). Durch *P. indica* kolonisierte Pflanzen zeigten in der qPCR in vier von fünf Versuchen ebenfalls eine *Bgh*-Induktion von *BCI-7* und in allen fünf Versuchen eine im Vergleich zu nicht kolonisierten Pflanzen verstärkte Expression des Gens 10 bis 12 Stunden nach *Bgh*-Inokulation.

Für *HSP17.9* ergab sich bezüglich des Einflusses von *P. indica* ein ähnliches Bild wie für das im Kapitel 3.3.1 beschriebene *HSP70*. Zwölf Stunden nach Inokulation mit *Bgh* war in der abgebildeten Kinetik eine um 1,5 und im Mittel in allen Experimenten eine um $3,3 \pm 1,6$ (SF, n = 5) erhöhte Transkriptmenge in den durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen zu verzeichnen (vgl. Abb. 3.3-2 B und Tabelle 7.3-1 F). Zudem wurde wie *HSP70* auch *HSP17.9* ohne Mehltrostress transient durch Licht (Nacht-Tag-Wechsel

10 hai) unabhängig von einer Besiedlung durch *P. indica* induziert. Dies zeigte sich an den erhöhten Transkriptmengen in den nicht mit *Bgh*-inokulierten Proben 12 hai relativ zu den Zeitpunkten 10 hai und 14 hai. Die Ergebnisse bezüglich der Mehлтаuregulation von *HSP17.9* waren dagegen widersprüchlich. In drei von fünf Versuchen wurde das in Abbildung 3.3-2 B dargestellte Muster beobachtet, dass zum Zeitpunkt 12 hai eine *Bgh*-Repression des Gens in den Kontrollpflanzen zu verzeichnen war. In den zwei anderen Versuchen wurde es dagegen durch das Pathogen induziert (vgl. Tabelle 7.3-1 F). Aufgrund dieser inkonsistenten Regulation wurde das Gen in der Transkriptomanalyse mit dem dort angewandten Selektionskriterien als nicht *Bgh*-reguliert klassifiziert.

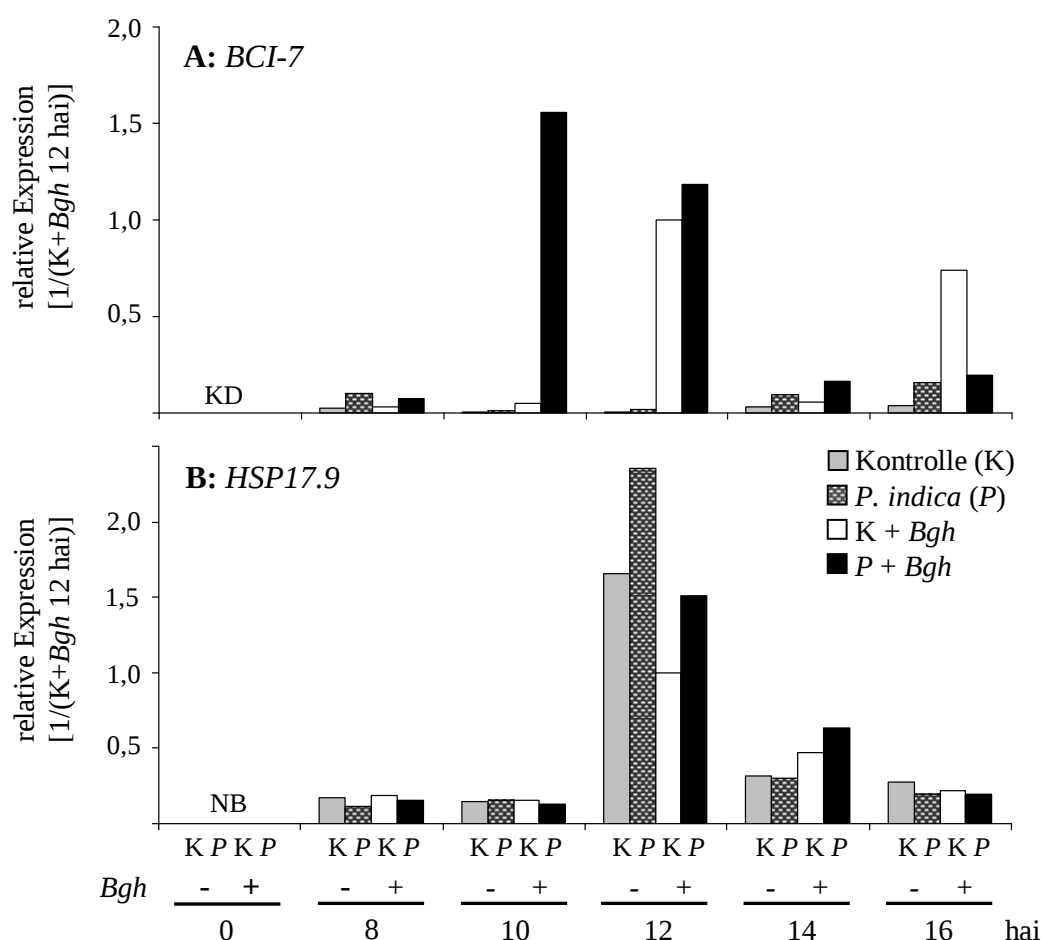


Abb. 3.3-2: Transkriptionskinetik von *BCI-7* und *HSP17.9* nach *Bgh*-Inokulation in Blättern durch *P. indica* besiedelter und nicht besiedelter Gerstenpflanzen. Für den Zeitraum von 0-16 hai mit *Bgh* ist die durch qPCR ermittelte relative Transkriptmenge für (A) *BCI-7* und (B) *HSP17.9* dargestellt. Abgebildet sind jeweils die Expressionswerte für durch *P. indica* besiedelte (P) und nicht besiedelte Pflanzen (Kontrolle, K) mit (+) und zum Vergleich ohne (-) *Bgh*-Inokulation relativ zum 12 hai + *Bgh* Wert der Kontrolle. Normalisierungsdetails siehe Abb. 3.3-1. Hellgrau: Kontrolle (K); dunkelgrau schraffiert: *P. indica*-kolonisiert (P); weiß: K + *Bgh*; schwarz: P + *Bgh*; NB: nicht bestimmt; KD: keine Detektion.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das *BCI-7*-Homolog, ähnlich wie die in Kapitel 3.3.1 näher charakterisierten Gene, eine verstärkte *Bgh*-Induktion in *P. indica*-kolonisierten Pflanzen zeigt. Im Falle des *HSP17.9* war der Einfluss von *Bgh* auf die Expression nicht eindeutig und die Analyse wurde durch die Tagesrhythmik, dem dieses Gen unterliegt, erschwert. Eindeutig ist jedoch, dass auch hier, 12 h nach Inokulation mit Mehltau, in den durch *P. indica* besiedelten Pflanzen jeweils eine höhere Transkriptmenge als in unbesiedelten Pflanzen vorliegt.

3.3.3 ANALYSE DES EINFLUSSES AUSGEWÄHLTER KANDIDATEN AUF DIE *BGH*-PENETRATIONSRATE

Durch das transiente Ausschalten von Genen mittels RNAi (TIGS: *transient induced gene silencing*) wurde der Einfluss zweier durch *P. indica* regulierter Gene auf die *Bgh*-Penetrationsrate untersucht. Aufgrund ihrer Expressionsmuster bzw. Homologien wurden das Contig23097_at und ein Glutaredoxin (Grx, Contig23773_at) für diese Analysen ausgewählt. Zur Erstellung der RNAi-Konstrukte, die anschließend durch ballistische Transformation in Epidermiszellen von Gerstenblättern eingebracht wurden, wurde das Gateway-Klonierungssystem verwendet. Zur Bestätigung der erfolgreichen Anwendung des Systems, wurde als Positivkontrolle zunächst der Effekt eines *Bax-Inhibitor*-RNAi-Konstruktes (zur Verfügung gestellt von R. Eichmann, TU München) auf die Penetrationsrate analysiert. Dieses zeigte im Gegensatz zur Überexpression (EICHMANN et al., 2004) wie erwartet eine Verminderung der Penetrationsrate um bis zu 45 % im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen.

3.3.3.1 Analyse des Einflusses von Contig23097_at auf die *Bgh*-Penetrationsrate

Der Contig23097_at zeigte in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalyse (vgl. Kap. 3.2) 12 hai eine starke Induktion durch Mehltau, die in den mit *P. indica* besiedelten Pflanzen weniger stark ausfiel. In nicht mit Mehltau inokulierten Proben war dagegen kaum bis gar kein Transkript nachweisbar (vgl. Abb. 3.3-3 A). Die detaillierte Überprüfung des Expressionsmusters in den drei im Laufe dieser Arbeit erstellten *Bgh*-Kinetiken bestätigte eine sehr transiente Induktion um den 12 hai Zeitpunkt (vgl. Abb. 3.3-3 B und Tabelle 7.3-1 G). Die geringere Expression in *P. indica*-besiedelten Pflanzen ließ sich dagegen nicht in allen Versuchen bestätigen.

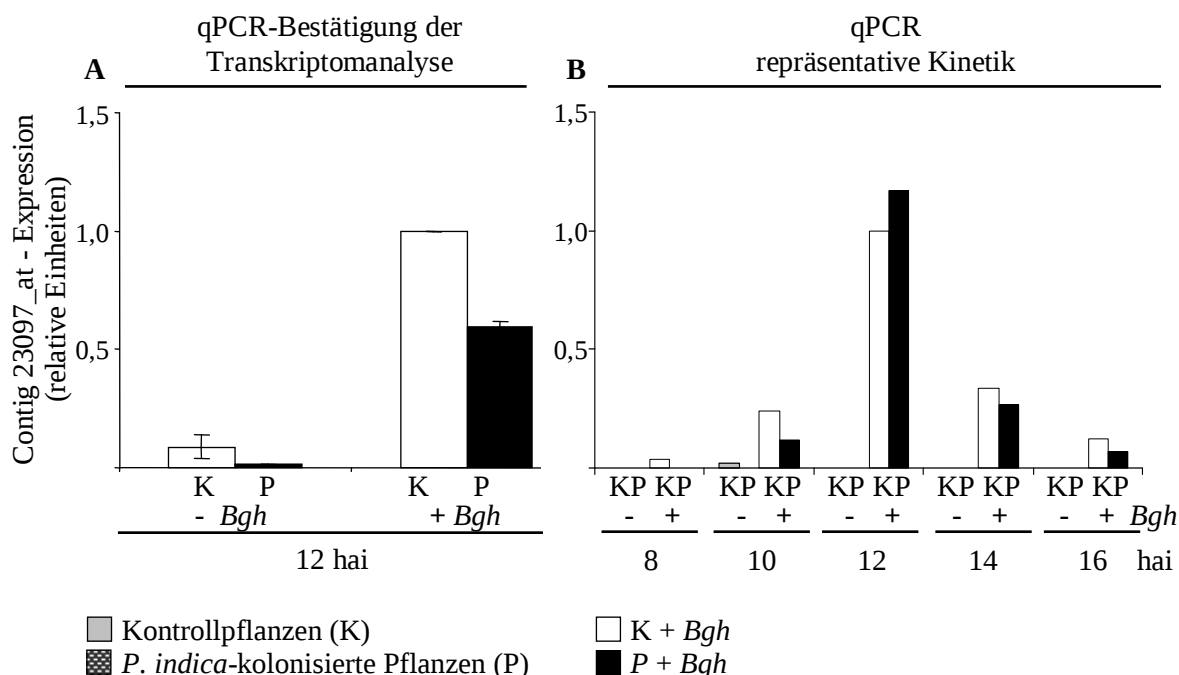


Abb. 3.3-3: Transkriptionsmuster von Contig23097_at. (A) Bestätigung des in der Mikroarray-analyse ermittelten Expressionsmuster von Contig23097_at 12 hai mit *Bgh* durch qPCR. In die qPCR wurde dazu cDNA, erstellt aus den für die Arrayanalysen verwendeten RNA-Proben, als Template eingesetzt. Abgebildet sind jeweils die Expressionswerte für durch *P. indica* besiedelte (P) und nicht besiedelte Pflanzen (Kontrolle, K) mit (+) und ohne (-) *Bgh* Inokulation (Mittelwert mit Angabe des Standardfehlers (n = 3)). Die Normalisierung der Einzelexperimente erfolgte mit einem konstitutiv exprimierten Ubiquitin und die Werte sind relativ zur Kontrolle 12 hai + *Bgh* gesetzt. **(B)** Repräsentative Transkriptionskinetik von Contig23097_at 8-16 h nach *Bgh*-Inokulation. Normalisierungsdetails siehe Abbildungsunterschrift 3.3-2. Hellgrau: Kontrollpflanzen (K); dunkelgrau schraffiert: *P. indica*-kolonisierte Pflanzen (P); weiß: K + *Bgh*; schwarz: P + *Bgh*; hai: Stunden nach Inokulation mit *Bgh*.

Aufgrund der eindeutigen *Bgh*-Regulation und der Beobachtung, dass dieses Gen auch in Gerstewurzeln 3 und 7 Tage nach Inokulation mit *P. indica* signifikant induziert ist (pers. Kommunikation S. PEIFFL, P. SCHÄFER), wurde der Einfluss auf die *Bgh*-Penetrationsrate mittels TIGS auch ohne eindeutige Regulation des Kandidaten durch *P. indica* überprüft (vgl. Abb. 3.3-4). Bei den ersten vier in Abbildung 3.3-4 dargestellten Versuchen war standardmäßig 48 h nach dem Partikelbombardement mit Mehltau inokuliert worden. Für den fünften Versuch wurde diese Zeitspanne auf 24 h verkürzt, um die zu diesem Zeitpunkt noch generell höhere Penetrationsrate auszunutzen. Unabhängig von dieser Zeitspanne zwischen Transformation und *Bgh*-Inokulation ließ sich jedoch in keinem der Versuche ein Unterschied zwischen mit dem Kontrollvektor und mit dem RNAi-Konstrukt transformierten Zellen bezüglich der *Bgh*-Penetrationsrate feststellen.

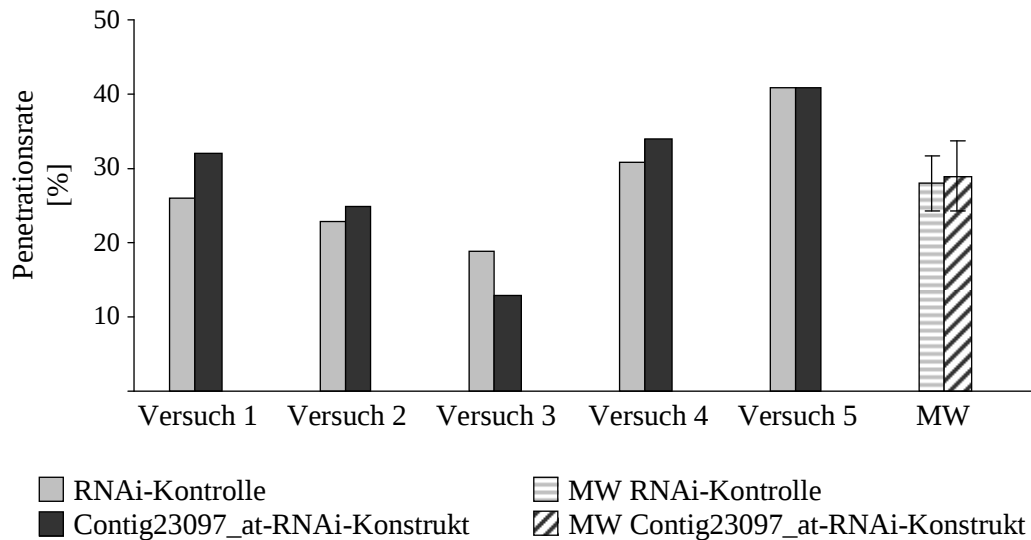


Abb. 3.3-4: Einfluss des Contig23097_at-RNAi-Konstruktes auf die *Bgh*-Penetrationsrate. Angegeben ist die Penetrationsrate (Anzahl penetrierter Zellen zur Gesamtanzahl an *Bgh* Interaktionen) für mit dem leeren RNAi-Vektor (Kontrollen) oder dem RNAi-Konstrukt transformierte Zellen. Dargestellt sind die Werte für fünf unabhängig voneinander durchgeführte Versuche sowie die daraus resultierenden Mittelwerte (MW) mit Angabe des Standardfehlers ($n = 5$). In Versuch 5 wurde abweichend zu den Versuchen 1-4 bereits 24 h und nicht erst 48 h nach der ballistischen Transformation mit *Bgh* inokuliert. Hellgrau: Kontrolle; dunkelgrau: RNAi-Konstrukt; schraffiert: Mittelwert der Kontrollen bzw. des RNAi-Konstruktes.

Insgesamt betrachtet zeigt das Expressionsmuster von Contig23097_at eine eindeutige, transiente Induktion zum Zeitpunkt der *Bgh*-Penetration (12 hai). Mittels TIGS ließ sich jedoch kein Einfluss auf die *Bgh*-Penetrationsrate feststellen.

3.3.3.2 Analyse des Einflusses von Contig23773_at auf die Penetrationsrate

Durch Sequenzvergleiche konnte der Contig23773_at als Glutaredoxin (Grx) des C-C-Typs annotiert werden. Dieses Gen zeigte in einer ersten, RMA normalisierten Analyse der hier durchgeführten Mikroarrayexperimente (vgl. Kap. 3.2) eine erhöhte Expression in *P. indica*-kolonisierten Pflanzen 12 h nach Mehltauinokulation im Vergleich zu ebenfalls *Bgh*-inokulierten Kontrollpflanzen. In der später durchgeführten GC-RMA-Analyse wurde dieses Contig dagegen nicht als *P. indica*-reguliert klassifiziert (vgl. Kap. 3.2.2). Das in der RMA-Analyse erhaltene Expressionsmuster ließ sich jedoch durch qPCR in dem für die Mikroarrayanalysen verwendeten Material und in weiteren, unabhängigen Versuchen bestätigen (vgl. Abb. 3.3-5 A und Tabelle 7.3-1 H). Aus Abbildung 3.3-5 A geht deutlich hervor, dass der beobachtete Expressionsunterschied zwischen *P. indica*-besiedelten und nicht besiedelten Pflanzen nach *Bgh*-Inokulation in einer Repression des Gens durch das Pathogen in den Kontrollpflanzen begründet lag. Dieses Bild zeigte sich

sowohl 12 als auch 24 Stunden nach Inokulation.

Aufgrund dieser eindeutigen Repression des Glutaredoxin durch *Bgh*, die sich nicht oder nicht so stark in *P. indica* besiedelten Pflanzen fand, und der sich aus der Homologie ableitenden möglichen Beteiligung des Proteins an abwehrrelevanten Redoxreaktionen, wurde der Einfluss auf die *Bgh*-Penetrationsrate mittels TIGS genauer untersucht (vgl. Abb. 3.3-5 B).

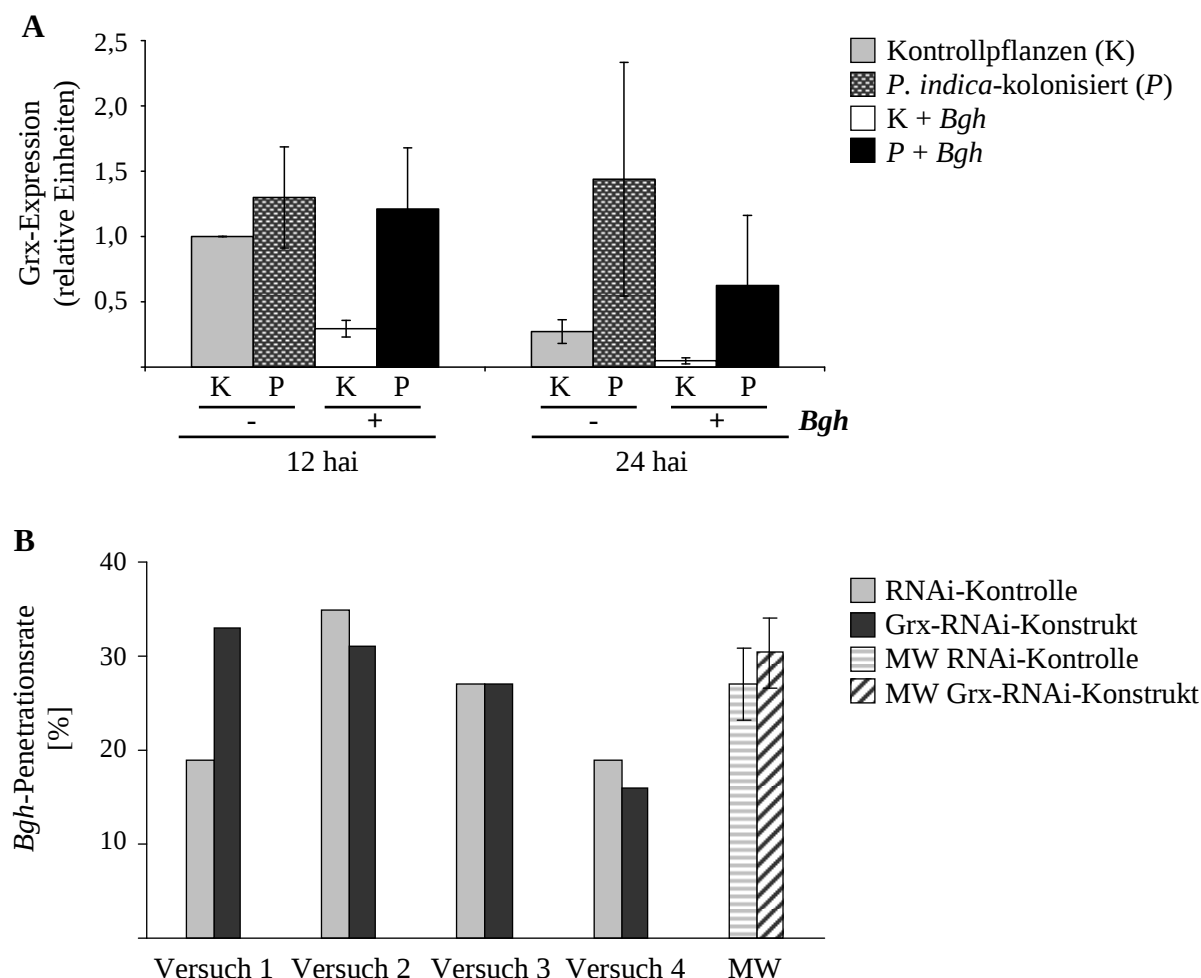


Abb. 3.3-5: Transkriptionskinetik von Glutaredoxin (Grx, Contig23773_at) und Einfluss des Grx-RNAi-Konstruktes auf die *Bgh*-Penetrationsrate. (A) Relative Transkriptmengen von Glutaredoxin 12 und 24 hai mit *Bgh*. Die Transkriptmengen wurden durch qPCR ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Angabe des Standardfehler (n = 5) relativ zum 12 hai Wert der Kontrollen. Die Normalisierung der Einzelexperimente erfolgte mit einem konstitutiv exprimierten Ubiquitin. Hellgrau: Kontrollpflanzen (K); dunkelgrau schraffiert: *P. indica*-kolonisierte Pflanzen (P); weiß: K + *Bgh*; schwarz: P + *Bgh*. (B) Einfluss des Grx-RNAi-Konstruktes auf die *Bgh*-Penetrationsrate. Angegeben ist die Penetrationsrate (Anzahl penetrierter Zellen zur Gesamtanzahl an *Bgh*-Interaktionen) für mit dem leeren RNAi-Vektor (Kontrollen) oder dem Grx-RNAi-Konstrukt transformierte Zellen in vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen sowie die daraus resultierenden Mittelwerte (MW) mit Angabe des Standardfehlers (n = 4). Hellgrau: Kontrolle; dunkelgrau: Grx-RNAi-Konstrukt; schraffiert: Mittelwert der Kontrollen bzw. des RNAi-Konstruktes; hai: Stunden nach Inokulation mit *Bgh*.

In vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zeigte sich jedoch kein eindeutiger Unterschied in der *Bgh*-Penetrationsrate zwischen mit dem Grx-RNAi-Konstrukt und mit dem Kontrollvektor transformierten Zellen. Mittels TIGS ließ sich somit kein Einfluss auf die *Bgh*-Penetrationsrate für das hier untersuchte Glutaredoxin nachweisen, obwohl das Expressionsmuster eine verstärkte *Bgh*-vermittelte Repression in den nicht durch *P. indica* besiedelten Kontrollpflanzen zeigte.

Zusammengefasst wurde somit durch TIGS weder für Contig23097_at noch für das Glutaredoxin (Contig23773_at) ein Effekt auf die *Bgh*-Penetrationsrate beobachtet. Die durch Mikroarray- und qPCR-Analysen ermittelten Expressionsmuster dieser beiden Kandidaten zeigen jedoch eine eindeutige Beeinflussung während der Mehltauetablierung.

3.3.4 ANALYSE DER ROLLE VON NPR1 BEI DEN DURCH *P. INDICA* INDUZIERTEN WACHSTUMS- UND RESISTENZEFFekten IN GERSTE

Das Regulatorprotein NPR1 spielt während vieler pflanzlicher Abwehrreaktionen und der Kommunikation zwischen verschiedenen Signalwegen eine entscheidende Rolle (z. B. DONG, 2004). Anhand von *NPR1*-RNAi-Gerstelinien mit einer um > 60 % reduzierten Menge an *NPR1*-Transkript (Daten J. IMANI, G. LANGEN, V. BABAEIZAD) wurde daher überprüft, ob NPR1 in Gerste an der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz und dem zu beobachtenden Wachstumseffekt beteiligt ist. Hierzu wurde der Einfluss des Endophyten auf die Mehltauresistenz und das Wachstum in RNAi-positiven im Vergleich zu Kontrollpflanzen analysiert. Als Kontrolle dienten hierbei die RNAi-negativen Pflanzen der verwendeten, noch segregierenden T2-Generation. Zur Vereinfachung werden die RNAi-negativen Segreganden folgend als Wildtyppflanzen (WT) bezeichnet.

Die Analyse des Wachstumseffektes zeigte, dass die Kolonisierung von *NPR1*-RNAi-Pflanzen durch *P. indica* nach drei Wochen im Durchschnitt eine erhöhte Sprosslänge bzw. ein erhöhtes Sprossgewicht von $8,3 \pm 3,4$ % bzw. $27,5 \pm 15,3$ % zur Folge hatte (SF, n = 4; vgl. Abb. 3.3-6). Dies entsprach in etwa der durch *P. indica* induzierten Wachstumsinduktion in den Kontrollen (Wildtyppflanzen, WT) von $6,9 \pm 2,9$ % (Sprosslänge, SF, n = 4) bzw. $28,6 \pm 18,9$ % (Sprossgewicht, SF, n = 4).

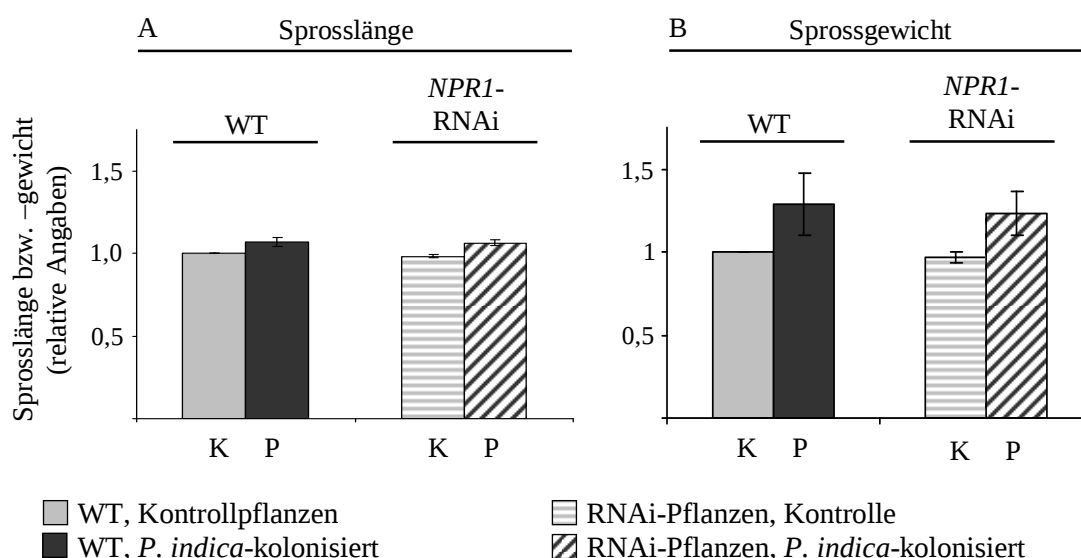


Abb. 3.3-6: Einfluss von *P. indica* auf das Wachstum in *NPR1*-RNAi-Gerstenpflanzen. Dargestellt ist die relative Sprosslänge bzw. das relative Sprossgewicht von Wildtyp (WT)- und *NPR1*-RNAi-Gerstenpflanzen. Die Werte der Einzelexperimente wurden jeweils auf nicht durch *P. indica* besiedelte WT-Pflanzen bezogen. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler aus vier Versuchen. Hellgrau: Kontrollen (K); dunkelgrau: *P. indica*-kolonisiert (P); schraffiert: *NPR1*-RNAi-Pflanzen.

Die Möglichkeit einer durch *P. indica* induzierten Resistenz in den *NPR1*-RNAi-Pflanzen wurde parallel zum Wachstumseffekt analysiert (vgl. Abbildung 3.3-7). Hierzu wurde die Anzahl an gebildeten Mehltaupusteln auf Blättern von durch *P. indica* kolonisierten und nicht kolonisierten Pflanzen (Kontrollen) in einem Blattsegmenttest (vgl. Kap. 2.4.2) verglichen. In den *NPR1*-RNAi-Pflanzen bedingte die Besiedlung durch *P. indica* in drei unabhängigen Versuchen eine tendenziell um 9,5 % bzw. signifikant um 28,1 % und 31,5 % reduzierte Anzahl an *Bgh*-Pusteln pro Blatt ($p < 0,05$, Studentischer *t*-Test). In den gleichzeitig getesteten Wildtyppflanzen induzierte *P. indica* in den drei Versuchen eine signifikant reduzierte Anzahl an Pusteln von 42,2 %, 39,5 % und 54,8 %. Im Durchschnitt war die Anzahl an Pusteln in den *NPR1*-RNAi-Pflanzen somit um $23,0 \pm 6,9$ % und im Wildtyp um $45,5 \pm 4,7$ % reduziert (SF, $n = 3$).

Insgesamt betrachtet konnte in den hier getesteten *NPR1*-RNAi-Pflanzen durch eine Kolonisierung der Wurzeln mit *P. indica* ein verstärktes Wachstum und eine höhere Mehltairesistenz induziert werden. Im Vergleich zu gleichzeitig getesteten Wildtyppflanzen zeigte sich bezüglich des Wachstumseffektes kein Unterschied. Die Resistenzausprägung in den *NPR1*-RNAi-Pflanzen fiel jedoch vergleichsweise nur halb so stark aus.

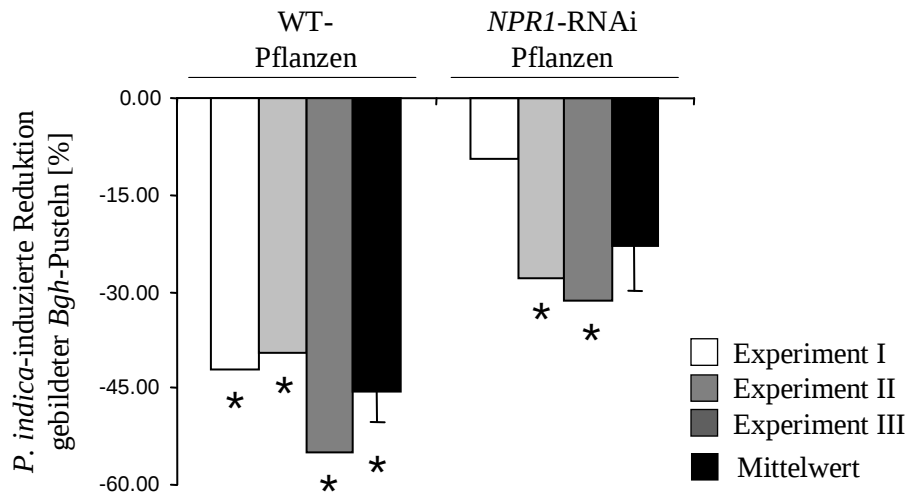


Abb. 3.3-7: *P. indica*-induzierte Resistenz gegen *Bgh* in WT- und *NPR1*-RNAi-Gerste. Angegeben ist der prozentuale Unterschied an *Bgh*-Pusteln pro Blatt zwischen durch *P. indica* kolonisierten und nicht kolonisierten WT- bzw. *NPR1*-RNAi-Gerstenpflanzen. In weiß, hell- und dunkelgrau dargestellt sind drei unabhängige Einzelversuche. In schwarz daneben findet sich der Mittelwert aus diesen mit Angabe des Standardfehlers (n = 3). In jedem Einzelversuch wurden WT und *NPR1*-RNAi-Pflanzen parallel analysiert. *p < 0,05, Studentischer *t*-Test (Einzelexperimente) bzw. Einfacher *t*-Test (Mittelwerte).

3.3.5 ANALYSE DER RESISTENZINDUKTION DURCH ABGETÖTETES *P. INDICA*-MYZEL

In einem weiteren Projekt dieser Arbeit wurde analysiert, ob der durch *P. indica* induzierte Resistenzeffekt in Gerste auch durch abgetötetes Pilzmaterial induziert werden kann. Die Applikation des Pilzes und die Anzucht der Pflanzen erfolgten in diesen Versuchen wie bei den in Kapiteln 3.2 und 3.3.1f beschriebenen Arrayanalysen und Mehltaukinetiken. Die Pflanzen wurden jedoch nicht mit einer Suspension aus lebendem Pilzmyzel inokuliert, sondern diese wurde zuvor autoklaviert. Die Resistenz der hiermit inokulierten Pflanzen gegen *Bgh* wurde durch einen Blattsegmenttest (vgl. Kap. 2.4.2) im Vergleich zu nicht inokulierten Kontrollpflanzen evaluiert. In drei unabhängigen Versuchen zeigte sich hierbei auf den Blättern von Pflanzen, die mit autoklaviertem Pilz behandelt worden waren, eine jeweils signifikante Reduktion an *Bgh*-Pusteln von 31,3 %, 43,0 % und 47,9 % (p < 0,05, Studentischer *t*-Test). Im Mittel betrug die Anzahl an *Bgh*-Pusteln auf den Blättern im Vergleich zu den Kontrollen somit nur $59,3 \pm 4,8$ % (SF, n = 3, vgl. Abb. 3.3-8). Neben der Resistenz wirkte sich die Inokulation mit autoklaviertem Pilzmyzel auch auf das Wachstum der Pflanzen aus. In zwei der drei durchgeführten Experimente konnte ein im Vergleich zu den Kontrollen signifikant um bis zu 20 % erhöhtes Sprossgewicht und in einem Fall zudem eine signifikant erhöhte Sprosslänge von 15,8 % gemessen werden (p < 0,05, Studentischer *t*-Test).

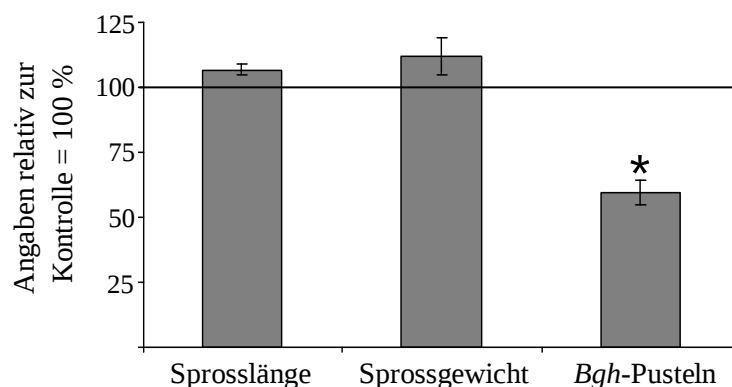


Abb. 3.3-8: Wachstums- und Resistenzeffekt induziert durch autoklaviertes *P. indica*-Myzel. Gerstenkeimlinge wurden mit autoklaviertem *P. indica*-Myzel inokuliert und drei Wochen später die Parameter Sprosslänge, Sprossgewicht sowie die *Bgh*-Anfälligkeit der Blätter im Vergleich zu nicht inokulierten Kontrollpflanzen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Die Werte sind relativ zur Kontrolle (gesetzt als 100) angegeben. * $p < 0,05$, Einfacher *t*-Test.

Die Ergebnisse zeigen somit, dass auch durch eine Inokulation von Gerstenwurzeln mit zuvor autoklaviertem *P. indica*-Myzel eine erhöhte *Bgh*-Resistenz sowie ein verstärktes Wachstum drei Wochen nach Inokulation induziert werden kann.

3.3.6 ANALYSE POTENZIELLER AUSLÖSER DER *P. INDICA*-INDUZIERTEN RESISTENZ

Alle bisher beschriebenen Experimente bezüglich der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz in Gerste wurden drei Wochen nach der Inokulation der Wurzeln mit dem Endophyten durchgeführt. Daher sollte im Folgenden geklärt werden, ob sich bereits zu früheren Interaktionsstadien zwischen *P. indica* und Gerste systemische Resistenzeffekte beobachten lassen. Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, welche Auslöser hierbei eine Rolle spielen könnten. Um dies zu analysieren, wurde zusätzlich zu der resistenzinduzierenden Wirkung lebender *P. indica*-Sporen der Einfluss von Bion (positive Kontrolle), von abgetöteten *P. indica*- oder Fusariumsporen (*F. graminearum*) sowie von einem Chitinoktamer (N-Acetylchitooctaoase) überprüft. Dazu wurden Gerstenwurzeln in den entsprechenden Lösungen inokuliert und drei Tage nach der Inokulation die Mehltauanfälligkeit der Pflanzen in einem Blattsegmenttest (vgl. Kap. 2.4.2) vergleichend evaluiert.

Um eine Vergleichbarkeit mit den vorherigen Versuchen zu gewährleisten, wurden zur Inokulation Pflanzen verwendet, die das zweite Blatt (erstes Sekundärblatt) schon voll ausgebildet hatten. Daher erfolgte die Anzucht der Pflanzen in Hydrokultur, um eine möglichst stressfreie Inokulation der Wurzeln der in diesem Entwicklungsstadium bereits relativ großen, 14 Tage alten Pflanzen zu gewährleisten. Bei den drei Tage nach der

Inokulation durchgeführten Resistenztests wurde zudem zwischen Pflanzen unterschieden, die das dritte Blatt (zweites Sekundärblatt) schon voll ausgebildet hatten und solchen, in denen dieses noch nicht vollständig aus der Blattscheide herausgewachsen war. Von letzteren Pflanzen wurde das zweite Blatt (erstes Sekundärblatt) verwendet.

Die Auswertung der Resistenztests zeigte, dass in mit Bion inokulierten Pflanzen, unabhängig davon, welches Blatt betrachtet wurde (vgl. Abb. 3.3-9 A und B), die Anzahl an *Bgh*-Pusteln auf den Blättern im Vergleich zu den Kontrollen signifikant um $39,5 \pm 4,1$ % bzw. $48,0 \pm 1,2$ % reduziert war (SF, $n = 4$ bzw. 3). Eine Resistenzinduktion in dem verwendeten System war somit möglich. Auch eine Inokulation mit lebenden *P. indica*-Sporen führte zu einer signifikant um $19,4 \pm 5,7$ % bzw. $24,2 \pm 4,5$ % (SF, $n = 4$ bzw. 3) verminderten Anzahl an *Bgh*-Pusteln in den beiden Blattvarianten. Des Weiteren zeigten abgetötete *P. indica* Chlamydosporen eine resistenzinduzierende Wirkung von $20,3 \pm 1,5$ % (SF, $n = 4$) im ersten und von $10,7 \pm 10,4$ % (SF, $n = 3$) im zweiten Sekundärblatt. Der Unterschied zu den Kontrollen im ersten Sekundärblatt war signifikant, im zweiten nur tendenziell. Hier schwankten die Einzelwerte stark (vgl. Abb. 3.3-9 B). Zwei der drei Einzelversuche zeigten jedoch eine signifikante Reduktion an Pusteln um 26,5 % bzw. 24,1 % ($p < 0,05$, Studentischer *t*-Test). Pflanzen, die mit abgetöteten Fusariumsporen oder der N-Acetylchitoctaoase inokuliert wurden, zeigten im zweiten Sekundärblatt dagegen weder im Mittel noch in den Einzelexperimenten einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen. Gleichfalls konnte im ersten Sekundärblatt keine resistenzinduzierende Wirkung von Fusarium oder Chitin festgestellt werden.

Insgesamt betrachtet lässt sich festhalten, dass bereits drei Tage nach einer Inokulation von Gerstenwurzeln mit Bion sowie lebenden oder toten Sporen von *P. indica* eine systemische Resistenz induziert werden kann. Eine Inokulation mit einem Chitinoktamer oder toten Fusariumsporen zeigt diesen Effekt dagegen nicht.

