

**Molekularbiologische Untersuchungen zur
Schwermetall- und Salztoleranz in der
Symbiose zwischen dem arbuskulären
Mykorrhizapilz *Glomus* und Tomate**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Fouad Ouziad
aus Marrakech

Köln, 2003

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Bothe

Prof. Dr. Hj.A.W. Schneider-Poetsch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.5 03

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand molekularbiologischer Methoden der Einfluß der Mykorrhizierung mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* BrI bzw. *Glomus geosporum* auf die Schwermetall- bzw. Salztoleranz der Wirtspflanze Tomate untersucht. Mittels PCR-Experimenten wurden Teilsequenzen für Phytochelatin synthase- (*LePCS*), Metallothionein- (*Lemt1*, *Lemt2*, *Lemt3*, *Lemt4*), Nrampttransporter- (*LeNramp1*, *LeNramp2*, *LeNramp3*), Aquaporin- (*LePIP1*, *LePIP2*, *LeTIP*) und Na⁺/H⁺-Antiportergene (*LeNHX1*, *LeNHX2*) aus Tomate amplifiziert und kloniert.

Bei der Anzucht von Tomatenpflanzen unter Schwermetallbelastung, durch Verwendung von Schwermetallerde oder Zusatz von Schwermetallen (CdCl₂), mit und ohne *Glomus intraradices* BrI zeigen die erhaltenen Ergebnisse eine deutliche Stimulierung des Wachstums von mykorrhizierten Tomatenpflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.

Das *LePCS*-Gen ist unter den angegebenen Versuchsbedingungen konstitutiv exprimiert und dessen Expression wird unter Schwermetallstress durch die Mykorrhizierung nicht beeinflusst. Durch Northern-Analysen und Real-Time PCR-Quantifizierung wurde gezeigt, daß die Transkriptmengen von *LeNramp1* und *LeNramp2* mit der Mykorrhizierung und unter Schwermetallstress reduziert wird, wohingegen bei *LeNramp3* keine Effekte bezüglich einer Mykorrhizierung zu beobachten sind.

Transkript-Analysen der Metallothioneingene *Lemt1*, *Lemt3* und *Lemt4* wiesen keine deutlichen Unterschiede in der Expression zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen unter Schwermetallbelastung auf. Im Gegensatz dazu konnte mittels Northern-Analysen und Real-Time PCR-Quantifizierung gezeigt werden, daß die Transkriptmenge von *Lemt2* mit der Mykorrhizierung unter Schwermetallstress um den Faktor 12 reduziert wird.

Durch RNA *In situ*-Hybridisierungen konnten Transkripte von *LeNramp1* in den nicht mykorrhizierten Wurzeln in unmittelbarer Umgebung des Zentralzylinders nachgewiesen werden. In den mykorrhizierten Wurzeln waren keine Signale nachweisbar. *Lemt2* wird stark in den nicht mykorrhizierten jungen Wurzelbereichen in den Rindenparenchym- und Rhizodermiszellen exprimiert. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *Lemt2* in den mykorrhizierten Wurzeln auf einige Rindenparenchymzellen beschränkt.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen läßt sich durch Vergleich der ermittelten Frischgewichte zwischen den mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Versuchspflanzen unter Salzstress keine Wachstumsstimulierung durch die Mykorrhizierung erkennen

In den Wurzeln wird die Transkriptmenge von *LePIP1* und *LeTIP* mit der Mykorrhizierung unter Salzbelastung herunterreguliert, während die Expression des *LePIP2*-Gens durch die Mykorrhizierung unter den gewählten Bedingungen nicht beeinflusst wird. In den Blättern mykorrhizierter Pflanzen sind für die drei Gene eine deutliche Erhöhung der Transkriptmengen unter Salzstress zu beobachten

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen wurde keine Induzierung der Na⁺/H⁺-Antiporter *LeNHX1* und *LeNHX2* unter Salzstress festgestellt. Durch Northern-Analysen konnten keine Unterschiede in der Expression beider Gene zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Salzbelastung beobachtet werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß die an der Schwermetall- bzw. Salztoleranz wahrscheinlich beteiligten Gene mit der Mykorrhizierung in der Transkriptionsrate in der Regel herunterreguliert werden, allerdings von Gen zu Gen in unterschiedlichem Maße.

