

### 3) Isolation und Charakterisierung von Mykorrhiza-Pilzen terrestrischer Orchideen

Anne-Mareen EISOLD, Christina LANGE, Simone BRENDEL, Kurt ZOGLAUER  
AG Botanik & Arboretum, Institut für Biologie, Humboldt-Universität  
zu Berlin, Invalidenstraße 42, 10115 Berlin  
E-Mail: anne-mareen.eisold@hu-berlin.de

Die Familie der Orchidaceae ist mit ca. 30 000 Arten von der tropischen bis zur boreal arktischen Klimazone beheimatet. Für die Keimung sind die endospermfreien Samen auf die Infektion mit Mykorrhizapilzen angewiesen. Die nach der Keimung entstehenden Protokorme sind obligat mykoheterotroph und weisen typischerweise eine enge Spezifität zu den Mykorrhizapartnern auf (McKENNDRICK et al., 2000). Für die Propagation sowohl epiphytischer als auch terrestrischer Orchideenarten ist die Kultivierung und Vermehrung *in vitro* in der gärtnerischen Praxis bereits fest etabliert. Die Verwendung spezieller kohlehydratreicher Basismedien ermöglicht die asymbiotische Keimung der Samen (z.B. VAN WAES und DEBERGH, 1986; LORENZEN, 1993). Da diese Methode nicht für jede gärtnerisch interessante Art gleichermaßen erfolgreich ist, steht die symbiotische Keimung von Orchideen weiterhin im Fokus des gartenbaulichen Interesses. Voraussetzung dafür ist der Einsatz der für die jeweilige Orchideenart spezifischen Mykorrhizapartner. Um die symbiotische Keimung für *Cypripedium calceolus*, *C. reginae*, *Dactylorhiza maculata*, *D. ochroleuca*, *D. incarnata* ssp. *pulchella* und *Gymnadenia conopsea* zu etablieren, wurden aus Wurzeln von Orchideen der Gattung *Dactylorhiza* von natürlichen sowie Gartenstandorten 26 potentielle Mykorrhizapilze isoliert. Nach makroskopischer und mikroskopischer Bonitur wurden die Isolate in Keimungs- und Inokulationsversuchen auf ihr tatsächliches Mykorrhizierungsvermögen untersucht. Die Samen von *Dactylorhiza maculata* keimten mit zehn Isolaten als Mykorrhizapartner, während die anderen Kombinationen von Orchideensamen und potentiellen Mykorrhizapilz keine Keimungserfolge zeigten. Die Quantität der gekeimten Samen von *D. maculata* variierte in Abhängigkeit der eingesetzten Pilzisolat, wobei mit sieben Isolaten gute bis sehr gute Keimungsergebnisse erzielt wurden, das heißt der Keimungsprozentsatz war vergleichbar mit der jeweiligen asymbiotisch gekeimten Kontrollgruppe. Im Vergleich zur asymbiotischen Keimung konnte die Entwicklungsdauer bis zum Erreichen des Protokormstadiums von zwölf auf vier Wochen deutlich reduziert werden. Asymbiotisch gekeimte Protokorme von *D. maculata*, welche mit den Pilzisolaten inokuliert und weiter kultiviert wurden, zeigten ebenfalls eine isolatspezifische Entwicklung. Während besonders das Isolat Nr. 13 Wachstum und Differenzierung der juvenilen *D. maculata* förderte, bewirkten andere Isolate ein vorzeitiges Absterben der Protokorme.

Die Sequenzanalyse auf der Grundlage der ITS-PCR und der anschließende Abgleich mit in der NCBI-Datenbank hinterlegten pilzlichen Sequenzen ergab für drei Isolate (Nr. 13, 22, 26) sehr hohe Übereinstimmungen mit den als Orchideen-Mykorrhiza bekannten Pilzgattungen *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Thanatephorus* und *Rhizoctonia*. Neben dem experimentellen Nachweis bestätigten auch die molekularbiologischen Daten die Eignung dieser Isolate als Mykorrhizapartner für *D. maculata*.

#### Literatur

- LORENZEN, W., 1993: Nährmedium für *Cypripedium*. (S. 30) in KOHLS, G., U. KÄHLER: Orchideen im Garten. Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey.  
McKENNDRICK, S.L., J.R. LEAKE, D.L. TAYLOR, D.J. READ, 2000: Symbiotic germination and development of myco-hetero-

trophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **145**, 523-537.

VAN WAES, J., P.C. DEBERGH, 1986: *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* **67**, 253-261.