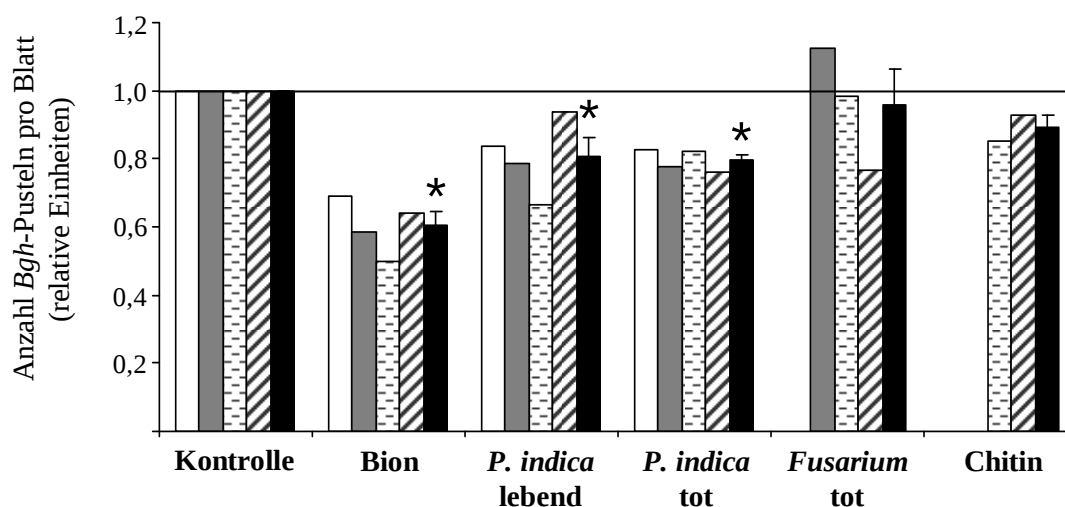
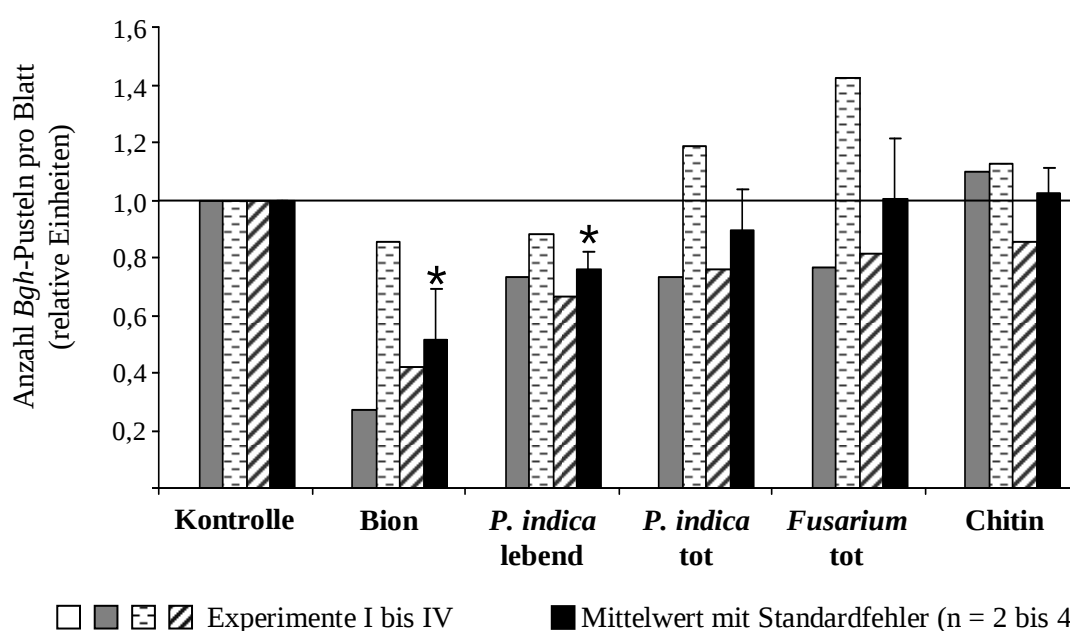
A: erstes Sekundärblatt, voll entwickelt (zweites Blatt)

B: zweites Sekundärblatt, voll entwickelt (drittes Blatt)


Abb. 3.3-9: Systemische Resistenzinduktion gegen *Bgh* durch Bion, lebende oder abgetötete Sporen von *P. indica* bzw. *F. graminearum* oder ein Chitinoktamer 3 Tage nach Inokulation. Zur Resistenzinduktion wurden die Wurzeln 14 Tage alter Gerstenpflanzen in entsprechenden Lösungen inokuliert. Dargestellt ist die Anzahl an *Bgh*-Pusteln, die sich in einem Blattsegmenttest auf den Blättern der unterschiedlich behandelten Gerstenpflanzen relativ zu Mock-inokulierten Kontrollpflanzen zeigten. Insgesamt wurden vier Versuche durchgeführt, wobei nicht immer alle Varianten in jedem Versuch vertreten waren (vgl. Experiment I bis IV). Sowohl die Werte aus den unabhängigen Experimenten (weiße, hellgraue und schraffierte Balken) als auch der Mittelwert aus diesen (schwarze Balken; Angabe des Standardfehlers, n = 2-4) sind abgebildet. Für die Resistenztests wurde jeweils das jüngste, voll entwickelte Blatt verwendet und daher zwischen Pflanzen unterschieden, die (A) das dritte Blatt noch nicht voll entwickelt hatten und solchen, (B) in denen das dritte Blatt bereits voll aus der Blattscheide herausgewachsen war. * p < 0,05, Einfacher t-Test.

Die in diesem Kapitel beschriebene, detaillierte Analyse der durch *P. indica* induzierten Resistenz in Gerste zeigt, dass die näher untersuchten pathogenresponsiven Gene *PR-1b*, *PR-2*, *PR-5* und *HSP70* eine verstärkte und schnellere Induktion nach *Bgh*-Inokulation in durch den Endophyten besiedelten Pflanzen aufweisen. Ein ähnliches Muster findet sich auch für *BCI-7*, während im Fall von *HSP17.9* und einem Glutaredoxin eine verringerte *Bgh*-Repression in den durch *P. indica* besiedelten Pflanzen zu beobachten ist. Ein Einfluss auf die *Bgh*-Penetrationsrate konnte weder für das Glutaredoxin noch für ein weiteres mittels TIGS analysiertes Gen mit unbekannter Funktion, welches eine sehr transiente Induktion durch *Bgh* zum Zeitpunkt der Penetration zeigt (Contig23097_at), nachgewiesen werden. In weiteren Experimenten wurde festgestellt, dass in einer *NPR1*-RNAi-Gerstenlinie durch *P. indica* ein verstärktes Wachstum und eine erhöhte *Bgh*-Resistenz induziert werden kann. Letztere fällt jedoch im Vergleich zu gleichzeitig getesteten Wildtyppflanzen deutlich geringer aus. Zudem wurde deutlich, dass auch durch autoklavierten *P. indica* (Myzel oder Sporen) drei Tage als auch noch drei Wochen nach Inokulation eine erhöhte Resistenz gegen *Bgh* induziert werden kann. Die Inokulation von Gerstenwurzeln in einer Chitinlösung zeigt dagegen systemisch im Blatt keinen resistenzinduzierenden Effekt gegen *Bgh*.

3.4 ANALYSE *P. INDICA*-INDUZierter SYSTEMISCHER RESISTENZ IN ARABIDOPSIS

In Analogie zu den bekannten Ergebnissen aus Gerste (WALLER et al., 2005) wurde die Fähigkeit von *P. indica* getestet, auch in Arabidopsis eine erhöhte Resistenz gegen einen kompatiblen Echten Mehltaupilz, hier: *Golovinomyces orontii*, zu induzieren. Darauf aufbauend sollte diese Fähigkeit zur Analyse ausgewählter Signalwegmutanten genutzt werden, um in diesen zu überprüfen, ob trotz der Mutation noch eine Resistenzinduktion durch *P. indica* möglich ist (Kap. 3.4.1). Zusätzlich wurde die Transkription Salizylsäure (SA)-, Jasmonsäure (JA)- oder Ethylen (ET)- responsiver Gene in den Blättern *P. indica* kolonisierter Arabidopsispflanzen im Vergleich zu nicht kolonisierten, sowohl vor als auch nach der Inokulation mit Mehltau, analysiert (Kap. 3.4.2). Ein signifikant verstärktes Wachstum oder eine schnellere Entwicklung der durch den Endophyten besiedelten Pflanzen konnte dabei im Beobachtungszeitraum unter den hier verwendeten Bedingungen nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Details zu den verwendeten Arabidopsismutanten finden sich in Tabelle 2.1-2 (vgl. Kap. 2.1).

3.4.1 ANALYSE DER DURCH *P. INDICA* INDUZierten SYSTEMISCHEN RESISTENZ IM WILDTYP UND IN VERSCHIEDENEN SIGNALWEGMUTANTEN

Um zu testen, ob *P. indica* in der Lage ist, in Arabidopsis eine systemische Resistenz zu induzieren, wurde die Entwicklung des Mehltaus *G. orontii* auf Blättern von Pflanzen mit und ohne vorherige Kolonisierung der Wurzeln durch den Endophyten vergleichend evaluiert. Hierzu wurden in einem Sand:Erde-Gemisch angezogene, 14 Tage zuvor mit *P. indica* bzw. Mock-inokulierte Wildtyppflanzen (Col-0) mit Konidien des Blattpathogens besprüht und die Anzahl gebildeter Konidiophoren pro Myzel (5 dai) und die Menge neu gebildeter Konidien (10 dai) pro Blattfrischgewicht bestimmt. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit E. Stein, IPAZ, Gießen, durchgeführt.

Die Auswertung der Versuche ergab, dass die Anzahl an Konidiophoren, die sich pro Myzel auf den durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen ausgebildet hatten, im Vergleich zu den Kontrollpflanzen durchschnittlich um $17,2 \pm 8,4$ % (Standardfehler (SF), $n = 11$) reduziert war. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 3.4-1 A repräsentative Myzelien abgebildet. Zusätzlich konnte eine im Mittel um $27,8 \pm 6,8$ % (SF, $n = 10$, $p < 0,05$, Einfacher *t*-Test) signifikant geringere Anzahl neu gebildeter Konidien 10 Tage nach Pathogeninokulation festgestellt werden.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Fähigkeit von *P. indica* getestet, auch in verschiedenen SA-, JA-, oder ET-Signalwegmutanten systemisch Resistenz gegen

G. orontii zu induzieren. Betrachtet wurden die SA-Mutanten *NahG* (Überexpressor einer bakteriellen SA-Hydroxylase, GAFFNEY et al., 1993), *npr1-3* und *npr1-1* (*nonexpressor of pathogenesis-related genes1*, CAO et al., 1994; GLAZEBOOK et al., 1996), die JA-Signalwegmutanten *jar1-1* und *jin1* (*jar1-1*, *jasmonate-resistant1-1*, STASWICK et al., 1992; *jin1*, *jasmonate-insensitive1*, BERGER et al., 1996) sowie die ET-Mutanten *ein2-1* und *etr1-3* (*ein2-1*, *ethylene-insensitive2-1*, ALONSO et al., 1999; *etr1-3*, *ethylene receptor1-3*, CHANG & STADLER, 2001). Ein repräsentatives Experiment für die SA- und JA-Mutanten, das die Anzahl an Konidien pro Blattfrischgewicht darstellt, findet sich in Abbildung 3.4-1 B. Für jede Mutante wurde das dort abgebildete Ergebnis in mindestens 2 weiteren Versuchen bestätigt.

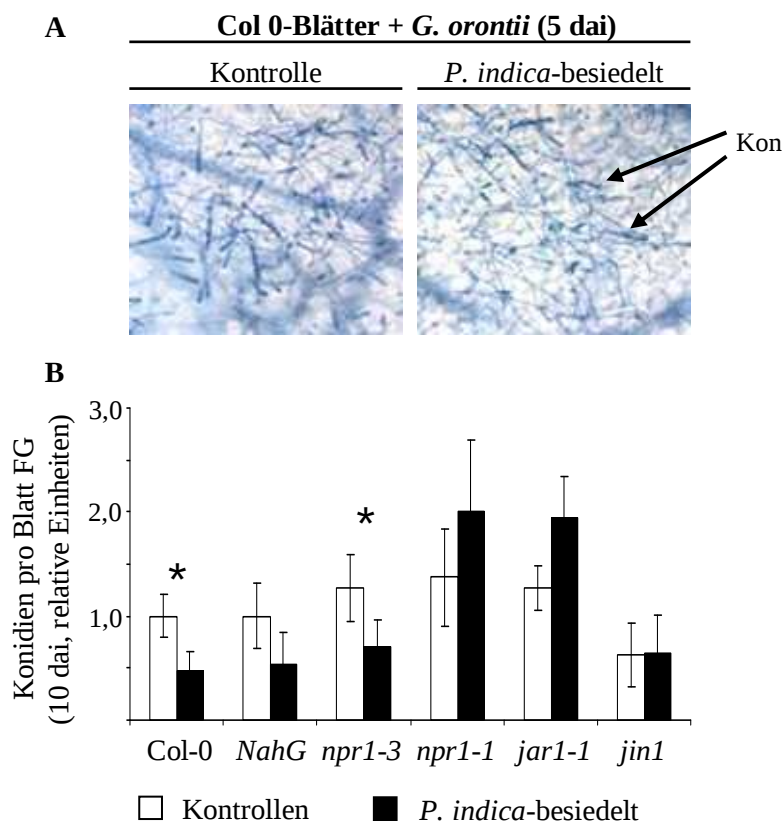


Abb. 3.4-1: Einfluss der Besiedlung von Arabidopsis durch *P. indica* auf das Wachstum des Blattpathogens *G. orontii*. (A) Repräsentative Mikroskopiebilder von *G. orontii* Myzelien (5 dai) auf Mock-inokulierten (Kontrollen) und *P. indica*-besiedelten Col-0 Wildtyp-Pflanzen. Kon: Konidiophore (Konidienträger). (B) Mehltaukonidien pro Blattfrischgewicht (FG) 10 dai auf Kontrollen und durch *P. indica* besiedelten WT, *NahG*, *npr1-3*, *npr1-1*, *jar1-1* und *jin1* Pflanzen. Abgebildet ist der Mittelwert eines repräsentativen Experiments (relative Einheiten, bezogen auf Col-0 ohne Kolonisierung durch *P. indica*) mit Angabe der Standardabweichung. * $p < 0,05$, Studentischer *t*-Test. Weiß: Kontrollen; schwarz: Pflanzen kolonisiert durch *P. indica*; dai: Tage nach Inokulation mit *G. orontii*.

Die Besiedlung mit *P. indica* bewirkte in dem abgebildeten Experiment in den Mutanten *npr1-3* und *NahG* eine signifikante bzw. tendenzielle Reduktion neu gebildeter Konidien um 45 % und 46 % im Vergleich zu nicht kolonisierten Pflanzen des gleichen Genotyps. Dies entspricht in etwa der im Wildtyp Col-0 beobachteten Reduktion an Konidien um 52 %. Auch bei der Auswertung der Anzahl an Konidiophoren pro Myzel 5 dai zeigten die Mutanten *npr1-3* und *NahG* ein ähnliches Bild wie der Wildtyp. So waren die Konidiophoren hier im Durchschnitt um $28,4 \pm 8,5$ % (*npr1-3*, SF n = 7) bzw. $35,0 \pm 27,1$ % (*NahG*, SF n = 2) reduziert. In den Mutanten *npr1-1*, *jar1-1* und *jin1* hatte die Besiedlung mit *P. indica* dagegen keinen Einfluss auf die Mehltauentwicklung, weder bezüglich der Anzahl an Konidien pro Blattfrischgewicht 10 dai (vgl. Abb. 3.4-1 B) noch bezüglich der Ausbildung von Konidiophoren 5 dai (vgl. Anhang Tabelle 7.4-1).

Neben SA- und JA- Mutanten wurden auch die ET-unsensiblen Mutanten *ein2-1* und *etr1-3* in Bezug auf die durch *P. indica* induzierte Resistenz analysiert. Mit dem Endophyten kolonisierte Pflanzen dieser Mutanten zeigten eine in Einzelexperimenten signifikante und im Mittel tendenziell reduzierte Anzahl an Konidiophoren pro Myzel von $16,8 \pm 13,4$ % (*ein2-1*, SF n = 8) bzw. $26,6 \pm 13,8$ % (*etr1-3*, SF n = 3). Bezüglich der Anzahl gebildeter Konidien pro Blattfrischgewicht zeigten sich dagegen im Mittel keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. In mehreren Einzelexperimenten konnte jedoch auch hier eine signifikante Reduktion neu gebildeter Konidien um bis zu 56,8 % (*ein2-1*) festgestellt werden (Studentischer *t*-Test, $p < 0,05$). Im Zeitraum der hier durchgeführten Experimente kristallisierte sich heraus, dass Ethylen einen entscheidenden Faktor während der Besiedlung von Wurzeln durch *P. indica* darstellt (vgl. Kap. 3.5). Aufgrund dieser Abhängigkeit wurde die Resistenzinduktion in den Ethylenmutanten nicht weiter getestet. Die soweit vorliegenden Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass Ethylen bei der durch *P. indica* systemisch induzierten Resistenz keine Rolle spielt.

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in Arabidopsis die Besiedlung der Wurzeln mit *P. indica* eine erhöhte Resistenz gegen das biotrophe Blattpathogen *G. orontii* induziert. Während auch in *NahG*, *npr1-3* und teilweise in *ein2-1* und *etr1-3* eine verstärkte Mehltauresistenz durch die Kolonisierung ausgelöst wird, lässt sich in *jar1-1*, *jin1* und *npr1-1* keine durch den Endophyten systemisch induzierte Resistenz beobachten.

3.4.2 SYSTEMISCHER EINFLUSS VON *P. indica* AUF DIE GENEXPRESSION IM BLATT

Eine Expressionsanalyse SA-, JA- und ET-responsiver Gene diente der weiteren Analyse potenziell durch *P. indica* systemisch induzierter Signalwege in Arabidopsis. Hierzu wurde der Einfluss von *P. indica* auf die Expression ausgewählter Gene in Arabidopsisblättern 14 Tage nach Inokulation der Wurzeln mit dem Endophyten überprüft. Dabei wurde die Transkriptmenge dieser Gene in Blattproben von Kontrollen und durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen vor (0 dai) und drei als auch sechs Tage nach der Inokulation mit Mehltau vergleichend evaluiert (vgl. Abb. 3.4-2 und Tabelle 7.5-1 im Anhang). Analysiert wurden die SA-responsiven Gene *PATHOGENESIS-RELATED (PR)-1b* und *PR-5*, die JA-responsiven Gene *VEGETATIVE STORAGE PROTEIN1 (VSP1)* und *LIPOXYGENASE2 (LOX2)* sowie die JA- und ET-responsiven Gene *PFLANT DEFENSIN1.2 (PDF1.2)* und *ETHYLENE RESPONSE FAKTOR1 (ERF1)*.

Bei Betrachtung der Expressionswerte für diese Gene vor Pathogenstress (0 dai), konnte in keinem Fall ein deutlicher Unterschied zwischen *P. indica*-kolonisierten und nicht -kolonisierten Pflanzen detektiert werden (vgl. Abb. 3.4-2 A-F). Zudem war die Transkriptmenge oftmals sehr gering. Im Fall von *PR-1b* ließ sich für diesen Zeitpunkt in einigen Proben gar kein Transkript nachweisen. Nach Inokulation der Blätter mit *G. orontii* stieg die Menge an Transkript für *PR-1b*, *PR-5*, *ERF1* und *PDF1.2* unabhängig von einer Besiedlung der Wurzeln durch *P. indica* an. *PR-1b* akkumulierte bereits 3 Tage nach Inokulation und die Werte erhöhten sich zum Zeitpunkt 6 dai weiter. *PR-5*, *ERF1* und *PDF1.2* wurden durch das Pathogen deutlich nach 6, nicht schon nach 3 Tagen, induziert. Im Gegensatz dazu war für *LOX2* und *VSP1* kein Einfluss von *G. orontii* auf die Expression in den Kontrollpflanzen zu verzeichnen. Die Menge an *VSP1*-Transkript in den durch *P. indica* besiedelten Pflanzen stieg dagegen drei Tage nach der Mehltauinokulation transient an. Beim direkten Vergleich *P. indica* besiedelter und nicht besiedelter Pflanzen nach Mehltauinokulation konnte somit für *VSP1* eine um den Faktor $8,0 \pm 3,8$ stärkere Expression 3 dai in den mit *P. indica* kolonisierten Pflanzen detektiert werden. Alle anderen hier untersuchten Gene wiesen für diesen Vergleich keine eindeutigen Unterschiede auf.

In Analogie zu den Ergebnissen aus Gerste (vgl. Kap. 3.2), lässt sich somit kein systemischer Einfluss auf die Expression der hier untersuchten Gene nachweisen, der durch die Besiedlung der Wurzeln durch *P. indica* *per se* hervorgerufen wird. Drei Tage nach Mehltauinokulation zeigen durch *P. indica* kolonisierte Pflanzen dagegen eine verstärkte Expression des JA-responsiven Gens *VSP1*. Rein durch *G. orontii* induziert werden *PR-1b*, *PR-5*, *PDF1.2* und *ERF1*.

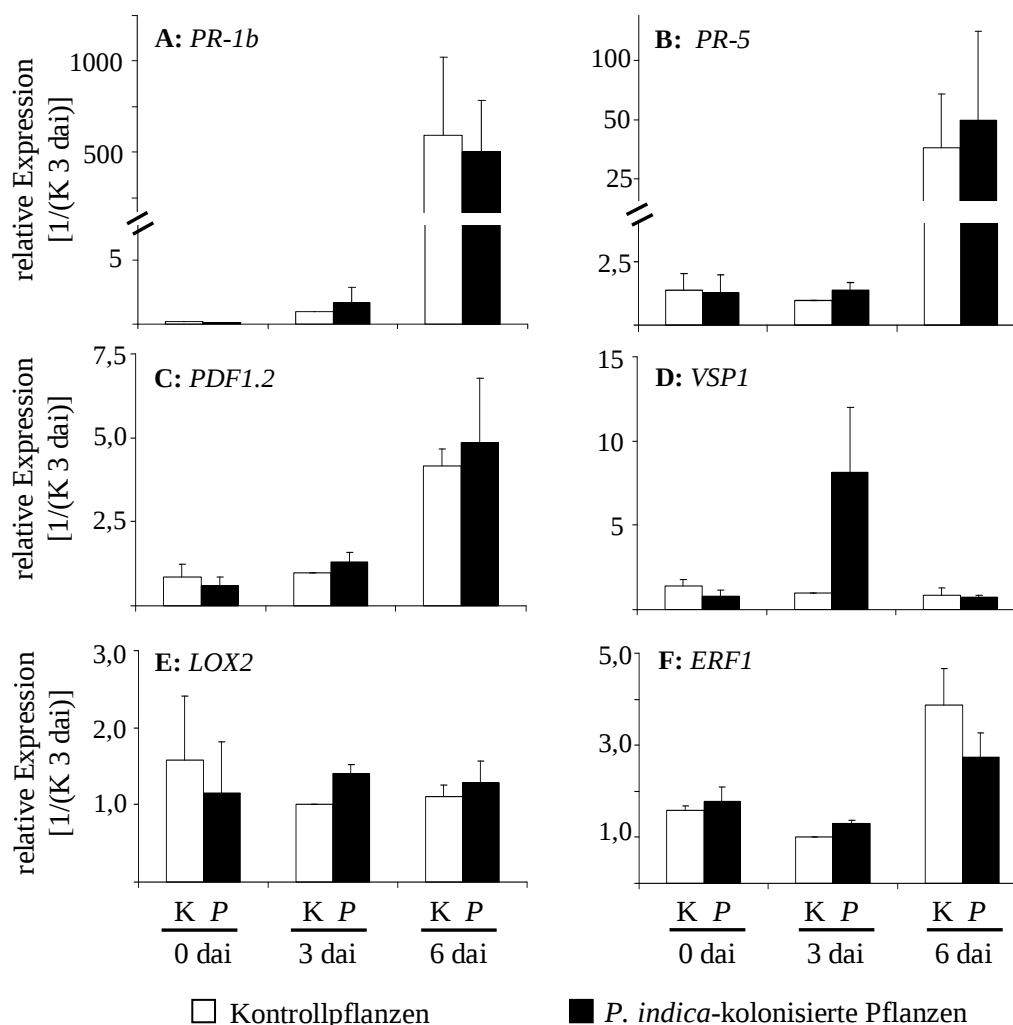


Abb. 3.4-2: Relative Expression hormonresponsiver Gene in Blättern *P. indica* kolonisierter und nicht kolonisierter Arabidopsispflanzen vor und nach Inokulation mit *G. orontii*. Durch qPCR wurden die Transkriptmengen der SA-responsiven Gene *PR-1b* (A) und *PR-5* (B), der JA-responsiven Gene *VSP* (D) und *LOX2* (E) sowie der JA- und ET-responsiven Gene *PDF1.2* (C) und *ERF1* (F) vor (0 dai) sowie 3 und 6 Tage nach Inokulation mit *G. orontii* (dai) quantifiziert. Jeweils nebeneinander dargestellt sind die Expressionswerte für nicht durch *P. indica* besiedelte (weiße Balken) und durch den Endophyten besiedelte Pflanzen (schwarze Balken). Die qPCR-Daten wurden mit dem konstitutiv exprimierten Ubiquitin 5 normalisiert und sind relativ zum 3 dai Wert der nicht besiedelten Kontrollpflanzen gesetzt. Die gezeigten Werte repräsentieren Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers (n = 3). Für *PR-1b* konnten 0 dai keine Standardfehler berechnet werden, da in 2 von 3 Experimenten keine Expression zu verzeichnen war. K: Kontrollpflanzen; P: *P. indica*-kolonisiert.

3.5 ABHÄNGIGKEIT DER WURZELBESIEDLUNG DURCH *P. INDICA* VOM WIRTSGENOTYP

Die erfolgreiche Besiedlung einer Wurzel durch einen Pilz setzt das Unterdrücken oder Umgehen pflanzlicher Abwehrreaktionen voraus. Um zu eruieren, welche genetischen Faktoren und Signalwegkomponenten an der erfolgreichen Besiedlung von Arabidopsiswurzeln durch *P. indica* beteiligt sind, wurde die Besiedlungsstärke ausgewählter Phytohormon- und Signalwegmutanten im Vergleich zum Wildtyp mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) bestimmt. Die ersten Analysen erfolgten 14 Tage nach Inokulation der entsprechenden Pflanzen mit dem Endophyten, wobei die Pflanzen auf Sand:Oil Dri[®] angezogen wurden (Topfversuche, Kap. 3.5.1). Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden zeitlich detaillierte Analysen auf agarhaltigem Medium durchgeführt (Sterilkultur, Kap. 3.5.2). Details zu den hier verwendeten Mutanten sind im Folgenden nur angegeben, wenn diese nicht in Kapitel 3.4 beschrieben wurden.

3.5.1 QUANTIFIZIERUNG DER BESIEDLUNG DURCH *P. INDICA* 14 TAGE NACH INOKULATION

Zur Analyse des Einflusses von SA-, JA- und ET-Signalwegkomponenten auf die Besiedlung von Arabidopsiswurzeln durch *P. indica* wurde zunächst ein semi-steriles System verwendet, das eine Korrelation der Daten mit den in einem ähnlichen System durchgeführten Resistenztests (Kap. 3.4) ermöglichte. Für zwei Wochen steril auf ½ MS⁺-Agar vorgekeimte Samen wurden hierbei mit *P. indica*-Chlamydosporen inokuliert und in ein 1:1 Sand:Oil Dri[®]-Gemisch umgesetzt. 14 Tage nach der Inokulation mit *P. indica* wurden jeweils 4 Pools á 4 Wurzeln pro Variante gebildet und das Verhältnis von pilzlicher zu pflanzlicher DNA durch qPCR bestimmt.

Beim Vergleich der Mutanten *npr1-3* und *NahG* mit dem Wildtyp, zeigten diese eine signifikant stärkere Besiedlung durch *P. indica* von im Durchschnitt $47 \pm 5 \%$ und $73 \pm 19 \%$ (SF, $n = 5$ und 3 ; $p < 0,05$, Einfacher *t*-Test). Die Kolonisierung von *npr1-1* war im Mittel ebenfalls um $44 \pm 20 \%$ erhöht (SF, $n = 3$, vgl. Abb. 3.5-1). In diesem Fall waren zwei der drei Einzelexperimente signifikant ($p < 0,05$, Studentischer *t*-Test). Die untersuchten JA-Signalwegmutanten *jin1* und *jar1-1* zeigten im Vergleich zum Wildtyp dagegen keinen Unterschied in der Besiedlungsstärke (vgl. Abbildung 3.5-1 und Tabelle 7.6-1 im Anhang), während die ET-Überproduzenten *eto1* und *eto3* (*ethylene overproducer1* und *ethylene overproducer3*, GUZMANN & ECKER, 1990; WOESTE et al., 1999) um $20 \pm 5 \%$ (SF, $n = 2$) bzw. $40 \pm 13 \%$ (SF, $n = 3$) stärker besiedelt wurden. Gleichfalls zeigte auch die Mutante *ctr1-1* (*constitutive tripple response1-1*, negativer Regulator des ET-

Signalweges, KIEBER et al., 1993) in einem Einzelexperiment eine signifikant um 21 % verstärkte Kolonisierung. Im Gegensatz zu den ET-Überproduzenten wiesen Mutanten mit Defekten im ET-Signalweg wie *ein2-1* keinen Unterschied bzw. *etr1-3* eine tendenziell um 16 ± 26 % (SF, $n = 3$) verringerte Besiedlung im Vergleich zum Wildtyp auf. Die ebenfalls in diesem System nur in einem Versuch getestete Camalexinmutante *pad3-1* (*phytoalexin deficiency3-1*, ZHOU et al., 1999) wurde tendenziell um 28 % stärker kolonisiert. Mutanten, die hier nur ein Mal getestet wurden, sind zum Vergleich mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.5.2 ebenfalls in der Abbildung 3.5-1 aufgeführt (hellgraue Balken).

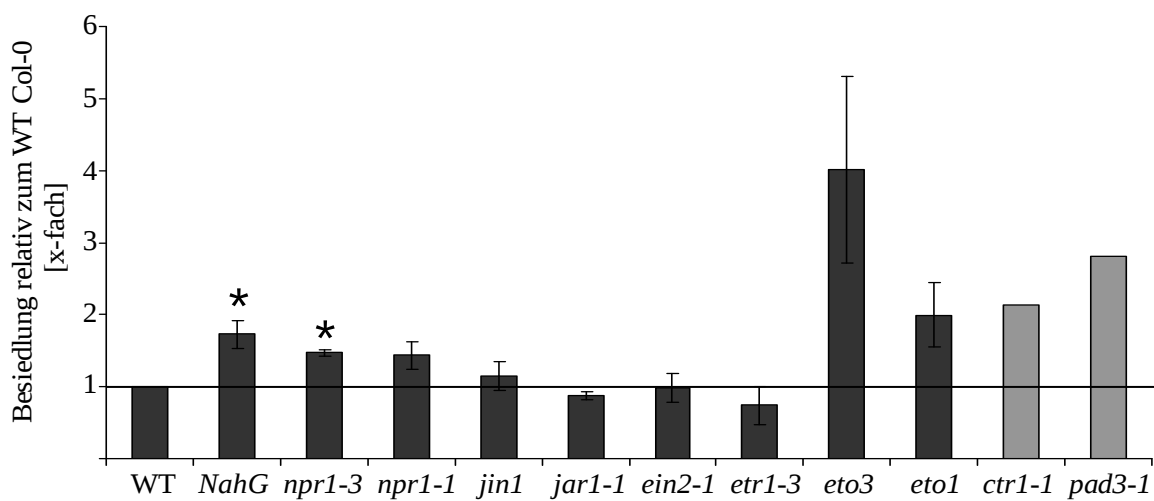


Abb. 3.5-1: Stärke der Besiedlung verschiedener Hormon- und Abwehrmutanten durch *P. indica* relativ zum Wildtyp 14 Tage nach Inokulation. Die Pflanzen wurden nach der Inokulation mit dem Endophyten in einer Sand:Oil Dri[®]-Mischung angezogen und zur Quantifizierung wurde das Verhältnis pilzlicher zu pflanzlicher DNA in den entsprechenden Wurzelproben durch qPCR bestimmt. Dargestellt ist der relative Unterschied zum Wildtyp Col-0 (WT) als Mittelwert aus mindestens 2 (*jar1-1*, *jin1*, *eto1*) bzw. 3-5 (3: *npr1-1*, *npr1-3*, *etr1-1*, *eto3*; 4: *ein2-1*; 5: *NahG*) unabhängigen Experimenten mit Angabe des Standardfehlers (dunkelgraue Balken). *ctr1-1* und *pad3-1* wurden in diesem System nur in einem Experiment getestet. Zum Vergleich, u. a. mit den Resultaten aus Kapitel 3.5.2, sind die Ergebnisse für diese beiden Mutanten trotzdem aufgeführt (hellgraue Balken). Im Fall von *npr1-1* und *eto3* waren nicht der Mittelwert jedoch Einzelexperimente (2 von 3 und 1 von 3) signifikant unterschiedlich zu den Werten für den Wildtyp ($p < 0,05$, Studentischer *t*-Test). * $p < 0,05$, Einfacher *t*-Test.

Zusammenfassend betrachtet wurden Mutanten mit Defekten im SA-Signalweg oder mit fehlender SA-Akkumulation sowie ET-Überproduzenten im Vergleich zum Wildtyp besser durch *P. indica* besiedelt. Mutanten mit Defekten im ET-Signalweg wiesen dagegen eine zum Teil geringere Besiedlung auf, während Mutationen im JA-Signalweg sich nicht auswirkten.

3.5.2 ZEITABHÄNGIGE QUANTIFIZIERUNG DER BESIELDUNG MIT *P. INDICA*

Basierend auf den im Sand:Oil Dri[®]-System 14 Tage nach Inokulation der Wurzeln mit *P. indica* erhaltenen Ergebnissen, erfolgte eine genauere zeitliche Analyse der Wurzelbesiedlung ausgewählter Mutanten in einem sterilen System auf agarhaltigem Medium in Zusammenarbeit mit der AG Schäfer, IPAZ, Universität Gießen. Der Wechsel der Anzuchtbedingungen wurde aus praktischen Gründen vollzogen, u. a. um leichter bereits zu frühen Zeitpunkten nach der Inokulation mit *P. indica* die Besiedlung quantifizieren zu können. Hierzu wurden sterile Samen der entsprechenden Mutanten auf saccharosehaltigem $\frac{1}{2}$ -MS⁺-Medium für eine Woche vorgekeimt, anschließend auf senkrecht stehende Platten mit zuckerfreiem $\frac{1}{2}$ -MS-Medium umgesetzt und nach weiteren 14 Tagen mit *P. indica*-Chlamydosporen inokuliert. Zu den Zeitpunkten 3, 7 und 14 Tage nach Inokulation, wurden Wurzelproben entnommen und das Verhältnis von pflanzlicher zu pilzlicher DNA mittels qPCR wie in Kapitel 3.5.1 analysiert.

Die Beteiligung von Ethylen an der Kolonisierung von *Arabidopsis* durch *P. indica* wurde von Behnam Khatabi weiter verfolgt und bestätigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den bereits in der Topfkultur (Kap. 3.5.1) getesteten Mutanten *npr1-1*, *NahG* und *pad3-1* zusätzlich die Mutanten *dnd1* (*defense, no death,1* YU et al., 1998), *sid2-2* (*SA induction-deficient2-2*, DEWDNEY et al., 2000), *coi1-16* (*coronatine-insensitive1*, ELLIS & TURNER, 2002) und die JA-hypersensitive Mutante *joe1* (*jasmonate overexpressing1*, JENSEN et al., 2002) genauer untersucht. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind in Abbildung 3.5-2 und in Tabelle 7.6-2 im Anhang zusammengefasst. Wie im Sand:Oil Dri[®]-System (vgl. Kap. 3.5.1) wurden auch auf Agar *NahG*, *pad3-1* und in geringem Maße *npr1-1* relativ zum Wildtyp 14 dai stärker durch *P. indica* besiedelt. Die vorherigen Zeitpunkte zeigten für diese Mutanten dagegen keine höhere Besiedlung im Vergleich zum Wildtyp. Auch die Mutanten *sid2-2* und *dnd1* waren 14 dai um 34 ± 10 % bzw. 45 ± 4 % (SF, n = 2) stärker besiedelt. Im Falle von *sid2-2* war die Besiedlung sogar schon nach sieben Tagen um 30 ± 8 % (SF, n = 3) erhöht. Die Mutante *dnd1* dagegen zeigte anfangs (3 dai) relativ zum Wildtyp eine um 19 ± 7 % (SF, n = 3) geringere und 7 dai eine gleich starke Besiedlung.

Ähnlich wie *sid2-2* wurde die JA-Mutante *coi1-16* sowohl 7 als auch 14 dai um 51 ± 34 % bzw. 54 ± 11 % (SF, n = 3) besser besiedelt. Da in dieser Mutante nach neuesten Erkenntnissen zusätzlich *pen2* mutiert ist (WESTPHAL et al., 2008), lässt sich dieser Phänotyp jedoch ohne weitere Analysen nicht genau zuordnen und die Daten sind nur im Anhang (Tabelle 7.6-2) angegeben. Im Gegensatz zu den anderen hier gezeigten Mutanten

wurde die JA-hypersensitive Mutante *joe1* im Vergleich zum Wildtyp 14 dai nicht stärker, sondern sogar tendenziell um $16 \pm 20 \%$ (SF, $n = 3$) geringer durch *P. indica* kolonisiert. Zu den Zeitpunkten 3 dai und 7 dai zeigte sich dieses Bild nicht.

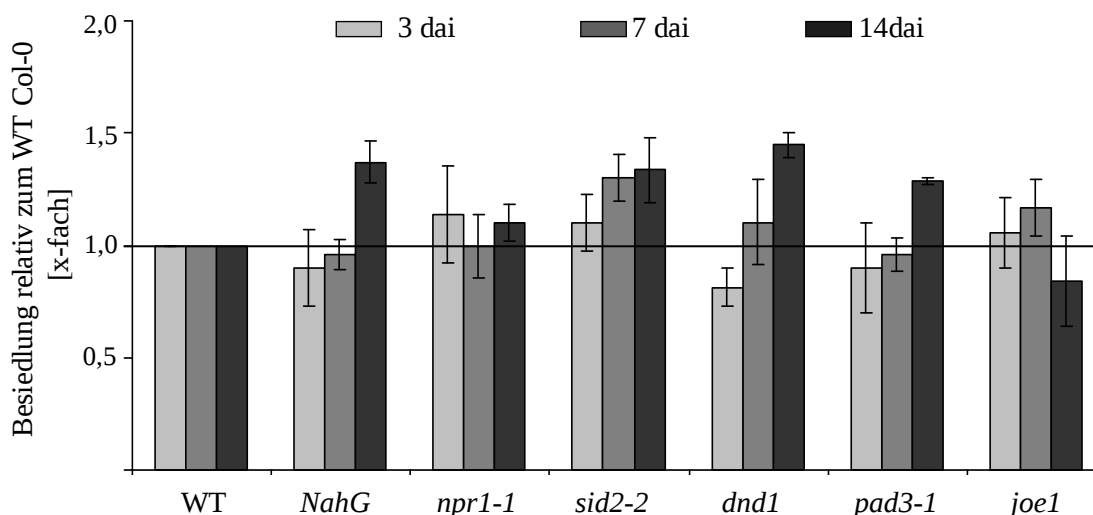


Abb. 3.5-2: Relative Besiedlung diverser Arabidopsismutanten durch *P. indica* im Vergleich zum Wildtyp 3, 7 und 14 Tage nach Inokulation. Die Quantifizierung erfolgte durch die Ermittlung des Verhältnisses pflanzlicher zu pilzlicher DNA in den entsprechenden Wurzelproben durch qPCR. Dargestellt ist der relative Unterschied zum Wildtyp Col-0 zum entsprechenden Zeitpunkt als Mittelwert aus zwei (14 dai, außer *joe1* und *coi1-16*) oder drei (3 und 7 dai, sowie *joe1* und *coi1-16* 14 dai) unabhängigen Experimenten mit Angabe des Standardfehlers. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf agarhaltigem Medium in Sterilkultur. Hellgrau: 3 Tage nach Inokulation (dai); mittelgrau: 7 dai; dunkelgrau: 14 dai.

Insgesamt betrachtet wurden somit in der Sterilkultur Mutanten mit fehlender SA-Akkumulation (*NahG*, *sid2-2*), die Camalexinmutante *pad3-1* sowie *dnd1* und *coi1-16* 14 dai im Vergleich zum Wildtyp besser durch *P. indica* kolonisiert. Drei und sieben Tage nach Inokulation zeigten diese Mutanten i. d. R. keine Unterschiede zum Wildtyp. Nur *dnd1* wurde 3 dai weniger und *sid2-2* sowie *coi1-16* 7 dai stärker durch den Endophyten besiedelt.

Ein Vergleich der Ergebnisse aus den Versuchen mit den beiden hier verwendeten Anzuchtssystemen zeigt, dass die mit diesen erhaltenen Resultate grundsätzlich vergleichbar sind. Eine fehlende SA- und Camalexin-Produktion wirkt sich zu späteren Zeitpunkten (14 dai) positiv auf die Besiedlung durch *P. indica* aus, während Veränderungen im JA-Signalweg keinen eindeutigen Einfluss auf die Kolonisierung zeigen. Zudem bewirken erhöhte Ethylenmengen eine verstärkte, Defekte im ET-Signalweg dagegen eine reduzierte Besiedlung durch den Endophyten.

4 DISKUSSION

Piriformospora indica ist ein mutualistischer Wurzelendophyt, der die Fähigkeit besitzt mit sehr unterschiedlichen Pflanzen (z. B. Orchideen, Poaceen, Brassicaeen, Solanaceen) Symbiosen auszubilden. Zudem beeinflusst er - zumindest unter bestimmten Voraussetzungen - Wachstum, Entwicklung sowie Stress- und Pathogenanfälligkeit seiner Wirte (z. B. PHAM et al., 2004a; 2004b; SCHÄFER & KOGEL, 2009; VARMA et al., 1999; WALLER et al., 2005). Die hier vorliegende Arbeit befasste sich mit dem Einfluss von *P. indica* auf die Kulturpflanze *Hordeum vulgare* (Gerste) sowie die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* und trug dazu bei, durch den Pilz induzierte Effekte und die Etablierung der Symbiose mit dem Pilz genauer zu charakterisieren. Die gleichzeitige Analyse der Interaktion von *P. indica* mit Gerste und mit *Arabidopsis* ermöglichte es zudem, sowohl die für *Arabidopsis* im größeren Maßstab vorhandenen Informationen und Mutantenlinien zu nutzen und als auch die Effekte von *P. indica* in einer agronomisch relevanten, monokotylen und der einer dikotylen Pflanze direkt zu vergleichen. Die molekulare Analyse der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz gegen Echte Mehltäupilze in Gerste und *Arabidopsis* erlaubte in beiden Pflanzen beteiligte Mechanismen und Signalwege zu identifizieren. Gleichzeitig wurden durch morphologische Studien grundlegende Auswirkungen des Endophyten auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen aufgezeigt. Zusätzlich konnten Kompatibilitätsfaktoren und Signalwege identifiziert werden, die bei der wechselseitigen Beeinflussung zwischen Pflanze und Pilz in der Wurzel beteiligt sind und sich auf die Etablierung der Symbiose auswirken. Mit der Diskussion der grundlegenden Beobachtungen aus den Wachstums- und Entwicklungsstudien wird im nächsten Kapitel begonnen (Kap. 4.1), um Resultate hieraus mit in die sich anschließende Diskussion der systemischen Resistenzinduktion einbeziehen zu können (Kap. 4.2). Nach der Diskussion dieser, auf der Pflanzenseite zu beobachtenden Effekte, befasst sich Kapitel 4.3 mit der Frage, welche Faktoren an der Etablierung des Pilzes in der Pflanze beteiligt sind und wie das Pilz/Pflanze-Verhältnis beeinflusst werden kann.