Abstract

The role of the arbuscular mycorrhizal (AM) fungi *Glomus intraradices* BrI respectively *Glomus geosporum* on heavy metal and salt tolerance in their host tomato was studied. Parts of the genes for phytochelatin synthase (*LePCS*), Metallothioneins (*Lemt1*, *Lemt2*, *Lemt3*, *Lemt4*), Nrampttransporters (*LeNramp1*, *LeNramp2*, *LeNramp3*), aquaporins (*LePIP1*, *LePIP2*, *LeTIP*) and Na⁺/H⁺-antiporters (*LeNHX1*, *LeNHX2*), all from tomato, were amplified by PCR and sequenced.

Tomato plants cultivated in the presence of heavy metals and inoculated with *Glomus intraradices* BrI showed a significant stimulation of growth in comparison to non-mycorrhizal plants.

The gene for phytochelatin synthase was constitutively expressed. Any difference in the expression levels of *LePCS* between mycorrhizal plants and controls was not significant.

The transcript levels of the Nrampttransportergenes *LeNramp1* and *LeNramp2* were reduced in mycorrhizal tomato in comparison to controls but the transcript amount of *LeNramp3* was the same as in controls. This result was shown by Northern analyses and real time PCR.

Northern analyses and real time PCR showed that transcripts of *Lemt2* are significantly reduced in mycorrhizal plants by the factor of 12, whereas transcript levels of *Lemt1*, *Lemt3* and *Lemt4* remain more or less unaltered in mycorrhizal plants in comparison to non-colonized controls.

In-situ hybridization experiments showed that transcripts of *LeNramp1* were localized near the central cylinder in non-colonized roots, whereas no signals were detectable in mycorrhizal roots. Non-mycorrhizal plants showed a strong expression of *Lemt2* in the parenchyma and the rhizodermal cells, whereas the expression of *Lemt2* in mycorrhizal roots is restricted to few cortical parenchyma cells.

A significant difference in growth stimulation between plants colonized with *Glomus geosporum* and controls under salt stress was not detected.

The transcript levels of *LePIP1* and *LeTIP* were downregulated under salt stress in mycorrhizal roots, whereas the transcript amount of *LePIP2* was the same in controls. A significant increase in the expression of these three genes under salt stress was observed in the leaves of mycorrhizal plants.

Differences in gene expression of *LeNHX1* and *LeNHX2* in mycorrhizal plants and controls under salt stress could not be observed.

It is generally concluded that colonization of the roots by AM fungi affects the expression for genes coding for proteins presumably involved in salt or heavy metal resistance, respectively, however, from gene to gene in a different manner.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Mykorrhiza als Form der Symbiose zwischen Pilzen und höheren Pflanzen	1
1.2 Mechanismen der Schwermetalltoleranz bei den höheren Pflanzen	4
1.2.1 Komplexierung der Schwermetalle im Cytoplasma durch Chelatoren	6
1.2.1.1 Metallothioneine	6
1.2.1.2 Phytochelatine	6
1.2.2 Verminderte Aufnahme der Metallionen durch die Plasmamembran und Kompartimentierung in der Vakuole	7
1.2.3 Einfluß der AM-Pilze auf die Schwermetalltoleranz der Wirtspflanze	8
1.3 Mechanismen der Salztoleranz bei den höheren Pflanzen	9
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Versuchsobjekte	12
2.1.1 Organismen	12
2.1.2 Oberflächensterilisierung von Saatgut	12
2.1.3 Oberflächensterilisierung der AM-Sporen	12
2.1.4 AM-Pilz-Inokulumproduktion	13
2.1.5 Kulturbedingungen und Ernte der Versuchspflanzen	13
2.1.5.1 Anzucht der Tomatenpflanzen unter Schwermetallstress	14
2.1.5.2 Anzucht der Versuchspflanzen unter Salzbelastung	14
2.1.5.3 Ernte der Versuchspflanzen	15
2.1.6 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades	15
2.1.6.1 Färbung der Wurzeln mit Lactophenolblau	15
2.1.6.2 Mikroskopische Bonitierung der gefärbten Wurzeln	16
2.1.6.3 Isolierung von AM-Sporen	16