### 4) Frühe transkriptionelle Veränderungen in *Medicago truncatula*-Wurzeln als Reaktion auf diffusiblen Glomus Faktoren

Natalija HOHNJEČ<sup>1</sup>, Frauke LENZ<sup>1</sup>, Jörg D. BECKER<sup>2</sup>, Helge KÜSTER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Plant Genetics, Unit IV-Plant Genomics, Leibniz Universität Hannover, Germany

<sup>2</sup> Affymetrix Core Facility, Instituto Gulbenkian de Ciência, Lisbon, Portugal

E-Mail: natalija@genetik.uni-hannover.de

The arbuscular mycorrhiza (AM) symbiosis between higher plants and *Glomeromycota* fungi is one of the most widely studied beneficial plant-microbe interactions. Since marker genes identified so far are connected to later stages of the symbiosis, e.g. arbuscule formation, access to more components of early AM signaling would strengthen our understanding how both partners initiate contact and which genes are important regulators of this process. We thus profiled the transcriptional changes of roots responding to fungal exudates (Myc-signals) and fungal spores in A17 and DMI3 plants 6 h and 24 h post application. Based on the responses, we identified genes possibly related to early symbiotic signaling, acting either upstream or downstream of DMI3. Genes that were found to be induced in both lines might be related to very early AM signaling, but could also reflect general differences in root development. By contrast, genes induced in A17 roots but not in the DMI3 mutant can be regarded as *DMI3*-dependent candidates, being likely associated with symbiotic signaling. A substantial fraction of these genes are important for membrane transport, cell wall biosynthesis, and plant defence. Apart from this, we found an activation of genes involved in hormone and calcium signaling, signal transduction, as well as genes encoding transcription factors (TF), including two GRAS and several AP2/ERF TFs. Three co-induced and eight *DMI3*-dependent genes were selected for the construction of reporter gene fusions to develop histological markers suitable for testing the Myc-signal activity of fungal exudates.

### 5) Transcriptional control of cellular reprogramming during the symbiotic interaction of *Medicago truncatula* with arbuscular mycorrhizal fungi

Claudia HOGEKAMP<sup>1</sup>, Natalija HOHNJEČ<sup>1</sup>, Jörg D. BECKER<sup>2</sup>, Helge KÜSTER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Plant Genetics, Unit IV-Plant Genomics, Leibniz Universität Hannover, Germany

<sup>2</sup> Affymetrix Core Facility, Instituto Gulbenkian de Ciência, Lisbon, Portugal

E-Mail: claudia.hogekamp@genetik.uni-hannover.de

*Medicago truncatula* is one of the most important model-plants for the investigation of root endosymbioses with soil microbes. One of these symbioses is the arbuscular mycorrhiza (AM) with beneficial fungi, enhancing the phosphate supply of the plant.

To establish a functional symbiosis, comprehensive changes in the transcriptional program of the root cells hosting fungal

structures are necessary. To date, investigations in this field have been limited by the asynchronous development of the symbiosis, leading to the presence of different developmental stages in the host root at a given timepoint and a lack of resolution, which has been restricted to whole root material.

To overcome these problems, we perform laser-capture-microdissection (LCM) of specific cell types in mycorrhized roots, using a PALM Microbeam (Zeiss). This technology provides the possibility to excise intact cells from complex tissues, so that homogenous cell pools for downstream analysis can be obtained.

Our goal is to isolate single cells or cell layers housing only one defined developmental stage of the AM fungus and to map the transcriptome of these, using *Medicago* GeneChips. The results should widen the knowledge about already known symbiosis genes, by providing information about the exact timepoint and place of activation, and will probably also lead to the identification of novel genes, which could not be detected in older approaches due to the lack of cellular resolution.

Finally, the function of selected genes in the AM symbiosis will be investigated. To this end, we use a RNAinterference (RNAi)-approach in *Agrobacterium*-derived hairy roots of *Medicago truncatula*. The knock-down-level of the candidate genes is assessed by real-time RT-PCR and the performance of AM in transgenic roots is investigated using histological methods and real-time RT-PCR. The ultimate goal is to identify plant genes essential for the different developmental checkpoints of AM symbiosis.