4.1 DER EINFLUSS VON *P. INDICA* AUF DIE MORPHOLOGIE UND DAS WACHSTUM SEINER WIRTSPFLANZE: HINTERGRÜNDE UND ZUSAMMENHÄNGE

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich der durch *P. indica* induzierten morphologischen Veränderungen in Gerste und *Arabidopsis* (vgl. Kap. 3.1) zeigen deutlich, zusammen mit weiteren Veröffentlichungen, dass die Effekte, die durch den Endophyten in diesen Pflanzen hervorgerufen werden, grundsätzlich

vergleichbar sind. Diese Gemeinsamkeiten werden im nächsten Abschnitt kurz zusammengefasst und gegenübergestellt um darauf aufbauend die möglichen physiologischen und regulatorischen Grundlagen der beobachteten Wachstumseffekte in den beiden Pflanzen zusammen zu diskutieren.

***P. indica* induzierte in Gerste und Arabidopsis ähnliche Wachstumsveränderungen**

Bereits aus früheren Studien ist bekannt, dass eine Kolonisierung durch *P. indica* in Gerste neben einer erhöhten Biomasseakkumulation eine schnellere Entwicklung (früheres Blühen), eine erhöhte Anzahl an Ähren und damit einhergehend einen erhöhten Ertrag bedingt (ACHATZ, 2006). Zusätzlich konnte in den detaillierten morphologischen Studien der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Kolonisierung von Wurzeln mit *P. indica* zu einer verstärkten Seitenwurzelbildung und einer reduzierten Wurzellänge führt, wobei das Ausmaß dieser Effekte in beiden Fällen von der Besiedlungsstärke abhängig ist (vgl. Kap. 3.1.1). Auch in Arabidopsis konnte unter bestimmten Bedingungen ein verstärktes Spross- und Wurzelwachstum, eine erhöhte Samenproduktion sowie eine erhöhte Anzahl an Seitenwurzeln und eine verkürzte Wurzellänge beobachtet werden (diese Arbeit vgl. Kap. 3.1.2; PESKAN-BERGHÖFER et al., 2004; SHAHOLLARI et al., 2005; 2007; SIRRENBURG et al., 2007). Zudem werden die Wachstumseffekte in Arabidopsis durch die in den einzelnen Studien verwendeten Anzuchts- und Inokulationsbedingungen beeinflusst. Dies zeigt sich u. a. daran, dass nicht alle Effekte stets in allen Studien beobachtet werden konnten und zu hohe Inokulationsdichten bzw. eine zu starke Kolonisierung sogar einen negativen Wachstums- und Fitnessseffekt hervorrufen kann (OELMÜLLER, 2008; VADASSERY et al., 2009a; 2009b). Auch in den Studien der hier vorliegenden Arbeit zeigten sich negative Effekte auf die Spross- und Wurzellänge von Gerste vor allem bei der höchsten zur Inokulation verwendeten Sporenkonzentration (vgl. Abb. 3.1-2). Zudem scheinen sich auch die jeweils verwendeten Lichtbedingungen maßgeblich auf die beobachtenden Effekte auszuwirken (eigene Beobachtungen).

Die hier durchgeführte genauere zeitliche Analyse der Wachstumseffekte in Gerste zeigte zudem, dass eine erhöhte Biomasseakkumulation durch die Besiedlung mit *P. indica* erst nach einer Übergangsphase sichtbar wird. So wurde in den hier durchgeführten Versuchen erst zwei Wochen nach Inokulation von Gerstenwurzeln mit dem Endophyten eine gesteigerte Zunahme des Wurzel- und in geringem Maße auch des Sprossgewichtes im Vergleich zu den unbesiedelten Kontrollpflanzen beobachtet (vgl. Abb. 3.1-2). In den ersten zwei Wochen wurde sogar eine eher verminderte Biomassezunahme der durch

P. indica-kolonisierten Pflanzen verzeichnet. Auch die Sprosslänge war in den ersten zwei Wochen nach Inokulation, vor allem bei hohen Inokulationsdichten, reduziert und nahm erst folgend langsam zu. Analog zu diesen Resultaten aus Gerste findet sich auch in *Arabidopsis* eine verstärkte Biomasseakkumulation im Spross und in der Wurzel erst nach einer gewissen Zeit (PESKAN-BERGHÖFER et al., 2004; SHAHOLLARI et al., 2005) und es kann zu Beginn der Interaktion vereinzelt ein negativer Wachstumseffekt beobachtet werden, der sich im Laufe der Interaktion relativiert (SIRRENBURG et al., 2007).

Insgesamt betrachtet lassen sich somit deutliche Übereinstimmungen bezüglich der durch eine Besiedlung mit *P. indica* induzierten morphologischen Veränderungen in der agronomisch relevanten Gerste und der Modellpflanze *Arabidopsis* festhalten. Neben dem bereits oftmals beschriebenen, jedoch erst nach einer Übergangsphase sichtbaren positiven Wachstumseffekt, bewirkt *P. indica* in beiden Wirten eine Umsteuerung der Wurzelmorphologie hin zu mehr Seiten- und kürzeren Hauptwurzeln, wobei das Ausmaß der Effekte vor allem bei Ersterem von der Inokulationsdichte abhängt. Dies ermöglicht es, Resultate aus den beiden Systemen zu vergleichen und in den folgenden Abschnitten zusammen zu diskutieren.

Etablierung einer mutualistischen Interaktion mit *P. indica*: Kosten und Nutzen

Die im vorherigen Abschnitt aufgeführten Resultate bezüglich des Einflusses von *P. indica* auf die zeitliche Entwicklung der Biomasse seiner Wirtspflanzen deuten darauf hin, dass sich positive Effekte erst ergeben, wenn die Pflanze hinsichtlich ihrer Größe und Photosyntheseleistung einen gewissen Schwellenwert überschritten, der Pilz eine kritische Besiedlungsstärke bzw. Besiedlungsstufe erreicht oder sich ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Pilz- und Pflanzenwachstum eingestellt hat. Dafür, dass sich ein balanciertes Pilz/Pflanze-Verhältnis einstellt, spricht, dass eine Verzehnfachung der Inokulationsmenge nur mit einer 1,3- bis 1,8-fach verstärkten Besiedlung in den ersten zehn Tagen nach Inokulation einhergeht (vgl. Kap. 3.1.1). Möglicherweise reduzieren sich diese Unterschiede zu späteren Zeitpunkten weiter und es stellt sich ein von der ursprünglichen Inokulationsdichte unabhängiges, durch die Pflanze reglementiertes maximales Pilz/Pflanze-Verhältnis ein (vgl. auch Kap. 4.3). Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass drei Wochen nach Inokulation von Gerstenwurzeln mit *P. indica* nur ein schwacher Zusammenhang zwischen der durch *P. indica* induzierten Biomassezunahme und der ursprünglichen Inokulationsdichte besteht. Nur Pflanzen inokuliert mit einer sehr hohen Sporenkonzentration ($3 \cdot 10^6$ Sporen/ml) zeigten einen vergleichsweise geringen Anstieg

des Wurzel- als auch des Gesamtgewichtes relativ zu Pflanzen, die mit geringen Inokulationsdichten behandelt wurden (vgl. Abb. 3.1-2). Möglicherweise ist zu späteren Zeitpunkten jedoch auch dieser Unterschied nicht mehr erkennbar. Auch das Sprossgewicht der mit dem Endophyten inokulierten Pflanzen nahm nach drei Wochen insgesamt zu, wenn auch nicht über alle Versuche und Inokulationsdichten konstant. Ein durch die *P. indica*-Besiedlung induziertes erhöhtes Sprossgewicht wurde bereits in anderen Arbeiten ausführlich dokumentiert (ACHATZ et al., eingereicht; WALLER et al., 2005). Die Daten implizieren somit auch hier, dass sich möglicherweise zu späteren Zeitpunkten, z. B. vier Wochen nach Inokulation, eine verstärkte Biomasseakkumulation, unabhängig von der anfänglichen Inokulationsdichte, zeigt.

Die am Anfang der Interaktion von Gerste und *Arabidopsis* mit *P. indica* fehlende Wachstumssteigerung bzw. das sogar tendenziell eher verminderte Wachstum kolonisierter Pflanzen deutet auf für die Pflanze kostenintensive Prozesse bei der Etablierung der Symbiose hin. Diese könnten einerseits aus einer starken *Sink*-Wirkung des Pilzes resultieren, der Nährstoffe (Kohlenhydrate und Aminosäuren) für seine eigene Entwicklung abzieht. Für diese Hypothese spricht, dass die Besiedlung durch *P. indica* in Gerstenwurzeln eine Verringerung der Konzentration an Hexosen und Stärke, nicht jedoch von Saccharose bedingt. Auch die Konzentrationen der Aminosäuren Glutamin, Asparagin und Glutaminsäure sind in der Wurzelspitze und in der Streckungszone *P. indica*-kolonisierter Gerstenpflanzen reduziert. Zusätzlich nimmt das Saccharose/Hexose-Verhältnis in *P. indica*-besiedelten Wurzeln von den proximalen Wurzelsegmenten hin zu der stoffwechselphysiologisch aktiveren Wurzelspitze stärker ab als in entsprechenden Kontrollpflanzen (SCHÄFER et al., 2009). Insgesamt betrachtet deutet dies darauf hin, dass die Besiedlung vor allem der Differenzierungs- und Streckungszone durch den Pilz (DESHMUKH et al., 2006) eine Umverteilung der Nährstoffe in der Wurzel bedingt (SCHÄFER et al., 2009) und der Pilz einen Teil der auch von der Pflanze benötigten Nährstoffe verbraucht. Eine Aufnahme von Hexosen und Aminosäuren aus der Wurzel konnte auch für AM-Pilze gezeigt werden (GOVINDARAJULU et al., 2005; PFEFFER et al., 1999). Zudem ist bekannt, dass zwischen Wirtszellen und Symbionten eine Konkurrenz um verfügbare Kohlenhydrate bestehen kann, wenn die Zufuhr über das Phloem limitiert ist (SON & SMITH, 1988). Neben der Nährstoffkonkurrenz durch den Pilz können jedoch auch kostenintensive Umsteuerungen in der Pflanze, vor allem in der Wurzel (z. B. die erhöhte Seitenwurzelbildung), einen Beitrag zu der geringeren Biomassezunahme durch *P. indica* besiedelter Pflanzen zu Beginn der Symbiose leisten.

Sobald sich ein bestimmtes Verhältnis zwischen *P. indica* und seinem Wirt stabilisiert hat, könnte der negative Einfluss des Endophyten auf das Wachstum aufgrund einer erhöhten Photosyntheseleistung kolonisierter Pflanzen, aufgrund einer besseren Nährstoff- und Wasserversorgung durch das sich bis dahin ausgebildete intensive Hyphennetzwerk des Pilzes und der veränderten Wurzelmorphologie oder auch aufgrund der Unterdrückung kostenintensiver Prozesse in der Pflanze durch den Pilz ausgeglichen werden. Zumindest unter geringen Lichtintensitäten weisen *P. indica*-kolonisierte Pflanzen kongruent zu diesen Annahmen eine verstärkte Photosyntheseleistung auf (ACHATZ, 2006). Zudem ist die Blattfläche *P. indica*-kolonisierter Pflanzen signifikant erhöht (eigene Beobachtungen, ACHATZ et al., eingereicht). Somit ist selbst unter Starklichtbedingungen, bei denen sich keine Unterschiede in der Photosyntheserate pro Fläche zwischen Kontrollen und mit *P. indica* besiedelten Pflanzen zeigen (ACHATZ et al., eingereicht), insgesamt von einer erhöhten C-Assimilationskapazität der mit dem Endophyten kolonisierten Pflanzen auszugehen.

Für eine (zusätzliche) bessere Nährstoff- oder Wasserversorgung der Pflanzen durch den Pilz und/ oder durch die veränderte Wurzelmorphologie spricht u. a. die Beobachtung, dass ein verbessertes Wachstum *P. indica*-besiedelter Weizenpflanzen vor allem auf nährstoffarmen Böden beobachtet werden konnte (SERFLING et al., 2007). Zudem wurde in Arabidopsis ein verstärkter Transport von Phosphat sowie in Arabidopsis und Tabak (*Nicotiana tabacum*) ein verstärkter Transport von Nitrat in oberirdische Pflanzenteile gemessen. Kongruent hierzu wird durch *P. indica* in Arabidopsiswurzeln eine NADH-abhängigen Nitratreduktase stimuliert (SHAHOLLARI et al., 2005; SHERAMATI et al., 2005). In Gerste dagegen ist die durch *P. indica* vermittelte Ertragssteigerung unabhängig vom N- und P-Nährstoffangebot und es konnte keine erhöhte Akkumulation dieser Makroelemente im Spross oder in der Wurzel von besiedelten Pflanzen beobachtet werden (ACHATZ et al., eingereicht). Ähnliches wurde auch in einer anderen als der oben verwendeten Tabakart (*Nicotiana attenuata*) beobachtet (BARAZANI et al., 2005). Möglicherweise ist in diesen Fällen eine verbesserte Wasseraufnahme oder eine verbesserte Versorgung mit bisher nicht untersuchten Makroelementen wie Magnesium, Kalium oder Sulfat für den Wachstumseffekt (mit)verantwortlich. Kongruent hierzu zeigten z. B. ALLEN & SHACHAR-HILL (2009), dass Sulfate von arbuskulären Mykorrhizapilzen aufgenommen und in die besiedelten Pflanzen transportiert werden können. Auch wird in arbuskulären Mykorrhiza, neben Mineralstoffen, Wasser durch den Pilz in die Pflanze transportiert (z. B. HAUSE & FESTER, 2005). Die genaue Analyse, welche Stoffe möglicherweise zwischen *P. indica* und seinem

jeweiligen Wirt ausgetauscht werden, ist ein noch offenes Forschungsfeld und wird helfen, die beobachteten Wachstumseffekte genauer zu verstehen.

Eine weitere Möglichkeit, durch die *P. indica* das Wachstum und die Fitness seiner Wirte erhöht, könnte in einer durch den Pilz unterdrückten Produktion kostenintensiver Abwehrstoffe in der Pflanze liegen. So argumentieren BARAZANI und Kollegen (2005 und 2007), dass eine Besiedlung mit *Sebacina vermifera* in Tabak Abwehrreaktionen unterdrückt, die mit Ethylen und TPI (TPI = Trypsin Proteaseinhibitoren) assoziiert sind, und dies für die Wachstumsstimulation durch den Endophyten ausschlaggebend ist. Gleichzeitig wird hierdurch jedoch eine erhöhte Anfälligkeit gegen Insekten hervorgerufen (BARAZANI et al., 2005). Auch in *P. indica*-besiedelten Gerstenwurzeln konnten Hinweise auf durch den Endophyten reprimierte Abwehrmechanismen gefunden werden (DESHMUKH & Kogel, 2007; SCHÄFER et al., 2009). Möglicherweise spielt somit auch in dieser Interaktion eine verminderte Expression konstitutiver Abwehrmechanismen und eine damit verbundene Kostenreduktion eine Rolle bei den beobachteten Wachstumssteigerungen.

Pilzexudate als Auslöser der *P. indica*-stimulierten Wachstumsveränderungen

Unabhängig von der Art der oben beschriebenen, durch *P. indica* induzierten Wachstumseffekte an sich und wie die mit diesen für die Pflanze einhergehenden Kosten abgedeckt werden, stellt sich die Frage, wie die morphologischen Veränderungen in der Pflanze reguliert und ausgelöst werden. Ein möglicher Auslöser können vom Pilz produzierte Substanzen darstellen, die den Pflanzenphänotyp direkt oder über eine Veränderung des Hormongleichgewichtes im Wirt beeinflussen. Für diese Vermutung spricht, dass nicht nur durch eine Besiedlung mit *P. indica*, sondern auch durch die Applikation von Kulturfiltrat, abgetötetem Pilz oder Zellwandextrakt und ohne direkten Kontakt der Wurzeln mit dem Endophyten, allein durch die Nachbarschaft auf agarhaltigem Medium, morphologische Veränderungen induziert werden können (diese Arbeit, vgl. Kap. 3.3.5; PESKANBERGHÖFER et al., 2004; SHAHOLLARI et al., 2005; SIRRENBURG et al., 2007; VADASSERY et al., 2009a; VARMA et al., 2000). Auch die nicht-lineare Abhängigkeit der Seitenwurzelinduktion von der Inokulationsdichte (vgl. Abb. 3.1-1) und die mit der Inokulationsdichte zunehmende Verkürzung der Wurzellänge (vgl. Abb. 3.1-2 B) in Gerste gibt Hinweise darauf, dass Dosis-Effekt-Kurven von Effektoren und die Balance zwischen unterschiedlichen Hormonen eine Rolle bei den beobachteten morphologischen Veränderungen spielen. Kongruent hierzu konnte gezeigt werden, dass *P. indica* neben Auxin vor allem Cytokinine produziert und die Produktion von Ethylenvorstufen in der Pflanze stimuliert (KHATABI et

al., eingereicht; VADASSERY et al., 2008). Damit einhergehend ist der Cytokiningehalt kolonisierter Arabidopsiswurzeln im Vergleich zu nicht kolonisierten erhöht und durch Cytokinin regulierte Gene werden differenziell exprimiert. Ein Beispiel ist die verstärkte Expression von *APR5*, dass auch während der Seitenwurzelbildung induziert wird (VADASSERY et al., 2008). Zugleich weisen besiedelte Arabidopsiswurzeln in den ersten sieben Tagen nach Kokultivierung mit dem Endophyten tendenziell erhöhte Mengen an freiem und gebundenem IAA auf (VADASSERY et al., 2008). Auch in Gerste werden durch Giberellin, Auxin, Abscisinsäure und Brassinosteroide regulierte Gene in durch *P. indica* besiedelten Wurzeln differenziell exprimiert (SCHÄFER et al., 2009).

Eine genauere Analyse der Beteiligung dieser Phytohormone bei der durch *P. indica* induzierten verstärkten Biomassezunahme zeigte, dass in Arabidopsis *trans*-Zeatin, nicht jedoch Auxin für das verstärkte Wachstum ausschlaggebend ist (VADASSERY et al., 2008). Auxin wird dagegen eine Rolle bei der Induktion der verstärkten Seitenwurzelbildung und der Verkürzung der Hauptwurzeln zugesprochen (SIRRENBURG et al., 2007). Vor allem bei ersterem nimmt Auxin eine dominante Rolle ein (LJUNG et al., 2005). Der Einfluss von Auxin auf das Streckungswachstum der Hauptwurzel muss jedoch im Zusammenspiel mit der ethyleninduzierenden Wirkung dieses Hormons betrachtet werden, da sowohl Auxin als auch Ethylen und das Zusammenspiel der beiden Hormone durch unterschiedliche Signalwege ein vermindertes Wurzelwachstum bedingen können (YOO et al., 2009). Neben den Effekten in der Wurzel kann auch die schnellere Entwicklung, z. B. das frühere Blühen von Gerste (ACHATZ, 2006), auf eine Veränderung der Phytohormonbalance in der Pflanze aufgrund der Besiedlung durch *P. indica* zurückzuführen sein. So stimulieren u. a. Auxin und Giberelline das Spross- bzw. Streckungswachstum von Pflanzen und letztere können sich auch auf die Blühinduktion auswirken (Übersicht in TAI & ZEIGER, 2000).

Schlussfolgerung: Der Einfluss von *P. indica* auf Wachstum und Entwicklung seiner Wirte wird vom Pflanze/Pilz-Verhältnis beeinflusst

Die vergleichende Diskussion der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit mit weiteren Veröffentlichungen macht deutlich, dass in Gerste und Arabidopsis durch *P. indica* ähnliche morphologische Veränderungen induziert werden und sich die beiden Systeme somit grundsätzlich vergleichen lassen. In beiden Wirten bewirkt *P. indica* ein verstärktes Wachstum und eine Umsteuerung der Wurzelmorphologie hin zu mehr Seiten- und kürzeren Hauptwurzeln, wobei vor allem Ersteres eine Abhängigkeit von der Inokulationsdichte zeigt. Zusätzlich wurde durch die hier präsentierten Resultate deutlich, dass der

bereits oftmals beschriebene, positive Wachstumseffekt in Gerste erst nach einer Übergangsphase sichtbar wird und sich vor allem sehr hohe Inokulationsdichten zunächst negativ auf die Pflanzenentwicklung auswirken. Dies deutet auf für die Pflanze kostenintensive Prozesse vor allem zu Beginn der Symbiose hin. Im Laufe der Interaktion mag die Pflanze eine zu starke Kolonisierung reglementieren, wodurch sich Effekte zu späteren Zeitpunkten unabhängig von der anfänglichen Inokulationsdichte zeigen und eine mutualistische Interaktion ermöglicht wird. Zu diesem Zeitpunkt werden die durch den Pilz hervorgerufenen Kosten möglicherweise durch eine erhöhte C-Assimilationskapazität, durch eine verbesserte Nährstoff- und Wasserversorgung oder auch durch die Unterdrückung kostenintensiver Prozesse in der Pflanze durch den Pilz mehr als ausgeglichen und somit ein verstärktes Wachstum ermöglicht. Als Auslöser der durch *P. indica* induzierten Wachstumseffekte werden vom Pilz exudierte Hormone und Effektoren diskutiert. Zu klären bleibt, welche Stoffe explizit zwischen *P. indica* und seinem Wirt ausgetauscht werden, wie das Zusammenspiel mehrerer Faktoren die beobachteten morphologischen Veränderungen und Wachstumseffekte induziert und wie sich ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Pflanze und Pilz einstellt, um eine zumindest kommensale Interaktion zu ermöglichen.

4.2 *P. indica*-INDUZIERTES SYSTEMISCHE RESISTENZ

Viele nützliche Bodenmikroorganismen wie Rhizobakterien und Mykorrhiza können sich auf Pflanzen positiv auswirken, u. a. indem sie eine Breitbandresistenz gegen mikrobielle Pflanzenpathogene und Insekten vermitteln (Übersicht in VAN WEES et al., 2008). Auch eine Besiedlung der Wurzeln durch *P. indica* kann eine verstärkte lokale als auch systemische Pathogenresistenz bedingen (SERFLING et al., 2007; STEIN et al., 2008; WALLER et al., 2005). An induzierten Resistenzmechanismen beteiligte Signalwege und molekulare Mechanismen wurden bisher vor allem in der Modellpflanze Arabidopsis untersucht. Daher steht dem großen Datensatz bezüglich induzierter Resistenz in dikotylen Pflanzen ein nur limitiertes Wissen aus Monokotylen gegenüber. Jedoch wurden sowohl SAR oder zumindest SAR-ähnliche Reaktionen (JØRGENSEN et al., 1998; SMITH & MÉTRAUX, 1991) als auch ISR und *Priming* (z. B. DE VLEESSCHAUWER et al., 2006; 2008; KRISHNAMURTHY & GNANAMANICKAM, 1997; 1998) bereits in monokotylen Pflanzen beschrieben, wobei sich viele, wenn auch nicht alle Erkenntnisse mit denen aus dikotylen Pflanzen decken (KOGEL & LANGEN, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher die molekularen Grundlagen der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz gegen biotrophe Echte Mehltäupilze nicht nur in der im Fokus stehenden Gerste, sondern auch in Arabidopsis analysiert (vgl. Kap. 3.2ff). Die während dieser Analysen erhaltenen Resultate werden zunächst für die beiden untersuchten Pflanzen getrennt diskutiert (Kap. 4.2.1 und 4.2.2). Anschließend erfolgt eine vergleichende Zusammenstellung und eine Diskussion dieser Ergebnisse unter Bezugnahme auf die in Kapitel 4.1 aus den Wachstumsstudien gezogenen Schlussfolgerungen (Kap. 4.2.3). Abschließend werden mögliche *P. indica*-spezifische Auslöser der induzierten Resistenz angesprochen (Kap. 4.2.4). Auf die enge Verbindung von *P. indica* mit dem ebenfalls Resistenz induzierenden α -Proteobakterium *Rhizobium radiobacter* (SHARMA et al., 2008) wird hier nicht gesondert eingegangen, da die Funktion dieser Assoziation und die Rolle die jedem Partner spezifisch während der Symbiose mit Pflanzen zukommt bisher nicht vollständig geklärt ist.

4.2.1 *P. indica*-INDUZIERTES SYSTEMISCHE RESISTENZ IN GERSTE

P. indica-besiedelte Gerste zeigt systemisch eine erhöhte Resistenz gegen den Echten Gerstenmehltau *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*). Diese äußert sich in einer verminderten Anzahl kompatibler *Bgh*-Interaktionen aufgrund einer erhöhten Anzahl effektiver Papillen sowie vermehrt auftretenden HR-Reaktionen in attackierten Epidermiszellen (WALLER et al., 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen

Grundlagen dieser erhöhten Resistenz, u. a. durch eine Analyse des Blatttranskriptoms zu verschiedenen Zeitpunkten nach Mehltauinokulation, näher charakterisiert (Kap. 3.2f). In der nun folgenden Diskussion wird hierbei nur exemplarisch auf bestimmte, in dieser Transkriptomanalyse identifizierte Mehltau- und *P. indica*-regulierte Gene eingegangen. Stattdessen ist der Fokus auf grundlegende und sich aus dem Gesamtmuster ergebende Resultate gesetzt. Es sei jedoch angemerkt, dass vor allem die identifizierten *Bgh*-regulierten Gene zusätzliche, interessante Einblicke in die Interaktion zwischen *Bgh* und Gerste ermöglichen und die Möglichkeit bieten, auf der Pflanzenseite an der Etablierung dieses Pathogens beteiligte molekulare Komponenten in weiterführenden Studien genauer zu analysieren.

Durch *P. indica* induzierte systemische Resistenz in Gerste beruht nicht auf konstitutiven Veränderungen der Genexpression vor Pathogenstress

Der Vergleich des Blatttranskriptoms durch *P. indica* kolonisierter und nicht kolonisierter Gerstenpflanzen ergab, dass die Besiedlung durch den Endophyten keine Veränderungen auf der Ebene der Genexpression bewirkt, die sich über einen längeren Zeitraum konstitutiv beobachten lassen. Dieses Resultat zeigte sich in der mehr als 22.000 „Gene“ (Def. siehe Kap. 3.2) umfassenden Transkriptomanalyse mit dem Affymetrix Barley1 GeneChip[®]. In dieser Analyse konnten ohne Pathogenstress nur transient durch *P. indica* regulierte Gene identifiziert werden, d. h., diese wurden nur zu einem bestimmten, nicht jedoch zu weiteren untersuchten Zeitpunkten nach der Kolonisierung differenziell expriert (vgl. Tabelle 7.2-1 im Anhang). Die Daten sprechen somit nicht dafür, dass durch die Besiedlung von Gerstenwurzeln mit dem Endophyten Gene konstitutiv über einen längeren Zeitraum systemisch beeinflusst werden. Auch in zusätzlich durchgeführten quantitativen Real-Time PCR-Analysen konnte keine systemische Akkumulation z. B. SA-, JA-, ET- oder weiterer, pathogenresponsiver Gene gefunden werden, weder drei Wochen noch in den ersten drei Tagen nach Inokulation der Wurzeln mit *P. indica* (vgl. Kap. 3.2f und nicht gezeigte Daten). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Resultate bestätigen und erweitern somit früherer Ergebnisse, in denen ebenfalls keine systemische Beeinflussung einzelner JA- oder SA-responsiver Gene durch *P. indica* gefunden werden konnte (WALLER et al., 2005). Die erhöhte Mehltaresistenz durch *P. indica* besiedelter Gerstenpflanzen ist somit nicht mit durchgehend detektierbaren Veränderungen in der Genexpression oder der bereits vor Pathogenstress verstärkten Expression abwehrassoziiierter Gene verbunden. Eine Mikroarrayanalyse der durch das Bakterium *P. fluorescens* WCS417r systemisch

induzierten Resistenz (ISR) zeigte ein ähnliches Bild in *Arabidopsis* (VERHAGEN et al., 2004). In diesem Fall war die beobachtete erhöhte Resistenz ebenfalls nicht mit einer zu mehreren Untersuchungszeitpunkten (hier 2) konsistent veränderten Genexpression ohne Pathogeninokulation assoziiert. In einer Mikroarrayanalyse von WANG und Kollegen (2005b) wurden dagegen 95 bzw. 105 aufgrund der Besiedlung von *Arabidopsis* mit *P. fluorescens* FPT9601-T5 systemisch induzierte bzw. reprimierte Gene identifiziert. In dieser Studie wurde jedoch nur ein Zeitpunkt nach Inokulation betrachtet. Möglicherweise werden diese Gene somit zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt der Pflanze oder zu einer bestimmten Tageszeit durch die Besiedlung mit den Rhizobakterien beeinflusst. Ebenso werden die durch *P. indica* zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Kolonisierung differenziell regulierten Gene möglicherweise bei der Entwicklung der Pflanze bzw. des Blattes eine Rolle spielen, ohne direkt mit Pathogenabwehr in Verbindung zu stehen. Bei Vorliegen der gesamten genomischen Sequenz der Promotorregion dieser Gene wäre es möglich, den Kandidatengenomen gemeinsame Promotormotive zu identifizieren und auf diesem Weg Transkriptionsfaktoren zu isolieren, die durch *P. indica* beeinflusst werden. Als Ausgangspunkt könnte hierbei ein von WALLER und Kollegen (2008) beschriebenes *HSP70* dienen. Zwar wurde dieses nicht unter den stringenten Selektionskriterien der hier durchgeführten Arrayanalysen als *P. indica*-reguliert klassifiziert. Es zeigte jedoch insgesamt betrachtet eine leicht erhöhte Expression in durch *P. indica* oder verwandten Sebacinales besiedelten Pflanzen (WALLER et al., 2008).

***P. indica* induziert systemisch eine schnellere und stärkere Abwehrreaktion bei Pathogenstress**

Im Gegensatz zum relativ milden und stark zeitabhängigen systemischen Einfluss von *P. indica*, führte die Inokulation von Gerstenblättern mit Mehltau (*Bgh*) lokal zu einer stark differenziellen Genexpression. Dieses Bild zeigte sich sowohl in durch *P. indica* kolonisierten als auch nicht kolonisierten Pflanzen (Kontrollen). Vor allem zum Zeitpunkt der Penetration (12 hai), aber auch noch 24 und 96 Stunden nach Inokulation wurden durch den Pathogenbefall starke transkriptionelle Veränderungen induziert. Der Vergleich zwischen Kontrollen und *P. indica*-besiedelten Pflanzen zeigte hierbei eine Übereinstimmung der zu den verschiedenen Zeitpunkten durch *Bgh*-regulierten Gene von ca. 70 % (vgl. Kap. 3.2.1). Eine Erklärung für diese hohe Überlappung mag darin zu suchen sein, dass eine Kolonisierung der Wurzeln durch *P. indica* keine absolute, sondern nur eine erhöhte *Bgh*-Resistenz bedingt (WALLER et al., 2005). Lokal und systemisch durch

kompatible Mehltauinteraktionen ausgelöste Veränderungen finden sich daher, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, in beiden Varianten. Kongruent hierzu zeigte ein direkter Vergleich des Blatttranskriptoms zwischen Kontrollen und durch *P. indica* kolonisierten Pflanzen nach *Bgh*-Inokulation vor allem quantitative Unterschiede (vgl. Tabelle 3.2-3 und 3.2-4).

Ein Teil dieser beobachteten, quantitativen Unterschiede in der Genexpression beruht auf einer stärkeren und schnelleren Reaktion der mit dem Endophyten kolonisierten Pflanzen auf das Pathogen (vgl. Kap. 3.2.2 und 3.3.1f). Dieses Phänomen einer verstärkten Abwehrreaktion nach Stressstimulus wird auch als „Sensibilisierung“, „*Priming*“ oder „Potenzierung“ bezeichnet (CONRATH et al., 2002; 2006). Vor allem die durch *Bgh*-induzierten Gene *PR-1b*, *PR-2* und *PR-5* sowie ein cytosolisches *HSP70*-Homolog zeigten während der hier durchgeführten Studien in *P. indica*-besiedelten Pflanzen eine stärkere und schnellere Akkumulation (vgl. Abb. 3.3-1). Ein ähnliches Bild ergab sich auch für den Serin-Proteinaseinhibitor *BCI-7* (*Barley Chemically Induced-7*) und für das Hitzeschockprotein *HSP17.9* (vgl. Abb. 3.3-2), die ebenfalls eine stärkere Expression in kolonisierten Pflanzen zum Zeitpunkt der *Bgh*-Penetration (10-12 hai) aufwiesen.

Der protektive Effekt dieser stärker exprimierten Gene könnte zumindest im Fall der *PR*-Gene auf einer direkten antagonistischen Wirkung der entsprechenden Proteine auf das Pathogen beruhen. So wird *PR-1b* als auch basischen *PR-5*-Isoformen eine direkte antimikrobielle Wirkung zugesprochen (HEJGAARD et al., 1991; RAUSCHER et al., 1999). Für *PR-1* konnte zudem eine direkte Beteiligung an einer erhöhten *Bgh*-Penetrationsresistenz gezeigt werden (SCHULTHEISS et al., 2003b). Das durch *P. indica* verstärkt exprimierte *PR-2*, eine β -1,3-Endoglucosidase, konnte durch Sequenzvergleiche der Isoformgruppe GII zugewiesen werden und ist vermutlich extrazellulär lokalisiert (ROULIN et al., 1997; XU et al., 1992). Dieses könnte durch die Hydrolyse verzweigter (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)- β -Glucane, einer weit verbreiteten Komponente pilzlicher Zellwände, vor allem in Kombination mit Chitinasen zur *Bgh*-Resistenz beitragen (LEAH et al., 1991; MAUCH et al., 1988). Abgesehen von den einzelnen Effekten ausgesuchter *PR*-Gene werden insgesamt betrachtet jedoch vor allem die synergistischen Effekte von diesen untereinander und mit weiteren antimikrobiell wirkenden Faktoren, sowie die Geschwindigkeit der Expression für erhöhte Resistenzeffekte verantwortlich gemacht (HÜCKELHOVEN et al., 2007). Hierzu passend konnte auch bei einem Vergleich von resistenten zu suszeptiblen Gerstenlinien nach Befall mit *Rhynchosporium secalis* eine stärkere und

schnellere Expression der *PR-2* Isoformen GI und GII in den resistenteren Linien gezeigt werden (ROULIN et al., 1997).

Den stärker exprimierten Hitzeschockproteinen HSP70 und HSP17.9 könnte während der durch *P. indica* induzierten Abwehr eine Funktion bei der korrekten Faltung neu synthetisierter Abwehrproteine und bei der Aufrechterhaltung des Zellgleichgewichts zukommen. Derartige Funktionen werden z. B. für ein HSP70 aus Tomate nach Inokulation mit einem avirulenten Stamm von *Ralstonia solanacearum* diskutiert (BYTH et al., 2001). Auch während der *Mla13*-vermittelten, rassenspezifischen Resistenz gegen Mehltau in Gerste konnte Hitzeschockproteinen, hier HSP90-Homologen, eine Rolle zugewiesen werden (HEIN et al., 2005). Andererseits wurden zwei weitere *HSP70* als spezifisch in mit *Bgh* infizierten, nicht resistenten Zellen induziert klassifiziert (GJETTING et al., 2007). Hierdurch kann den dazugehörigen Proteinen eine Funktion während kompatibler Reaktionen zugeschrieben werden. So könnten diese an der Aufrechterhaltung der Zellstabilität beteiligt sein, um eine, dem Pilz die Nahrungsgrundlage entziehende, Zelltodreaktion zu verhindern. Die Sequenzen der beiden *HSP70* zeigen jedoch nur eine sehr geringe Sequenzhomologie von 5 % auf Nukleinsäureebene zu dem durch *P. indica* regulierten Homolog.

Das in *P. indica*-besiedelten Pflanzen nach *Bgh*-Inokulation stärker exprimierte *BCI-7* ist ein Serin-Proteinaseinhibitorhomolog. Der Einfluss von *Bgh* auf die Expression dieses Gens in den nicht durch *P. indica* besiedelten Pflanzen war nicht über alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche und Zeitpunkte konsistent. Insgesamt betrachtet konnte jedoch eine transiente Induktion des Gens durch *Bgh* 10 bis 12 h nach Inokulation beobachtet werden. Dies steht zunächst im Gegensatz zu Veröffentlichungen von BEßER et al., 2000 bzw. BEßER, 2001. Hier wurde von einer eher verringerten Expression des *BCI-7* nach Inokulation mit *Bgh* berichtet. Insgesamt betrachtet implizieren die Resultate somit eine nur sehr transiente Induktion und möglicherweise im Laufe der Entwicklung von *Bgh* durch pilzliche Suppressoren reprimierte Expression des Gens in den Kontrollpflanzen, während in *P. indica*-kolonisierten Pflanzen eine beständige und länger andauernde Induktion zu verzeichnen ist. Diese Vermutung wird von weiteren Studien unterstützt, in denen ebenfalls eine kurzzeitige Induktion von *BCI-7* in Gerste durch *Bgh* beobachtet werden konnte (VON RÜDEN, 2002). Zusätzlich korrelierten auch in dieser Studie eine länger anhaltende *BCI-7* Induktionen und eine erhöhte Resistenz der Pflanze gegen Mehltau. Ein direkter Einfluss von *BCI-7* auf die *Bgh*-Penetrationsrate konnte jedoch nicht festgestellt werden (VON RÜDEN, 2002), womit sich ein protektiver

Effekt möglicherweise erst zu späteren Interaktionszeitpunkten ergibt. So könnte die Entwicklung des Pathogens erschwert bzw. verlangsamt werden, indem die Verfügbarkeit von Aminosäuren durch eine gehemmte Proteolyse limitiert wird (RYAN, 1990).

Insgesamt betrachtet wird aus den hier diskutierten Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deutlich, dass die stärkere und schnellere Expression von Genen, sprich eine potenzierte Reaktion der durch *P. indica* besiedelten Gerstenpflanzen (*Priming*), zu der beobachteten erhöhten *Bgh*-Resistenz beitragen kann. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass in *P. indica*-besiedelter Gerste eine verstärkte apoplastische Alkalisierung im Blatt etwa 30 bis 60 Stunden nach Inokulation mit *Bgh* zu verzeichnen ist (FELLE et al., akzeptiert). Eine derartige, *geprimte* Änderung des pH-Wertes, wie sie sich auch beim Vergleich von resistenteren zu suszeptibleren Gerstenlinien zeigt, ist indikativ für eine erfolgreiche, vermutlich HR-assoziierte Abwehr (FELLE et al., 2004). *Priming* als Teil einer effektiven Abwehr ist auch aus weiteren Monokotylen bekannt. Durch den *P. fluorescens* Stamm WCS374r-vermittelte ISR in Reis basiert ebenfalls nicht auf einer direkten Aktivierung von basalen Resistenzmechanismen, sondern auf einer durch das Siderophor Pseudobactin-vermittelten, ET- und JA-abhängigen Potenzierung eines vielseitigen zellulären Abwehrprogrammes (u. a. Zellwandverstärkung, schnellere H₂O₂-Entwicklung; DE VLEESSCHAUWER et al., 2008). Des Weiteren führt eine Behandlung von Reis mit Vitamin B₁ (Thiamin) zu einer stärkeren Expression von *PR-1a*, *PR-10* und *PR-11* nach Inokulation mit *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* oder *Magnaporthe oryzae* (AHN et al., 2005). Auch eine Behandlung mit BTH bedingt eine schnellere Akkumulation von *PR-1* und *PR-10* bei Befall mit *M. oryzae* (DE VLEESSCHAUWER et al., 2008). Zugleich löst die Überexpression des *NPR1* aus Arabidopsis (*AtNPR1*) in Reis eine erhöhte Resistenz gegen pilzliche und bakterielle Pathogene aus, die mit einer verstärkten Expression SA-responsiver Gene einhergeht (QUILIS et al., 2008). In Weizen induziert die Überexpression von *AtNPR1* eine potenzierte *PR1*-Akkumulation nach BTH Behandlung oder Infektion mit *F. graminearum* (MAKANDER et al., 2006).