2.1.6.4	Ernte von Pilzmaterial aus den Kompartimentsystemen	16
2.1.7	Bestimmung der Schwermetallverfügbarkeit im Boden mittels Lux-Reporter-System	17
2.2	Isolierung von Nukleinsäuren	18
2.2.1	Isolierung genomischer DNA	18
2.2.1.1	Isolierung genomischer DNA mit CTAB nach Doyle und Doyle	18
2.2.1.2	Isolierung genomischer DNA nach Raeder und Broda	18
2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA	19
2.2.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus AM-Sporen	19
2.2.4	Isolierung von Plasmiden aus transformierten Kulturen von <i>E. coli</i>	20
2.2.5	Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren	20
2.3	Amplifizierung von DNA-Bereichen durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.3.1	Oligonukleotid-Primer	21
2.3.1.1	Auswahl geeigneter Sequenzbereiche zur Entwicklung von Oligonukleotidprimern	21
2.3.2	Reaktionsbedingungen für die PCR	24
2.3.3	Die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	24
2.3.3.1	Erststrangsynthese mit isolierten RNA aus Tomate	25
2.3.3.2	3'-RACE (Rapid Amplifikation of cDNA Ends)	25
2.3.4	PCR mit einzelnen <i>Glomus</i> -Sporen	26
2.3.5	Real-Time quantitative PCR	26
2.3.5.1	Entwicklung von Oligonukleotidprimer-Sequenzen	27
2.3.5.2	Reaktionsbedingungen für die Realtime-PCR	27
2.3.5.3	Quantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse	28
2.3.6	Analyse der PCR-Produkte	28
2.3.7	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	28

2.4	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten	28
2.4.1	Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pGEM [®] -T Easy	29
2.4.2	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	29
2.4.3	Selektion der transformierten Klone	30
2.4.4	DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte	30
2.5	Herstellung markierter DNA- und RNA-Sonden für Hybridisierungs- experimente	31
2.5.1	Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin durch PCR	31
2.5.2	Herstellung von RNA-Sonden durch <i>in vitro</i> -Transkription	32
2.5.2.1	Linearisierung der als Matrize verwendeten Vektoren	32
2.5.2.2	Markierung von RNA-Sonden mit Digoxigenin durch <i>In vitro</i> - Transkription	32
2.5.2.3	Kontrolle der Transkriptgröße und partielle Hydrolyse der hergestellten RNA-Sonden	33
2.6	Hybridisierung von DNA und RNA mit Dig-markierten Sonden	33
2.6.1	Restriktion genomischer DNA für "Southern Blots"	33
2.6.2	Agarose-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	33
2.6.3	Auftrennung von RNA auf denaturierenden Agarosegelen	34
2.6.4	Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembran	34
2.6.4.1	Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen (Southern-Blot)	35
2.6.4.2	Transfer von RNA auf Nylonmembran (Northern-Transfer)	35
2.6.5	Hybridisierung der Filter mit digoxigeninmarkierten DNA- und RNA-Sonden	35
2.6.6	Waschen der Filter und Detektion der mit Digoxigenin markierten Sonden	36
2.6.7	Quantifizierung der Hybridisierungssignale	37
2.6.8	Entfernen der gebundenen RNA-Sonden	37
2.7	RNA- <i>In situ</i> -Hybridisierung von Wurzellängsschnitten	37

2.7.1	Fixierung und Einbettung des Pflanzenmaterials für die <i>In situ</i> -RNA-Hybrisierung	37
2.7.1.1	Fixierung von Pflanzenmaterial mit Paraformaldehyd	37
2.7.1.2	Einbettung des Wurzelmaterials in Paraffin	38
2.7.2	Beschichtung der Objektträger zur Bindung von Gewebe	38
2.7.3	Schneiden der eingebetteten Wurzeln	38
2.7.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Dig-markierten RNA-Sonden	39
2.7.4.1	Vorbehandlung der Gewebeschnitte	39
2.7.4.2	RNA- <i>In situ</i> -Hybridisierung mit Dig-markierten RNA-Sonden	40
2.7.5	Waschen der Schnitte	40
2.7.6	Detektion der Hybridisierungssignale	40
2.7.7	Fotografische Dokumentation der Ergebnisse der <i>In situ</i> -Hybridisierungen und Quantifizierung der Hybridisierungssignale	41
3	Ergebnisse	42
3.1	PCR-Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus Genen, die an der Schwermetall- und Salz-Toleranz beteiligt sind	42
3.1.1	Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von Genen, die an Schwermetalltoleranz beteiligt sind	42
3.1.1.1	Vergleich von Aminosäuresequenzen der Phytochelatin synthase	42
3.1.1.2	Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von Nrampttransportern	43
3.1.1.3	Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von Zink-Transportern	44
3.1.1.4	Vergleich von Nukleotidsequenzen der Metallothioneine aus Tomate	44
3.1.2	Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von Genen, die an der Salztoleranz beteiligt sind	45
3.1.2.1	Vergleich von Aminosäuresequenzen der Plasmamembran (PIP)- und Tonoplast (TIP)-Aquaporine	45
3.1.2.2	Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter	46
3.1.3	Resultate der PCR-Experimente zur Amplifikation von Genen, die möglicherweise an der Schwermetall- bzw. Salz-Toleranz beteiligt sind	47