## 6) Transcriptional and functional analysis of plant genes during the symbiotic interaction of the model legume *Medicago truncatula* with arbuscular mycorrhizal fungi

Lisa F. CZAJA<sup>1</sup>, Natalija HOHNJEČ<sup>1</sup>, Raffaella BALESTRINI<sup>2</sup>, Paola BONFANTE<sup>2</sup>, Vivienne GIANINAZZI-PEARSON<sup>3</sup>, Million TADEGE<sup>4</sup>, Colby G. STARKER<sup>5</sup>, Jörg D. BECKER<sup>6</sup>, Helge KÜSTER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Plant Genetics, Unit IV-Plant Genomics, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany

<sup>2</sup> Istituto Protezione Piante, sez. di Torino – CNR and Dipartimento Biologia Vegetale – Università di Torino, Torino, Italy

<sup>3</sup> UMR INRA/CNRS/Université de Bourgogne Plante-Microbe-Environnement, Dijon, France

<sup>4</sup> Plant Biology Division, The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, USA

<sup>5</sup> Department of Plant Biology, University of Minnesota, Saint Paul, USA

<sup>6</sup> Affymetrix Core Facility, Instituto Gulbenkian de Ciência, Lisbon, Portugal

E-Mail: Lisa.Czaja@genetik.uni-hannover.de

Arbuscular mycorrhiza (AM) is a widespread symbiotic association between plants and fungi. AM fungi supply their symbiotic partner with nutrients and water from the soil, while they receive photosynthates from the plant in return. The successful establishment of AM requires mutual signaling of both symbiotic partners. Compared to the root nodule symbiosis, knowledge of the molecular basis of this signaling pathway is still limited. Thus, we are interested in uncovering plant genes involved in early symbiotic signaling.

To this end, candidate genes have been identified via extensive data mining of 72 *Medicago* GeneChip hybridizations covering (1) comparisons of different wild type plants with mutants impaired in early symbiotic signaling, (2) wild type plants inoculated with different AM fungi, and (3) wild type

plants inoculated with diffusible microbial signals; obtained in the frame of the TRUNCATULIX project. Candidate genes were selected according to their expression characteristics from the GeneChip experiments mentioned above, their expression profiles from the *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA) and their annotation. Concerning the last point, we had a special focus on genes annotated as transcription factors and annotated as being involved in calcium signaling, since calcium signaling seems to play an important role in the closely related signaling pathway of the root nodule symbiosis.

To functionally characterize those candidate genes we currently design RNAi-constructs to determine whether the knock down of these genes has an impact on formation of AM symbiosis between *Medicago truncatula* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*; and study the phenotype of Tnt1 mutants in the genes concerned. In addition, promoter studies for selected candidate genes are planned to uncover novel expression markers that can be used to study microbial infection and plant responses to signals from AM fungi.

## 7) Ist *Piriformospora indica* eine Alternative zur arbuskulären Mykorrhiza?

Philipp FRANKEN

IGZ, Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Großbeeren

E-Mail: franken@igzev.de

Neben den arbuskulären Mykorrhiza (AM) Pilzen gibt es eine Vielzahl anderer pilzlicher Organismen, die sich in der Wurzel tummeln. Einer davon ist der Basidiomycet *Piriformospora indica*. Er besiedelt die Wurzeln aller bisher untersuchten Pflanzen und zeigt bei vielen von ihnen erstaunliche Wachstumseffekte. Gemeinsame Untersuchungen mit der Arbeitsgruppe von Professor Karl-Heinz KOGEL an der Universität Gießen haben ergeben, dass *P. indica* bei Gerstenpflanzen den Ertrag deutlich steigern und gleichzeitig die Pflanze schützen kann. Im Gegensatz zu den AM-Pilzen induziert er Resistenzen aber nicht nur gegen Wurzelpathogene, sondern auch gegen die Blattkrankheit 'Echter Mehltau'. Dabei scheint keiner der bisher bekannten Signaltransduktionswege eine Rolle zu spielen. Stattdessen konnte eine Erhöhung verschiedener Antioxidantien beobachtet werden, die die Pflanze gegen das Pathogen schützen. Die Besiedelung der Wurzeln erfolgt nach einem gänzlich anderen Prinzip als bei den AM Pilzen. *P. indica* scheint den programmierten Zelltod der Wurzelzellen zu induzieren und so findet man ihn nur in toten Pflanzenzellen. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass man bei einer zu hohen Inokulationsdosierung auch negative Effekte erreichen kann. Am IGZ untersuchen wir nun, wie dieser Pilz im modernen Anbau von Tomaten eingesetzt werden kann.

### Literatur

FAKHRO, A., D.R. ANDRADE-LINARES, S. VON BARGEN, M. BANDTE, C. BÜTTNER, R. GROSCH, D. SCHWARZ, P. FRANKEN, 2010: Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. *Mycorrhiza* **20**, 191-200.

WALLER, F., B. ACHATZ, H. BALTRUSCHAT, J. FODOR, K. BECKER, M. FISCHER, T. HEIER, R. HÜCKELHOVEN, C. NEUMANN, D. VON WETTSTEIN, P. FRANKEN, K.-H. KOGEL, 2005: The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS* **102**, 13386-13391.