Analyse des Einflusses möglicher (In-) Kompatibilitätsfaktoren auf die Mehлтаuentwicklung

Neben schneller und stärker exprimierten Genen konnten in der Transkriptomanalyse Kandidaten identifiziert und durch quantitative Real-Time PCR bestätigt werden, die entweder eine geringere Induktion oder eine geringere oder stärkere Repression durch *Bgh* in *P. indica*-kolonisierten Pflanzen aufweisen (vgl. Abb. 3.2-2, Tabelle 3.2-4). Auch bei

diesen Kandidaten handelt es sich um potenzielle Kompatibilitäts- bzw. Resistenzfaktoren, deren genaue Funktion im Einzelnen und im Zusammenspiel noch untersucht werden muss und über diese Arbeit hinaus interessante Forschungsansätze bietet. Von zweien dieser Kandidaten, einem Glutaredoxin (Grx) und einem Protein bisher unbekannter Funktion, wurde der direkte Einfluss auf die *Bgh*-Penetrationsrate mittels TIGS untersucht (vgl. Kap. 3.3.3). Hierzu wurden Epidermiszellen von Gerstenblättern mit RNAi-Konstrukten der entsprechenden Sequenzen transformiert und die Anzahl kompatibler und inkompatibler *Bgh*-Interaktionen im Vergleich zu mit einem Kontrollkonstrukt transformierten Zellen bestimmt. Für keines der beiden RNAi-Konstrukte konnte jedoch ein Einfluss auf die Penetrationsrate festgestellt werden. Dies könnte darin begründet liegen, dass das alleinige Ausschalten eines Faktors für eine Erhöhung der Penetrationsrate nicht ausreichend ist. Vor allem im Falle von Grx könnten auch redundante Isoformen die Funktion des ausgeschalteten Gens übernommen haben. In höheren Landpflanzen sind bis zu 30 Grx-Isoformen bekannt, die sich drei verschiedenen Klassen zuordnen lassen (ROUHIER et al., 2008). Das hier untersuchte Grx gehört zur Gruppe der CC-Typ-Isoformen. Grx dieses Typus wurde bisher eine Beteiligung an der Blütenentwicklung aber auch bei der Regulation des SA/JA-Antagonismus zugesprochen (NDAMUKONG et al., 2007; XING et al., 2005). Diese Beobachtungen, zusammen mit dem eindeutig *Bgh*-reprimierten Expressionsmuster des hier untersuchten Grx vor allem in den nicht durch *P. indica* besiedelten Kontrollpflanzen (vgl. Abb. 3.3-5 A), lässt eine Beteiligung oder zumindest sekundäre Beeinflussung während der Mehltauentwicklung vermuten, auch wenn durch TIGS kein eindeutiger Einfluss festgestellt werden konnte. Ähnliches gilt für den zweiten mittels TIGS untersuchten Kandidaten, Contig23097_at, für den bisher keine Annotierung möglich war. Hier weist nicht nur die beobachtete transiente Induktion 12 Stunden nach *Bgh* Inokulation im Blatt (vgl. Abb. 3.3-3), sondern auch die während der Besiedlung von Gerstenwurzeln durch *P. indica* beobachtete Induktion vor allem zu frühen Interaktionszeitpunkten (3 dai, persönliche Mitteilung S. PFIFFL, P. SCHÄFER) auf eine generelle Beteiligung an Penetrations- und Besiedlungsprozessen hin.

Die Rolle von NPR1 bei der *P. indica*-induzierten Resistenz in Gerste

Ein zentraler Regulator von und Vermittler zwischen verschiedenen Signalkaskaden in pflanzlichen Zellen ist das Regulatorprotein NPR1 (Nonexpressor of *PR*-Genes1). Es spielt sowohl bei der Signalweiterleitung während der SAR, der SA-induzierten Genexpression als auch während der ISR eine entscheidende Rolle. Zudem vermittelt es den

antagonistischen Effekt von SA auf JA (z. B. DONG, 2004; PIETERSE et al., 1998; SPOEL et al., 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob NPR1 auch an der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz beteiligt ist. Im Fall von Gerste wurde dazu die Fähigkeit von *P. indica* überprüft, in einer *NPR1*-RNAi-Gerstenlinie (*NPR1-knockdown*) ein verstärktes Wachstum und Resistenz zu induzieren (vgl. Kap. 3.3.4). Es zeigte sich, dass der durch *P. indica* induzierte Wachstumseffekt in der RNAi-Linie sich nicht wesentlich vom Effekt im Wildtyp unterschied. Im Bezug auf die Resistenzinduktion war dagegen im direkten Vergleich nur ein reduzierter Effekt in der RNAi-Linie zu detektieren. Dieser Unterschied impliziert eine Beteiligung von NPR1 während der durch *P. indica* induzierten Resistenz in Gerste, wogegen der Wachstumseffekt NPR1-unabhängig zu sein scheint.

Diese Vermutung ist kongruent zu den ebenfalls in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen mit Arabidopsis. Auch in dieser Pflanze spielt NPR1 bei der durch *P. indica* induzierten Resistenz eine entscheidende Rolle (vgl. diese Arbeit Kap. 3.4.1 und 4.2.4; STEIN et al., 2008). Diese Übereinstimmung verstärkt die Beobachtung, dass die Funktion von NPR1 in monokotylen und dikotylen Pflanzen zu großen Teilen konserviert ist (CHERN et al., 2001; 2005; YUAN et al., 2007), auch wenn sich bezüglich der Regulation Unterschiede finden lassen (KOGEL & LANGEN, 2005). Während in Arabidopsis der Verlust eines funktionalen NPR1-Proteins jedoch eine vollständige Blockade der systemisch durch *P. indica* induzierten Resistenz bedingt, zeigt sich in der *NPR1*-RNAi-Gerstenlinie immer noch eine gewisse, wenn auch verminderte Resistenzausprägung. Diese „Restresistenz“ könnte darin begründet liegen, dass die verwendete RNAi-Linie zwar eine um mehr als 60 % reduzierte *NPR1*-Transkriptmenge aufweist, jedoch keinen vollständigen „knockout“ darstellt (unpub. Daten G. LANGEN, V. BABAEIZAD). Möglicherweise sind jedoch auch NPR1-abhängige und -unabhängige Signalwege an der durch *P. indica* systemisch induzierten Resistenz beteiligt. Ähnliches ist z. B. von der SA-regulierten Genexpression aus Arabidopsis bekannt. Auch hier wird ein Teil der Gene über einen NPR1-abhängigen, ein anderer über einen NPR1-unabhängigen Weg induziert (BLANCO et al., 2009).

Schlussfolgerung: *Priming* bildet die Grundlage der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz in Gerste

Die hier diskutierten Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die durch *P. indica* induzierte systemische Resistenz in Gerste auf eine zumindest teilweise NPR1-abhängige Sensibilisierung der Pflanze zurückzuführen ist, die in einer verstärkten

und/oder schnelleren basalen Abwehr mündet. Die sich aus diesem *Priming*-Effekt ergebenden direkten und synergistischen Effekte können die makroskopisch beobachtete erhöhte *Bgh*-Resistenz durch eine verstärkte Papillen- und HR-basierte Abwehr erklären. So ist z. B. die Wirksamkeit von Papillen gegen *Bgh* in entscheidendem Maße von der Verknüpfungsgeschwindigkeit und der Stärke von Quervernetzungen in der Zellwand abhängig (ASSAAD et al., 2004; VON RÖPENACK et al., 1998). Gleichfalls geht auch die *mlo*-vermittelte Resistenz in dafür homozygoter Gerste mit einer im Vergleich zum Wildtyp schnelleren und stärkeren Akkumulation von H₂O₂, *PR*-Genen und Phytoalexinen einher (HÜCKELHOVEN et al., 1999; PETERHÄNSEL et al., 1997; STOLZENBURG et al., 1984; VON RÖPENACK et al., 1998). Die in der vorliegenden Arbeit im Detail nachgewiesene frühere und stärkere Expression mehrere Kandidatengene stellt somit einen wichtigen Bestandteil der durch *P. indica* vermittelten Resistenz gegen Mehltau dar.

4.2.2 *P. INDICA*-INDUZIERTES SYSTEMISCHES RESISTENZ IN ARABIDOPSIS

In Analogie zu den bekannten Ergebnissen aus Gerste (WALLER et al., 2005), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Fähigkeit von *P. indica* getestet, auch in *Arabidopsis* systemisch Resistenz gegen Echten Mehltau zu induzieren. Entsprechend wurde die Entwicklung eines zu *Arabidopsis* kompatiblen Mehltaus, hier: *Golovinomyces orontii*, auf Pflanzen mit und ohne Besiedlung durch den Endophyten vergleichend evaluiert. Dieser Vergleich zeigte, dass auf den Blättern durch *P. indica* besiedelter Pflanzen eine verringerte Anzahl an Konidiophoren pro Mehltaumyzel und eine geringere Anzahl neu gebildeter Mehltaukonidien pro Blattfrischgewicht nach Inokulation mit *G. orontii* gebildet werden (vgl. Kap. 3.4; STEIN et al., 2008). Ähnlich zu Gerste bedingt *P. indica* somit auch in der dikotylen *Arabidopsis* systemisch eine erhöhte Resistenz gegen ein biotrophes Blattpathogen. Dies spricht dafür, dass der Endophyte in mono- und dikotylen Pflanzen ähnliche Abwehrmechanismen induziert. Während in Gerste jedoch ein frühzeitiger Entwicklungsstopp von Mehltau vor oder kurz nach der Penetration beobachtet wurde (WALLER et al., 2005), löst *P. indica* in *Arabidopsis* eine verlangsamte und retardierte Entwicklung des Blattpathogens aus, was in einem Fitnessverlust resultiert (Post-Penetrationsresistenz).

JA-Signalwegkomponenten und NPR1 sind essenziell für die durch *P. indica* induzierte Resistenz in *Arabidopsis*

Eine Analyse verschiedener *Arabidopsis*mutanten zeigte, dass ähnlich wie im Wildtyp auch in den Salizylsäure (SA)-Mutanten *NahG* (fehlende SA-Akkumulation, GAFFNEY

et al., 1993) und *nonexpressor of PR Genes1-3* (*npr1-3*, GLAZEBROOK et al., 1996) durch *P. indica* Resistenz induziert werden kann. Im Gegensatz dazu wurde durch den Endophyten in *npr1-1* (CAO et al., 1994) sowie in den Jasmonat (JA)-Signalwegmutanten *jar1-1* (STASWICK et al., 1992) und *jin1* (Alias: *myc2*, BERGER et al., 1996) keine systemische Resistenz gegen *G. orontii* vermittelt (vgl. Kap. 3.4.1). Diese fehlende Resistenzinduktion liegt nicht in einer verminderten Kolonisierung der Mutanten durch *P. indica* begründet. So wurden weder *jar1-1* noch *jin1* schlechter, *npr1-1*, *npr1-3* und *NahG* sogar vergleichsweise besser besiedelt als der respektive Wildtyp (vgl. Kap. 3.5.1). Im Umkehrschluss impliziert dies zudem, dass eine mäßig erhöhte Kolonisierungsrate die durch *P. indica* induzierte Resistenz nicht beeinträchtigt, wie es teilweise für die durch den Endophyten induzierten Fitnesseffekte in *Arabidopsis* diskutiert wird (SHERAMETI et al., 2008b; VADASSERY et al., 2009b).

Die oben aufgeführten Resultate implizieren, dass der SA-Signalweg und die Expression SA-responsiver Gene an der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz in *Arabidopsis* nicht beteiligt sind. Dies geht zunächst aus der noch vorhandenen Resistenzinduktion in *NahG* hervor. In dieser Mutante wird die Akkumulation von SA durch die konstitutive Expression einer SA-Hydroxylase verhindert. Aufgrund dessen sind diese Pflanzen nicht mehr in der Lage SAR auszubilden und zeigen keine SA-induzierte Genexpression (DELANEY et al., 1994; GAFFNEY et al., 1993). Kongruent zu den Ergebnissen mit *NahG* induziert *P. indica* auch in *npr1-3* systemisch eine erhöhte Mehлтаuresistenz. In dieser Mutante ist die Kerntranslokation von NPR1, eine Grundvoraussetzung für die Expression bestimmter SA-responsiver Gene, durch eine Deletion am C-Terminus ausgeschaltet. Die cytosolische Funktion des Proteins ist dagegen noch weitgehend erhalten (GLAZEBROOK et al., 2003; KINKEMA et al., 2000; LEON-RYES et al., 2009; SPOEL et al., 2003). Im Gegensatz zu *npr1-3* zeigt sich in *npr1-1* keine durch *P. indica* induzierte Resistenz. Letztere Mutante weist eine Punktmutation in einer essenziellen *ankyrin-repeat* Domäne von NPR1 auf. Hierdurch wird sowohl die Expression SA-, aber auch Ethylen (ET)- und JA- abhängiger Gene beeinflusst (CAO et al., 1994; GLAZEBROOK et al., 2003). Zudem ist in *npr1-1* im Gegensatz zu *npr1-3* die im Cytosol stattfindende, antagonistische Wirkung von SA auf JA-Signalkaskaden inhibiert (LEYON-RYES et al., 2009; SPOEL et al., 2003). Während demnach in *npr1-3* vor allem die mit der Kernlokalisation des Proteins einhergehende Induktion SA-responsiver Gene beeinträchtigt ist, sind in *npr1-1* auch die cytosolischen Funktionen des Proteins nicht mehr vorhanden. Die Resistenzphänotypen von *NahG*, *npr1-3* und *npr1-1* zusammen betrachtet sind somit weder eine Akkumulation

von SA noch eine SA-induzierte Genexpression an der durch *P. indica* induzierten Resistenz beteiligt. Die cytosolische Funktion des Regulatorproteins NPR1 ist dagegen essenziell.

Die nicht verminderte Mehltauanfälligkeit von *jin1* und *jar1-1* weist zudem auf eine Beteiligung von Komponenten des JA-Signalweges an der Resistenzausprägung hin. JAR1-Mutanten zeigen neben der fehlenden *P. indica*-induzierten Resistenz einerseits eine reduzierte Sensibilität gegenüber JA und Methyljasmonat sowie eine verminderte Resistenz gegen den Bodenzpilz *Pythium irregulare*. Zudem kann in ihnen keine durch Rhizobakterien induzierte systemische Resistenz (ISR) ausgebildet werden (PIETERSE et al., 1998; STASWICK et al., 1992; 1998). Andererseits zeigt *jar1-1* eine dem Wildtyp ähnliche Suszeptibilität gegenüber virulenten *P. syringae* spp. und keine Sterilität der männlichen Fortpflanzungsorgane, zwei Eigenschaften, die ebenfalls durch JA-Signalwegkomponenten reguliert werden (KLOEK et al., 2001; SANDERS et al., 2000; STINTZI & BROWSE, 2000). Hieraus ergibt sich, dass JAR1 nicht alle Komponenten des JA-Signalweges beeinflusst. Biochemisch katalysiert dieses Protein die Konjugation von JA mit Aminosäuren, vorzugsweise Isoleucin (JA-Ile; STASWICK & TIRYAKI, 2004). JA-Ile spielt eine zentrale Rolle bei der Bindung von COI1 an JAZ1, zwei ausschlaggebenden Elementen im JA-Signalweg (CHINI et al., 2007; THINES et al., 2007). Eine Beteiligung von JAR1 an der durch *P. indica* vermittelten Resistenz beruht somit auf der Bildung von JA-Konjugaten die bei vielen, wenn auch nicht allen JA-vermittelten Antworten während der Signaltransduktion beteiligt sind.

JIN1 (AtMYC2) ist ein Transkriptionsfaktor der unterhalb von COI1 und MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-aktivierten Signalkaskaden im JA-Signalweg ansetzt und zwei distinkte Klassen an JA-responsiven Genen beeinflusst (LORENZO et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2007). So agiert JIN1 u. a. als positiver Regulator der JA-responsiven Gene *VSP* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN*) oder *LOX2* (*LIPOXYGENASE2*). Synergistisch durch JA und ET über den Transkriptionsfaktor ERF1 regulierte Gene wie *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN1.2*) werden dagegen reprimiert (LORENZO et al., 2003; 2004; LORENZO & SOLANO, 2005). Zudem konnte kürzlich, wie schon für JAR1 (siehe oben) und NPR1 (PIETERSE et al., 1998), eine Beteiligung von JIN1 an der *P. fluorescens* WCS417r vermittelten ISR, die mit einer Potenzierung JA-regulierter Gene einhergeht, gezeigt werden (POZO et al., 2008). Die fehlende *P. indica*-induzierte Resistenz in *jin1* weist somit auf die Beteiligung eines bestimmten Sets an JA-induzierten Genen bei der Resistenzausbildung hin.

Neben den SA- und JA- Mutanten wurden auch die ET-unsensiblen Mutanten *ein2-1* (GUZMAN & ECKER, 1990) und *etr1-3* (BLEECKER et al., 1998) in Bezug auf die durch *P. indica* systemisch induzierte Resistenz analysiert. Im Mittel zeigten diese hierbei nur eine tendenzielle, in Einzelexperimenten jedoch signifikante Resistenzinduktion durch den Endophyten (vgl. Kap. 3.4.1). Im Laufe der hier durchgeführten Experimente kristallisierte sich heraus, dass diese inkonsistenten Ergebnisse vermutlich mit dem Einfluss von Ethylen auf die Besiedlung der Wurzeln durch *P. indica* einhergehen (vgl. Kap. 3.5 und 4.3). Aufgrund dieser Abhängigkeit und der sich daraus ergebenden Komplikationen, wurden Ethylenmutanten nicht weiter bezüglich der induzierten Resistenz getestet. Die vorliegenden Ergebnisse deuten jedoch auf eine fehlende Beteiligung von Ethylen bei der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz hin, ähnlich zu der durch *P. fluorescens* CHA0 vermittelten ISR, die ebenfalls auf JA- nicht jedoch auf ET-Signalwegen beruht (IAVICOLI et al., 2003).

Zusammenfassend impliziert die durchgeführte Analyse verschiedener Mutanten, dass bei der durch *P. indica* induzierten Resistenz in Arabidopsis JA-Konjugate und JA-regulierte Transkriptionsfaktoren sowie die cytosolische Funktion von NPR1, nicht jedoch SA- und ET-abhängige Signalwegkomponenten beteiligt sind. Ähnlich zu *P. indica* induziert auch *Trichoderma asperellum* eine JA- und NPR1-abhängige, verstärkte Abwehr gegen das bakterielle Pathogen *P. syringae*, den biotrophen Oomyceten *Hyaloperonospora parasitica* und den nekrotrophen Pilz *Plectosphaerella cucumerina* (SEGARRA et al., 2009). Durch beide Pilze induzierte Resistenzen ähneln somit bezüglich der beteiligten Signalwege der durch bestimmte *P. fluorescens* spp. ausgelösten ISR. Diese beruht ebenfalls oftmals auf SA-unabhängigen, jedoch von JA- und teilweise ET-abhängigen Signalwegen sowie auf NPR1 (Übersicht in VAN WEES et al., 2008).

***P. indica* induziert in Arabidopsis eine verstärkte Expression JA-responsiver Gene nach Pathogeninokulation**

Neben den oben aufgeführten Ergebnissen aus der Analyse verschiedener Signalwegmutanten, zeigt auch das ermittelte Expressionsmusters ausgewählter pathogenresponsiver Gene in *P. indica*-besiedelten Arabidopsispflanzen Ähnlichkeiten zu ISR. Ohne Stressfaktor, allein durch die Besiedlung der Wurzeln mit dem Endophyten, konnten keine erhöhten mRNA-Konzentrationen für SA-, JA oder ET-indikative Gene gefunden werden. Damit ergaben sich keine Hinweise auf erhöhte Konzentrationen dieser Hormone oder auf eine generelle Stressantwort in Blättern durch *P. indica* besiedelter Pflanzen (vgl. Abb.

3.4-2). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit Ergebnissen zu ISR, z. B. ausgelöst durch apathogene Rhizobakterien, und kongruent zu den Resultaten bezüglich der durch *P. indica* induzierten Resistenz in Gerste. Auch in diesen Fällen konnten keine oder im Vergleich zu pathogeninduzierter SAR nur relativ milde systemische Veränderungen durch die Besiedlung mit dem Resistenzinduzierer detektiert werden (diese Arbeit Kap. 4.2.1; ALFANO et al., 2007; LIU et al., 2007; VERHAGEN et al., 2004; WANG et al., 2005b).

Nach Pathogeninokulation wurde im Zusammenhang mit ISR dagegen oftmals von einer verstärkten Expression JA-regulierter Gene berichtet (POZO et al., 2008; SEGARRA et al., 2009; VAN WEES et al., 1999; VERHAGEN et al., 2004). VAN WEES und Kollegen (1999) zeigten, dass während der Rhizobakterien-vermittelten ISR eine potenzierte Expression des vegetativen Speicherproteins *VSP*, nicht jedoch von *PDF1.2* (ein Pflanzendefensin) oder *LOX2* (Lipoxygenase beteiligt an der JA-Synthese) zu beobachten ist. Auch in *P. indica*-besiedelten Arabidopsispflanzen konnte, im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit, drei Tage nach Inokulation mit Mehltau eine verstärkte Expression von *VSP1*, nicht jedoch von *LOX2*, *PDF1.2* oder *ERF1* beobachtet werden (vgl. Abb. 3.4-2). Aufgrund der Tatsache, dass *VSP* über JIN1 rein durch JA, *PDF1.2* und *ERF1* jedoch synergistisch durch JA und ET induziert werden (LORENZO et al., 2003; 2004; 2005; PENNINCKX et al., 1998), stützt dieses Ergebnis somit die Resultate aus der Mutantenanalyse, dass JA-, aber nicht ET-Signalwegkomponenten an der durch *P. indica* vermittelten Resistenz gegen *G. orontii* beteiligt sind. Auch *LOX2* wird durch MeJA induziert (BELL & MULLET, 1993; HEITZ et al., 1997; SEGARRA et al., 2009). Die fehlende stärkere Expression dieses Gens in den durch *P. indica* besiedelten Pflanzen deutet somit darauf hin, dass nicht eine erhöhte JA-Synthese, sondern eine Sensibilisierung gegenüber diesem Hormon bei der durch den Endophyten vermittelten Resistenz eine Rolle spielt. Ähnlich wurde auch in der durch Rhizobakterien vermittelten ISR eine erhöhte Sensibilität für JA und ET, nicht jedoch ein Anstieg in der Produktion dieser Hormone verzeichnet (PIETERSE et al., 2000).

Die SA-responsiven Gene *PR-1* und *PR-5* (CAO et al., 1994) zeigten im Einklang mit Ergebnissen von REUBER und Kollegen (1998) eine Induktion durch *G. orontii* vor allem sechs Tage nach Inokulation. In mit *P. indica* kolonisierten Pflanzen konnte hier im Vergleich zu Kontrollpflanzen kein Unterschied festgestellt werden. Dies bestätigt wiederum die fehlende Beteiligung einer verstärkten SA-assozierten Abwehr an der *P. indica*-induzierten systemischen Resistenz in Arabidopsis.

Schlussfolgerung: *P. indica*-induzierte Resistenz in *Arabidopsis* zeigt Parallelen zu ISR

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass nicht nur in Gerste und Weizen (SERFLING et al., 2007; WALLER et al., 2005), sondern auch in *Arabidopsis* durch eine Besiedlung mit *P. indica* eine systemische Resistenz gegen Mehltäupilze induziert werden kann (Kap. 3.4; STEIN et al., 2008). Die genauere Analyse offenbarte hierbei starke Parallelen zu ISR, die durch fluoreszierende *Pseudomonas* spp. oder den Bodenpilz *Trichoderma asperellum* vermittelt wird. Wie in diesen Fällen, beruht die durch *P. indica* induzierte Resistenz in *Arabidopsis* auf JA-Signalwegkomponenten sowie der cytosolischen Funktion von NPR1 und geht mit einer verstärkten Expression JA-regulierter Gene nach Pathogen-inokulation einher. SA- oder ET-basierte Mechanismen scheinen dagegen keine oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Gleichzeitig finden sich ohne Pathogenstress - wie bei ISR - keine Hinweise auf durch die Besiedlung mit dem Endophyten differenziell regulierte, mit Abwehr oder Stress assoziierte Gene. Auch gibt es keine Hinweise auf konstitutiv erhöhte SA-, JA oder ET-Konzentrationen. Vielmehr implizieren die Resultate, dass durch *P. indica* besiedelte Pflanzen möglicherweise eine erhöhte Sensibilität gegenüber JA aufweisen.

4.2.3 ISR-ÄHNLICHE MECHANISMEN UND PRIMING ALS GRUNDLAGE DER DURCH *P. INDICA* INDUZIERTEN RESISTENZ

Sowohl für Rhizobakterien als auch für Mykorrhiza und weitere nützliche Pilze wurde gezeigt, dass sie die Abwehrkapazität von Pflanzen durch *Priming*, d. h. durch eine verstärkte Abwehrreaktion auf einen Stressstimulus, erhöhen (z. B. VAN WEES et al., 2008). Neben ISR können zudem auch SAR oder cIR (chemisch induzierte Resistenz) mit *Priming* assoziiert sein und in Abhängigkeit vom *Priming*- als auch vom auslösenden Stressstimulus sind JA- und/oder ET-Signalwegkomponenten, NPR1, SA oder ABA bei der Ausprägung dieses Phänomen beteiligt (Übersicht in GOELLNER & CONRATH, 2008). *Priming* ist somit ein genereller Mechanismus der induzierten Resistenz. Auf Grundlage der in den vorherigen Abschnitten diskutierten Ergebnisse, kann nun auch *P. indica* zu der Riege ISR und *Priming* in monokotylen (Gerste) und dikotylen Pflanzen (*Arabidopsis*) induzierender Organismen gezählt werden.

***P. indica*-induzierte Resistenz in Arabidopsis und Gerste zeigt grundlegende Übereinstimmungen**

Die Ergebnisse bezüglich der durch *P. indica* induzierten Resistenz in Gerste und Arabidopsis weisen in mindestens drei Bereichen Übereinstimmungen auf. Zum einen zeigte weder die Transkriptomanalyse in Gerste noch die Analyse ausgewählter Gene in Arabidopsis, dass allein durch eine Besiedlung mit dem Endophyten an der Abwehr beteiligte Gene in den Blättern der Pflanzen konstitutiv erhöht werden. Auch fanden sich in keinem der beiden Systeme Hinweise auf systemisch erhöhte ET-, JA-, oder SA-Konzentrationen, die durch die Induktion der entsprechenden responsiven Gene detektierbar gewesen wären. Zweitens konnte nach Inokulation mit Mehltau in beiden Pflanzenarten eine potenzierte Induktion von Genen (*Priming*-Effekt) in durch *P. indica* besiedelten Pflanzen und drittens eine Beteiligung des zentralen Regulators NPR1 an der induzierten Resistenz gezeigt werden. Zumindest in Arabidopsis spielen zudem, ähnlich wie bei der durch bestimmte Rhizobakterien induzierten Resistenz (ISR), Komponenten des JA-Signalweges eine entscheidende Rolle. Welche Signalwege bei der durch *P. indica* induzierten Resistenz in Gerste beteiligt sind, werden dagegen weiterführende Experimente zeigen müssen. Durch einen Analogieschluss zu den Ergebnissen aus Arabidopsis kann jedoch auch hier eine mögliche Beteiligung von JA-regulierten Signalkaskaden angenommen werden. Für diese Annahme spricht, dass *PR-1* und *BCI-7*, zwei der hier identifizierten Gene, die eine erhöhte Induktion nach Inokulation mit *Bgh* in *P. indica*-kolonisierten Gerstenpflanzen zeigen, u. a. durch JA induziert werden (BEßER et al., 2000; 2001). Auch in Reis können Homologe der *PR*-Gene *PR-1*, *PR-2* und *PR-5* nicht nur durch Pathogene und zum Teil durch SA-Analoga, sondern auch durch JA induziert werden (SCHWEIZER et al., 1997).

Festhalten lässt sich somit, dass in beiden Pflanzen, der monokotylen Gerste und der dikotylen Arabidopsis, ISR-ähnliche Mechanismen und *Priming* die Grundlagen der durch *P. indica* induzierten Resistenz stellen und die dahinter stehenden molekularen Mechanismen Parallelen aufweisen. Dieses Resultat bekräftigt die Vermutung, dass zentrale Abwehrkomponenten in SAR und ISR, wie z. B. NPR1, zwischen den beiden Hauptgruppen der Angiospermen konserviert sind (CHERN et al., 2001; 2005; KOGEL & LANGEN, 2005; YUAN et al., 2007).

Kosten und Nutzen von *Priming*: verstärktes Wachstum und erhöhte Resistenz

Ressourcen, die einer Pflanze zur Verfügung stehen, müssen von dieser zwischen verschiedenen, kostenträchtigen biologischen Prozessen wie Reproduktion, Abwehr und Wachstum aufgeteilt werden. So gehen aktive Abwehrmechanismen gegen ein bestimmtes Pathogen mit direkten (z. B. für die Bereitstellung von Abwehrkomponenten) sowie indirekten Kosten (z. B. erhöhte Anfälligkeit gegen Pathogene mit anderem Lebensstil) einher (KLIEBENSTEIN & ROWE, 2008). Hieraus ergibt sich die Frage, wie durch *P. indica* besiedelte Pflanzen, trotz einer erhöhten lokalen und systemischen Resistenz gegen so unterschiedliche Pathogene wie *Fusarium* und Mehltau, gleichzeitig ein verstärktes Wachstum aufweisen können (DESHMUKH & KOGEL, 2007; WALLER et al., 2005). Eine mögliche Erklärung ist, dass *Priming*, nicht eine konstitutiv aktive Abwehr die Grundlage der durch *P. indica* induzierten Resistenz in den beiden hier analysierten Systemen darstellt. VAN HULTEN und Kollegen (2006) konnten nachweisen, dass unter stressfreien Bedingungen *Priming* durch geringe BABA-Dosen in Arabidopsis, im Vergleich zur direkten Resistenzinduktion durch hohe BABA-Dosen oder BTH, nur zu einem sehr geringen Wachstumsunterschied und keiner verringerten Samenmenge führt. Unter Pathogenstress ist sogar ein Fitnesszuwachs zu verzeichnen. Zudem ermöglicht *Priming* der Pflanze jeweils für das attackierende Pathogen adäquate Resistenzmechanismen zu aktivieren (JAKAB et al., 2001; TON et al., 2005), ohne durch die konstitutive Expression eines bestimmten Abwehrweges Suszeptibilität gegen andersartige Pathogene zu induzieren. Aus ökologischer Sicht bietet der *geprimte* Zustand somit eine Möglichkeit, das *Trade-off*-Dilemma zwischen den Kosten und dem Nutzen einer konstitutiv erhöhten Abwehr zu lösen. Die trotz *Priming* immer noch entstehenden, jedoch relativ geringen Kosten während der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz könnten durch positive Effekte des Pilzes, z. B. auf die Photosyntheseleistung oder die Nährstoff- und/oder Wasserversorgung (vgl. Kap. 4.1), mehr als ausgeglichen werden. Somit wäre es der Pflanze möglich, Ressourcen sowohl für eine verstärkte Resistenz als auch für ein verstärktes Wachstum aufzubringen.

4.2.4 ETABLIERUNG DER SYSTEMISCH DURCH *P. INDICA* INDUZIERTEN RESISTENZ: LOKALE UND SYSTEMISCHE AUSLÖSER

Über die direkten Auslöser der durch *P. indica* induzierten Resistenz und die bei der Signalweiterleitung von den Wurzeln in den Spross beteiligten Komponenten ist bisher wenig bekannt. Zudem wurden alle bisherigen Untersuchungen bezüglich der Resistenzinduktion zwei bis drei Wochen nach Inokulation der Wurzeln mit dem Endophyten

durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob sich bereits zu früheren Interaktionsstadien Resistenzeffekte zeigen lassen und welche Faktoren als Resistenzvermittler eine Rolle spielen könnten (vgl. Kap. 3.3.6). In Versuchen diesbezüglich zeigte sich, dass neben Bion als positiver Kontrolle auch lebende und durch autoklavieren abgetötete Chlamydosporen von *P. indica* - zumindest in Gerste - eine systemische Resistenzinduktion gegen Mehltau bereits drei Tagen nach Inokulation vermitteln können. Abgetötete Fusariumsporen als auch ein getestetes Chitinoktamer zeigten dagegen keinen resistenzinduzierenden Effekt (vgl. Abb. 3.3-9). Zusätzlich induzierte auch autoklaviertes *P. indica*-Myzel (vgl. Abb. 3.3-8), in diesem Fall sogar noch drei Wochen nach Inokulation, eine verstärkte, systemische Resistenz gegen *Bgh*. Diese Ergebnisse implizieren, dass nicht die Besiedlung der Wurzeln an sich, sondern vom Pilz abgegebene Effektoren oder Hormone bzw. sich innerhalb von oder an Myzel und Chlamydosporen befindliche MAMPs für die Induktion der systemischen Resistenz verantwortlich sind.

Pilzexudate und MAMPs als lokale Auslöser der durch *P. indica* induzierten Resistenz

Eine mögliche Beteiligung veränderter Hormongleichgewichte an der systemischen Resistenzausprägung ergibt sich aus der Beobachtung, dass u. a. Auxin und Cytokinin durch *P. indica* freigesetzt und möglicherweise eine erhöhte Synthese dieser und weiterer Hormone wie Ethylen durch den Pilz in der Pflanze induziert wird (KHATABI et al., eingereicht; SCHÄFER et al., 2009; VADASSERY et al., 2008). Gleichzeitig wird Hormonen wie Auxin, Cytokinin oder Ethylen eine Beteiligung bei der Modulierung von Abwehrprozessen zugesprochen. Hierbei hängt es jedoch von der Art des Pathogens als auch weiteren Komponenten ab, ob die Resistenz gegen ein Pathogen verstärkt oder vermindert wird (Übersicht in BARI & JONES, 2008). Für die durch *P. indica* induzierte Resistenz bedeutet dies, dass möglicherweise durch den Pilz abgegebene Substanzen das Hormongleichgewicht in der Pflanze in der Art verändern, dass systemisch und lokal ein erhöhter Abwehrstatus ausgelöst wird, auch ohne dass eine Besiedlung der Wurzeln erfolgt.

Alternativ könnten von der Pflanze jedoch auch (*P. indica*)-spezifische MAMPs oder Effektoren erkannt und hierdurch resistenzauslösende Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Als ISR auslösende, bakterielle MAMPs wurden u. a. Zellwandkomponenten wie Flagellin oder Lipopolysaccharide (LPS) beschrieben (MEZIANE et al., 2005; REITZ et al., 2000; VAN PEER & SCHNIPPERS, 1992). Auch Fe^{3+} -spezifische Chelatoren (Siderophore)

bakteriellen Ursprungs können ISR auslösen. Oftmals ist hierbei jedoch nicht nur ein Faktor an der Resistenzinduktion beteiligt, sondern mehrere Komponenten wirken redundant zusammen (Übersicht in BAKKER et al., 2007). Ein beschriebener pilzlicher, ISR auslösender Elizitor ist das sekretierte, hydrophobin-ähnliche Protein Sm1 von *Trichoderma virens* bzw. dessen Homolog Epl1 aus *Hypocrea atroviride*. Beide lösen in monomerer Form in Mais systemisch Resistenz gegen *Colletotrichum graminicola* aus (DJONOVIC et al., 2007; VARGAS et al., 2008). Als pilzliche MAMPs können jedoch auch Endopolygalacturonasen, Xylanasen und Zellwandkomponenten wie Chitin oder Glucane wirken (z. B. GAULIN et al., 2006; NÜRNBERGER et al., 2004; SCHWEIZER et al., 2000). Derartige, resistenzauslösende Faktoren, die sich auch in oder an toten Sporen oder Myzelstücken noch finden können, spielen somit möglicherweise bei der durch *P. indica* systemisch induzierten Resistenz eine tragende Rolle. Chitin scheint jedoch nicht der auslösende Faktor zu sein, da das hier untersuchte Chitinoktamer oder eine Inokulation mit *Fusarium*-sporen keine resistenzinduzierende Wirkung zeigten. Dafür, dass neben Chitin jedoch noch weitere, möglicherweise *P. indica*-spezifische MAMPs an lebenden und toten Sporen exponiert und durch die Pflanze erkannt werden, sprechen Untersuchungen an Gerstenwurzeln, die den Einfluss von Chitin sowie lebenden und toten *P. indica*-Sporen auf den pH-Wert der Zelloberfläche zum Gegenstand hatten. Hierbei wurde festgestellt, dass in der Streckungszone der Wurzeln durch *P. indica*-Sporen, lebende wie abgetötete, eine anfänglichen Reduktion des pH-Wertes (Ansäuerung) gefolgt von einer Oszillation ausgelöst wurde, während Chitinfragmente eine typische Alkalisierungsreaktion bedingten (FELLE et al., akzeptiert). *P. indica*-Sporen vermitteln somit ein vom Chitinsignal zu unterscheidendes (spezifisches) Signal, welches möglicherweise auch an der Induktion der Resistenzausprägung beteiligt ist.

Induktion und Aufrechterhaltung des *geprimten* Zustandes in systemischen Geweben

Unabhängig davon, welche spezifischen Faktoren die durch *P. indica* induzierte Resistenz primär auslösen, stellt sich auch die Frage, wie das generierte Signal von der Wurzel in den Spross transportiert und dort die verstärkte Abwehrbereitschaft, der *geprimte* Zustand, ausgelöst und manifestiert wird. Aufgrund der oftmals fehlenden sichtbaren Veränderung auf Transkriptomebene im Zusammenhang mit ISR und *Priming* wurde vorgeschlagen, dass Letzteres mit einer erhöhten Akkumulation inaktiver Signalmoleküle assoziiert ist, die eine Rolle bei der Signalverstärkung spielen (CONRATH et al., 2006). Kongruent hierzu konnten BECKERS und Kollegen (2009) in *Arabidopsis* zeigen,

dass *Priming* durch BTH oder avirulente *P. syringae* spp. mit der Akkumulation von mRNA und inaktivem Protein der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 einhergeht. Ihre Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verstärkte Akkumulation dieser Proteine im inaktiven Zustand einen kritischen Schritt des *Priming*-Mechanismus darstellt. Ähnliche Mechanismen, sprich eine Akkumulation inaktiver Signalproteine, könnten auch dem durch *P. indica* induzierten *Priming*-Effekt zugrunde liegen.

Welche systemischen Signale die Etablierung des *Priming*-Effektes während ISR einleiten und wie das Signal von der Wurzel in den Spross transferiert wird, ist kaum untersucht. Im Falle von *P. indica* konnte gezeigt werden, dass bereits wenige Minuten nach Inokulation von Gerstenwurzeln mit Sporen des Pilzes Änderungen im pH-Wert des Blattapoplasten zu messen sind (FELLE et al., akzeptiert). Im Gegensatz zu einer normalerweise bei Stressapplikation beobachteten Alkalisierung (FELLE et al., 2005), konnte hier eine transiente Ansäuerung für etwa zwei Stunden beobachtet werden. *P. indica* induziert somit ein sehr frühes, systemisches pH-Signal in der Pflanze, auch ohne Kolonisierung des Wurzelgewebes. Dieser pH-Impuls könnte folgend Signalkaskaden in Gang setzen, die die Ausbildung eines potenzierten Abwehrstatus nach sich ziehen. Möglicherweise sind jedoch auch mobile Metabolite an der Signalweiterleitung im Xylem oder Phloem und der Etablierung des *Priming*-Effektes beteiligt. So konnte Azelainsäure als mobile Komponente während SAR in *Arabidopsis* identifiziert werden, die nach Pathogeninokulation im Leitbündelsaft akkumuliert und eine verstärkte SA-Synthese nach Pathogenbefall (*Priming*) in systemischen Geweben auslöst (JUNG et al., 2009). Zusätzlich werden jedoch noch eine Reihe anderer Faktoren diskutiert, die bei der Weiterleitung eines SAR oder auch ISR-Signals eine Rolle spielen könnten, u. a. Aktionspotentiale, Lipide, Kationen wie Ca^{2+} oder auch bestimmte mRNAs (z. B. VAN BEL & GAUPELS, 2004; ZIMMERMANN et al., 2009). Zukünftige Ansätze werden zeigen, welche davon bei der durch *P. indica* induzierten Resistenz beteiligt sind.

4.3 „BALANCIERTER ANTAGONISMUS“: WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PFLANZLICHER ABWEHR UND PILZLICHEN KOMPATIBILITÄTSFAKTOREN

Interaktionen zwischen verschiedenen Organismen gehen mit einer wechselseitigen Beeinflussung der Partner einher. Auf dieser Beobachtung aufbauend stellten bereits SCHULZ & BOYLE (2005) die Hypothese eines „balancierten Antagonismus“ in Pflanze-Endophyt-Interaktionen auf. Diese besagt, dass ein Gleichgewicht zwischen pilzlichen Virulenzfaktoren und dem pflanzlichen Abwehrsystem besteht, welches eine begrenzte, apathogene Kolonisierung des pflanzlichen Gewebes durch den Endophyten erlaubt. Eine Veränderung externer oder interner Faktoren sollte zu einem Missverhältnis dieser Komponenten führen, was einen Umschwung von einer asymptomatischen zu einer parasitischen Interaktion bedingt. Im Fall von *P. indica* konnte bisher keine Wirtsspezifität festgestellt werden. Im Gegenteil, er besiedelt ein breites Spektrum sowohl mono- als auch dikotyler Pflanzen, u. a. Orchideen (*Dactylorhiza* spp.), Poaceen (z. B. Gerste, Mais, Reis, Weizen) und Brassicaceen (z. B. Arabidopsis; BLECHERT et al., 1999; VARMA et al., 1999; VERMA et al., 1998; WALLER et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, welche pflanzlichen Faktoren die Besiedlung durch *P. indica* limitieren bzw. welche pilzlichen Faktoren das pflanzliche Immunsystem oder den pflanzlichen Stoffwechsel verändern können und somit die Etablierung und den Verlauf der Interaktion entscheidend beeinflussen. Die Anzucht der Pflanzen für die Versuche erfolgte entweder in einem Sand:Oil Dri[®]-Gemisch (Topfkultur) oder steril auf agarhaltigem Medium (vgl. Kap. 3.5). Prinzipiell zeigten beide Systeme vergleichbare Resultate, so dass die Ergebnisse im Folgenden zusammen diskutiert werden. Vor allem der Einfluss der Hormone Salizylsäure (SA)-, Jasmonsäure (JA)- und Ethylen (ET) sowie des Phytoalexins Camalexin wurden untersucht¹. Hierzu wurde zunächst 14 Tage nach Inokulation mit *P. indica* die Besiedlungsstärke verschiedener Arabidopsismutanten mit Defekten in den entsprechenden Signaltransduktions- oder Synthesewegen vergleichend analysiert (Kap. 3.5.1). Zu diesem Zeitpunkt, an dem bereits neue Chlamydosporen durch den Endophyten gebildet werden, sollte sich ein gewisses Gleichgewicht zwischen Pilz und Pflanze eingestellt haben. In weiterführenden Experimenten wurden zudem frühere Zeitpunkte nach Inokulation betrachtet (3 und 7 dai, vgl. Kap. 3.5.2), die im Zusammenhang mit der zelltodabhängigen Besiedlungsstrategie des Pilzes ausgewählt wurden. Letztere äußert sich z. B. darin, dass der Zelltodinhibitor *Bax Inhibitor-1* die Besiedlung durch *P. indica* in Gerste und Arabidopsis negativ

¹ Details zu den in diesem Kapitel diskutierten Mutanten sind nur angegeben, wenn diese nicht schon in Kapitel 4.2.2 beschrieben wurden. Weitere Informationen finden sich auch in Tabelle 2.1-2. 119

beeinflusst (DESHMUKH et al., 2006; P. SCHÄFER, mündliche Mitteilung). Kongruent hierzu geht die Besiedlung von Wurzelzellen in Gerste und Arabidopsis einige Zeit nach Penetration mit einer Zelltodreaktion einher (DESHMUKH et al., 2006; SCHÄFER & KOGEL, 2009; SCHÄFER & ZECHMANN, unpub. Daten). Dieses Muster, dass zunächst lebende Zellen durch *P. indica* penetriert werden, die jedoch im Laufe der Interaktion absterben, könnte eine generelle Kolonisierungsstrategie des Endophyten darstellen, um den besten Nutzen aus den abgestorbenen Zellen zu ziehen. Alternativ besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die beobachtete Zelltodreaktion in Gerste und Arabidopsis Ausdruck einer unausgeglichene Interaktion mit einem nicht komplett adaptierten Wirt ist (SCHÄFER & KOGEL, 2009). Unabhängig von den Gründen für den Zelltod kann hierdurch bei einer zeitlichen Betrachtung der Interaktion von *P. indica* mit Gerste und Arabidopsis eine anfänglich eher biotrophe (< 5 dai) und eine spätere zelltodabhängige Besiedlungsphase unterschieden werden (> 5 dai, SCHÄFER et al., 2009).