3.1.3.1	Amplifikation eines Teilbereiches von Phytochelatin synthase aus Tomate	47
3.1.3.2	PCR-Amplifizierung eines Bereiches von Nrampttransportergenen aus Tomate	48
3.1.3.3	PCR-Amplifizierung eines Bereiches von Metallothioneingenen aus Tomate	50
3.1.3.4	Amplifikation von Teilbereichen von PIP-Aquaporingenen aus Tomate	51
3.1.3.5	Amplifikation von Teilbereichen von TIP-Aquaporingenen aus Tomate	52
3.1.3.6	Amplifikation von Teilbereichen aus Na ⁺ /H ⁺ -Antiportergenen aus Tomate	53
3.1.3.7	Amplifikation eines Teilbereiches von Zink- und Nramp-Transportern aus AM-Pilze	54
3.1.4	Entwicklung von Sonden mittels 3'-RACE-Verfahrens	55
3.1.4.1	3'-RACE-Experimente zur Amplifizierung von 3'-cDNA-Enden von zwei Metallothioneinen aus Tomate	55
3.1.4.2	3'-RACE-Experimente zur Amplifizierung von 3'-cDNA-Enden von Nrampttransportergenen aus Tomate	57
3.1.4.3	3'-RACE-Experimente zur Amplifizierung von 3'-cDNA-Enden von Aquaporingenen aus Tomate	60
3.2	Einfluß der AM-Pilze auf das Wachstum von Tomate unter Schwermetallbelastung	63
3.2.1	Bestimmung der Schwermetallverfügbarkeit im Boden mittels <i>lux</i> -Reporter-System	63
3.2.2	Wachstum der mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen in der Schwermetallerde aus Breinigerberg und Mechernich	65
3.2.3	Wachstum der mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Cadmiumbelastung	66
3.3	Einfluß von AM-Pilzen auf das Wachstum von Tomatenpflanzen unter Salzstress	68
3.4	Kreuzhybridisierung zwischen den unterschiedlichen Nrampttransporter-Sonden	70
3.5	Southern-Analyse der klonierten Nrampttransportergene aus Tomate	72
3.6	Expression der Gene von Tomate für Schwermetall- und Salztoleranz	73

3.6.1	Northern-Analysen zur Untersuchung der Expression der Gene, die an der Schwermetalltoleranz beteiligt sind	73
3.6.1.1	Northern-Analyse zur Expression der Phytochelatinsynthase- und Metallothioneingene in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen	73
3.6.1.2	Northern-Analyse zur Expression der Nramtransportergene in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen	75
3.6.1.3	Northern-Analyse zur Expression der Phytochelatin synthase-, Metallothionein <i>Lemt2</i> - und Nramtransportergene 1, 2 und 3 in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Cadmium-Stress	77
3.6.2	Northern-Analyse zur Expression von PIP-, TIP-Aquaporinen und Na ⁺ /H ⁺ -Antiporterengen in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Salzstress	80
3.6.3	Quantitative Real-Time PCR-Ergebnisse zur Untersuchung der Expression der an der Schwermetall- und Salztoleranz beteiligten Gene	83
3.7	RNA- <i>In Situ</i> -Hybridisierungen zur Lokalisierung der mRNA für das Metallothioneingen <i>Lemt2</i> und das Nramtransportergen <i>LeNramp1</i>	85
4	Diskussion	90
4.1	Gewinnung von Sonden zu Untersuchungen der Expression von den an Schwermetall- bzw. Salztoleranz beteiligten Genen aus Tomate	90
4.2	Einfluß der Mykorrhizierung auf die Schwermetalltoleranz von Tomatenpflanzen	93
4.2.1	Bestimmung der Schwermetallverfügbarkeit im Boden mittels <i>Lux</i> -Reporter-Systems	93
4.2.2	Einfluß der Mykorrhizierung auf das Wachstum von Tomatenpflanzen unter Schwermetallbelastung	94
4.2.3	Expression der Nramtransportergene aus Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza unter Schwermetallbelastung	96
4.2.4	Expression der Metallothioneingene aus Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza unter Schwermetallbelastung	98