Ein verminderter Abwehrstatus in Pflanzen verstärkt die Besiedlung durch *P. indica*

Eine Arbeitshypothese, welcher im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen wurde, war, dass bei der Limitierung des pilzlichen Wachstums durch die Pflanze sowohl Signalkomponenten wie SA und JA und mit diesen verbundene Abwehrmechanismen als auch bestimmte Phytoalexine eine Rolle spielen. Kongruent zu dieser Hypothese zeigten die durchgeführten Versuche, dass Arabidopsislinien mit einer verminderten SA- oder Camalexin-assoziierten Abwehr zu späteren Interaktionszeitpunkten stärker durch den Endophyten besiedelt werden. So wiesen die SA-Mutanten *NahG*, *npr1-3*, *npr1-1* und *sid2-2* (keine ICS1-abhängige SA-Synthese; DEWDNEY et al., 2000) sowie die Camalexin-Mutante *pad3-1* (ZHOU et al., 1999) einen im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Kolonisierungsgrad 14 Tage nach Inokulation mit *P. indica* in Topf- und Sterilkultur auf (vgl. Abb. 3.5-1 und 3.5-2). In *sid2-2* war sogar bereits nach sieben Tagen eine stärkere Besiedlung zu erkennen. Drei Tage nach Inokulation konnte dagegen bei keiner der Mutanten eine stärkere Besiedlung relativ zum Wildtyp festgestellt werden. Im Gegenteil zeigte *NahG* sogar eine tendenziell geringere Kolonisierung durch den Endophyten. Insgesamt betrachtet implizieren die Resultate somit, dass die Pflanze das Pilzwachstum zu der späteren, zelltodabhängigen Besiedlungsphase limitiert, und hierbei SA-abhängige Signalwege und Camalexin eine Rolle spielen. Zu früheren Interaktionszeitpunkten wirken sich diese beiden Faktoren dagegen nicht oder möglicherweise sogar positiv auf das pilzliche Wachstum aus. Diese Annahmen werden durch die Beobachtung gestützt, dass Pflanzen,

denen zuvor das SA-Analog DCINA appliziert wurde, drei Tage nach Inokulation mit *P. indica* eine erhöhte und 14 Tage nach Inokulation eine verminderte Besiedlung relativ zu unbehandelten Pflazen aufweisen (unpub. Daten P. SCHÄFER).

Eine inhibierende Wirkung von Camalexin auf die Besiedlung durch *P. indica* mag in der direkten antimikrobiellen Wirkung des Phytoalexins zu suchen sein (FERRARI et al., 2007). Die negative Wirkung von SA auf das Pilzwachstum kann durch mehrere Möglichkeiten, u. a. (1) die Induktion bestimmter Abwehrmechanismen (z. B. *PR*-Genexpression), (2) die antagonistische Wirkung von SA auf weitere Hormone wie JA oder Auxin (Übersicht in SPOEL & DONG, 2008) oder (3) die regulatorische Wirkung des Hormons auf Zelltodreaktionen (ALVAREZ, 2000), erklärt werden. Im ersten Fall würden demnach die Mutanten *NahG*, *npr1* und *sid2-2* besser durch *P. indica* besiedelt, da basale SA-abhängige Abwehrmechanismen in diesen Pflanzen nicht induziert werden können. Letzteres äußert sich in diesen drei Mutanten z. B. in einer erhöhten Suszeptibilität gegen den biotrophen Oomyceten *Peronospora parasitica* (NAWRATH & MÉTRAUX, 1999; THOMMA et al., 1998). Für eine Rolle abwehrbezogener Gene bei der Limitierung des Wachstums von *P. indica* sprechen auch die Ergebnisse von SCHÄFER und Kollegen (2009). Sie konnten zeigen, dass Gerstenpflanzen mit einer verminderten Menge an endogener Giberellinsäure eine reduzierte Kolonisierungsrate aufweisen, die mit einer verstärkten Expression abwehrbezogener Gene einhergeht.

Im zweiten Fall könnte die wachstumshemmende Wirkung von SA auf *P. indica* in der antagonistischen Wirkung des Hormons auf auxininduzierte Signale liegen. *P. indica* ist in der Lage, Auxin zu produzieren (SIRRENBURG et al., 2007; VADASSERY et al., 2008). Zudem ergaben sich in kolonisierten Gerstenwurzeln Hinweise auf eine erhöhte Auxinbiosynthese und auf die Aktivierung von Signalwegen, die mit diesem Hormon assoziiert sind (SCHÄFER et al., 2009). Gleichzeitig wird die Störung des Auxingleichgewichtes in Pflanzen mit einer erhöhten Virulenz von Pathogenen in Verbindung gebracht, wobei SA hierauf antagonistisch wirken kann (SPOEL & DONG, 2008; WANG et al., 2007). Möglicherweise stellt Auxin somit einen Kompatibilitätsfaktor bei der Besiedlung mit *P. indica* dar, der durch die SA-assoziierte Abwehr der Pflanze unterdrückt wird. Kongruent hierzu wird *tfl2*, eine Mutante mit reduzierten IAA und Glucosinolat-Konzentrationen, nur in reduziertem Maße mit dem Endophyten besiedelt (VADASSERY et al., 2008).

Bei der dritten Möglichkeit könnte von der Pflanze über SA-abhängige Signalwege eine Zelltodreaktion eingeleitet werden, welche zu einer inkompatiblen Interaktion mit dem Endophyten führt. Der beobachtete Zelltod durch *P. indica* penetrierter Wirtszellen

(vgl. auch Seite 119) würde somit, zumindest unter bestimmten Voraussetzungen, eine Abwehrreaktion der Pflanze zur Limitierung des pilzlichen Wachstums darstellen, die von dieser zu einem bestimmten Zeitpunkt der Interaktion initiiert wird. Eine durch den Pilz gesteuerte Zelltodreaktion würde dagegen möglicherweise, ähnlich zu nekrotrophen Pilzen, die Verfügbarkeit von Nährstoffen für diesen erhöhen und somit die pilzliche Entwicklung begünstigen. Abhängig vom Zeitpunkt und vom Ablauf der Zelltodreaktion könnte der Pilz demnach in seinem weiteren Wachstum eingeschränkt oder verstärkt werden.

Die Vermutung, dass die Regulation von Zelltodreaktionen durch die Pflanze eine entscheidende Rolle bei der Limitierung der Besiedlung durch *P. indica* spielt, wird auch durch erste Ergebnisse hinsichtlich der Besiedlung von *dnd1* (*defence, no death1*, YU et al., 1998) gestützt. *dnd1* weist einen Defekt in einem cyclischen Ionenkanal auf, akkumuliert SA und zeigt eine starke resistenzgenvermittelte aber HR unabhängige Breitbandresistenz gegen diverse Pathogene (BALAGUE et al., 2003; GENDER et al., 2008; YU et al., 1998; 2000). Trotz der hohen endogenen SA-Konzentration wurde die Mutante drei Tage nach Inokulation mit *P. indica* im Vergleich zum Wildtyp weniger, 14 Tage nach Inokulation dagegen stärker besiedelt (vgl. Abb. 3.5-2). Die anfänglich geringere Besiedlung kann durch die multiplen aktiven Abwehrreaktionen in der Mutante erklärt werden, die das Wachstum des Pilzes einschränken. Im Laufe der Etablierung der Symbiose zwischen *P. indica* und der Pflanze, könnte der Pilz in der Lage sein, diese zu unterdrücken. Für eine generelle Fähigkeit von *P. indica*, die Abwehr in Pflanzen zu modulieren, spricht, dass in Gerstenwurzeln eine Repression abwehrrassoziierten Gene zu späteren Zeitpunkten in der Interaktion mit dem Endophyten beobachtet werden konnte (SCHÄFER et al., 2009). Dies ist ein Phänomen, das auch von Mykorrhizapilzen bekannt ist (SCHULZ & BOYLE, 2005). Die Unterdrückung der Abwehr, zusammen mit dem zelltoddefizienten Phänotyp von *dnd1* könnte somit erklären, dass diese Mutante 14 Tage nach Inokulation mit *P. indica* stärker besiedelt wird als der Wildtyp. Hier gilt es jedoch zu klären, welche Reaktionen in den Wurzeln dieser Mutante während der Besiedlung durch den Endophyten wirklich zu beobachten sind. Interessant wäre es z. B. zu sehen, ob eine Zelltodreaktion in durch *P. indica* penetrierten Zellen zu beobachten ist, oder nicht. Dies gilt vor allem im Hinblick auf die Tatsache, dass die meisten bisherigen Untersuchungen von Arabidopsismutanten mit Blatt- bzw. Sprossmaterial durchgeführt wurden und nicht in jedem Fall davon auszugehen ist, dass sich die Ergebnisse ohne Einschränkungen auf Wurzelgewebe übertragen lassen.

Die auf ihre Besiedlung mit *P. indica* getesteten JA-Signalwegmutanten *jar1-1* und *jin1* zeigten in den hier durchgeführten Versuchen in Topfkultur 14 Tage nach Inokulation mit *P. indica* im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Besiedlungsstärke. In den Versuchen in Sterilkultur konnte für die JA-hypersensitive Mutante *joe1* ebenfalls nur eine tendenziell verminderte Besiedlung zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden. Dagegen wurde die JA-unsensible Mutante *coi1-16* ab sieben Tage nach der Inokulation mit dem Endophyten besser besiedelt. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass in letzterer auch *PEN2* mutiert ist und dies somit für die verstärkte Besiedlung mit ausschlaggebend sein kann (WESTPHAL et al., 2008). Auf Grundlage der hier vorliegenden Resultate kann daher nicht von einer maßgeblichen Beteiligung von JA an der Limitierung des Pilzwachstums während der späteren, zelltodassoziierten Interaktionsphase ausgegangen werden.

Die bisherigen Ergebnisse können jedoch nicht ausschließen, dass vielleicht zu früheren Zeitpunkten ein Einfluss von JA auf die Besiedlung gegeben ist. Dies wird noch in weitergehenden Untersuchungen zu analysieren sein. Hierfür spricht, dass u. a. die Arabidopsismutante *pyk10* eine erhöhte Besiedlung aufweist (SHERAMETI et al., 2008b). *PYK10* kodiert eine *PEN2*-ähnliche, wurzel- und hypokotylspezifische β -Glucosidase/Myrosinase, der eine Rolle bei der pflanzlichen JA-abhängigen Abwehr zugesprochen wird (HARA-NISHIMURA & MATSUSHIMA, 2003; MATSUSHIMA et al., 2003; POZO et al., 2008). Auch die Mutanten *mdar2* (*monodehydroascorbat reductase2*) und *dhar5* (*dehydroascorbat reductase5*), deren Defekte zwei Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus betreffen, werden zumindest unter Trockenstressbedingungen stärker besiedelt (VADASSERY et al., 2009b). Interessanterweise zeigen sowohl *pyk10* und bei Trockenstress auch *mdar2* und *dhar5* durch die Besiedlung mit *P. indica* erhöhte Transkriptlevel des JA/ET-responsiven Defensin *PDF1.2* (SHERAMETI et al., 2008b; VADASSERY et al., 2009b). Gleichzeitig wird nicht nur SA eine antagonistische Wirkung auf JA, sondern auch JA eine inhibierende Wirkung auf SA-induzierte Signalwege zugesprochen (z. B. über WRKY 70, BECKERS & SPOEL, 2006; LI et al., 2004). Gleichzeitig ermöglicht eine Reduzierung SA-abhängiger, pflanzlicher Abwehrmaßnahmen eine stärkere Besiedlung durch den Pilz, wie die oben ausgeführten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen. Dies alles zusammen betrachtet könnte darauf hindeuten, dass *P. indica* eine JA-abhängige Abwehr induzieren kann und hierdurch z. B. SA-assozierte Abwehrmaßnahmen reprimiert. Ein ähnliches Verhalten ist von einigen *P. syringae* Stämmen bekannt. Diese produzieren einen Virulenzfaktor (Coronatine), der JA imitiert, dadurch SA-vermittelte Abwehr unterdrückt und so eine

erhöhte Virulenz der Bakterien ermöglicht (BENDER et al., 1999; GLAZEBROOK, 2005; SPOEL & DONG, 2008).

Auch wenn noch nicht alle Fragen bezüglich des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Kolonisierung von *Arabidopsis* durch *P. indica* abschließend geklärt sind, so weisen die Resultate der hier vorliegenden Arbeit doch eindeutig darauf hin, dass zumindest SA und auch Camalexin eine Rolle bei der Limitierung und Regulierung des Wachstums von *P. indica* durch die Pflanze spielen.

Ethylen wirkt als Kompatibilitätsfaktor während der Kolonisierung durch *P. indica*

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche machten deutlich, dass Ethylen sich auf die Besiedlungsstärke von Pflanzenwurzeln durch *P. indica* auswirkt. Dies zeigte sich daran, dass die Ethylenüberproduzenten *eto1* und *eto3* (GUZMAN & ECKER, 1990; WOESTE et al., 1999) sowie die einen konstitutiven Ethylenphänotyp aufweisende Mutante *ctr1-1* (*constitutive tripple response1*; KIEBER et al., 1993) eine stärkere Besiedlung durch *P. indica* im Vergleich zum Wildtyp 14 Tage nach Inokulation in Topfkultur zeigten. Kongruent hierzu wiesen Mutanten mit Defekten im Ethylensignalweg (*ein2-1*) oder in einem Ethylenrezeptor (*etr1-3*) eine zumindest tendenziell schlechtere Kolonisierung mit dem Endophyten auf (vgl. Kap. 3.5). Auch in Sterilkultur konnte die bessere Besiedlung von *eto1* und *ctr1-1* bzw. die geringere Kolonisierung von *ein2-1* bestätigt werden (KHATABI B, MOLITOR A, SCHÄFER P, eingereicht).

Während *CTR1* einen negativen Regulator des ET-Signalweges kodiert (KIEBER et al., 1993), beruhen sowohl der *eto1* als auch der *eto3* Phänotyp auf einer erhöhten Stabilität von ACS (1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) Synthase). Dieses Enzym katalysiert den limitierenden Schritt in der Ethylenbiosynthese (CHAE et al., 2003). *ETO1* kodiert einen negativen Regulator der Ethylenbiosynthese, der die Degradation von ACS5 reguliert (WANG et al., 2004; YOSHIDA et al., 2005), während in *eto3* ACS9 aufgrund einer Mutation im C-Terminus eine erhöhte Stabilität aufweist. Aufgrund der veränderten Stabilität der ACS-Enzyme findet sich in *eto1* und in *eto3* eine erhöhte Ethylenkonzentration, die sich vor allem in etiolierten Keimlingen, in geringerem Maße jedoch auch in Blättern zeigt. Dieser Effekt kann zudem durch Auxin, Cytokinin und weitere Faktoren synergistisch weiter verstärkt werden (GUZMAN & ECKER, 1990; WOESTE et al., 1999). Die hier erhaltenen Ergebnisse implizieren somit, dass Ethylen bei der Wurzelbesiedlung durch *P. indica* als Kompatibilitätsfaktor wirkt und dass der Endophyt eine erhöhte Ethylenproduktion induzieren kann. Letzteres wird von Daten gestützt, die eine erhöhte Konzentration

an freiem ACC (Vorstufe in der Ethylenbiosynthese) in Gerstenwurzeln und eine verstärkte *GUS*-Expression in *ACS1::GUS/GFP*- und *ACS8::GUS/GFP*-Reporterpflanzen in *Arabidopsis* zeigten (KHATABI et al., eingereicht).

Zusätzlich wird die Wirkung von Ethylen als Kompatibilitätsfaktor durch die Beobachtung gestützt, dass die exogen applizierte Ethylenvorstufe ACC eine verbesserte und der ET-Antagonist MCP (1-Methylcyclopropen), der freie Ethylenrezeptoren besetzt, eine verminderte Kolonisierung bedingt (KHATABI et al., eingereicht). Auch von SCHÄFER und Kollegen (2009) durchgeführte Mikroarrayanalysen in Gerste weisen auf Ethylen als einen modulierenden Faktor bei der Besiedlung mit *P. indica* hin. In diesen Studien konnte in Gerstenwurzeln eine Induktion von zwei ACC-Oxidasen, die die Umwandlung von ACC in Ethylen katalysieren, drei Tage nach Inokulation mit *P. indica* detektiert werden. Der Auslöser der ethyleninduzierenden Wirkung von *P. indica* mag in von ihm freigesetztem Auxin oder in der durch ihn möglicherweise in der Pflanze induzierten Auxinsynthese begründet liegen (SIRRENBURG et al., 2007; SCHÄFER et al., 2009). So kann durch einen Auxinstimulus die Expression von ACS-Isoformen induziert werden (TSUCHISAKA & THEOLOGIS, 2004). Gleichzeitig kann sich jedoch Ethylen auch auf die Auxinbiosynthese auswirken (STEPANOVA et al., 2007).

Die die Kolonisierung durch *P. indica* verstärkende Wirkung von Ethylen könnte - ähnlich wie bereits für SA diskutiert (s. o.) - in der Regulation von Zeitpunkt und Stärke der beobachteten Zelltodreaktion nach Penetration liegen (BOUCHEZ et al., 2007). Andererseits ermöglicht möglicherweise erst die Akkumulation von Ethylen eine Umsteuerung in der Pflanze, die die für eine fortschreitende Kolonisierung durch den Endophyten nötigen morphologischen und physiologischen Voraussetzungen gewährleistet. So wirkt sich Ethylen u. a. - und oftmals im Zusammenspiel mit Auxin - auf die Wurzelhaarbildung und die Wurzellänge aus, wobei letzteres über eine Reduzierung der Zelllänge erfolgt (Übersicht in DUGARDEYN & VAN DER STRAETEN, 2008).

Insgesamt betrachtet zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit weiteren hier aufgeführten Resultaten, dass eine erhöhte Ethylenkonzentration das Pflanze/Pilz-Verhältnis auf die Pilzseite verschieben kann und hieran ein funktionaler ET-Signalweg beteiligt ist. Ethylen stellt somit einen Kompatibilitätsfaktor in der Symbiose mit *P. indica* dar, der zur Initiierung von Signalkaskaden beitragen und hierdurch die Fähigkeit des Endophyten erklären kann, sehr diverse Pflanzen zu kolonisieren.

Schlussfolgerung: pflanzliche Abwehrmechanismen und pilzliche Kompatibilitätsfaktoren bestimmen das Maß der Besiedlung durch *P. indica*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen SA-abhängiger Abwehrmechanismen oder von Camalexin die Besiedlung durch den Endophyten in der späteren, zelltodassoziierten Interaktionsphase verstärkt. Eine Verringerung der mit diesen Faktoren assoziierten pflanzlichen Abwehrmechanismen ermöglicht es dem Pilz somit, die Balance auf seine Seite zu verschieben. Zusätzlich konnte Ethylen als Kompatibilitätsfaktor identifiziert werden, der dem Pilz eine verstärkte Besiedlung der Wurzeln erlaubt. Insgesamt betrachtet wird die Balance zwischen *P. indica* und seinem Wirt somit sowohl durch den Pilz als auch durch die Pflanze beeinflusst. Neben diesen hier identifizierten und weiteren bereits bekannten Faktoren (z. B. Giberellinsäure, SCHÄFER et al., 2009) werden auch weitere Hormone und veränderte Verhältnisse verschiedener Faktoren zueinander eine entscheidende und reglementierende Rolle bei der Besiedlung durch den Endophyten einnehmen. Die Analyse der Interaktion zwischen den einzelnen sich auf die Kolonisierung auswirkenden pflanzlichen und pilzlichen Kompatibilitätsfaktoren und Abwehrmechanismen, speziell in den einzelnen Entwicklungsstadien des Pilzes, bietet hierdurch auch zukünftig spannende Forschungsfelder.

4.4 GESAMTBILD, ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN

Die hier diskutierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die durch *P. indica* induzierten Wachstumseffekte und die durch den Endophyten vermittelte systemische Resistenz gegen Mehltapilze in der monokotylen Gerste und der dikotylen Arabidopsis grundlegende Übereinstimmungen aufweisen. In beiden Pflanzen kann durch die Besiedlung eine vermehrte Seitenwurzelbildung und eine Verkürzung der Hauptwurzeln ausgelöst werden und der Resistenzeffekt beruht auf *Priming* und einem ISR-ähnlichen Prinzip. Zudem war es möglich, mehrere *geprimte* Gene zu identifizieren, die ursächlich für die systemische Resistenz sein könnten. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse implizieren zudem, dass vor allem vom Pilz produzierte Effektoren (z. B. Hormone) und deren direkter Einfluss auf die Pflanze sowohl für die beobachteten Wachstums- und Resistenzeffekte als auch für die Aufrechterhaltung eines „balancierten Antagonismus“ zwischen den Interaktionspartnern ausschlaggebend sind. Kongruent hierzu konnten Ethylen und SA als Komponenten identifiziert werden, die während der Etablierung eines ausgeglichenen Pilz/Pflanze-Verhältnisses beteiligt sind.

Vor allem die Möglichkeit der axenischen Kultivierbarkeit von *P. indica* und das verstärkte Wachstum zusätzlich zu einem lokalen und systemischen Resistenzeffekt, lassen ihn aus agronomischer Sicht interessant erscheinen. In einem größeren Zusammenhang betrachtet zielten daher sowohl die molekularbiologischen als auch die morphologischen Studien dieser Arbeit darauf ab, durch die Analyse der Grundlagen der durch den Endophyten induzierten Effekte, neue Ansatzpunkte zur Eindämmung von pflanzlichen Pathogenen und für den nachhaltigen Pflanzenschutz zu erlangen. Das im Rahmen dieser Arbeit erhaltene bessere Verständnis der molekularen Grundlagen dieser Effekte wird dazu beitragen können, Hochleistungssorten zu entwickeln, die trotz eines erhöhten Resistenzpotentials keinen negativen Fitnessseffekt aufweisen. Als Ansatzpunkte können hier die Gene und Signalwege dienen, die als Bestandteil der systemischen Resistenz und des beobachteten *Priming*-Effektes identifiziert wurden.

In weiterführenden Forschungsansätzen gilt es nun vor allem zu verstehen, wie der *geprimte* Zustand durch *P. indica* in Pflanzen etabliert und durch welche Faktoren spezifisch ausgelöst wird, um dies agronomisch umsetzen zu können. Zudem wurden im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche bisher nicht charakterisierte Mehltau- und *P. indica*-regulierte Gene in Gerste identifiziert. Aus diesen Resultaten ergeben sich noch weitere Möglichkeiten, durch vertiefende Studien einzelner Aspekte und Kompatibilitätsfaktoren, weitere interessante Einblicke in die *Bgh*-Pathogenität und die systemisch durch *P. indica*

induzierten Wachstums- und Resistenzeffekte zu erhalten. Auch ergaben sich neue Ansatzpunkte für die vertiefende Analyse der Interaktion von *P. indica* mit seinem Wirt in der Wurzel, etwa, wie eine für beide Partner zumindest kommensale Interaktion aufrechterhalten wird oder wie sich eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen Pilz und Pflanze auf Effekte wie Wachstum und Resistenz auswirkt. Hier gilt es die Stellschrauben zu identifizieren, die das Zusammenspiel aller dieser Faktoren regulieren, um Möglichkeiten zu entwickeln, diese im Sinne einer nachhaltigen Landwirtschaft beeinflussen zu können.

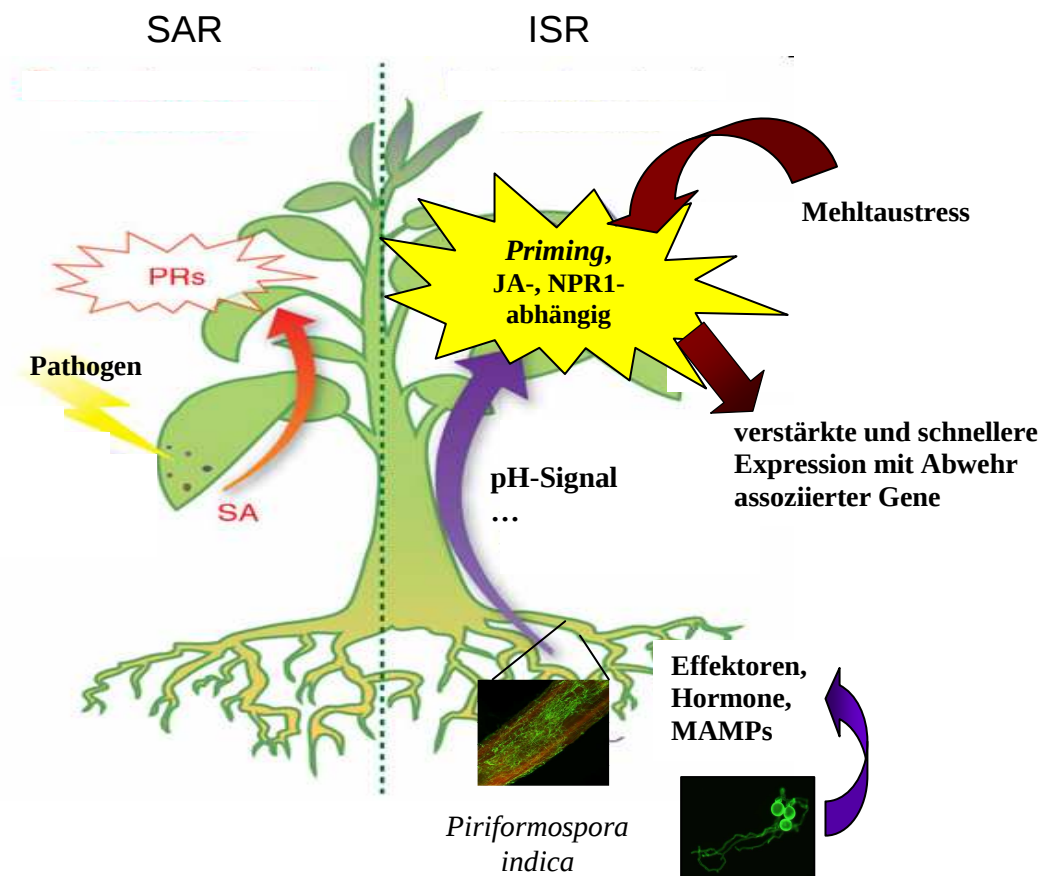


Abb. 4.4-1: Modell zur durch *Piriformospora indica* induzierten systemischen Resistenz. *Priming* und ein ISR-ähnlicher Mechanismus, nicht SAR, bilden die Grundlage der durch *P. indica* induzierten Resistenz, wobei NPR1 und JA-abhängige Signalwege während der Resistenzausbildung beteiligt sind. Als mögliche Auslöser der Resistenz kommen pilzinduzierte Hormone, Effektoren oder *P. indica*-spezifische MAMPs in Frage, wobei das generierte Signal z. B. durch Änderungen des pH-Wertes von der Wurzel in den Spross übertragen wird. Sporenbild verändert nach SCHÄFER et al., 2009; Abbildung verändert nach PIETERSE et al., 2009.

5 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

5.1 ZUSAMMENFASSUNG

Die hier vorliegende Arbeit befasste sich mit dem Einfluss des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf die Kulturpflanze *Hordeum vulgare* (Gerste) sowie die als Modellpflanze genutzte *Arabidopsis thaliana* und trägt dazu bei, durch den Pilz induzierte Wachstums- und systemische Resistenzeffekte sowie die Etablierung der Symbiose in der Wurzel genauer zu verstehen. Die gleichzeitige Analyse der Interaktion von *P. indica* mit Gerste und mit *Arabidopsis* ermöglichte es zudem, Übereinstimmungen bezüglich der beobachteten Effekte in der agronomisch relevanten, monokotylen Gerste und der dikotylen Modellpflanze aufzudecken.

Die Analyse der durch *P. indica* induzierten systemischen Resistenz gegen den Echten Mehltaupilz in Gerste erfolgte mittels einer mikroarraybasierten Transkriptomanalyse. Die Beteiligung potenzieller Resistenz- oder Kompatibilitätsfaktoren mit Wirkung auf die Mehлтаuentwicklung wurde anschließend durch TIGS (*transient induced gene silencing*) funktionell überprüft. Die systemische Resistenzinduktion durch *P. indica* in *Arabidopsis* gegen den Echten Mehltaupilz *Golovinomyces orontii* wurde im Rahmen dieser Arbeit am Institut erstmals etabliert und einerseits durch die Untersuchung diverser Signalwegmutanten und andererseits durch die Analyse des Expressionsmusters ausgewählter Gene genauer charakterisiert. Insgesamt betrachtet zeigte sowohl die Transkriptomanalyse in Gerste als auch die Analyse der Expression spezifischer Gene in *Arabidopsis*, dass die Besiedlung durch den Endophyten keine an der Abwehr beteiligten Gene in den Blättern der Pflanzen konstitutiv erhöht. Auch fanden sich keine Hinweise auf systemisch erhöhte Ethylen (ET)-, Jasmonsäure (JA)-, oder Salizylsäure (SA)-Konzentrationen. Des Weiteren konnte nach Inokulation mit Mehltau in beiden Systemen eine potenzierte Induktion von Genen (*Priming*-Effekt) nachgewiesen werden. In Gerste zeigten vor allem die pathogenresponsiven Gene *PR-1b*, *PR-2* und *PR-5* sowie ein Hitzeschockprotein (*HSP70*) eine potenzierte Reaktion in *P. indica*-besiedelten Pflanzen, während in *Arabidopsis* das vegetative Speicherprotein *VSP1* verstärkt nach Pathogeninokulation exprimiert wurde. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass sowohl in Gerste als auch in *Arabidopsis* der zentrale Regulator NPR1 an der systemisch durch *P. indica* induzierten Resistenz beteiligt ist. In *Arabidopsis* wurde zudem, ähnlich zur Rhizobakterien-induzierten Resistenz (ISR), Jasmonat-Signalweg-Komponenten, eine entscheidende Rolle bei der Resistenzausprägung zugewiesen. Eine Analyse möglicher Auslöser der systemisch induzierten Resistenz zeigte, dass hierfür an *P. indica*-Sporen oder -Myzel befindliche MAMPs oder vom Pilz produ-

zierte Effektoren in Frage kommen, da auch durch autoklaviertes Pilzmaterial Resistenz induziert werden konnte. Chitinoktamere als möglicher Auslöser wurden ausgeschlossen.

Zusätzlich zur Resistenzinduktion wurde der Einfluss des Endophyten auf das Wachstum und die morphologische Entwicklung seiner Wirte genauer charakterisiert. Hierbei wurde deutlich, dass ein verstärktes Wachstum in Gerste erst nach einer Übergangsphase sichtbar wird und *P. indica* eine Umsteuerung der Wurzelmorphologie hin zu mehr Seiten- und kürzeren Hauptwurzeln in Abhängigkeit von der Inokulationsdichte bedingt. Auch in *Arabidopsis* konnte eine Verminderung der Wurzellänge beobachtet werden.

Des Weiteren ergab eine genauere Analyse der Interaktion in der Wurzel, dass die Balance zwischen *P. indica* und seinem Wirt zusätzlich zu bereits beschriebenen Faktoren auf der einen Seite durch Kompatibilitätsfaktoren wie Ethylen und auf der anderen Seite durch einen SA-abhängigen Abwehrmechanismus der Pflanze beeinflusst wird. Eine Verringerung der pflanzlichen Abwehrmechanismen ermöglichte vor allem zu späteren Interaktionszeitpunkten ein verstärktes Wachstum des Pilzes in der Wurzel, was auf eine aktive Limitierung des Pilzwachstums durch die Pflanze hindeutet.

In einem größeren Zusammenhang ergaben sich somit sowohl durch die molekularbiologischen als auch die morphologischen Studien dieser Arbeit neue Ansatzpunkte, die in weiterführenden Forschungsansätzen vertieft und zur Entwicklung neuer Strategien zur Eindämmung von pflanzlichen Pathogenen und für den nachhaltigen Pflanzenschutz genutzt werden können.

5.2 SUMMARY

The axenically cultivable, root-colonizing mutualistic fungus *Piriformospora indica* leads to a better growth of its hosts and induces systemic resistance against powdery mildew. In the present work, the influence of this fungus on barley (*Hordeum vulgare*) and *Arabidopsis thaliana* was investigated and helped to better understand the establishment of symbiosis and the induction of morphological changes and systemic resistance. Furthermore, the parallel investigation of the *P. indica*-interaction in the two plants allowed a comparison of the results from the agronomical important, monocotyledonous plant barley and the dicotyledonous model plant *Arabidopsis*.

The analysis of the *P. indica*-induced systemic resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Bgh*) in barley was performed using a transcriptome approach and allowed to identify *Bgh*- and *P. indica*-regulated genes. Potential resistance and compatibility factors identified during this approach were further characterized using TIGS (transient induced gene silencing). In *Arabidopsis*, the potential of *P. indica* to induce systemic resistance against powdery mildew (*Golovinomyces orontii*) was established for the first time at the institute during the course of this work. This allowed the functional analysis of signaling mutants. At the same time, the expression pattern of select genes in leaves of *P. indica*-colonized and non-colonized plants was monitored. In conclusion, the received results implicate that *P. indica*-induced systemic resistance follows similar patterns in the two analysed plants: First, the transcriptome approach in barley and the investigation of selected genes in *Arabidopsis* showed that colonization of plant roots with the endophyte is not leading to systemic changes in the expression of defence-related genes, which could explain the observed systemic resistance effect. Second, the results demonstrated that due to the colonization with *P. indica* both plants show a potentiated reaction, a so called priming-effect, after powdery mildew challenge. In barley, pathogen-responsive genes *PR-1b*, *PR-2* and *PR-5* and, additionally, a *HSP70* displayed a stronger induction after pathogen challenge whereas in *Arabidopsis* the JA-responsive *VSP1* showed a potentiated reaction. Third, the studies in course of this work revealed that in both plants NPR1 plays a role during *P. indica* induced systemic resistance. Furthermore, at least in *Arabidopsis*, JA-signaling components were found to be an essential factor during resistance induction. The involvement of NPR1 and JA-signaling components, together with the potentiated expression of defense-associated genes during *P. indica*-induced systemic resistance is a phenomenon reminiscent of rhizobacteria-induced systemic resistance (ISR). Looking for potential triggers of the *P. indica*-induced

systemic resistance, further studies indicated that fungal MAMPs on spores or hyphae might play an important role during resistance induction, as also autoclaved fungal material induces resistance. A chitooctamer as potential trigger was excluded.

In further studies, the influence of *P. indica* on the growth of its hosts was characterized in more detail. These analyses revealed that the growth-promoting effect of the fungus in barley takes about two weeks, before it gets visible. Looking onto root morphology, the fungus induces changes leading to a higher number of lateral roots and to a reduced main root length. Besides, the extent of the two effects is influenced by the concentration of the primary inoculum. In agreement with these results, *P. indica* also induces shorter main roots in *Arabidopsis*.

A detailed analysis of *P. indica* colonization-levels in different phytohormone signaling mutants revealed that the balance between *P. indica* and its host is shaped on the one hand by fungal compatibility factors like ethylene, allowing it to better colonize the plant, and on the other hand by plant defence-mechanisms depending on SA.

In a broader view, the results of this thesis revealed new aspects of the *P. indica* – plant symbiosis which will open new research areas, allowing to better understand e. g. the maintenance of the primed state. Additionally, the results might be used to develop new strategies to improve plant protection methods and to support a sustainable agriculture.

6 QUELLENVERZEICHNIS

6.1 VERZEICHNIS DER WICHTIGSTEN INTERNETSEITEN

www.arabidopsis.org: TAIR-Datenbank
www.bioconductor.org: *Open-source* Softwareprojekt für die Analyse und Zusammenstellung genomischer Daten, R als Plattform
www.plexdb.org: Sequenzen der Contigs und Singletons auf dem Affymetrix Barley1 GeneChip®, weitere Mikroarrayexperimente
www.ncbi.nlm.nih.gov: *National Center for Biotechnology Information*, Pubmed und BLAST-Programme
www.ebi.ac.uk: Alignment- und Proteinanalyseprogramme

6.2 LITERATURVERZEICHNIS

- ACHATZ B. (2006). Untersuchungen zum Einfluss des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf das Wachstum von *Hordeum vulgare*, die Resistenz gegen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* und die Genexpression in den Blättern. Dissertationsschrift. Philipps-Universität, Marburg, Deutschland.
- ACHATZ B, VON RÜDEN S, ANDRADE D, NEUMANN E, PONS-KÜHNEMANN J, KOGEL KH, FRANKEN P & WALLER F. (eingereicht). Root colonisation by *Piriformospora indica* enhances grain yield in barley under diverse nutrient regimes by accelerating plant development. *Plant Soil*. eingereicht.
- ADAM L & SOMERVILLE SC. (1996). Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 9:341-356.
- ADAM L, ELLWOOD S, WILSON I, SAENZ G, XIAO S, OLIVER RP, TURNER JG & SOMERVILLE S. (1999). Comparison of *Erysiphe cichoracearum* and *E. cruciferarum* and a survey of 360 *Arabidopsis thaliana* accessions for resistance to these two powdery mildew pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*. 12:1031-1043.
- AGRIOS GN. (1997). *Plant Pathology* 4th edn. Academic Press. San Diego, USA.
- AHN IP, KIM S & LEE XH. (2005). Vitamin B₁ functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiol*. 138:1505-1515.
- AHN IP, LEE SW & SUH SC. (2007). Rhizobacteria-induced *Priming* in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Plant Physiol*. 143:838-848.
- ALFANO G, IVEY MLL, CAKIR C, BOS JIB, MILLER SA, MADDEN LV, KAMOUN S & HOITINK HAJ. (2007). Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathol*. 97:429-437.
- ALLEN MF, MOORE JTS & CHRISTENSEN M. (1980). Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae I: cytokinin increases in the host plant. *Can J Bot*. 58:371-374.
- ALLEN MF, MOORE JTS & CHRISTENSEN M. (1982). Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae II: altered levels of gibberellin-like substances and abscisic-acid in the host plant. *Can J Bot*. 60:468-471.
- ALLEN JW & SHACHAR-HILL Y. (2009). Sulfur transfer through an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol*. 149:549-560.
- ALONSO JM, HIRAYAMA T, ROMAN G, NOURIZADEH S & ECKER JR. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*. 284:2148-2152.
- ALVAREZ ME. (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol*. 44:429-442.

- ASSAAD FF, QIU JL, YOUNGS H, EHRHARDT D, ZIMMERLI L, KALDE M, WANNER G, PECK SC, EDWARDS H, RAMONELL K, SOMERVILLE CR & THORDAL-CHRISTENSEN H. (2004). The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Mol Biol Cell*. 15:5118-5129.
- AUDENAERT K, PATTERY T, CORNELIS P & HÖFTE M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol Plant Microbe Interact*. 15:1147-1156.
- AZCÓN-AGUILAR C, PADILLA IG, ENCINA CD, AZCÓN R & BAREA JM. (1996). Arbuscular mycorrhizal inoculation enhances plant growth and changes root system morphology in micro-propagated *Annona cherimola*. *Mill Agronomie*. 16:647-652.
- AZCÓN-AGUILAR C & BAREA JM. (1997). Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae*. 68:1-24.
- BAGO B, PFEFFER PE, ABUBAKER J, JUN J, ALLEN JW, BROUILLETTE J, DOUDS DD, LAMMERS PJ & SHACHAR-HILL Y. (2003). Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol*. 131:1496-1507.
- BAKKER PAHM, PIETERSE CMJ & VAN LOON LC. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol*. 97:239-243.
- BALAGUE C, LIN B, ALCON C, FLOTTES G, MALMSTROM S, KOHLER C, NEUHAUS G, PELLETIER G, GAYMARD F & ROBY D. (2003). HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell*. 15:365-379.
- BALTRUSCHAT B, FODOR J, HARRACH BD, NIEMCZYK E, BARNA B, GULLNER G, JANECZKO A, KOGEL KH, 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.
- BARAZANI O, BENDEROTH M, GROTEN K, KUHLEMEIER C & BALDWIN IT. (2005). *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* increase growth performance at the expense of herbivore resistance in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia*. 146:234-243.
- BARAZANI O, VON DAHL CC & BALDWIN IT. (2007). *Sebacina vermifera* promotes the growth and fitness of *Nicotiana attenuata* by inhibiting ethylene signalling. *Plant Physiol*. 144:1223-1232.
- BARI R & JONES JDG. (2008). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol*. 69:473-488.
- BECHINGER C, GIEBEL KF, SCHNELL M, LEIDERER P, DEISING HB & BASTMEYER M. (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science*. 285:1896-1899.
- BECKERS GJM & SPOEL SB. (2006). Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biol*. 8:1-10.
- BECKERS GJM, JASKIEWICS M, LIU Y, UNDERWOOD WR, HE SY, ZHANG S & CONRATH U. (2009). Miogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full *Priming* of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 21:944-953.
- BELL E & MULLET JE. (1993). Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol*. 103, 1133-1137.
- BENDER CL, ALARCON-CHAIDEZ F & GROSS DC. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63:266-292.

- BERGER S, BELL E & MULLET JE. (1996). Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of *Atvsp* in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* 111:525-531.
- BEßER K, JAROSCH B, LANGEN G & KOGEL KH. (2000). Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol Plant Pathol.* 1:277-286.
- BEßER K. (2001). Chemisch induzierte Resistenz im Pathosystem Gerste - Echter Gerstenmehltau: Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter Gene in der Gerste. Dissertationsschrift. Justus-Liebig Universität, Gießen, Deutschland.
- BLANCO F, SALINAS P, CECCHINI NM, JORDANA X, VAN HUMMELEN P, ALVAREZ MA & HOLUIGUE L. (2009). Early genomic responses to salicylic acid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 70:79-102.
- BLECHERT O, KOST G, HASSEL A, REXER KH & VARMA A. (1999). First remarks on the symbiotic interaction between *Piriformospora indica* and terrestrial orchids. In: Varma A & Hock B. (eds). *Mycorrhiza* 2ndedn. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 683-688.
- BLEECKER AB, ESTELLE MA, SOMERVILLE C & KENDE H. (1988). Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 241:1086-1089.
- BOUCHEZ O, HUARD C, LORRAIN S, ROBY D & BELAGUÉ C. (2007). Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the *Arabidopsis* lesion mimic mutant *vad1*. *Plant Physiol.* 145:465-477.
- BOYD LA, SMITH PH, FOSTER EM & BROWN JKM. (1995). The effects of allelic variation at the *Mla* resistance locus in barley on the early development of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* and host responses. *Plant J.* 7:959-968.
- BRISSON LF, TENHAKEN R & LAMB C. (1994). Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell.* 6:1703-1712.
- BRUNDRETT M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev.* 79:473-495.
- BRUNNER F, ROSAHL S, LEE J, RUDD JJ, 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.
- BUCHER M. (2007). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol.* 173:11-26.
- BÜSCHGES R, HOLLRICHER K, PANSTRUGA R, SIMONS G, WOLTER M, FRIJTERS A, VAN DAELEN R, VAN DER LEE T, DIERGAARDE P, GROENENDIJK J, TOPSCH S, VOS P, SALAMINI F & SCHULZE-LEFERT P. (1997). The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell.* 88:695-705.
- BYTH HA, KUUN KG & BORNMAN L. (2001). Virulence-dependent induction of Hsp70/Hsc70 in tomato by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol Biochem.* 39:697-705.
- CAO H, BOWLING SA, GORDON S & DONG X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 6:1583-1592.
- CAO H, GLAZEBROOK J, CLARK JD, VOLKO S & DONG X. (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell.* 88:57-63.
- CARVER TLW, KUNOH H, THOMAS GJ & NICHOLSON RL. (1999). Release and visualisation of the extracellular matrix of conidia of *Blumeria graminis*. *Mycol Res.* 103:547-560.

- CHAE HS, FAURE F & KIEBER JJ. (2003). The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell*. 15:545-559.
- CHANDRAN D, TAI YC, HATHER G, DEWDNEY J, DENOUE C, BURGESS DG, AUSUBEL FM, SPEED TP & WILDERMUTH MC. (2009). Temporal global expression data reveal known and novel salicylate-impacted processes and regulators mediating powdery mildew growth and reproduction on Arabidopsis. *Plant Physiol*. 149:1435-1451.
- CHANG C & STADLER R. (2001). Ethylene hormone receptor action in Arabidopsis. *Bioessays*. 23:619-627.
- CHERN M, FITZGERALD HA, YADAV RC, CANLAS PE, DONG X & RONALD PC. (2001). Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis. *Plant J*. 27:101-113.
- CHERN M, FITZGERALD HA, CANLAS PE, NAVARRE DA & RONALD PC. (2005). Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol Plant Microbe Interact*. 18:511-520.
- 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.
- CHINI A, FONSECA S, FERNANDEZ G, ADIE B, CHICO JM, LORENZO O, GARCIA-CASADO G, LOPEZ-VIDRIERO I, LOZANO FM, PONCE MR, MICOL JL & SOLANO R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling. *Nature*. 448:666-671.
- CLARK TA, ZEYEN RJ, SMIKTH AG, BUSHNELL LJ, SZABO LJ & VANCE CP. (1993). Host response gene transcript accumulation in relation to visible cytological events during *Erysiphe graminis* attack in isogenic barley lines differing at the *ML-a* locus. *Physiol Mol Plant Pathol*. 43:283-298.
- CLOSE TJ, WANAMAKER SI, CALDO RA, TURNER SM, ASHLOCK DA, DICKERSON JA, WING RA, MUEHLBAUER GJ, KLEINHOF A & WISE RP. (2004). A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. *Plant Physiol*. 134:960-968.
- CONRATH U, PIETERSE CMJ & MAUCH-MANI B. (2002). *Priming* in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci*. 7:210-216.
- CONRATH U, BECKERS GJM, FLORS V, GARCIA-AGUSTIN P, JAKAB G, MAUCH F, NEWMAN MA, PIETERSE CMJ, POINSSOT B, POZO MJ, PUGIN A, SCHAFFRATH U, TON J, WENDEHENNE D, ZIMMERLI L & MAUCH-MANI B. (2006). *Priming*: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact*. 19:1062-1071.
- COQUOZ JL, BUCHALA AMPH & METRAUX JP. (1995). Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathol*. 85:1219-1224.
- CORDIER C, POZO MJ, BAREA JM, GIANINAZZI S & GIANINAZZI-PEARSON V. (1998). Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Plant Microbe Interact*. 11:1017-1028.
- CRUZ C, EGSGAARD H, TRUJILLO C, AMBUS P, REQUENA N, MARTINS-LOUCXAO MA & JAKOBSEN I. (2007). Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol*. 144:782-792.
- DANGL JL & JONES JDG. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411:826-833.

- DE TORRES M, MANSFIELD JW, GRABOV N, BROWN IR, AMMOUNEH H, TSIAMIS G, FORSYTH A, ROBATZEK S, GRANT M & BOCH J. (2006). *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 47:368-382.
- DE VLEESSCHAUWER D, CORNELIS P & HOFTE M. (2006). Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. *Mol Plant Microbe Interact.* 19:1406-1419.
- DE VLEESSCHAUWER D, DJAVAHEI M, BAKKER PAHM & HÖFTE M. (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated *Priming* for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiol.* 148:1996-2012.
- DEBROY S, THILMONY R, KWACK YB, NOMURA K & HE SY. (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:9927-9932.
- DEHNE HW. (1982). Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathol.* 72:1115-1119.
- DELANEY TP, UKNES S, VERNOOIJ B, FRIEDRICH L, WEYMANN K, NEGROTTO D, GAFFNEY T, GUR-RELLA M, KESSMANN H, WARD E & RYALST J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science.* 266:1247-1250.
- DESHMUKH S, HÜCKELHOVEN R, SCHÄFER P, IMANI J, SHARMA M, WEISS M, WALLER F & KOGEL KH. (2006). The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:18450-18457.
- DESHMUKH S & KOGEL KH. (2007). *Piriformospora indica* protects barley from root rot caused by *Fusarium graminearum*. *J Plant Dis Prot.* 114:263-268.
- DEWDNEY J, REUBER TL, WILDERMUTH MC, DEVOTO A, CUI J, STUTIUS LM, DRUMMOND EP & AUSUBEL FM. (2000). Three unique mutants of *Arabidopsis* identify eds loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *Plant J.* 24:205-218.
- DJONOVIC S, VARGAS WA, KOLOMIETS MV, HORNDESKI M, WIEST A & KENERLEY CM. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol.* 145:875-889.
- DONG X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol.* 7:547-552.
- DOUCHKOV D, NOWARA D, ZIEROLD U & SCHWEIZER P. (2005). A highthroughput gene-silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells. *Mol Plant Microbe Interact.* 18:755-761.
- DOYLE JJ & DOYLE JL. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12:13-15.
- DRUEGE U, BALTRUSCHAT H & FRANKEN P. (2007). *Piriformospora indica* promotes root formation in cuttings. *Scientia Horticulture.* 112:422-426.
- DUGARDEYN J & VAN DER STRAETEN D. (2008). Ethylene: fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant Sci.* 175:59-70.
- DURRANT WE & DONG X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 42:185-209.
- EDWARDS HH. (2002). Development of primary germ tubes by conidia of *Blumeria graminis* f. sp *hordei* on leaf epidermal cells of *Hordeum vulgare*. *Can J Bot.* 80:1121-1125.

- EICHMANN R, SCHULTHEIS H, KOGEL KH & HÜCKELHOVEN R. (2004). The barley apoptosis suppressor homologue Bax Inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:484-490.
- EICHMANN R & HÜCKELHOVEN R. (2008). Accommodation of powdery mildew fungi in intact Plant Cells. *J Plant Physiol.* 165:5-18.
- ELLIS C & TURNER JG. (2002). A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta.* 215:549-556.
- FARMER EE & RYAN CA. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell.* 4:129-134.
- FELLE HH, HERRMANN A, HANSTEIN S, HÜCKELHOVEN R & KOGEL KH. (2004). Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:118-123.
- FELLE HH, HERRMANN A, HÜCKELHOVEN R & KOGEL KH. (2005). Root-to-shoot signalling: apoplastic alkalisation, a general stress signal and defence factor in barley (*Hordeum vulgare*). *Protoplasma.* 227:17-24.
- FELLE HH, WALLER F, MOLITOR A & KOGEL KH. (akzeptiert). The mycorrhiza fungus *Piriformospora indica* induces fast root surface pH signalling and primes systemic alkalisation of the leaf apoplast upon powdery mildew infection. *Mol Plant Microbe Interact.* akzeptiert.
- FENG G, ZHANG FS, LI XL, TIAN CY, TANG C & RENGEL Z. (2002). Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mykorrhiza.* 12:185-190.
- FERRARI S, GALLETTI R, DENOUE C, DE LORENZO G, AUSUBEL FM & 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 Physiol.* 144:367-379.
- FLOR HH. (1955). Host-parasite interaction in flax rust - its genetic and other implications. *Phytopathol.* 45:680-685.
- FLOR HH. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol.* 9:275-296.
- FREIALDENHOVEN A, SCHERAG B, HOLLRICHER K, COLLINGE DB, THORDAL-CHRISTENSEN H & SCHULZE-LEFERT P. (1994). *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla12*-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell.* 6:983-994.
- GAFFNEY T, FRIEDRICH L, VERNOOIJ B, NEGROTTO D, NYE G, UKNES S, WARD E, KESSMANN H & RYALS J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science.* 261:754-756.
- GANGE AC. (2006). Insect-mycorrhizal interactions: patterns, processes, and consequences. In: Ohgushi T, Craig TP & Price PW (eds). *Indirect Interaction Webs: Nontrophic linkages through induced plant traits*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp 124-144.
- GAULIN E, DRAME N, LAFITTE C, TORTO-ALALIBO T, MARTINEZ Y, AMELINE-TORREGROSA C, KHATIB M, MAZARGUIL H, VILLALBA-MATEOS F, KAMOUN S, MAZARS C, DUMAS B, BOTTIN A, ESQUERRÉ-TUGAYÉ MT & RICKAUER M. (2006). Cellulose binding domains of a phytophthora cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell.* 18:1766-1777.
- GENGER RK, JURKOWSKI GI, MCDOWELL JM, LU H, JUNG HW, GREENBERG JT & BENT AF. (2008). Signaling pathways that regulate the enhanced disease resistance of *Arabidopsis* "defense, no death" mutants. *Mol Plant Microbe Interact.* 21:1285-1296.

- GERNNS H, VON ALTEN H & POEHLING HM. (2001). Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen - is a compensation possible? *Mycorrhiza*. 11:237-243.
- GJETTING T, HAGEDORN PH, SCHWEIZER P, THORDAL-CHRISTENSEN H, CARVER TL & LYNKJAER MF. (2007). Single-cell transcript profiling of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Mol Plant Microbe Interact*. 20:235-246.
- GLAWE AG. (2008). The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. 46:27-51.
- GLAZEBROOK J, ROGERS EE & AUSUBEL FM. (1996). Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics*. 143:973-982.
- GLAZEBROOK J, CHEN W, ESTES B, CHANG HS, NAWRATH C, MÉTRAUX JP, 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.
- GLAZEBROOK J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. 43:205-227.
- GOELLNER K & CONRATH U. (2008). *Priming*: it's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol*. 121:233-242.
- GÖRG R, HOLLRICHER K & SCHULZE-LEFERT P. (1993). Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. *Plant J*. 3:857-866.
- GÖRLACH J, VOLRATH S, KNAUF-BEITER G, HENGY G, BECKHOVE U, KOGEL KH, OOSTENDORP M, STAUB T, WARD E, KESSMANN H & RYALS J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*. 8:629-643.
- GOVINDARAJULU M, PFEFFER PE, JIN H, ABUBAKER J, DOUDS DD, ALLEN JW, BUCKING H, LAMMERS PJ & SHACHAR-HILL Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 435:819-823.
- GRANER A & ALTSCHMIED L. (2001). Gerste- ein Modell zur Erforschung komplexer Getreidegenome. *GenomXPress*. 1:5-12.
- GREENBERG JT & YAO N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant pathogen interactions. *Cell Microbiol*. 6:201-211.
- GUZMAN P & ECKER JR. (1990). Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*. 2:513-523.
- HAMMOND-KOSACK KE & JONES JD. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*. 8:1773-1791.
- HARA-NISHIMURA I & MATSUSHIMA R. (2003). A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum: a plant strategy against environmental stresses? *Curr Opin Plant Biol*. 6:583-588.
- HARLEY JL & SMITH SE. (1983). *Mycorrhizal symbiosis* ^{1st}edn. Academic Press. London.
- HARRISON MJ. (1999). Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 50:361-389.
- HAUCK P, THILMONY R & HE SY. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:8577-8582.
- HAUSE B & FESTER T. (2005). Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta*. 221:184-196.

- HEATH MC. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol.* 3:315-319.
- HEIN I, BARCISZEWSKA-PACAK M, HRUBIKOVA K, WILLIAMSON S, DINESEN M, SOENDERBY IE, SUNDAR S, JARMOLOWSKI A, SHIRASU K & LACOMME C. (2005). Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant Physiol.* 138:2155-2164.
- HEITZ T, BERGEY DR & RYAN CA. (1997). A gene encoding a chloroplasttargeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 114:1085-1093.
- HEJGAARD J, JACOBSEN S & SVENDSEN I. (1991). Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *FEBS Letters.* 291:127-131.
- HOWE GA. (2004). Jasmonates as signals in the wound response. *J Plant Growth Reg.* 23:223-237.
- HÜCKELHOVEN R & KOGEL KH. (1998). Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Mol Plant Microbe Interact.* 11:292-300.
- HÜCKELHOVEN R, FODOR J, PREIS C & KOGEL KH. (1999). Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with H₂O₂ but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119:1251-1260.
- HÜCKELHOVEN R, TRUJILLO M & KOGEL KH. (2000). Mutations in *Ror1* and *Ror2* genes cause modification of hydrogen peroxide accumulation in *mlo*-barley under attack from the powdery mildew fungus. *Mol Plant Pathol.* 1:287-292.
- HÜCKELHOVEN R & KOGEL KH. (2003). Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta.* 216:891-902.
- HÜCKELHOVEN R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol.* 45:101-127.
- IAVICOLI A, BOUTET E, BUCHALA A & METRAUX JP. (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interact.* 16:851-858.
- JABS T, TSCHÖPE M, COLLING C, HAHLBROCK K & SCHEEL D. (1997). Elicitor-stimulated ionfluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:4800-4805.
- JAKAB G, COTTIER V, TOQUIN V, RIGOLI G, ZIMMERLI L, METRAUX JP & MAUCH-MANI B. (2001). β-aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur J Plant Pathol.* 107:29-37.
- JAROSCH B, KOGEL KH & SCHAFFRATH U. (1999). The ambivalence of the barley *Mlo* locus: mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 12:508-514.
- JENSEN AB, RAVENTOS D & MUNDY J. (2002). Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in *Arabidopsis*. *Plant J.* 29:595-606.
- JOHAL GS & BRIGGS SP. (1992). Reductase activity encoded by the Hm1 disease resistance gene in maize. *Science.* 258:985-987.
- JONES JDG & DANGL JL. (2006). The plant immune system. *Nature.* 444:323-329.
- JØRGENSEN HJL, LUBECK PS, THORDAL-CHRISTENSEN H, NEERGAARD ED & SMEDEGAARD PETERSEN V. (1998). Mechanisms of induced resistance in barley against *Drechslera teres*. *Phytopathol.* 88:698-707.

- JUNG HW, TSCHAPLINSKI TJ, WANG L, GLAZEBROOK J & GREENBERG JT. (2009). *Priming in systemic plant immunity. Science.* 324:89-91.
- KAKU H, NISHIZAWA Y, ISHII-MINAMI N, AKIMOTO-TOMIYAMA C, DOHMAE N, TAKIO 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.
- KELLER H, HOHLFELD H, WRAY V, HAHLBROCK K, SCHEEL D & STRACK D. (1996). Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochem.* 42:389-396.
- KHATABI B, MOLITOR A, KANNANGARA G, LINDERMAYR C, DURNER J, VON WETTSTEIN D, KOGEL KH & SCHAEFER P. (eingereicht). A simplified transcript-based subtractive hybridization assay identifies ethylene as compatibility factor in mutualistic plant root-*Piriformospora indica* symbioses. *Plant J.* eingereicht.
- KIEBER JJ, ROTHENBERG M, ROMAN G, FELDMANN KA & ECKER JR. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell.* 72:427-441.
- KINKEMA M, FAN W & DONG X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell.* 12:2339-2350.
- KITA N, TOYODA H & SHISHIYAMA J. (1981). Chronological analysis of cytological responses in powdery-mildewed barley leaves. *Can J Bot.* 59:1761-1768.
- KLIEBENSTEIN DJ & ROWE HC. (2008). Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. *Plant Sci.* 174:551-556.
- KLOEK AP, VERBSKY ML, SHARMA SB, SCHOELZ JE, VOGEL J, KLESSIG DF & KUNKEL BN. (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana coronatine-insensitive (coi1)* mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J.* 26:509-522.
- KNOESTER M, PIETERSE CMJ, BOL JF & VAN LOON LC. (1999). Systemic resistance in Arabidopsis induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol Plant Microbe Interact.* 12:720-727.
- KOGEL KH, BECKHOVE U, DRESCHERS J, MÜNCH S & ROMME Y. (1994). The resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiol.* 106:1269-1277.
- KOGEL KH & LANGEN G. (2005). Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cell Microbiol.* 7:1555-1564.
- KOH S, ANDRE A, EDWARDS H, EHRHARDT D & SOMERVILLE S. (2005). *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. *Plant J.* 44:516-529.
- KOMBRINK E & SCHMELZER E. (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *Eur J Plant Pathol.* 107:69-78.
- KRAJINSKI F, BIELA A, SCHUBERT D, GIANINAZZI-PEARSON V, KALDENHOFF R & FRANKEN P. (2000). Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of *Mtaqp1* encoding a mercuryinsensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta.* 211:85-90.
- KRAJINSKI F, HAUSE B, GIANINAZZI-PEARSON V & FRANKEN P. (2002). *Mtha1*, a plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant Biol.* 4:754-761.
- KRISHNAMURTHY K & GNANAMANICKAM SS. (1997). Biological control of sheath blight of rice: induction of systemic resistance in rice by plant associated *Pseudomonas* spp. *Curr Sci.* 72:331-334.

- KRISHNAMURTHY K & GNANAMANICKAM SS. (1998). Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14: evaluation of marker gene and formulations *Biol Control* 13:158-165.
- KUMAR J, HÜCKELHOVEN R, BECKHOVE U, NAGARAJAN S & KOGEL KH. (2001). A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathol.* 91:127-133.
- KUNOH H, ITOH O, KOHNO M & ISHIZAKI H. (1979). Are primary germ tubes of conidia unique to *Erysiphe graminis*? *Annal Phytopathol Soc Japan.* 45:675-682.
- LAWTON K, WEYMANN K, FRIEDRICH L, VERNOOIJ B, UKNES S & RYALS J. (1995). Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Mol Plant Microbe Interact.* 8:863-870.
- LEAH R, TOMMERUP H, SVENDSEN I & MUNDY J. (1991). Biochemical and molecular characterisation of three barley seed proteins with antifungal properties. *J Biol Chem.* 266:1564-1573.
- LEON-REYES A, SPOEL SH, DE LANGE ES, ABE H, KOBAYASHI M, TSUDA S, MILLENAAR FF, WELSCHEN RAM, RITSEMA T & PIETERSE CMJ. (2009). Ethylene modulates the role of NPR1 in cross-talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol.* 149:1797-1809.
- LEWIS DH. (1985). Symbiosis and mutualism: crisp concepts and soggy semantics In: Boucher DH (ed). *The biology of mutualism*. Croom-Helm Ltd. London, UK. pp 29-39.
- LI J, BRADER G & PALVA ET. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell.* 16:319-331.
- LIU J, MALDONADO-MENDOZA I, LOPEZ-MEYER M, CHEUNG F, TOWN CD & HARRISON MJ. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J.* 50:529-544.
- LIVAK KJ & SCHMITTGEN TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ method. *Methods.* 25:402-408.
- LJUNG K, HULL AK, CELENZA J, YAMADA M, ESTELLE M, NORMANLY J & SANDBERG G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell.* 17:1090-1104.
- LOGEMANN J, SCHELL J & WILLMITZER L. (1987). Improved methods for the preparation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem.* 163:16-20.
- LORENZO O, PIQUERAS R, SANCHEZ-SERRANO JJ & SOLANO R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell.* 15:165-178.
- LORENZO O, CHICO JM, SANCHEZ-SERRANO JJ & 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.
- LORENZO O & SOLANO R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol.* 8:532-540.
- LUDWIG-MÜLLER J. (2000). Hormonal balance in plants during colonisation by mycorrhizal fungi. In: Kapulnik Y & Douds Jr DD (eds). *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. pp 263-287.
- MAKANDER R, ESSIG JS, SCHAPAUGH MA, TRICK HN & SHAH J. (2006). Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR1. *Mol Plant Microbe Interact.* 19:123-129.

- MALECK K, LEVINE A, EULGEM T, MORGAN A, SCHMID J, LAWTON KA, DANGL JL & DIETRICH RA. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics*. 26:403-410.
- MANAVELLA PA, DEZAR CA, BONAVENTURE G, BALDWIN IT & CHAN RL. (2008). HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses. *Plant J*. 56:376-388.
- MARSCHNER H & DELL B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil*. 159:89-102.
- MATSUSHIMA R, KONDO M, NISHIMURA M & HARA-NISHIMURA I. (2003). A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *Plant J*. 33:493-502.
- MAUCH F, MAUCH-MANI B & BOLLER T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol*. 88:936-942.
- MEZIANE H, VAN DER SLUIS I, VAN LOON LC, HÖFTE M & BAKKER PAHM. (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol Plant Pathol*. 6:177-185.
- MISHINA TE & ZEIER J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant J*. 50:500-513.
- MOLINA A, GÖRLACH J, VOLRATH S & RYALS J. (1999). Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance. *Mol Plant Microbe Interact*. 12:53-58.
- MURASHIGE T & SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
- NAWRATH C & MÉTRAUX JP. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell*. 11:1393-13404.
- NDAMUKONG I, ABDALLAT AA, THUROW C, FODE B, ZANDER M, WEIGEL R & GATZ C. (2007). SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGAfactors and suppresses JA-responsive *PDF1.2* transcription. *Plant J*. 50:128-139.
- NÜRNBERGER T, BRUNNER F, KEMMERLING B & PIATER L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev*. 198:249-266.
- NÜRNBERGER T & LIPKA V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol*. 6:1-10.
- NULTSCH W. (1996). *Allgemeine Botanik* ¹⁰edn. Thieme-Verlag. Stuttgart, New York.
- OELMÜLLER R. (2008). Interaction between *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana*: early plant signaling events involved in a beneficial symbiosis with a growth- and seed yield-promoting endophytic fungus. In: Matteo L, Woo S & Scala F (eds). *Biology of Molecular Plant-Microbe Interactions* Vol 6. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN.
- ONGENA M, JOURDAN E, ADAM A, PAQUOT M, BRANS A, JORIS B, ARPIGNY JL & THONART P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol*. 9:1084-1090.
- PAPADOPOULOU K, MELTON RE, LEGGETT M, DANIELS MJ & OSBOURN AE. (1999). Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:12923-12928.

- PARLEVLIET J. (2002). Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica*. 124:147-156.
- PARNISKE M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Rev.* 6:763-775.
- PENNINCKX IAMA, THOMMA BPHJ, BUCHALA A, METRAUX JP & BROEKAERT WF. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin. *Plant Cell*. 10:2103-2113.
- PESKAN-BERGHÖFER T, SHAHOLLARIA B, GIONG PH, HEHL S, MARKERTA C, BLANKE V, KOST G, VARMA A & 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.
- PETERHÄNSEL C, FREIALDENHOVEN A, KURTH J, KOLSCH R & SCHULZE-LEFERT P. (1997). Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *Plant Cell*. 9:1397-1409.
- PEYRONEL B, FASSI B, FONTANA A & TRAPPE JM. (1969). Terminology of mycorrhizae. *Mycologia*. 61:410-411.
- PFEFFER PE, DOUDS JR DD, BÉCARD G & SHACHAR-HILL Y. (1999). Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol*. 120:587-598.
- PHAM GH, KUMARI R, SINGH A, MALLA R, PRASAD R, SACHDEV M, KALDORF M, BUSCOT F, OELMÜLLER R, HAMPP R, SAXENA AK, REXER KH, KOST G & VARMA A. (2004a). Axenic culture of symbiotic fungus *Piriformospora indica*. In: Varma A, Abbot L, Werner D & Hampp R (eds). *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 593-612.
- PHAM GH, SINGH A, MALLA R, KUMARI M, PRASAD R, SACHDEV M, REXER KH, KOST G, LUIS P, KALDORF M, BUSCOT F, HERRMANN S, PESKAN T, OELMÜLLER R, SAXENA AK, DECLERCK S, MITTAG M, STABENTHEINER E, HEHL S & VARMA A. (2004b). Interaction of *Piriformospora indica* with diverse microorganisms and plants. In: Varma A, Abbot L, Werner D & Hampp R (eds). *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 237-264.
- PIETERSE CM, VAN WEES SC, HOFFLAND E, VAN PELT JA & VAN LOON LC. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*. 8:1225-1237.
- PIETERSE CM, VAN WEES SC, VAN PELT JA, KNOESTER M, LAAN R, GERRITS H, WEISBEEK PJ & VAN LOON LC. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10:1571-1580.
- PIETERSE CMJ, VAN PELT JA, TON J, PARCHMANN S, MUELLER MJ, BUCHALA AJ, MÉTRAUX JP & VAN LOON LC. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol Mol Plant Pathol*. 57:123-134.
- PIETERSE CMJ, LEON-RYES A, VAN DER ENT S & VAN WEES SCM. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chem Biol*. 5:308-316.
- PIFFANELLI P, ZHOU F, CASAIS C, ORME J, JAROSCH B, SCHAFFRATH U, COLLINS NC, PANSTRUGA R & SCHULZE-LEFERT P. (2002). The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol*. 129:1076-1085.
- POINSSOT B, VANDELLE E, BENTÉJAC M, ADRIAN M, LEVIS C, BRYGOO Y, GARIN J, SICILIA F, COUTOS-THÉVENOT P & PUGIN A. (2003). The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol Plant Microbe Interact*. 16:553-564.

- POLAND JA, BALINT-KURTI PJ, WISSER RJ, PRATT RC & NELSON RJ. (2008). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14:1360-1385.
- POZO MJ, CORDIER C, DUMAS-GAUDOT E, GIANINAZZI S, BAREA JM & AZCÓN-AGUILAR C. (2002). Localized vs. systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J Exp Bot.* 53:525-534.
- POZO MJ, VAN DER ENT S, VAN LOON LC & PIETERSE CMJ. (2008). Transcription factor MYC2 is involved in *Priming* for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 180:511-523.
- PRYCE-JONES E, CARVER T & GURR SJ. (1999). The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 55:175-182.
- QUILIS J, PENAS G, MESSEGUER J, BRUGIDOU C & SEGUNDO BS. (2008). The *Arabidopsis AtNPR1* inversely modulates defense responses against fungal, bacterial or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stress in transgenic rice. *Mol Plant Microbe Interact.* 21:1215-1231.
- RAI M, ACHARYA D, SINGH A & VARMA A. (2001). Positive growth responses of the medicinal plants *Spilantes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. *Mycorrhiza.* 11:123-128.
- RASMUSSEN HN & RASMUSSEN FN. (2009). Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos.* 118:334-345.
- RAUSCHER M, ADAM AL, WIRTZ S, GUGGENHEIM R, MENDGEN K & DEISING HB. (1999). PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J.* 19:625-633.
- REDMAN RS, DUNIGAN DD & RODRIGUEZ RJ. (2001). Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytol.* 151:705-716.
- REITZ M, RUDOLPH K, SCHRÖDER I, HOFFMAN-HERGARTEN S, HALLMAN J & SIKORA RA. (2000). Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Appl Environ Microbiol.* 66:3515-3518.
- REUBER TL, PLOTNIKOVA JM, DEWDNEY J, ROGERS EE, WOOD W & AUSUBEL FM. (1998). Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *Plant J.* 16:473-485.
- REYMOND P, WEBER H, DAMOND M & FARMER EE. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 12:707-720.
- RIDOUT CJ. (2009). Profiles in pathogenesis and mutualism: powdery mildews plant relationship. In: Deising H (ed). *Plant Relationship 2ndedn, The Mycota V.* Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. pp 51-68.
- 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.
- ROSS AF. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology.* 14:340-358.
- ROUHIER N, LEMAIRE SD & JACQUOT JP. (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol.* 59:143-166.
- ROULIN S, XU P, BROWN AHD & FINCHER GB. (1997). Expression of specific (1,3) β -glucanase genes in leaves of near-isogenic resistant and susceptible barley lines infected with the leaf scald fungus (*Rhynchosporium secalis*). *Physiol Mol Plant Pathol.* 50:245-261.

- RUSSELL J & BULMAN S. (2004). The liverwort *Marchantia foliacea* forms a specialized symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus*. *New Phytol.* 165:567-579.
- RYALS JA, NEUENSCHWANDER UH, WILLITS MG, MOLINA A, STEINER HY & HUNT MD. (1996). Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell.* 8:1809-1819.
- RYAN CA. (1990). Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 28:425-449.
- RYAN CA. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta.* 1477:112-121.
- RYU CM, FARAG MA, HU CH, REDDY MS, KLOEPPER JW & PARÉ PW. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134:1017-1026.
- SAHAY NS & VARMA A. (1999). *Piriformospora indica*: a new biological hardening tool for micropropagated plants. *FEMS Microbiol Lett.* 181:297-302.
- SAHAY NS & VARMA A. (2000). Biological approach towards increasing the survival rates of micropropagated plants. *Curr Sci.* 78:126-129.
- SANDERS PM, LEE PY, BIESGEN C, BOONE JD, BEALS TP, WEILER EW & GOLDBERG RB. (2000). The Arabidopsis *DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell.* 12:1041-1062.
- SCHÄFER P, KHATABI B & KOGEL KH. (2007). Root cell death and systemic effects of *Piriformospora indica*: a study on mutualism. *FEMS Microbiol Lett.* 275:1-7.
- SCHÄFER P & KOGEL KH. (2009). The sebacinoid fungus *Piriformospora indica*: an orchid mycorrhiza which may increase host plant reproduction and fitness. In: Deising H (ed). *Plant Relationship 2nd edn, The Mycota V.* Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 99-112.
- SCHÄFER P, PFIFFI S, VOLL LM, ZAJIC D, CHANDLER PM, WALLER F, SCHOLZ U, PONS-KÜHNEMANN J, SONNEWALD S, SONNEWALD U & KOGEL KH. (2009). Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *Plant J.* doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03887.x. E pub ahead of print.
- SCHAFFRATH U, ZABBAI F & DUDLER R. (2000). Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *Eur J Biochem.* 267:5935-5942.
- SCHARDL CL, LEUCHTMANN A & SPIERING MJ. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu Rev Plant Biol.* 55:315-340.
- SCHIFFER R, GÖRG R, JAROSCH B, BECKHOVE U, BAHRENBERG G, KOGEL KH & SCHULZE-LEFERT P. (1997). Tissue dependence and differential cordycepin sensitivity of race-specific resistance responses in the barley-powdery mildew interaction. *Mol Plant Microbe Interact.* 10:830-839.
- SCHLÖSSER E. (1997). *Allgemeine Phytopathologie.* Georg Thieme Verlag. Stuttgart.
- SCHÜßLER A, SCHWARZOTT D & WALKER C. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol Res.* 105:1413-1421.
- SCHULTHEIß H. (2003a). Identifizierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse von Determinanten der Suszeptibilität und Resistenz im Pathosystem Gerste/Echter Gerstenmehltaupilz. Dissertationsschrift. Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland.
- SCHULTHEIß H, DECHERT C, KIRALY L, FODOR J, MICHEL K, KOGEL KH & HÜCKELHOVEN R. (2003b). Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Sci.* 165:1275-1280.
- SCHULZ B & BOYLE C. (2005). The endophytic continuum. *Mycol Res.* 109:661-686.

- SCHULZE-LEFERT P & VOGEL J. (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci.* 5:343-348.
- SCHWEIZER P, BUCHALA A & MÉTRAUX JP. (1997). Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Physiol.* 115:61-70.
- SCHWEIZER P, POKORNY J, ABDERHALDEN O & DUDLER R. (1999). A transient assay system for the functional assessment of defence-related genes in wheat. *Mol Plant Microbe Interact.* 12:647-654.
- SCHWEIZER P, KMECL A, CARPITA N & DUDLER R. (2000). A soluble carbohydrate elicitor from *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is recognized by a broad range of cereals. *Physiol Mol Plant Pathol.* 56:157-167.
- SCHWESSINGER B & ZIPFEL C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 11:389-395.
- SEGARRA G, VAN DER ENT S, TRILLAS I & PIETERSE CMJ. (2009). MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol.* 11:90-96.
- SELOSSE MA, SETARO S, GLATARD F, RICHARD F, URCELAY C & WEISS M. (2007). Sebacinale are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytol.* 174:864-878.
- SERFLING A, WIRSEL SGR, LIND V & DEISING HB. (2007). Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. *Phytopathol.* 97:523-531.
- SHAHOLLARI B, VARMA A & OELMÜLLER R. (2005). Expression of a receptor kinase in *Arabidopsis* roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. *J Plant Physiol.* 162:945-958.
- SHAHOLLARI B, VADASSERY J, VARMA A & OELMÜLLER R. (2007). A leucine-rich repeat protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus *Piriformospora indica* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 50:1-13.
- SHARMA M, SCHMID M, ROTHBALLER M, HAUSE G, ZUCCARO A, IMANI J, KÄMPFER P, DOMANN E, SCHÄFER P, HARTMANN A & KOGEL KH. (2008). Detection and identification of bacteria intimately associated with fungi of the order Sebaciniales. *Cellular Microbiol.* 11:2235-2246.
- SHAUL O, GALILI S, VOLPIN H, GINZBERG I, ELAD Y, CHET I & KAPULNIK Y. (1999). Mycorrhiza-induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. *Mol Plant Microbe Interact.* 12:1000-1007.
- SHERAMETI I, SHAHOLLARI B, VENUS Y, ALTSCHMIED L, VARMA A & OELMÜLLER R. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. *J Biol Chem.* 280:26241-26247.
- SHERAMETI I, TRIPATHI S, VARMA A & OELMÜLLER R. (2008a). The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. *Mol Plant Microbe Interact.* 21:799-807.
- SHERAMETI I, VENUS Y, DRZEWIECKI C, TRIPATHI S, DAN VM, NITZ I, VARMA A, GRUNDLER FM & OELMÜLLER R. (2008b). PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant J.* 54:428-439.

- SHORESH M, YEDIDIA I & CHET I. (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathol.* 95:76-84.
- SILVERMAN P, SESKAR M, KANTER D, SCHWEIZER P, MÉTRAUX JP & RASKIN I. (1995). Salicylic acid in rice (biosynthesis, conjugation, and possible role). *Plant Physiol.* 108:633-639.
- SIRRENBERG A, GOEBEL C, GROND S, CZEMPINSKI N, RATZINGER A, KARLOVSKY P, SANTOS P, FEUSSNER I & PAWLOWSKI K. (2007). *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiol Plant.* 131:581-589.
- SMITH JA & MÉTRAUX JP. (1991). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* induces systemic resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Physiol Mol Plant Pathol.* 39:451-461.
- SON CL & SMITH SE. (1988). Mycorrhizal growth response: interactions between photon irradiance and phosphorus nutrition. *New Phytol.* 108:305-314.
- SPOEL SH, KOORNNEEF A, CLAESSENS SMC, KORZELIUS JP, VAN PELT JA, MUELLER MJ, BUCHALA AJ, MÉTRAUX JP, BROWN R, KAZAN K, VAN LOON LC, DONG X & PIETERSE CMJ. (2003). Npr1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell.* 15:760-770.
- SPOEL SH & DONG X. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe.* 3:348-351.
- STASWICK PE, SU W & HOWELL SH. (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:6837-6840.
- STASWICK PE, YUEN GY & LEHMAN CC. (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* 16:747-754.
- STASWICK PE & TIRYAKI I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 16:2117-2127.
- STEIN E, MOLITOR A, KOGEL KH & WALLER F. (2008). Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhiza fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiol.* 49:1747-1751.
- STEPANOVA AN, YUN J, LIKHACHEVA AV & ALONSO JM. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* 19:2169-2185.
- STINTZI A & BROWSE J. (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:10625-10630.
- STOKSTAD E. (2007). Deadly wheat fungus threatens world's breadbaskets. *Science.* 315:1786-1787.
- STOLZENBURG MC, AIST JR & ISRAEL HW. (1984). The role of papillae in resistance to powdery mildew conditioned by the *ml-o* gene in barley: correlative evidence. *Physiol Plant Pathol.* 25:337-346.
- STRAKER CJ. (1996). Ericoid mycorrhiza: ecological and host specificity. *Mycorrhiza.* 6:215-225.
- TAIZ L & ZEIGER E. (2000). *Physiologie der Pflanzen* 2nd edn. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, Berlin. Amerikanische Originalausgabe bei Sinauer Associates Inc, 1998.
- TAKAHASHI F, YOSHIDA R, ICHIMURA K, MIZOGUCHI T, SEO S, YONEZAWA M, MARUYAMA K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K & SHINOZAKI K. (2007). The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19:805-818.

- THINES B, KATSIR L, MELOTTO M, NIU Y, MANDAOKAR A, LIU G, NOMURA K, HE SY, HOWE GA & BROWSE J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature*. 448:661-665.
- THOMMA BPHJ, EGGERMONT K, PENNINCKX IAMA, MAUCH-MANI B, VOGELSANG R, CAMMUE BP & BROEKAERT WF. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:15107-15111.
- THORDAL-CHRISTENSEN H, ZHANG Z, WEI Y & COLLINGE DB. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants, H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J*. 11:1187-1194.
- THORDAL-CHRISTENSEN H, GREGERSEN PL & COLLINGE DB. (1999). The barley/*Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. In: Slusarenko A, Fraser R & van Loon K (eds). *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. pp 77-100.
- THORDAL-CHRISTENSEN H. (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol*. 6:351-357.
- TJAMOS SE, FLEMETAKIS E, PAPLOMATAS EJ & KATINAKIS P. (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Mol Plant Microbe Interact*. 18:555-561.
- TON J & MAUCH-MANI B. (2004). β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent *Priming* for callose. *Plant J*. 38:119-130.
- TON J, JAKAB G, TOQUIN V, FLORS V, IAVICOLI A, MAEDER MN, MÉTRAUX JP & MAUCH-MANI B. (2005). Dissecting the β -Aminobutyric Acid-Induced *Priming* Phenomenon in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 17:987-999.
- TORP J & JØRGENSEN JH. (1986). Modification of barley powdery mildew resistance gene *Ml-a12* by induced mutation. *Can J Genet Cytol*. 28:725-731.
- TORRES MA, DANGL JL & JONES JD. (2002). *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:517-522.
- TORRES MA, JONES JD & DANGL JL. (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet*. 37:1130-1134.
- TRAN H, FICKE A, ASIIMWE T, HOFTE M & RAAIJMAKERS JM. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol*. 175:731-742.
- TRUJILLO M, KOGEL KH & HÜCKELHOVEN R. (2004). Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in non-host interactions of cereals and inappropriate *formae speciales* of *Blumeria graminis*. *Mol Plant Microbe Interact*. 17:304-312.
- TSUCHISAKA A & THEOLOGIS A. (2004). Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol*. 136:2982-3000.
- VADASSERY J, RITTER C, VENUS Y, CAMEHL I, VARMA A, SHAHOLLARI B, NOVAK O, STRNAD M, LUDWIG-MÜLLER J & OELMÜLLER R. (2008). The role of auxin and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol Plant Microbe Interact*. 21:1371-1383.