4.2.5	Expression des Phytochelatin synthasegens aus Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza unter Schwermetallbelastung	100
4.3	Einfluß der Mykorrhizierung auf die Salztoleranz von Tomatenpflanzen	101
4.3.1	Einfluß der Mykorrhizierung auf das Wachstum von Tomatenpflanzen unter Salzstress	101
4.3.2	Expression von Aquaporinen <i>LePIP1</i> , <i>LePIP2</i> und <i>LeTIP</i> aus Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza unter Salzstress	102
4.3.3	Expression von Na ⁺ /H ⁺ -Antiportergenen aus Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza unter Salzstress	104
4.4	Ausblick auf weitere Untersuchungen	105
5	Zusammenfassung	107
6	Literaturverzeichnis	109
7	Anhang	129
7.1	Abkürzungsverzeichnis	129
7.2	DNA-Sequenzen	131

1. Einleitung

1.1 Mykorrhiza als Form der Symbiose zwischen Pilzen und höheren Pflanzen

Der Begriff Mykorrhiza (griechisch: *mykes* = Pilz; *rhiza* = Wurzel) wurde zum erstenmal von A.B. Frank (1885) verwendet, um die Symbiose zwischen Bäumen und Pilzen zu beschreiben. Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Ausbildungsformen der Mykorrhiza: die ekto- und die endotrophe Mykorrhiza.

Bei der ektotrophen Mykorrhiza umgibt ein dicker Mantel aus Pilzhyphen die Wurzel der Wirtspflanze. Einige der Hyphen wachsen in den Interzellularen der Wurzelrinde und umgeben sie mit einem dichten Geflecht, dem sogenannten Hartigschen Netz (Hartig, 1851). Die symbiotischen Pilze gehören zur Klasse der Ascomycetes und der Basidiomycetes. Arten aus mehr als 140 Gattungen von Samenpflanzen sind an der Ausbildung einer ektotrophen Mykorrhiza beteiligt (Werner, 1987).

Die endotrophe Mykorrhiza lässt sich in drei Grundtypen gliedern (Werner, 1987): die Orchideenmykorrhiza, die Ericaceenmykorrhiza und die arbuskuläre Mykorrhiza (AM). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen befassen sich ausschließlich mit den zu letzt genannten AM-Pilzen.

Die AM-Pilze gehören zur Klasse der Zygomycetes und werden in der Ordnung Glomales zusammengefaßt. Diese wird neuerdings in sechs Gattungen: *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora*, *Paraglomus* und *Archaeospora* unterteilt (Morton und Redecker, 2001). Die AM ist eine sehr alte Symbiose. Der Fund von ähnlichen AM-Pilzstrukturen (Sporen, Arbuskeln) aus dem Ordovizium spricht dafür, daß Glomales-ähnliche Pilze bereits vor 460 Millionen Jahren existiert haben (Redecker et al., 2000) und eine Rolle bei der Eroberung des Festlandes durch die Gefäßpflanzen gespielt haben könnten (Simon et al., 1993, Redecker, 2002). Sie gilt als die wichtigste, weltweit verbreitete Symbiose (Hayman, 1982). Etwa 80% der höheren Pflanzen bilden eine Symbiose mit AM-Pilzen aus. Dabei spielt die Wirtsspezifität bei den AM-Pilzen eine untergeordnete Rolle. AM-Pilze einer Art sind in der Lage eine Symbiose mit Pflanzen aus verschiedenen Genera, Familien, Ordnungen und Klassen einzugehen (Harley und Smith, 1983; Harley, 1984). Nur wenige Familien, wie die Brassicaceae, die Chenopodiaceae und die Cyperaceae werden als nicht oder nur schwach mykorrhizierbar angesehen (Harley und Smith, 1983; Peat und Fitter, 1993).

Die AM-Pilze sind obligat biotrophe Organismen. Sie sind für Wachstum und Vermehrung darauf angewiesen, die Wurzel der Wirtspflanze zu kolonisieren. Der Pilz bekommt Kohlenhydrate in Form von Hexose (Shachar-Hill et al, 1995, Solaiman und Saito, 1997). Im Gegensatz zu dem extraradikalen Myzel (ERM), das nicht in der Lage ist, Hexose aufzunehmen, werden Hexose von den intraradikalen Hyphen aktiv aufgenommen. (Douds et al., 2000).

Der Lebenszyklus des Pilzes beginnt mit der Sporenkeimung. Während dieses begrenzten Wachstums werden Triacylglyceriden und Glykogen mobilisiert (Bécard et al., 1991; Gaspar et al., 1994, 1997). Diese Mobilisierung dient der Entwicklung von Keimschläuchen und der Bereitstellung der Kohlenstoffgerüste für anabolische Vorgänge wie die Neosynthese der Zellwand (Bonfante-Fasolo et al., 1990; Bago et al., 1996). Die auswachsenden Hyphen können innerhalb von ein bis zwei Wochen einige Zentimeter lang werden. Treffen sie in dieser Zeit nicht auf eine Wurzel einer

Wirtspflanze, stellen sie ihr Wachstum ein. Die Hyphe zerfällt, die Zellkerne lösen sich auf und die Spore kehrt in den Ruhezustand zurück (Bago et al., 1998a).

Trifft die auskeimende Spore auf eine Wurzel der Wirtspflanze, wird der Pilz als Symbiosepartner anerkannt. Diese Erkennung der Wirtspflanze durch die AM-Pilze soll auf der Abgabe von Signalsubstanzen durch Wurzeln potentieller Wirtspflanzen beruhen. Der Pilz reagiert mit einem starken Hyphenwachstum und Verzweigung (Giovanetti et al., 1993). Während Wurzelexudate von Wirtspflanzen das Hyphenwachstum stimulieren (Mosse und Hepper, 1975; Bécard und Piché, 1989a, 1989b, Tawarayama et al., 1996), haben Wurzelexudate von nicht Wirtspflanzen entweder keinen Effekt (Gianinazzi-Pearson et al., 1989; Bécard und Piché, 1990; Giovanetti und Sbrana, 1998) oder scheinen einen inhibitorischen Effekt zu haben (Koide und Schreiner, 1992; Vierheilig und Piché, 1995). Die Substanzen konnten bislang nicht chemisch identifiziert werden. Flavonoiden stimulieren zwar das Wachstum von AM-Pilzen (Tsai und Phillips, 1991; Bécard et al., 1992; Fries et al., 1997) sind aber nicht erforderlich als Pflanzensignal in der Symbiose (Bécard et al., 1995). Buee et al. (2000) erzielten mit einem Wurzelextrakt (branching factor) aus *Daucus carota*, der kein Flavonoid ist, eine Stimulierung des Hyphenwachstums in *Gigaspora margarita*. Diese Substanz konnte in nicht mykorrhizierbaren Pflanzen wie *Brassica* spp. Nicht identifiziert werden. Dieser Befund bekräftigt die Vermutung, daß den nicht mykorrhizierbaren Pflanzen die stimulatorische Komponente fehlt, die normalerweise in den Wirtspflanzen zu finden ist (Glenn et al., 1988; Bécard und Piché, 1990; Giovanetti und Sbrana, 1998).