- VADASSERY J, RANI S, DRZEWIECKI C, MITHOFER A, MAZARS C, SCHEEL D, LEE J & OELMÜLLER R. (2009a). A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of Arabidopsis seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *Plant J.* doi:10.1111/j.1365-3113X2009.03867. E pub ahead of print.
- VADASSERY J, TRIPATHI S, PRASAD R, VARMA A & OELMÜLLER R. (2009b). Monodehydroascorbate reductase 2 and dehydroascorbate reductase 5 are crucial for a mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and Arabidopsis. *J. Plant Physiol.* doi:10.1016/j.jplph.2008.12.016. E pub ahead of print.
- VAN BEL AJE & GAUPELS F. (2004). Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. *Mol Plant Pathol.* 5:495-504.
- VAN DER BIEZEN EA & JONES JDG. (1998). Plant disease resistance proteins and the “gene-for-gene” concept. *Trends Biochem Sci.* 23:454-456.
- VAN DER ENT S, VERHAGEN BWM, VAN DOORN R, BAKKER D, VERLAAN MG, PEL MJC, JOOSTEN RG, PROVENIERS MCG, VAN LOON LC, TON J & PIETERSE CMJ. (2008). MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146:1293-1304.
- VAN DER HOORN RAL & KAMOUN S. (2008). From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell.* 20:2009-2017.
- VAN HULTEN M, PELSER M, VAN LOON LC, PIETERSE CMJ & TON J. (2006). Costs and benefits of *Priming* for defense in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:5602-5607.
- VAN LOON LC, BAKKER PA & PIETERSE CM. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 36:453-483.
- VAN LOON LC, REP M & PIETERSE CMJ. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 44:135-162.
- VAN PEER R & SCHIPPERS B. (1992). Lipopolysaccharides of plantgrowth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Neth J Plant Pathol.* 98:129-139.
- VAN WEES SCM, LUIJENDIJK M, SMOORENBURG I, VAN LOON LC & PIETERSE CMJ. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on known defense-genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol Biol.* 41:537-549.
- VAN WEES SCM, VAN DER ENT S & PIETERSE CMJ. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol.* 11:443-448.
- VARGAS WA, DJONOVIC S, SUKNO SA & KENERLEY CM. (2008). Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *J Biol Chem.* 283:19804-19815.
- VARMA A, VERMA S, SUDHA, SAHAY N, BÜTEHORN B & FRANKEN P. (1999). *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth promoting root endophyte. *Appl Environ Microbiol.* 65:2741-2744.
- VARMA A, SINGH A, SUDHA, SAHAY N, SHARMA J, ROY A, KUMARI M, RANA D, THAKRAN S, DEKA D, BHARTI K, HUREK T, BLECHERT O, REXER KH, KOST G, HAHN A, MAIER W, WALTER M, STRACK D & KRANNER I. (2000). *Piriformospora indica*: an axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. In: Hock B (ed). *Mycota IX*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 123-150.
- VERHAGEN BW, GLAZEBROOK J, ZHU T, CHANG HS, VAN LOON LC & PIETERSE CM. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:895-908.

- VERMA S, VARMA A, REXER KH, HASSEL A, KOST G, SARBHOY A, BISEN P, BÜTEHORN B & FRANKEN P. (1998). *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*. 90:896-903.
- VOGEL J & SOMERVILLE S. (2002). Powdery mildew of Arabidopsis: a model for host-parasite interactions. In: Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ & Carver TLW (eds). *The powdery mildews - a comprehensive treatise*. The American Phytopathological Society. St Paul, MN. pp 161-168.
- VON RÖPENACK E, PARR A & SCHULZE-LEFERT P. (1998). Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J Biol Chem*. 272:9013-9022.
- VON RÜDEN S. (2002). Charakterisierung und Funktionsanalyse des chemisch induzierbaren Serin-Proteinaseinhibitors *Bci-7* in *Hordeum vulgare* L. Diplomarbeit. Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland.
- VRANOVA E, INZE D & VAN BREUSEGEM F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot*. 53:1227-1236.
- WALLER F, ACHATZ B, BALTRUSCHAT H, FODOR J, BECKER K, FISCHER M, HEIER T, HÜCKELHOVEN R, NEUMANN C, VON WETTSTEIN D, FRANKEN P & KOGEL KH. (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.
- WALLER F, MUKHERJEE K, DESHMUKH SD, ACHATZ B, SHARMA M, SCHÄFER P & KOGEL KH. (2008). Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related Sebaciniales species. *J Plant Physiol*. 165:60-70.
- WANG KLC, YOSHIDA H, LURIN C & ECKER JR. (2004). Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein. *Nature*. 428:945-950.
- WANG D, WEAVER ND, KESARWANI M & DONG X. (2005a). Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science*. 308:1036-1040.
- WANG YQ, OHARA Y, NAKAYASHIKI H, TOSA Y & MAYAMA S. (2005b). Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact*. 18:385-396.
- WANG B & QIU YL. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 16:299-363.
- WANG D, PAJEROWSKA-MUKHTAR K, CULLER AH & DONG X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol*. 17:1784-1790.
- WEI F, GOBELMAN-WERNER K, MORROLL SM, KURTH J, MAO L, WING R, LEISTER D, SCHULZE-LEFERT P & WISE RP. (1999). The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. *Genetics*. 153:1929-1948.
- WEISS M, SELOSSE MA, REXER KH, URBAN A & OBERWINKLER F. (2004). Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycol Res*. 108:1003-1010.
- WESTPHAL L, SCHEEL D & ROSAHL S. (2008). The *coi1-16* mutant harbors a second site mutation rendering PEN2 nonfunctional. *Plant Cell*. 20:824-826.
- WILDERMUTH MC, DEWDNEY J, WU G & AUSUBEL FM. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*. 414:562-571.

- WOESTE KE, YE C & KIEBER JJ. (1999). Two Arabidopsis mutants that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiol.* 119:521-530.
- XING S, ROSSO MG & ZACHGO S. (2005). ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 132:1555-1565.
- Xu P, Wang J & Fincher GB. (1992). Evolution and differential expression of the (1→3)-β-glucan endohydrolase encoding gene family in barley *Hordeum vulgare*. *Gene.* 120:157-165.
- YOO SD, CHO Y & SHEEN J. (2009). Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Sci.* doi:10.1016/j.tplants.2009.02.007. E pub ahead of print.
- YOSHIDA H, NAGATA M, SAITO K, WANG KL & ECKER JR. (2005). Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *BMC Plant Biol.* 10:5-14.
- YU D, LIU Y, FAN B, KLESSIG DF & CHEN Z. (1997). Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? *Plant Physiol.* 115:343-349.
- YU I-C, PARKER J & BENT AF. (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:7819-7824.
- YU I-C, FENGLER KA, CLOUGH SJ & BENT AF. (2000). Identification of Arabidopsis mutants exhibiting an altered hypersensitive response in gene-for-gene disease resistance. *Mol Plant Microb Interact.* 13:277-286.
- YUAN YX, ZHONG SH, LI Q, ZHU ZR, LOU YG, WANG LY, WANG JJ, WANG MY, LI QL, YANG DL & HE Z. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnol J.* 5:313-324.
- ZHOU N, TOOTLE TL & GLAZEBROOK J. (1999). Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell.* 11:2419-2428.
- ZHOU F, KURTH J, WEI F, ELLIOTT C, VALE G, YAHIAOUI N, KELLER B, SOMERVILLE S, WISE R & SCHULZE-LEFERT P. (2001). Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *Rar1*-independent signalling pathway. *Plant Cell.* 13:337-350.
- ZIMMERMANN MR, MAISCHAK H, MITHÖFER A, BOLAND W & FELLE HH. (2009). System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiol.* 149:1593-1600.
- ZIMMERLI L, JAKAB G, MÉTRAUX JP & MAUCH-MANI B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by beta-aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:12920-12925.
- ZIMMERLI L, MÉTRAUX JP & MAUCH-MANI B. (2001). β-aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 126:517-523.
- ZIPFEL C, ROBATZEK S, NAVARRO L, OAKELEY EJ, JONES JD, FELIX G & BOLLER T. (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature.* 428:764-767.
- ZIPFEL C, KUNZE G, CHINCHILLA D, CANIARD A, JONES JD, BOLLER T & FELIX G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell.* 125:749-760.

7 ANHANG

7.1 SEQUENZEN UND VEKTORKARTEN

7.1.1 SEQUENZEN UND PRIMER DER RNAi-KONSTRUKTE

Sequenzen und sequenzspezifische Primer der in die Gateway-RNAi-Kassette inserierten Fragmente von Contig23773_at und Contig23097_at.

Transformationssequenz C23773_at (Glutaredoxin) (474 bp)

GATGGAGCAGGTGACGAAGCTAGCGGGGACGCGGGCGGTGGTGATCTTCGGCATGAGCTCCTGCTGCATGTGC
CACACGGTGACGAGCCTCCTCCGGGATCTCGGGGCCAACCCGATGGTAGTGGAAGTGGACGAGGACCCTAGGG
GGAAGGAGATGGAGAAGGCGCTGGTGCGGCTCCTTGCCCGGAACCCCTGCTGTGCCGGTGGTGTTTCATCGGCGG
CAGGCTCGCCGGATGCACCGACAAGGTCATGTCCCTTCACCTCGGCGGCAAGCTTGTCCCGCTGCTTCGTAAT
GCAGGTGCTGTCTGGGTGTAGTGTCATGTGCATGGGAGGGCTTTGTAGATATTATGGGTGTAATGCATGCAGGT
GCTGCTTCGTATGCTACGTGTTCTCTGTTACCTTGATCAGGTGATGACGAAGACTAAGGCAAACCATGCAAG
TCGACGTGTCCGGTCAAGGTGTTACCCAATGTCCCA

Transformationssequenz C23097_at (unbekanntes Protein) (359 bp)

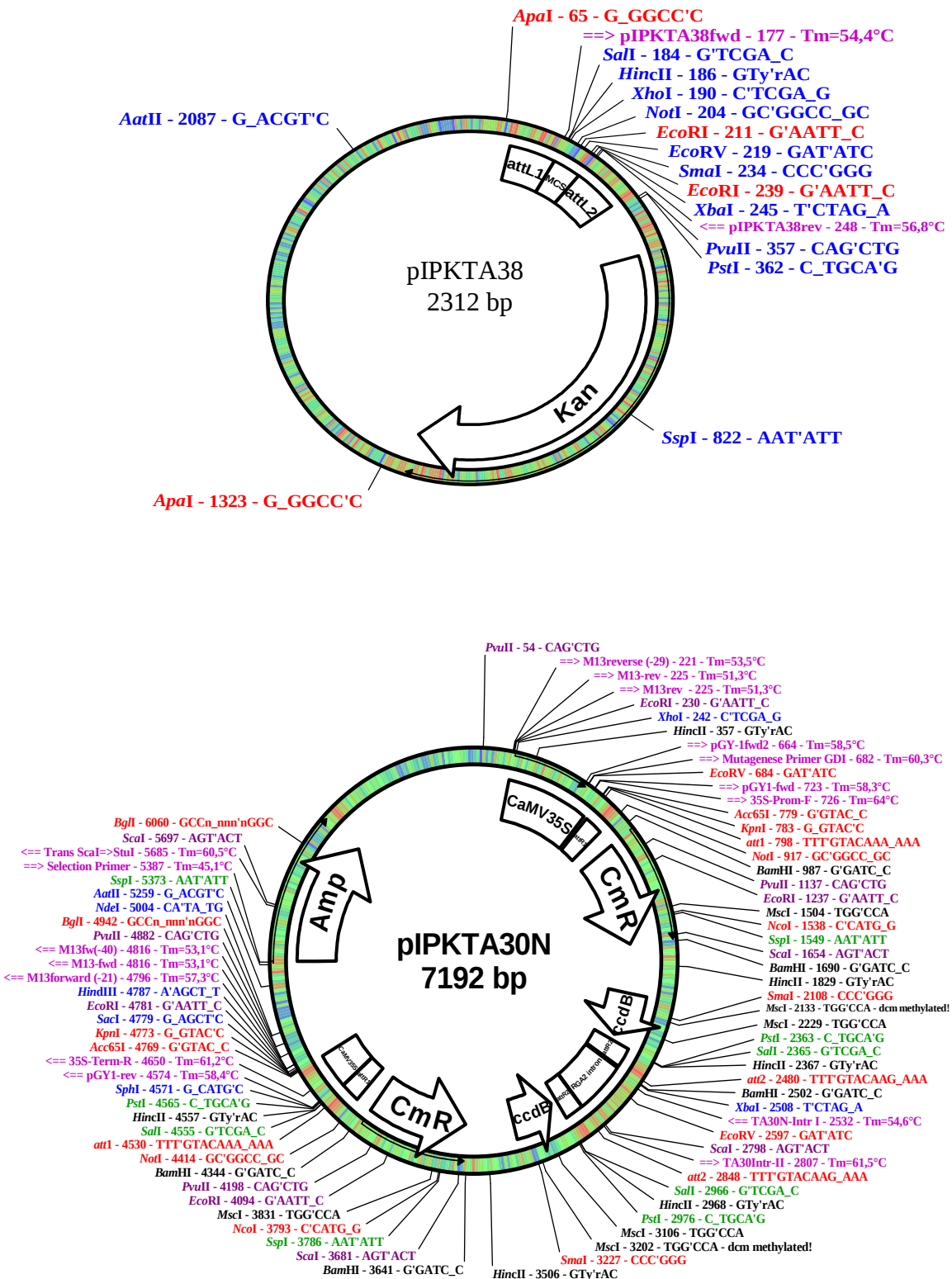
CACAAGCCCTGCTGAACCTCGAAACCTCAAGCTACGAAACACGAAGCAAGGACATCCGATTCTTTCCCTGA
AGATCAAAACCTGCTGTCTCCGTCTGCACCGCAACAACAGCGATTGCGGCGACGCGACGGCGTTGATGAGG
ATGGTGCTGCTGGTCTGTTCTTGCTGCTGATGCTCAACGTCATGACAGTCTCGGCGAGGACGTTGAAGGGGG
ACGCTGGCTCAAGGACGGCTTCGGGATGGTGATGGAGATGCTCGGCGACCTGAAATCAGGGTCCAGCCCTCC
CACGCACTGCTGCTGATCGATCAAGCAGACGGTTTTCTTCGGTTAGAAGATGTAAAGATGCGAGGC

Tabelle 7.1-1: Sequenzspezifische Primer für die RNAi-Fragmente von Contig23773_at und -23097_at. AT = Anlagerungstemperatur.

Bezeichnung	AT; Produkt- länge (bp)	Sequenz
TIGS-Primer Contig23773_at	63 °C 474 bp	Fwd 5'-GATGGAGCAGGTGACGAAG-3'
		Rev 5'-R TGGGACATTGGGTAACACCT-3'
TIGS-Primer Contig23097_at	60 °C 359 bp	Fwd 5'-CACAAGCCCTGCTGAACC-3'
		Rev 5'-GCCTCGCATCTTTACATCTTCT-3'

7.1.2 VEKTORKARTEN

Eingangs (*Entry*-) und Ziel (*Destination*)-Vektor pIPKTA38 bzw. pIPKTA30N zur Erstellung der RNAi-Konstrukte. Diese Vektoren wurden freundlicher Weise von R. Eichmann, TU München, D, zur Verfügung gestellt.



7.2 TRANSKRIPTOMANALYSE

Auf Grundlage der Transkriptomanalyse (vgl. Kap. 3.2.2) erstellte Listen potenziell durch *P. indica* systemisch regulierter Gene in Gerstenblättern ohne Stressfaktor (Tabelle 7.2-1) und nach Mehltauinokulation (Tabelle 7.2-2). Sequenzinformationen zu den einzelnen Contig-Nummern bzw. Singletons finden sich unter www.plexdb.org.

7.2.1 GC-RMA-LISTE *P. INDICA*-REGULierter GENE OHNE STRESSFAKTOR

Auflistung der laut der Mikroarrayanalysen (vgl. Kap. 3.2.2) ohne Pathogenstress durch *P. indica* systemisch in Gerstenblättern regulierten Transkripte.

Tabelle 7.2-1 A-C: Listen der laut Transkriptomanalyse ohne Pathogenstress durch *P. indica* systemisch regulierten Transkripte in Gerste. Die für die Analysen verwendeten Blattproben wurden parallel als Kontrollen zu mit *Bgh* behandelten Proben geerntet und tragen daher die Bezeichnungen 12, 24 und 96 hai. Diese Zeitpunkte beziehen sich auf die Erntezeitpunkte nach der *Bgh*-Inokulation. Diese erfolgte 19 Tage nach der Inokulation mit *P. indica*. Eine Sequenz auf dem Array galt als *P. indica* reguliert, wenn ein mindestens 1,5-facher Expressionsunterschied zwischen *P. indica*-kolonisierten und nicht kolonisierten Pflanzen ohne *Bgh*-Inokulation in allen drei unabhängigen Experimenten zu den Zeitpunkten 12 hai (Tabelle A), 24 hai (Tabelle B) oder 96 hai (Tabelle C) zu verzeichnen war. Für Sequenzen, die diesem Kriterium entsprachen, sind die aus den drei Experimenten errechneten mittleren Expressionsunterschiede zwischen *P. indica*-kolonisierten und nicht kolonisierten Pflanzen ohne bzw. mit *Bgh*-Inokulation zu den Zeitpunkten 12, 24 und 96 hai mit *Bgh* angegeben. Die Expressionsunterschiede des Zeitpunktes, nach dem selektiert wurde, sind fett hervorgehoben und hellgrau hinterlegt. hai: Stunden nach Inokulation mit *Bgh*; K: Kontrolle; P: *P. indica*-kolonisiert.

Tabelle 7.2-1 A: 12 hai Kandidaten: Vergleich P (12 hai) zu K (12 hai).

12 hai Kandidaten		Expressionsunterschiede P vs. K					
		ohne <i>Bgh</i>			mit <i>Bgh</i>		
Kandidaten	UniprotDesc (Barley_160 Annotation)	12 hai	24 hai	96 hai	12 hai	24 hai	96 hai
Contig17324_at	Cluster: Os02g0658200 protein	4,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Contig21173_at	Putative NPSN12; n=2; Oryza sativa	2,9	0,9	1,3	1,1	1,1	0,7
Contig13144_at	Exocyst subunit EXO70 family protein	2,6	0,9	1,4	0,8	1,1	0,8
Contig4131_at	OSIGBa0102D10.4 protein – O. sativa	2,3	0,7	1,2	1,3	1,0	0,8
Contig18017_at	Rep: UPI0000DC195F UniRef100 entry	2,3	0,8	1,3	1,3	1,0	1,0
HI05I11r_at		2,3	0,8	1,2	0,7	0,8	1,0
Contig12147_at	Cluster: Os02g0756800 protein	2,3	1,1	0,9	1,0	1,0	1,2
Contig8200_at	Rep: B0812A04.8 protein - Oryza sativa	2,2	0,8	1,4	1,1	1,0	1,2
Contig23984_at	far-red impaired response protein	2,2	1,2	1,1	1,0	0,9	1,1
Contig12046_at		2,2	0,8	1,3	1,6	1,2	0,9
Contig9422_at	Cluster: Os01g0173900 protein	2,1	0,7	1,0	0,9	1,0	0,9
Contig20418_at		2,1	1,0	1,1	0,6	1,1	1,2
HV_CEB0016L17r2_at		2,1	1,0	1,4	0,7	1,1	1,0
Contig18752_at	YbaK/prolyl-tRNA synthetase-like	2,1	0,6	1,2	1,1	1,0	1,0
Contig4534_s_at	Cluster: Os11g0174000 protein	2,1	0,8	1,2	1,0	1,0	1,0
Contig21140_at	Cluster: Putative serine/threonine kinase	2,1	1,0	1,1	1,0	1,0	1,1
HU05L13u_at	Cluster: Os01g0496900 protein	1,9	0,9	1,3	0,9	0,8	1,2
Contig20064_at		1,9	1,0	0,8	0,7	1,0	1,1
Contig7479_at	OSIGBa0106G07.8 protein – (Rice)	1,9	0,9	0,9	0,9	1,0	1,1
Contig12715_at	Putative myosin heavy chain-related	1,9	1,0	1,1	1,1	0,9	1,0
Contig15079_at	Mitochondrial ribosomal protein L5	1,9	0,4	1,5	0,7	1,1	1,2

Contig17926_at	Cluster: Hypothetical protein	1,9	0,8	1,1	1,0	0,9	0,9
Contig5640_at		1,9	1,3	1,3	1,0	1,1	1,2
Contig11368_at		1,8	0,8	1,1	1,3	1,1	1,0
Contig6447_at		1,8	1,0	1,2	1,1	1,0	0,9
Contig9570_s_at	Hypothetical protein OJ1735_C10.3	1,8	0,9	0,8	0,8	0,9	1,0
Contig14495_at	Hypothetical protein P0491F11.32	1,8	0,7	1,0	0,9	1,0	1,0
Contig15719_at	Cluster: Os09g0418000 protein	1,8	1,3	1,3	1,0	1,0	1,1
Contig21269_at	Os03g0737800 protein - Oryza sativa	1,8	1,0	1,2	0,8	1,0	1,2
Contig14838_at	Cluster: Putative cdc2 protein kinase	1,7	0,5	0,8	1,4	0,9	1,8
HVSMEL0010B09r2_at		1,7	1,3	1,2	1,6	0,7	1,5
Contig21865_at	Cluster: Yip1 domain containing protein	1,7	0,7	1,1	1,0	0,7	1,1
HV12A05u_s_at	Rep: Ferritin - Triticum aestivum	1,7	1,6	1,1	1,2	1,2	1,2
HT12E22u_s_at	Putative copper chaperone COX17-1	1,7	0,8	1,3	0,8	1,0	1,3
Contig18391_x_at	Cluster: Os01g0916800 protein	1,7	0,8	0,8	0,8	1,0	0,9
Contig13366_at	Cluster: Os09g0557700 protein	1,7	0,9	1,3	1,0	1,0	1,1
Contig16201_at	Cluster: Os07g0563000 protein	1,7	0,9	1,0	1,2	1,0	0,9
Contig1986_at	40S ribosomal protein S20 - Oryza sativa	1,7	1,1	1,1	1,2	0,9	1,1
Contig8896_s_at	Cluster: Os09g0381400 protein	1,7	1,6	1,9	1,9	1,0	0,5
Contig2915_at	UDP-D-glucuronate decarboxylase	1,7	0,8	1,1	0,9	0,9	1,1
Contig10165_at	Cluster: Os05g0513200 protein	1,7	0,8	1,2	1,0	1,1	1,4
Contig11661_at	Protein BUD31 homolog 1 – (Rice)	1,6	0,9	1,1	1,0	0,9	1,2
EBem08_SQ002_L02_s_at	Cluster: 60S ribosomal protein L5-1	1,6	0,9	0,9	1,4	1,0	0,9
Contig91_at		1,6	0,8	1,4	1,1	1,0	0,8
HD13B05r_s_at	S-like RNase - Triticum aestivum	1,6	1,3	1,1	1,3	1,5	1,1
Contig20757_at	OSIGBa0158F05.1 protein – (Rice)	1,6	0,9	1,1	1,0	0,9	1,2
Contig10397_at		1,6	1,2	0,8	1,0	0,9	1,1
HM02O03r_s_at	Cluster: Os01g0565900 protein	1,6	0,9	1,2	1,0	1,0	0,8
Contig9959_at	Cluster: Zinc finger protein-like	0,8	2,1	2,0	1,8	0,4	0,6
HVSMEH0080L10r2_x_at		0,6	1,2	0,7	1,0	1,1	1,9
Contig14053_at	Hypothetical protein P0623F08.34	0,6	0,9	1,0	0,9	1,1	1,0
Contig10409_at		0,6	1,1	1,0	1,3	1,0	1,0
EB-ro04_SQ003_G13_at	Hypothetical protein P0407A09.23	0,6	0,9	1,1	0,8	0,8	1,0
Contig6759_at	Putative Zn-finger transcription factor	0,6	1,3	1,1	0,7	0,9	1,1
Contig5804_at		0,6	0,9	0,9	1,3	1,2	1,1
Contig15116_at		0,6	0,6	1,1	0,7	0,9	1,4
Contig228_s_at		0,6	0,6	1,0	0,9	1,0	0,9
Contig9764_at	Cluster: Glutathione-S-transferase Cla47	0,6	1,0	1,1	0,7	1,2	1,0
HY08M06u_at		0,6	1,1	1,0	0,8	0,9	1,0
Contig2243_s_at	Hypothetical protein wrsi5-1 - (Wheat)	0,6	1,5	1,2	1,0	0,8	0,9
Contig6477_s_at	Pherophorin-C2 protein precursor	0,5	1,1	1,2	0,8	0,9	1,1
Contig16053_at	Hypothetical protein OSJNBa0093M23.4	0,5	1,5	1,0	1,3	0,9	1,1
Contig20426_at	Hypothetical protein	0,5	0,9	0,8	1,3	1,1	0,9
Contig2769_s_at	Germin-like protein 1 - (Barley)	0,5	0,6	0,7	1,0	1,2	2,4
Contig13172_at	Hypothetical protein OJ1607A12.9	0,5	0,9	0,8	1,3	1,0	1,0
HY08A19u_at	Cluster: Polygalacturonase PG1-like	0,5	0,8	0,9	0,7	1,0	1,0
Contig17515_at	Cluster: Putative serine/threonine kinase	0,5	0,9	1,0	0,7	0,9	0,9
Contig6_x_at		0,5	1,2	0,9	1,5	1,3	1,2
Contig837_x_at	Chlorophyll a-b binding protein 3C	0,5	1,3	1,1	2,1	1,1	1,0
Contig24930_at	Cluster: Putative beta-glycosidase	0,5	1,2	0,7	1,0	1,5	1,2
EB-ro04_SQ004_L16a_at		0,5	1,6	1,1	0,9	1,0	0,9
Contig5807_s_at		0,5	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
Contig4386_at	WRKY transcription factor - (Barley)	0,5	1,2	1,3	0,7	0,9	1,1

Contig9248_s_at		0,4	0,4	1,3	0,9	1,1	1,5
Contig13457_s_at	Hypothetical protein P0643A10.1	0,4	1,1	0,6	1,3	1,5	1,1
Contig11540_s_at	Cluster: Putative glycine rich protein	0,4	0,6	1,0	1,1	1,6	1,8
Contig7914_at		0,4	0,9	1,1	1,0	1,1	1,1
Contig7394_at	Beta-expansin TaEXPB3 - (Wheat)	0,4	0,7	0,8	1,4	1,4	0,9
baak26h09_x_at		0,4	1,3	1,1	1,9	1,2	0,9
Contig418_at	Chlorophyll a-b binding protein 3C	0,4	1,3	0,8	1,2	1,4	0,9
HVSMEb0006O01r2_at		0,4	1,6	1,0	1,0	1,4	1,1
Contig12793_at	Cluster: 50S ribosomal protein L12	0,4	1,2	0,8	0,8	1,8	1,0
Contig5585_s_at	Cluster: 50S ribosomal protein L18	0,4	1,6	0,7	0,9	1,7	0,8
HD04G07u_s_at	Putative protease inhibitor - (Barley)	0,3	1,4	2,2	1,0	1,2	1,1
HW02N10u_at	PREDICTED: hypothetical protein	0,3	1,1	1,2	0,7	1,0	0,8
Contig4976_at	Hypothetical protein B1097D05.32	0,3	3,4	1,5	0,8	1,0	1,0
HVSMEb0010E16r2_s_at	Putative CUT1	0,3	0,6	1,1	0,7	1,1	1,3
Contig422_at		0,2	2,0	1,0	1,1	1,6	0,9
Contig425_at	Chlorophyll a-b binding protein 3C	0,2	1,6	1,0	1,5	1,3	1,0

Tabelle 7.2-1 B: 24 hai Kandidaten: Vergleich P (24 hai) zu K (24 hai).

24 hai Kandidaten		Expressionsunterschiede P vs. K					
		ohne Bgh			mit Bgh		
Kandidaten	UniprotDesc (Barley_160 Annotation)	12 hai	24 hai	96 hai	12 hai	24 hai	96 hai
Contig2416_at	Hypothetical protein Ose705 – (Rice)	0,9	4,4	0,9	1,7	1,9	1,5
Contig11780_at	Hypothetical protein P0592G05.6	0,8	3,4	1,2	1,6	1,4	1,1
Contig12005_at	WRKY transcription factor - (Wheat)	0,7	2,6	1,4	0,7	0,8	1,2
Contig8597_at	OSIGBa0142I02-OSIGBa0101B20.3	0,9	2,4	0,6	1,6	1,9	1,4
Contig9398_s_at	Cluster: Os12g0428000 protein	0,7	2,3	1,0	1,4	1,7	1,6
Contig5128_s_at	OSIGBa0123D13.3 protein – (Rice)	0,9	2,1	1,1	0,7	1,0	1,1
Contig2643_at		0,8	2,1	1,1	1,1	1,0	0,9
Contig6380_at	Nucellin-like aspartic protease	1,0	2,0	2,1	1,4	1,2	1,1
Contig6526_at	Putative EREBP-like protein – (Rice)	0,8	2,0	0,9	1,0	1,2	1,1
HM05I23r_at		0,9	1,9	1,0	1,0	1,0	0,9
Contig20776_at		0,7	1,9	1,0	1,4	0,7	0,7
HU10A18u_at		0,7	1,9	0,8	0,8	0,7	0,9
Contig12913_s_at	Hypothetical protein OSJNBa0094J08.22	1,0	1,8	1,4	0,9	1,1	1,1
HVSMEb0022B10r2_at		0,8	1,8	0,6	0,9	1,0	1,1
Contig10162_s_at	Hypothetical protein P0426E02.8	1,2	1,8	0,7	1,2	1,4	1,1
Contig6229_s_at	Putative nematode-resistance protein	0,8	1,8	1,0	0,9	0,9	1,0
Contig20943_at		0,9	1,7	0,9	1,3	1,1	1,0
rbags18k24_x_at	50S ribosomal protein L17	0,8	1,7	0,8	1,2	1,3	0,9
Contig1247_at	Osr40c1 protein - Oryza sativa	1,5	1,6	1,9	1,0	1,4	1,1
HV14N20u_at		0,8	1,6	0,9	1,0	0,9	1,0
Contig5585_s_at	Cluster: 50S ribosomal protein L18	0,4	1,6	0,7	0,9	1,7	0,8
Contig15511_at	Cluster: Expressed protein	0,8	1,6	1,1	1,2	1,3	1,1
Contig4187_at	Alpha-galactosidase precursor - (Rice)	0,8	1,5	1,0	1,6	1,5	1,1
Contig14007_at		1,0	0,7	0,9	1,1	0,7	1,2
Contig14502_at	Cluster: Os11g0544800 protein	1,2	0,7	1,2	0,7	0,9	1,1
Contig3829_at	Cluster: Putative Serine/threonine Kinase	1,5	0,6	0,9	0,9	0,9	1,1
Contig1954_at	Serine-glyoxylate aminotransferase	0,8	0,6	0,8	1,1	0,8	0,8
Contig17960_at	Ice recrystallization inhibition protein 2	1,4	0,6	1,2	0,9	1,1	1,4
Contig6623_s_at	Sucrose-phosphate synthase 2 - (Wheat)	1,2	0,6	1,2	0,9	0,8	1,1
Contig25506_at		0,8	0,6	0,9	1,1	0,9	1,1
HX01N16w_s_at	Cluster: Putative WD repeat protein	1,2	0,6	1,1	0,9	1,6	1,2
Contig2446_x_at		1,2	0,6	0,8	0,8	1,0	1,0
HA08f06r_s_at	Cluster: Ribosomal protein L7	1,5	0,6	0,9	0,9	0,8	1,2

Contig23893_at		1.1	0.6	1.2	1.1	0.8	0.7
Contig7760_at	Cluster: Expressed protein	1.1	0.6	1.0	1.0	0.9	1.0
HW04D13u_at		1.0	0.5	0.7	0.7	0.9	1.4
rbags19e09_s_at		1.2	0.5	0.6	1.1	0.8	0.9
Contig13447_s_at	Cluster: Os03g0824100 protein	1.0	0.5	0.8	1.0	1.1	1.1
HVSMec0005O17f_x_at		1.1	0.5	0.6	0.9	1.3	0.9
Contig23526_at	Beta-fructofuranosidase - (Maize)	0.7	0.5	0.9	1.0	1.0	1.0
EBpi03_SQ003_J22_at	Calmodulin-binding family protein	0.6	0.5	1.3	0.8	0.8	0.8
HZ65P03r_at	LigA - Anaeromyxobacter dehalogenans	1.1	0.5	1.0	1.0	1.3	1.0
Contig18036_at	Cluster: Os01g0661600 protein	0.9	0.5	0.6	1.2	1.0	0.9
Contig9229_at	Cluster: Os01g0769000 protein	1.1	0.5	1.2	1.3	1.1	1.6
Contig11099_at	Cluster: Putative SL-TPS/P	1.0	0.5	1.2	1.0	1.0	1.1
Contig8986_at	Putative AT-Hook DNA-binding protein	0.8	0.5	1.2	1.8	0.9	0.8
Contig741_at	Putative eukaryotic initiation factor SU	1.0	0.5	0.9	1.2	1.0	1.0
Contig15079_at	Mitochondrial ribosomal protein L5	1.9	0.4	1.5	0.7	1.1	1.2
Contig2670_x_at	Xyloglucan endotransglycosylase	0.7	0.4	0.7	0.9	1.2	2.4
Contig10600_s_at	Os03g0295600 protein	1.1	0.4	0.5	0.8	1.1	1.0
Contig8247_at	Branched-chain aa aminotransferase	1.0	0.3	0.8	0.6	1.0	0.8
Contig3675_at	Alpha-expansin EXPA2 - (Wheat)	0.7	0.3	1.1	1.1	1.0	0.9

Tabelle 7.2-1 C: 96 hai Kandidaten: Vergleich P (96 hai) zu K (96 hai).

96 hai Kandidaten		Expressionsunterschiede P vs. K					
		ohne Bgh			mit Bgh		
Kandidaten	UniprotDesc (Barley_160 Annotation)	12 hai	24 hai	96 hai	12 hai	24 hai	96 hai
Contig3097_at	Allene oxide synthase – (Barley)	1,2	1,2	2,4	0,9	1,0	2,8
Contig7739_at	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2	1,6	1,0	2,4	0,7	0,8	1,2
HV10O20u_x_at		1,0	0,9	2,2	0,9	0,9	1,1
rbags11h24_s_at	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2	1,0	1,0	2,1	0,5	1,0	1,3
Contig6380_at	Cluster: Nucellin-like aspartic protease	1,0	2,0	2,1	1,4	1,2	1,1
Contig26235_at		1,7	1,3	2,1	1,1	1,1	0,7
HR01G01r_at	Cluster: Putative cytochrome	1,1	0,9	2,1	1,3	0,8	1,0
HZ01K16u_s_at	Cluster: Putative blue copper protein	0,8	0,8	2,1	0,8	0,9	1,6
Contig11332_at	major facilitator superfamily antiporter	2,4	1,1	2,1	1,1	1,0	1,5
Contig9959_at	Cluster: Zinc finger protein-like	0,8	2,1	2,0	1,8	0,4	0,6
Contig19197_at		0,7	0,9	2,0	0,7	1,2	1,0
Contig7354_at	Cluster: Putative NADPH dehydrogenase	1,0	0,5	2,0	0,8	0,9	0,9
Contig8896_s_at	Cluster: Os09g0381400 protein	1,7	1,6	1,9	1,9	1,0	0,5
Contig13658_at	Cluster: Os07g0683200 protein	1,0	0,9	1,9	0,9	0,8	1,3
Contig10522_at	Fibroin heavy chain - like protein	1,2	1,1	1,8	1,0	0,9	1,5
Contig18372_at	Rep: OSJNBa0042I15.23 protein - (Rice)	1,0	1,2	1,8	1,0	0,6	0,9
Contig8354_at	Rep: Putative Pti1-like kinase - (Maize)	1,0	0,8	1,7	1,0	1,2	1,0
Contig5528_at	AMP-binding enzyme family protein	1,0	1,1	1,7	0,9	1,1	1,2
Contig6782_at	Fasciclin-like protein FLA15 -(Wheat)	0,8	0,5	1,6	0,7	0,9	1,3
HR01A09u_at	Cluster: Os10g0577600 protein	1,2	0,9	1,5	0,9	0,9	1,1
Contig10887_at	Cluster: OSJNBa0040D17.13 protein	0,9	0,5	1,5	0,8	1,2	0,9
Contig14621_at	Cluster: Os01g0612700 protein	0,9	0,8	1,5	1,4	0,9	1,0
Contig8505_s_at		1,9	1,0	1,5	1,0	0,9	1,0
Contig21281_at	Hypothetical protein P0576F08.30	1,0	0,9	0,6	1,3	1,2	0,6
Contig12545_at	Rep: H0410G08.9 protein - Oryza sativa	0,8	1,2	0,6	1,2	1,2	1,3
Contig11556_s_at	Rep: OSIGBa0130O15.5 protein	1,2	0,8	0,6	0,7	0,9	1,2
HT12G07u_s_at	Asparaginyl endopeptidase REP-2 (Rice)	1,3	0,8	0,6	0,9	1,0	1,0
rbags19e09_s_at		1,2	0,5	0,6	1,1	0,8	0,9
HW07N21u_at		1,0	0,7	0,5	1,0	1,2	1,0
Contig12100_at	Cluster: Expressed protein	0,6	1,2	0,5	1,0	1,2	0,8
Contig26439_at		1,6	1,3	0,5	1,0	1,2	0,9
Contig11270_at	CCAAT-box transcription factor-related	1,0	0,8	0,4	0,9	0,9	1,0
Contig594_x_at		0,6	0,5	0,2	1,4	1,0	1,9

7.2.2 GC-RMA-LISTE *P. indica*-REGULierter GENE NACH *Bgh*-INOKULATION

Auflistung der laut der Transkriptomanalyse (vgl. Kap. 3.2.2) 12, 24 und 96 Stunden nach Inokulation mit *Bgh* durch *P. indica* differenziell regulierten Transkripte im Gerstenblatt.

Tabelle 7.2-2 A-C: Listen der laut Transkriptomanalyse nach *Bgh*-Inokulation durch *P. indica* systemisch regulierten Transkripte in Gerste. Die angegebenen Zeitpunkte (12, 24 und 96 hai) beziehen sich auf die Erntezeitpunkte nach der *Bgh*-Inokulation. Diese erfolgte 19 Tage nach der Inokulation mit *P. indica*. Selektionskriterium war ein mindestens 1,5-facher Expressionsunterschied zwischen *P. indica*-kolonisierten und nicht kolonisierten Pflanzen nach *Bgh*-Inokulation in allen drei unabhängigen Experimenten zu den Zeitpunkten 12 hai (Tabelle A), 24 hai (Tabelle B) oder 96 hai (Tabelle C). Für Sequenzen, die diesem Kriterium entsprachen, sind die aus den drei Experimenten errechneten mittleren Expressionsunterschiede zwischen *P. indica*-kolonisierten und nicht kolonisierten Pflanzen ohne bzw. mit *Bgh*-Inokulation zu den Zeitpunkten 12, 24 und 96 hai mit *Bgh* angegeben. Die Expressionsunterschiede des Zeitpunktes, nach dem selektiert wurde, sind fett hervorgehoben und hellgrau hinterlegt. Abkürzungen siehe Tabelle 7.2-1.

Tabelle 7.2-2 A: 12 hai + *Bgh* Kandidaten: *P* + *Bgh* (12 hai) zu *K* + *Bgh* (12 hai).