Die Entwicklung der Symbiose wird durch den Kontakt zwischen der Wurzel der Wirtspflanze und dem Pilzhyphen initiiert. Dabei bilden die Hyphen ein Appressorium aus. Die Penetration in die Wurzel ist charakterisiert durch eine lokalisierte Produktion von zellwandabbauenden hydrolytischen Enzymen durch den Pilz und die Ausübung eines hydrostatischen Drucks durch die Hyphenspitze (Bonfante und Perotto, 1995). Trotz der Penetration durch den Pilz weist die Wirtspflanze nur eine sehr begrenzte Abwehrreaktion auf. In *Allium porrum* ist die Aktivität der Chitinase und die an der Zellwand gebundene Peroxidase deutlich geringer in den mykorrhizierten als in den Kontrollpflanzen (Spanu et al., 1989; Spanu und Bonfante, 1988). Dazu haben immunocytochemische Untersuchungen gezeigt, dass die Chitinase bei den mykorrhizierten Pflanzen in der Vakuole lokalisiert ist (Spanu et al., 1989). Die Regulation der Abwehrreaktion der Wirtspflanze könnte auf der Ebene der Gen-Expression stattfinden. *Medicago sativa* und *Medicago truncatula* reagieren auf pathogene Pilze mit einer raschen Produktion der Abwehrkomponente Medicago. Die Kolonisierung durch AM-Pilze führt zu einem Herunterregulieren der Transkriptmenge des kodierenden Gens für die Isoflavon Reduktase, das vorletzte Enzym der Medicago-Biosynthese, was zu einer Verhinderung der Akkumulation von Medicago führt (Harrison und Dixon, 1993; Volpin et al., 1995). *In situ*-Hybridisierungen zeigten, daß diese Herunterregulierung nur in der Umgebung der Arbuskeln stattfindet (Harrison und Dixon, 1994).

Nach der Infektion erstrecken sich die Pilze in der Wurzelrinde inter- und intrazellulär. Die Hyphen durchbrechen die Pflanzenzellwand, ohne jedoch das Plasmalemma des Wirtes zu überwinden (Harley und Smith, 1983). In den Rindenparenchymzellen bilden sich die typischen Strukturen dieser Mykorrhiza, die Arbuskeln aus. Diese bäumchenartigen Gebilde stellen diejenigen Strukturen der AM-Pilze dar, über die der Stoffaustausch von Nährelementen und Kohlenhydraten erfolgt (Saito 2000). In den Arbuskeln enthaltenden Zellen erfolgt eine Vielzahl zytomorphologischer Prozesse:

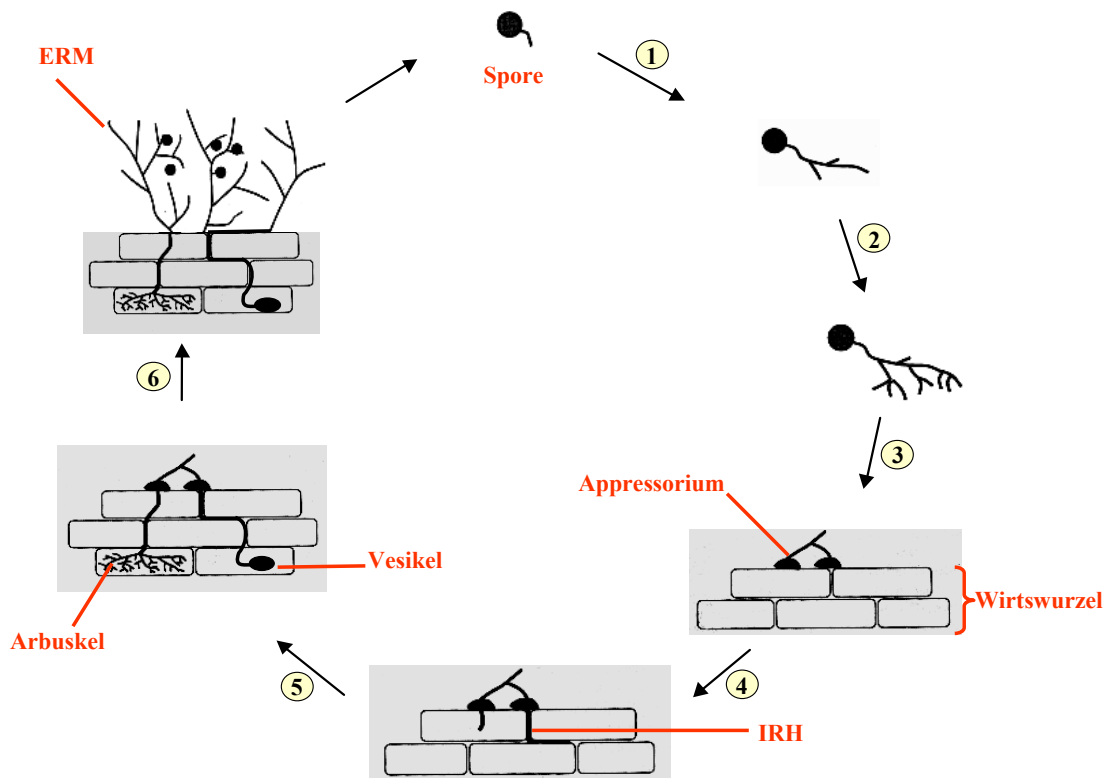
Fragmentierung der Zentralvakuole, Erhöhung des Cytoplasmavolumens, Verlagerung des Zellkernes in eine zentrale Position (Bonfante und Perotto, 1995; Gianinazzi-Pearson, 1996). Begleitet werden diese Umstrukturierungen von einer Neubildung des Cytoskelettes, wobei Mikrotubuli ein neues Netzwerk ausbilden (Bonfante, 1996). Die arbuskelnbildende Hyphe wird vollständig von der pflanzlichen Plasmamembran umgeben, die damit zur periarbuskulären Membran wird. Der Zwischenraum zwischen Pilzwand und Plasmamembran bildet ein Kontinuum mit der pflanzlichen Zellwand. Strukturell ist dieser Zwischenraum einer pflanzlichen Primärwand ähnlich, das heißt, es finden keine Vernetzungen der Zellwandbestandteile statt (Harrison, 1999).