12 hai + <i>Bgh</i> Kandidaten		Expressionsunterschiede <i>P</i> vs. <i>K</i>					
		ohne <i>Bgh</i>			mit <i>Bgh</i>		
Kandidaten	UniprotDesc (Barley_160 Annotation)	12 hai	24 hai	96 hai	12 hai	24 hai	96 hai
Contig34_s_at	CI2D - Hordeum vulgare (Barley)	1,5	0,8	1,4	6,9	1,6	1,0
Contig1637_at	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII	0,7	1,7	1,0	4,7	2,5	2,0
Contig2787_s_at	Thaumatococcus-like protein TLP5	1,2	0,9	1,1	4,2	1,7	1,4
HVSME0003C15r2_s_at	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII	0,8	1,1	1,0	4,2	1,8	2,1
Contig2212_s_at	Pathogenesis-related protein PRB1-2	1,9	0,7	1,0	3,2	1,6	1,5
Contig1637_s_at	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII	1,3	1,0	1,0	3,2	1,6	1,9
HY03K23u_at	17.4 kDa class I heat shock protein 3	1,2	0,7	0,9	3,1	0,8	1,0
Contig2210_at	Pathogenesis-related protein PRB1-2	1,1	1,1	1,4	3,1	1,5	1,6
Contig873_s_at	Heat shock cognate 70 kDa protein	0,7	1,3	1,2	2,7	1,1	0,7
HVSME0004L13r2_s_at	Hypothetical protein P0015F11.13	0,7	1,2	0,8	2,4	1,1	1,0
HZ52M24r_s_at	Os11g0120600 protein – Oryza sativa	1,1	1,0	0,8	2,4	0,9	1,0
Contig22458_at		1,1	0,8	1,0	2,2	1,2	0,9
Contig7516_at	Os09g0437500 protein	0,9	1,2	1,0	2,1	1,1	0,9
Contig4707_at	Hypothetical protein P0015F11.13	0,5	1,5	1,0	2,1	1,4	1,0
Contig2474_at	Hypothetical protein P0410E03.33-1	1,2	0,9	1,0	2,1	1,1	1,1
Contig5508_at	Hydrolase, alpha/beta fold family protein	0,8	1,8	0,9	2,0	1,4	0,9
Contig11248_at	Dormancy/auxin associated protein	0,9	1,2	1,0	2,0	1,2	0,8
Contig13265_at	Hypothetical protein OSJNBa0041P03.5	0,9	1,3	1,3	2,0	1,0	0,9
HVSME0006F05r2_at		0,8	1,0	1,2	2,0	1,3	1,0
Contig2209_at	Pathogenesis-related protein PRB1-2	1,4	0,9	1,1	1,9	1,1	0,9
Contig10116_at		1,0	0,9	1,0	1,9	1,0	1,1
Contig7403_s_at	TA9 protein-like	1,7	0,8	1,5	1,9	1,2	1,2
Contig14709_at	Os01g0579800 protein	0,9	1,7	0,9	1,9	1,2	1,2
Contig1762_s_at	Auxin-repressed protein-like	0,9	2,4	1,3	1,9	1,7	1,1
HVSME0008L09r2_at	Hypothetical protein OSJNBb0026G06.13	1,1	0,8	0,9	1,9	1,1	0,8
rbags19n07_at		1,2	1,1	1,0	1,8	0,8	1,2
rbah58n17_s_at	Putative lipase	1,0	0,9	1,1	1,8	1,2	1,2
Contig5929_at	Hypoxia induced protein conserved region	1,1	1,6	0,8	1,7	1,6	1,0
Contig5465_at	Sec61beta family protein	1,2	0,9	1,1	1,7	1,3	1,0

Contig2214_s_at	Pathogenesis-related protein PRB1-2	1,4	1,0	1,1	1,7	1,1	0,9
Contig9767_at	Hypothetical protein OSJNBb0008A05.2	1,1	1,3	1,1	1,6	1,0	1,0
Contig17510_s_at	OSIGBa0140C02.4 protein - (Rice)	1,0	0,8	1,0	1,6	0,9	0,8
Contig9197_at	Shikimate kinase 2	1,0	1,0	1,5	0,6	1,0	0,7
Contig14490_at	GTP1/OBG family protein	0,9	1,3	0,7	0,6	1,0	1,0
HZ40O06r_at		0,9	1,1	0,6	0,6	0,9	1,5
Contig4603_at	Hypothetical protein P0431A02.22	0,9	0,8	1,0	0,6	1,0	0,9
Contig26263_at	Hypothetical protein OSJNBa0029C15.5	0,9	1,0	1,2	0,6	0,8	1,1
Contig13460_s_at	Putative phosphatase	1,0	0,7	1,2	0,6	0,7	1,0
Contig20165_at		0,9	0,6	0,9	0,6	1,0	1,0
HY10F06u_at		0,8	1,2	1,0	0,6	0,9	1,2
Contig7668_at		1,2	1,0	1,1	0,6	1,0	1,0
HV08I05u_s_at	Hypothetical protein OSJNBa0052M16.13	1,1	0,8	1,0	0,6	0,9	1,0
Contig9172_s_at	Germin-like protein 5a	0,9	1,2	1,0	0,6	1,0	1,1
Contig15230_at	Initiator-binding protein	0,7	1,0	1,0	0,6	1,0	1,0
HV_CEb0001N11r2_at	Nodulin family protein	1,3	1,0	1,3	0,6	1,3	0,8
HV03P03u_at		1,1	0,8	1,2	0,6	1,0	1,2
Contig5234_at	ASF/SF2-like pre-mRNA splicing factor SRP32	1,6	0,9	1,1	0,6	0,9	1,0
Contig16043_at	Genomic DNA, chromosome 3	1,0	1,0	1,0	0,6	0,8	1,2
Contig3366_at	Vacuolar processing enzyme	1,0	1,1	1,2	0,6	1,1	0,8
Contig14870_at	Putative trehalose-6-phosphate phosphatase	0,9	0,6	1,7	0,6	1,1	0,6
Contig6308_at	Putative CDP-diacylglycerol synthetase	0,9	1,0	1,0	0,6	0,9	1,1
Contig11983_at	Putative Avr9 elicitor response protein	0,9	0,8	0,8	0,6	0,9	1,2
Contig7577_at	OSIGBa0115K01-H0319F09.10 - (Rice)	1,0	0,8	0,8	0,6	0,8	1,0
Contig21793_at	C2H2-type zinc finger protein ZFP36	1,0	1,0	1,0	0,6	1,0	0,9
Contig25717_at	Zinc finger (C3HC4-type) family-like	1,0	0,9	1,1	0,5	1,0	1,1
Contig13682_at	Target of rapamycin - Zea mays (Maize)	1,2	0,7	1,5	0,5	1,1	1,3
Contig2206_at		1,2	1,0	0,8	0,5	1,1	0,9
Contig14040_at	Expressed protein	1,1	1,1	1,2	0,5	1,0	1,0
Contig21126_at	Os01g0175700 protein	1,1	1,0	1,0	0,5	1,1	0,9
Contig12473_at	Expressed protein	1,9	1,0	1,0	0,5	0,9	0,9
HV_CEb0022J21r2_at	OSJNBa0093F12.11 protein	1,0	1,0	1,0	0,5	1,2	1,2
HW08C04u_at	Hypothetical protein P0498C03.1	0,9	1,1	1,0	0,4	1,0	0,9
Contig23097_at	OSJNBa0038P21.18 protein	1,0	1,0	1,0	0,4	1,0	1,0
HV03G03u_at	Pirin, putative, expressed	0,6	1,0	1,0	0,3	1,0	1,0
HVSMEI0007O17r2_at		0,9	1,0	1,0	0,2	1,0	1,3

Tabelle 7.2-2 B: 24 hai + *Bgh* Kandidaten: Vergleich *P* + *Bgh* (24 hai) zu *K* + *Bgh* (24 hai).

24 hai + <i>Bgh</i> Kandidaten		Expressionsunterschiede <i>P</i> vs. <i>K</i>					
		ohne <i>Bgh</i>			mit <i>Bgh</i>		
Kandidaten	UniprotDesc (Barley_160 Annotation)	12 hai	24 hai	96 hai	12 hai	24 hai	96 hai
Contig2433_s_at	Putative acid phosphatase	1,0	2,9	1,7	1,4	3,6	2,3
Contig1071_s_at	Glycine-rich cell wall structural protein	0,8	1,5	0,9	1,8	2,8	1,5
Contig8679_at		0,9	1,8	1,0	1,7	2,4	1,1
Contig8678_s_at	Aspartate kinase-homoserine DH precursor	1,1	2,4	1,2	1,8	2,4	1,5
Contig1012_s_at	Chlorophyll a-b binding protein 3C	0,4	1,8	0,7	1,6	2,3	1,3
Contig16151_at	Os12g0438600 protein	1,0	1,8	0,7	2,0	2,3	1,1
Contig4273_at		1,0	1,9	1,5	1,4	2,1	1,0
Contig8597_at	OSIGBa0142I02-OSIGBa0101B20.3	0,9	2,4	0,6	1,6	1,9	1,4
Contig12407_at	Kelch repeat-containing F-box-like	0,5	2,2	0,9	1,1	1,8	1,1
Contig11957_at	Putative P450	1,0	2,2	1,3	1,2	1,7	1,3
HP01E21w_s_at	Expressed protein	0,8	1,2	1,4	1,3	1,7	0,8
HZ36B23r_at	Hyp. protein OJ1540_H01.11 - (Rice)	1,0	1,0	0,9	1,0	0,6	0,7

Contig11172_at	Os11g0120600 protein - Oryza sativa	1,0	0,9	1,0	0,8	0,6	1,1
Contig17156_at	Expressed protein	1,0	0,8	0,8	1,2	0,6	1,1
rbaal21f05_s_at	Cysteine proteinase precursor - (Barley)	1,0	0,7	0,7	0,6	0,6	1,3
Contig16623_at	Putative 50S ribosomal protein L20	1,0	0,8	1,1	1,0	0,6	1,0
Contig3392_at	Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase	1,3	0,7	1,0	0,7	0,5	1,0
Contig24328_at	Hypothetical protein P0438G07.127	0,8	1,5	1,1	0,6	0,5	1,0
Contig14311_at	Putative HGA1	1,0	1,0	1,2	1,0	0,5	2,1
Contig3901_s_at	Cysteine proteinase precursor - (Barley)	1,0	0,5	0,6	0,6	0,5	0,9
HA11P12u_s_at	Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase	1,2	0,5	1,3	0,5	0,4	1,0
Contig9959_at	Zinc finger protein-like	0,8	2,1	2,0	1,8	0,4	0,6

Tabelle 7.2-2 C: 96 hai + *Bgh* Kandidaten: Vergleich *P* + *Bgh* (96 hai) zu *K* + *Bgh* (96 hai).

96 hai + <i>Bgh</i> Kandidaten		Expressionsunterschiede <i>P</i> vs. <i>K</i>					
		ohne <i>Bgh</i>			mit <i>Bgh</i>		
Kandidaten	UniprotDesc (Barley_160 Annotation)	12 hai	24 hai	96 hai	12 hai	24 hai	96 hai
Contig14026_at	Putative NAM	0,9	1,0	0,9	0,7	0,9	2,3
Contig3873_at		1,2	0,7	0,8	0,9	1,1	2,1
Contig4459_at	Seed imbibition protein - (Barley)	0,8	1,3	1,0	1,1	1,4	1,8
Contig15186_at	OSIGBa0118P15.3 protein	1,2	0,5	0,8	1,3	0,7	1,8
Contig15820_at		0,9	1,0	1,4	1,0	1,3	1,8
Contig1168_at	Os01g0238900 protein	1,2	1,0	1,5	0,9	0,8	1,7
Contig7953_at	SPFH domain / Band 7 family	1,3	0,9	0,9	1,2	0,8	1,6
Contig16608_at	Hypothetical protein OSJNBa0032M14.22	0,9	1,1	0,7	1,2	0,9	1,6
Contig8462_at	Ubiquitin-conjugating enzyme-like	1,0	0,8	1,0	0,9	1,0	1,5
Contig20783_at	Cellulose synthase-like protein CslG	1,3	0,9	1,0	0,9	1,0	0,6
Contig4545_s_at	Hypothetical protein OJ1651_D06.1	1,4	1,0	0,8	1,5	1,0	0,6
Contig20159_at	Hypothetical protein OJ1123_G09.3	1,0	0,8	1,3	0,7	0,9	0,6
Contig4025_s_at	Adenosine 5'-phosphosulfate reductase 2	0,9	0,7	0,7	0,9	1,2	0,6
X93170_at	14-3-3-like protein B - (Barley)	1,9	1,5	1,1	0,9	1,1	0,6
HZ37P18r_at		1,0	0,8	1,1	1,0	0,9	0,6
Contig4024_at		0,8	0,7	0,5	0,9	1,1	0,5
Contig14243_at	Ser/thr-specific receptor protein kinase-like	1,0	1,0	1,0	1,5	1,3	0,5

7.3 AUFLISTUNG DER qPCR-ERMITTELTEN EXPRESSIONSWERTE AUS GERSTE

In den Tabellen 7.3.1 A bis H sind die qPCR-Ergebnisse aus den Einzelversuchen dieser Arbeit und die daraus berechneten mittleren Expressionsunterschiede in den Blättern durch *P. indica* kolonisierter und nicht kolonisierter Gerstenpflanzen für die Gene *PR-1b*, *PR-2*, *PR-5*, *HSP70*, *BCI-7* (Contig34_s_at), *HSP17.9* sowie ein Glutaredoxin (Contig23773_at) und Contig23097_at aufgeführt.

Tabelle 7.3-1 A-H: Zusammenstellung der qPCR-Ergebnisse für *PR-1b*, *PR-2*, *PR-5*, *HSP70*, *BCI-7* (Contig34_s_at), *HSP17.9*, Glutaredoxin (Contig23773_at) und Contig23097_at. Die Angaben sind jeweils normiert zur Variante *K* + *Bgh* 12 hai, die für alle Versuche zur Verfügung stand. Zusätzlich ist der relative Expressionsunterschied zwischen *P. indica*-kolonisierten und nicht-kolonisierten Pflanzen, jeweils mit bzw. ohne *Bgh*-Inokulation, für die einzelnen Beobachtungszeitpunkte als Mittelwert aus allen durchgeführten Versuchen mit Standardfehler (SF, n = Anzahl der Versuche) angegeben. Die Normalisierung erfolgte mit einem konstitutiv exprimierten Ubiquitin (Primer: Ubi60deg), außer Kinetik III, hier wurde auf drei konstitutive Gene (Primerpaare: Ubi60deg, HKGI, 18S) normalisiert. KT: kein Transkript nachweisbar; AE1-3: Mikroarrayexperimente I bis III; (AE3 = Kinetik I); K: Kinetik; Ge17: Gewächshausversuch Beate Achatz; hai: Stunden nach Inokulation mit *Bgh*.

Tabelle 7.3.1 A: qPCR-Ergebnisse für *PR-1b* (Barley1_02210 und _02212).

<i>PR-1b</i>		relative Expressionswerte (K + <i>Bgh</i> 12 hai = 1)						Expressionsunterschied <i>P</i> zu K ohne bzw. mit <i>Bgh</i>	
hai	Variante	AE1	AE2	AE3	KII	Ge17	KIII	Mittelwert	± SF
0	Kontrolle (K)				2,70		0,24	0,95	0,43
	<i>P. indica</i> (<i>P</i>)				4,20		0,08		
2	Kontrolle (K)				11,25		0,60	0,38	0,10
	<i>P. indica</i> (<i>P</i>)				2,68		0,31		
	K + <i>Bgh</i>				3,60		0,44	0,90	0,40
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>				5,28		0,14		
4	Kontrolle (K)			0,10	1,44		0,09	63,05	45,71
	<i>P. indica</i> (<i>P</i>)			1,20	2,63		15,07		
	K + <i>Bgh</i>			0,39	1,60		2,79	1,05	0,56
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>			0,28	3,79		0,13		
8	Kontrolle (K)			0,17	3,85		0,05	3,41	2,07
	<i>P. indica</i> (<i>P</i>)			0,65	2,92		0,46		
	K + <i>Bgh</i>			1,58	2,98		0,24	0,79	0,18
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>			0,62	2,44		0,28		
10	Kontrolle (K)				8,72		0,14	3,28	2,11
	<i>P. indica</i> (<i>P</i>)				2,61		0,85		
	K + <i>Bgh</i>				4,52		0,21	1,60	0,18
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>				8,34		0,29		
12	Kontrolle (K)	0,54	0,23	0,38	3,09	0,58	0,34	0,86	0,13
	<i>P. indica</i> (<i>P</i>)	0,49	0,32	0,39	2,26	0,43	0,13		
	K + <i>Bgh</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,38	1,24
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>	2,28	8,24	3,23	8,76	3,13	0,63		
14	Kontrolle (K)				1,19		0,80	1,38	0,59
	<i>P. indica</i> (<i>P</i>)				2,63		0,44		
	K + <i>Bgh</i>				56,12		6,42	1,53	0,12
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>				76,38		10,88		
16	Kontrolle (K)			0,43	0,73		0,48	1,34	0,90
	<i>P. indica</i> (<i>P</i>)			0,04	2,61		0,18		
	K + <i>Bgh</i>			19,33	104,13		5,59	0,89	0,09
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>			13,44	112,62		5,04		
20	Kontrolle (K)			0,06	1,51		0,02	5,27	1,68
	<i>P. indica</i> (<i>P</i>)			0,10	8,26		0,14		
	K + <i>Bgh</i>			22,11	112,49		10,43	0,95	0,09
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>			23,09	83,40		11,21		
24	Kontrolle (K)	0,19	0,04	0,17	2,18	11,69	0,15	1,02	0,24
	<i>P. indica</i> (<i>P</i>)	0,27	0,05	0,06	2,29	21,83	0,04		
	K + <i>Bgh</i>	3,39	5,00	15,09	32,41	66,87	18,34	2,06	0,61
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>	7,01	8,11	33,16	24,32	341,32	11,06		

Tabelle 7.3.1 B: qPCR-Ergebnisse für PR-2 (Barley1_01637).

PR-2		relative Expressionswerte (K + Bgh 12 hai = 1)						Expressionsunterschied P zu K ohne bzw. mit Bgh	
hai	Variante	AE1	AE2	AE3	KII	Ge17	KIII	Mittelwert	± SF
0	Kontrolle (K)				7,65		0,66	1,52	0,89
	<i>P. indica</i> (P)				21,26		0,17		
2	Kontrolle (K)				208,89		1,06	0,34	0,20
	<i>P. indica</i> (P)				11,91		0,66		
	K + Bgh				5,54		1,29	3,13	1,68
	P + Bgh				30,56		0,96		
4	Kontrolle (K)			0,06	19,88		0,26	34,28	16,16
	<i>P. indica</i> (P)			1,86	15,62		17,94		
	K + Bgh			0,72	53,91		7,00	2,02	0,66
	P + Bgh			1,43	185,40		4,41		
8	Kontrolle (K)			0,40	21,10		0,16	1,69	0,46
	<i>P. indica</i> (P)			0,90	26,67		0,45		
	K + Bgh			1,95	10,85		0,87	2,25	0,65
	P + Bgh			1,83	23,12		3,23		
10	Kontrolle (K)				12,13		0,45	0,74	0,10
	<i>P. indica</i> (P)				7,22		0,40		
	K + Bgh				12,35		0,62	2,98	0,11
	P + Bgh				38,63		1,75		
12	Kontrolle (K)	1,11	0,07	0,31	6,13	0,77	0,36	1,08	0,43
	<i>P. indica</i> (P)	0,85	0,23	0,27	1,47	0,68	0,12		
	K + Bgh	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	6,25	2,79
	P + Bgh	1,53	9,25	1,62	20,30	2,64	2,14		
14	Kontrolle (K)				0,77		2,92	0,40	0,25
	<i>P. indica</i> (P)				0,59		0,13		
	K + Bgh				120,57		4,38	3,88	0,24
	P + Bgh				508,49		15,56		
16	Kontrolle (K)			0,13	0,41		0,76	0,43	0,27
	<i>P. indica</i> (P)			0,01	0,45		0,11		
	K + Bgh			23,88	209,95		3,26	1,70	0,50
	P + Bgh			13,54	395,35		8,66		
20	Kontrolle (K)			0,02	2,01		0,10	1,55	0,40
	<i>P. indica</i> (P)			0,02	4,92		0,07		
	K + Bgh			1,38	73,70		10,92	2,20	0,44
	P + Bgh			4,39	153,13		14,57		
24	Kontrolle (K)	0,50	0,00	0,06	3,50	0,77	0,30	5,02	3,93
	<i>P. indica</i> (P)	0,82	0,06	0,02	1,63	0,68	0,08		
	K + Bgh	4,60	1,60	5,72	24,06	1,00	20,32	1,72	0,36
	P + Bgh	7,56	4,87	8,97	16,36	2,64	15,45		

Tabelle 7.3.1 C: qPCR-Ergebnisse für PR-5 (Contig2787_s_at).

PR-5		relative Expressionswerte (K + Bgh 12 hai = 1)						Expressionsunterschied P zu K ohne bzw. mit Bgh	
hai	Variante	AE1	AE2	AE3	KII	Ge17	KIII	Mittelwert	± SF
0	Kontrolle (K)				7,41		0,31	1,00	0,21
	<i>P. indica</i> (P)				9,68		0,22		
2	Kontrolle (K)				116,69		0,28	1,44	0,41
	<i>P. indica</i> (P)				99,29		0,56		
	K + Bgh				103,33		0,15	1,05	0,12
	P + Bgh				90,72		0,19		
4	Kontrolle (K)			0,01	1,78		0,06	61,95	35,95
	<i>P. indica</i> (P)			0,37	2,18		9,32		
	K + Bgh			0,27	3,76		0,54	0,72	0,34
	P + Bgh			0,20	5,39		0,00		
8	Kontrolle (K)			0,02	2,54		0,05	6,64	0,19
	<i>P. indica</i> (P)			0,16	17,97		0,31		
	K + Bgh			0,27	4,86		0,28	0,99	0,37
	P + Bgh			0,31	0,75		0,47		
10	Kontrolle (K)				11,08		0,25	1,38	0,75
	<i>P. indica</i> (P)				3,49		0,62		
	K + Bgh				8,11		0,22	1,37	0,17
	P + Bgh				9,20		0,36		
12	Kontrolle (K)	0,21	0,11	0,31	9,75		0,23	1,08	0,39
	<i>P. indica</i> (P)	0,30	0,30	0,11	1,37		0,21		
	K + Bgh	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	10,51	7,47
	P + Bgh	1,52	4,45	2,20	43,82		0,57		
14	Kontrolle (K)				1,67		0,75	1,60	0,65
	<i>P. indica</i> (P)				4,21		0,50		
	K + Bgh				370,61		6,28	1,48	0,24
	P + Bgh				672,50		7,19		
16	Kontrolle (K)			0,48	1,13		0,62	0,35	0,20
	<i>P. indica</i> (P)			0,01	0,92		0,14		
	K + Bgh			18,31	721,01		3,26	0,82	0,12
	P + Bgh			12,53	480,03		3,58		
20	Kontrolle (K)			0,01	28,52		0,04	3,62	1,14
	<i>P. indica</i> (P)			0,03	62,20		0,24		
	K + Bgh			7,04	405,07		5,66	1,12	0,19
	P + Bgh			8,29	602,00		3,92		
24	Kontrolle (K)			0,05	21,94		0,13	0,61	0,12
	<i>P. indica</i> (P)			0,02	19,83		0,06		
	K + Bgh			0,92	73,70		5,53	1,20	0,43
	P + Bgh			2,06	46,92		3,91		

Tabelle 7.3.1 D: qPCR-Ergebnisse für *HSP70* (Contig873_at).

<i>HSP70</i>		relative Expressionswerte (K + Bgh 12 hai = 1)						Expressionsunterschied P zu K ohne bzw. mit Bgh	
hai	Variante	AE1	AE2	AE3	KII	Ge17	KIII	Mittelwert	± SF
0	Kontrolle (K)				0,06			0,65	
	<i>P. indica</i> (P)				0,04				
2	Kontrolle (K)								
	<i>P. indica</i> (P)								
	K + Bgh								
	P + Bgh								
4	Kontrolle (K)			0,01				1,16	
	<i>P. indica</i> (P)			0,02					
	K + Bgh			0,01				2,14	
	P + Bgh			0,02					
8	Kontrolle (K)			0,00	0,03			0,71	0,21
	<i>P. indica</i> (P)			0,09	0,01				
	K + Bgh			0,00	0,09			12,18	8,11
	P + Bgh			0,07	0,06				
10	Kontrolle (K)				0,03		0,02	0,81	0,07
	<i>P. indica</i> (P)				0,03		0,01		
	K + Bgh				0,03		0,01	1,43	0,55
	P + Bgh				0,02		0,03		
12	Kontrolle (K)	0,50	0,61	0,23	0,87		0,12	0,85	0,16
	<i>P. indica</i> (P)	0,67	0,69	0,11	0,75		0,05		
	K + Bgh	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,97	0,45
	P + Bgh	1,06	2,89	2,56	2,84		0,47		
14	Kontrolle (K)				0,51		0,27	0,68	0,07
	<i>P. indica</i> (P)				0,40		0,16		
	K + Bgh				4,08		5,06	1,67	0,20
	P + Bgh				5,70		9,87		
16	Kontrolle (K)			0,03	0,29			39,32	27,44
	<i>P. indica</i> (P)			2,63	0,15				
	K + Bgh			0,31	1,05			0,54	0,36
	P + Bgh			0,01	1,10				
20	Kontrolle (K)			0,47	0,06			1,63	0,46
	<i>P. indica</i> (P)			0,46	0,14				
	K + Bgh			0,00	0,22			1,54	0,77
	P + Bgh			0,01	0,10				
24	Kontrolle (K)	0,20		0,07	0,08			0,91	0,06
	<i>P. indica</i> (P)	0,15		0,07	0,07				
	K + Bgh	0,25		0,01	0,13			1,71	0,58
	P + Bgh	0,21		0,03	0,15				

Tabelle 7.3.1 E: qPCR-Ergebnisse für *BCI-7* (Contig34_s_at).

<i>BCI-7</i>		relative Expressionswerte (K + <i>Bgh</i> 12 hai = 1)						Expressionsunterschied <i>P</i> zu K ohne bzw. mit <i>Bgh</i>	
hai	Variante	AE1	AE2	AE3	KII	Ge17	KIII	Mittelwert	± SD
0	Kontrolle (K)				KT		2,13	0,16	0,00
	<i>P. indica</i> (P)				0,02		0,34		
2	Kontrolle (K)				0,02		0,34	10,04	5,56
	<i>P. indica</i> (P)				0,04		6,10		
	K + <i>Bgh</i>				0,01		2,80	15,64	9,92
	P + <i>Bgh</i>				0,33		4,51		
4	Kontrolle (K)			0,03	0,09		2,92	12,36	6,14
	<i>P. indica</i> (P)			0,79	0,01		31,85		
	K + <i>Bgh</i>			0,28	0,42		7,80	5,54	3,84
	P + <i>Bgh</i>			0,41	6,34		1,83		
8	Kontrolle (K)			0,27	0,02		3,66	2,05	1,09
	<i>P. indica</i> (P)			0,40	0,10		0,37		
	K + <i>Bgh</i>			0,05	0,03		1,28	30,63	23,45
	P + <i>Bgh</i>			4,68	0,07		1,71		
10	Kontrolle (K)				0,01		2,19	2,48	0,87
	<i>P. indica</i> (P)				0,01		8,13		
	K + <i>Bgh</i>				0,05		5,65	16,27	10,82
	P + <i>Bgh</i>				1,56		5,52		
12	Kontrolle (K)	0,10	4,20	0,38	0,01		3,23	1,11	0,35
	<i>P. indica</i> (P)	0,08	4,59	0,03	0,02		3,50		
	K + <i>Bgh</i>	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	3,22	0,60
	P + <i>Bgh</i>	2,08	4,55	3,88	1,18		4,43		
14	Kontrolle (K)				0,03		0,01	123,13	84,79
	<i>P. indica</i> (P)				0,09		1,79		
	K + <i>Bgh</i>				0,06		2,33	1,78	0,80
	P + <i>Bgh</i>				0,16		1,50		
16	Kontrolle (K)			0,30	0,04		4,36	1,74	1,07
	<i>P. indica</i> (P)			0,14	0,16		1,63		
	K + <i>Bgh</i>			0,01	0,74		0,60	43,23	34,52
	P + <i>Bgh</i>			1,11	0,19		0,99		
20	Kontrolle (K)			0,13	0,02		1,72	21,04	8,95
	<i>P. indica</i> (P)			0,10	0,89		10,43		
	K + <i>Bgh</i>			0,20	0,08		1,12	1,16	0,18
	P + <i>Bgh</i>			0,22	0,13		0,88		
24	Kontrolle (K)			0,31	0,01		13,82	43,32	23,28
	<i>P. indica</i> (P)			0,34	0,83		4,97		
	K + <i>Bgh</i>			0,02	0,14		0,87	0,64	4,53
	P + <i>Bgh</i>			0,41	0,06		0,75		

Tabelle 7.3.1 F: qPCR-Ergebnisse für *HSP17.9* (HY03K23u_at).

<i>HSP17.9</i>		relative Expressionswerte (K + <i>Bgh</i> 12 hai = 1)						Expressionsunterschied <i>P</i> zu K ohne bzw. mit <i>Bgh</i>	
hai	Variante	AE1	AE2	AE3	KII	Ge17	KIII	Mittelwert	± SF
0	Kontrolle (K)								
	<i>P. indica</i> (P)								
2	Kontrolle (K)								
	<i>P. indica</i> (P)								
	K + <i>Bgh</i>								
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>								
4	Kontrolle (K)								
	<i>P. indica</i> (P)								
	K + <i>Bgh</i>								
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>								
8	Kontrolle (K)				0,17			0,66	
	<i>P. indica</i> (P)				0,12				
	K + <i>Bgh</i>				0,18			0,84	
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>				0,15				
10	Kontrolle (K)				0,15		0,10	1,06	0,00
	<i>P. indica</i> (P)				0,16		0,10		
	K + <i>Bgh</i>				0,15		0,06	1,05	0,16
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>				0,13		0,08		
12	Kontrolle (K)	0,63	2,43	2,65	1,66		0,28	1,35	0,08
	<i>P. indica</i> (P)	0,84	3,73	3,84	2,36		0,28		
	K + <i>Bgh</i>	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	3,28	1,63
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>	1,27	2,38	10,49	1,51		0,76		
14	Kontrolle (K)				0,32		0,18	0,98	0,02
	<i>P. indica</i> (P)				0,30		0,18		
	K + <i>Bgh</i>				0,51		1,50	1,47	0,16
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>				0,63		2,55		
16	Kontrolle (K)				0,28			0,71	
	<i>P. indica</i> (P)				0,20				
	K + <i>Bgh</i>				0,22			0,90	
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>				0,20				
20	Kontrolle (K)								
	<i>P. indica</i> (P)								
	K + <i>Bgh</i>								
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>								
24	Kontrolle (K)								
	<i>P. indica</i> (P)								
	K + <i>Bgh</i>								
	<i>P</i> + <i>Bgh</i>								

Tabelle 7.3.1 G: qPCR-Ergebnisse für Contig 23097_at (unbekanntes Protein).

Contig23097_at		relative Expressionswerte (K + Bgh 12 hai = 1)						Expressionsunterschied P zu K ohne bzw. mit Bgh	
hai	Variante	AE1	AE2	AE3	KII	Ge17	KIII	Mittelwert	± SD
0	Kontrolle (K)						0,02	0,57	
	<i>P. indica</i> (P)						0,01		
2	Kontrolle (K)								
	<i>P. indica</i> (P)								
	K + Bgh								
	P + Bgh								
4	Kontrolle (K)			KT				0,91	
	<i>P. indica</i> (P)			1,74					
	K + Bgh			4,03					
	P + Bgh			3,67					
8	Kontrolle (K)			0,00			0,08	0,74	0,18
	<i>P. indica</i> (P)			0,60			0,04		
	K + Bgh			1,21	0,04		0,06	0,44	0,19
	P + Bgh			0,60	0,00		0,05		
10	Kontrolle (K)				0,02		0,26	0,11	0,08
	<i>P. indica</i> (P)				0,00		0,06		
	K + Bgh				0,24		0,68	0,96	0,33
	P + Bgh				0,12		0,97		
12	Kontrolle (K)	0,00	0,18	2,38	0,00		0,02	9,51	6,48
	<i>P. indica</i> (P)	0,01	KN	90,73	0,00		0,15		
	K + Bgh	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	8,57	6,90
	P + Bgh	0,55	0,71	39,41	1,17		1,02		
14	Kontrolle (K)						0,06	0,38	
	<i>P. indica</i> (P)						0,02		
	K + Bgh				0,34		0,08	1,50	0,50
	P + Bgh				0,27		0,18		
16	Kontrolle (K)			1,54	0,00		0,09	0,30	0,25
	<i>P. indica</i> (P)			0,00	0,00		0,00		
	K + Bgh			2,48	0,12		0,03	0,73	0,07
	P + Bgh			2,11	0,07		0,02		
20	Kontrolle (K)			1,86				0,72	
	<i>P. indica</i> (P)			1,33					
	K + Bgh			2,83				1,14	
	P + Bgh			3,23					
24	Kontrolle (K)	0,02		3,30				1,14	0,06
	<i>P. indica</i> (P)	0,02		4,04					
	K + Bgh	0,02		1,62				1,03	0,04
	P + Bgh	0,02		1,75					

Tabelle 7.3.1 H: qPCR-Ergebnisse für Glutaredoxin (Contig23773_at).

Glutaredoxin Contig23773_at		relative Expressionswerte (K + Bgh 12 hai = 1)						Expressionsunterschied P zu K ohne bzw. mit Bgh	
hai	Variante	AE1	AE2	AE3	KII	Ge17	KIII	Mittelwert	± SF
0	Kontrolle (K)				40,92		3,00	0,65	0,32
	<i>P. indica</i> (P)				45,27		0,58		
2	Kontrolle (K)						1,43	0,35	
	<i>P. indica</i> (P)						0,51		
	K + Bgh						2,21	0,67	
	P + Bgh						1,47		
4	Kontrolle (K)			1,35			1,99	6,07	1,05
	<i>P. indica</i> (P)			10,19			9,09		
	K + Bgh			11,68	11,37		2,52	0,53	0,07
	P + Bgh			6,84	7,29		0,94		
8	Kontrolle (K)			3,91	10,67		10,09	1,17	0,60
	<i>P. indica</i> (P)			1,92	28,24		3,80		
	K + Bgh			9,46	0,83		6,45	0,55	0,05
	P + Bgh			5,77	0,51		2,70		
10	Kontrolle (K)				59,78		11,47	0,16	0,06
	<i>P. indica</i> (P)				3,91		2,84		
	K + Bgh				8,33		4,33	2,54	1,34
	P + Bgh				37,00		2,79		
12	Kontrolle (K)	2,93	10,49	3,20	5,05		1,93	1,30	0,39
	<i>P. indica</i> (P)	2,38	29,11	0,76	5,15		3,18		
	K + Bgh	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	8,40	5,50
	P + Bgh	1,76	32,86	4,85	1,62		0,93		
14	Kontrolle (K)				14,53		0,85	0,86	0,34
	<i>P. indica</i> (P)				5,48		1,13		
	K + Bgh				0,28		0,44	1,98	0,76
	P + Bgh				0,84		0,40		
16	Kontrolle (K)			5,30	2,83		0,19	6,19	4,17
	<i>P. indica</i> (P)			2,67	46,32		0,32		
	K + Bgh			0,48	0,14		0,07	3,22	1,32
	P + Bgh			3,06	0,35		0,06		
20	Kontrolle (K)			2,19	4,30		0,21	1,65	0,74
	<i>P. indica</i> (P)			1,70	14,86		0,15		
	K + Bgh			0,38	0,04		0,03	2,81	1,46
	P + Bgh			2,36	0,08		0,01		
24	Kontrolle (K)	0,22	6,43	0,38	1,93		0,32	4,56	1,31
	<i>P. indica</i> (P)	1,02	56,90	2,45	1,77		0,59		
	K + Bgh	0,07	0,52	0,47	0,03		0,02	4,94	3,51
	P + Bgh	0,05	0,55	9,69	0,01		0,04		

7.4 DATENZUSAMMENSTELLUNG KONIDIOPHOREN PRO MYZEL

Unterschied in der Anzahl an *G. orontii*-Konidiophoren/Myzel auf Blättern diverser Arabidopsismutanten mit und ohne Besiedlung durch *P. indicica*.

Tabelle 7.4-1: *G. orontii*-Konidiophoren pro Mycel. Angegeben sind die Werte für durch *P. indicica* besiedelte Pflanzen relativ zu Kontrollpflanzen (gesetzt als 100).

	Mittelwert	Standardfehler	Anzahl Versuche
col	82,81	± 8,46	11
<i>npr1-3</i>	71,63	± 8,51	6
<i>NahG</i>	65,02	± 27,09	2
<i>npr1-1</i>	121,73	± 15,62	7
<i>jar</i>	123,57	± 11,12	6
<i>jin</i>	109,45	± 9,31	4
<i>ein2-1</i>	83,19	± 13,41	8
<i>etr1-3</i>	73,40	± 13,83	3

7.5 AUFLISTUNG DER qPCR-ERMITTELTEN EXPRESSIONSWERTE AUS ARABIDOPSIS

Angegeben sind die qPCR-ermittelten Expressionswerte bezüglich der Quantifizierung ausgewählter Gene in Arabidopsisblättern (Col-0, Wildtyp, vgl. Abb. 3.4-2).

Tabelle 7.5-1: Relative Expression hormonresponsiver Gene 0, 3 und 6 Tage nach *G. orontii* - Inokulation in Blättern *P. indicica*-kolonisierter bzw. nicht -kolonisierter Col-0 Arabidopsispflanzen. Die qPCR-Daten sind mit UBQ5 normalisiert und relativ zum Wert der Kontrollen 3 dai angegeben. K: nicht kolonisiert; P: *P. indicica*-kolonisiert; MW: Mittelwert; SF: Standardfehler (n = 3); dai: Tage nach Inokulation mit *P. indicica*. Für *PR-1b* 0 dai konnte aufgrund fehlender Expression in 2 von drei Experimenten kein SF errechnet werden.

Transkript	Behandlung	0 dai		3 dai		6 dai	
		MW	± SF	MW	± SF	MW	± SF
<i>PR-1b</i>	K	0,19	-	1,00		602,45	425,11
	P	0,17	-	1,66	1,21	513,37	275,18
<i>PR-5</i>	K	1,38	0,70	1,00		38,30	22,55
	P	1,31	0,72	1,39	0,30	49,74	37,45
<i>PDF1.2</i>	K	0,85	0,40	1,00		4,17	0,52
	P	0,62	0,23	1,30	0,30	4,87	1,89
<i>VSP1</i>	K	1,42	0,38	1,00		0,88	0,38
	P	0,77	0,39	8,17	3,82	0,75	0,10
<i>LOX2</i>	K	1,59	0,83	1,00		1,11	0,15
	P	1,15	0,67	1,41	0,11	1,29	0,28
<i>ERF1</i>	K	1,58	0,09	1,00		3,87	0,78
	P	1,78	0,32	1,29	0,07	2,75	0,53

7.6 EXPRESSIONSWERTE DER QUANTIFIZIERUNG VON *P. INDICA* IN ARABIDOPSIS

Angegeben sind die Werte zu den Abbildungen des Kapitels 3.5 bezüglich der Quantifizierung von *P. indica* in verschiedenen Arabidopsismutanten im semi-sterilen Sand:Oil Dri® System (Tabelle 7.6-1) und in Sterilkultur auf agarhaltigem Medium (Tabelle 7.6-2).

Tabelle 7.6-1: Relative Besiedlung verschiedener Arabidopsismutanten mit *P. indica* in einem Sand:Oil Dri®-Gemisch (Topfkultur) 14 Tage nach Inokulation. Die qPCR ermittelten Daten sind relativ zum Wildtyp Col-0 gesetzt. SA: Salicylsäure; JA: Jasmonsäure; ET: Ethylen; MW: Mittelwert; SF: Standardfehler.

	Anzahl Versuche	MW	± SF	beeinflusster Signalweg bzw. verändertes Phytohormon (Literatur: Kap. 2.2)
Col-0	Referenz	1		Wildtyp
<i>NahG</i>	5	1,73*	0,19	keine SA-Akkumulation
<i>npr1-3</i>	3	1,47*	0,05	SA-Signalweg
<i>npr1-1</i>	3	1,44	0,20	JA- und SA-Signalweg
<i>jin</i>	2	1,14	0,20	JA-Signalweg
<i>jar1</i>	2	0,87	0,06	JA-Signalweg
<i>ein2-1</i>	4	0,98	0,20	ET-Signalweg
<i>etr1-3</i>	3	0,74	0,26	ET-Signalweg
<i>eto3</i>	3	4,02	1,29	erhöhte ET-Level
<i>eto1</i>	2	1,99	0,45	erhöhte ET-Level
<i>ctr1-1</i>	1	2,13*	-	ET-Signalweg
<i>pad3-1</i>	1	2,81	-	keine Camalexin-Produktion

* $p < 0,05$; One sample t-Test (*NahG*, *npr1-3*) bzw. Studentischer t-Test (*ctr1-1*).

Tabelle 7.6-2: Besiedlungsstärke verschiedener Arabidopsismutanten 3, 7 und 14 Tage nach Inokulation mit *P. indica* auf agarhaltigem Medium relativ zum Wildtyp Col-0. Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus zwei (3 und 7 dai) bis drei Versuchen (14 dai). MW: Mittelwert; SF: Standardfehler; dai: Tage nach Inokulation mit *P. indica*.

	3 dai		7 dai		14 dai	
	MW	± SF	MW	± SF	MW	± SF
Col-0	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
<i>NahG</i>	0,90	0,14	0,96	0,06	1,37	0,06
<i>npr1-1</i>	1,13	0,19	0,99	0,12	1,10	0,06
<i>sid2-2</i>	1,10	0,10	1,30	0,08	1,34	0,10
<i>dnd1</i>	0,81	0,07	1,10	0,15	1,45	0,04
<i>pad3-1</i>	0,90	0,16	0,96	0,06	1,29	0,01
<i>joe1</i>	1,06	0,15	1,17	0,13	0,84	0,20
<i>coi1-16</i>	0,99	0,11	1,51	0,34	1,54	0,11

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Erklärung:

ich versichere, dass ich meine Dissertation:

***Piriformospora indica*: Systemische Resistenz, Wachstumseffekte und Wechselwirkungen in der Wurzel**

Molekularbiologische und morphologische Analysen der Interaktion des Endophyten mit Gerste (*Hordeum vulgare*) und *Arabidopsis thaliana*

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Gießen, Mai 2009

Alexandra Molitor

DANKSAGUNG

Zum Schluss, und dafür ausdrücklich, möchte ich mich bei allen denen bedanken, die in den letzten drei Jahren - in welcher Situation auch immer - an mich geglaubt, mir vertraut und mich unterstützt haben.

Prof. Dr. Kogel danke ich für die Möglichkeit der Promotion an seinem Institut und die fachliche Betreuung und Unterstützung während meiner Promotionszeit. Zudem möchte ich bei ihm für die mir eröffneten Möglichkeiten und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt auch Prof. Dr. v. Bel, der stets für Fragen zur Verfügung stand und mir half, auch mal einen anderen Blickwinkel auf verschiedenste Aspekte meiner Arbeit zu werfen, was einen sehr positiven Einfluss auf das Gelingen dieser Arbeit hatte.

Vor allem für die fachliche aber auch persönliche Unterstützung gilt mein herzlicher Dank Frank Waller, Gregor Langen, Patrick Schäfer und Alga Zuccharo. Ich habe sehr gerne mit euch diskutiert. Danke auch an Jörn Pons für die geduldige, statistische Nachhilfe.

Ausdrücklich danken möchte ich an dieser Stelle Daggi für ihre fachliche Hilfe, ihre anpackende Art und vor allem dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen konnte. Danke Daggi, ohne dich wäre vieles nicht möglich gewesen!

Für die gute Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des IPAZ bedanken. Danke an Udo und Volker für den „Extra-Mehltau“, wann immer ich ihn brauchte. Danke an Valentina, die sich nie beschwerte, wenn ich „Extra-.Autoklavierladungen“ anschleppte. Danke an Christina, Elke und Martina und alle meine Doktorandenkollegen für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und wertvollen Tipps.

Extra erwähnen möchte ich hier meine Bürokollegen in der „Endphase“ Anna und Susanna, die stets ein offenes Ohr und eine freie Minute für mich hatten. Danke auch an Steffi und Magda, die ihr oftmals verstanden habt, ohne zu fragen.

Vielen Dank an Sophie, für das entgegengebrachte Vertrauen (und die Schokolade ;-)).

Vielen Dank an Bille und Sebastian, in ewiger Erinnerung an das Bermuda-Dreieck, sowie an Jutta, Ingo, Rainer und Eileen. Bitte bleibt genau so, wie ihr seid. Ich werde die fröhlichen Stunden mit euch nie vergessen.

Zudem möchte ich mich bei allen Freunden außerhalb des Labors bedanken, die mich immer wieder daran erinnern haben, dass es auf der Welt nicht nur Wissenschaft gibt. Dies gilt besonders für „meinen Helden“. Vielen Dank auch an Miri und Susanne, dass ihr komplett unvoreingenommen Teile meiner Arbeit korrigiert habt.

Und ganz besonders Danke ich meiner Familie - meinen Eltern und meinen Geschwistern Claudia, Thomas und Anna - auf die ich bei allen meinen Entscheidungen stets bauen und auf die ich mich immer verlassen konnte.

!! DANKE !!