Die Arbuskeln sind vier bis 15 Tage lebensfähige Strukturen (Carling und Brown, 1982). Bei den meisten AM-Pilzen entstehen blasenförmige Aufbreitungen der Hyphen, die als Vesikel bezeichnet werden. Diese Strukturen enthalten große Mengen Lipide und haben somit eine Speicherfunktion (Werner 1987).

Während der Wurzelkolonisation kommt es zur Ausbildung des extraradikalen Myzels (ERM) mit den charakteristischen Arbuskel-ähnlichen Strukturen (BAS: branched absorbing structures) (Moose und Hepper, 1975; Bago et al., 1998b; 1998c). Diese Strukturen spielen möglicherweise eine Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen (Bago et al., 1998b). Der ERM dient der Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden und der Kolonisierung von Wurzeln sowie der Produktion von Sporen. ERM trägt außerdem zur Stabilisierung des Bodens, möglicherweise durch Produktion von Glykoproteine, bei (Wright et al., 1996; Wright und Upadhyaya, 1996). Mit der Ausbildung der extraradikalen Sporen kommt es zur Vollendung des Pilzzyklus.

In der Symbiose durchwachsen die Pilze mit ihren feinen Pilzhyphen den Boden und mobilisieren dadurch für die Pflanzen Nährstoffe. Mykorrhizierte Pflanzen zeigen ein verbessertes Wachstum in nährstoffarmen Böden gegenüber nicht mykorrhizierten Pflanzen (Gerdemann, 1964). Die Pilzhyphen stellen eine enorme Vergrößerung des Wurzelsystems dar und sind an der Aufnahme, neben anderen Nährstoffen, an Phosphat beteiligt. In Böden mit limitierendem Phosphatgehalt ist die Phosphataufnahme bei mykorrhizierten Pflanzen zwei- bis dreimal höher als bei nicht mykorrhizierten Pflanzen (Tinker et al., 1992). Dabei nehmen die Pilzhyphen Phosphat aktiv auf und transportieren es durch die Hyphen zur Wurzel (Smith und Gianinazzi-Pearson, 1988). Neben der gesteigerten Phosphataufnahme ermöglichen die AM-Pilze eine verbesserte Versorgung der Wirtspflanzen mit Kalium, Kalzium, Eisen, Kupfer und Zink (Kothari et al., 1991; Khaliel, 1993) und eine erhöhte Salz- und Schwermetalltoleranz (Pond et al., 1984; Hildebrandt et al., 1999; Kaldorf et al., 1999). Weitere wichtige Wirkungen des AM-Pilzes auf die Wirtspflanze sind eine erhöhte Wasseraufnahme (Kothari et al., 1990) und eine gesteigerte Resistenz gegenüber pathogenen Pilzen und Nematoden (Dehne, 1982).

Abbildung 1:



Phasen in der Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza. Sporenkeimung und begrenztes Hyphenwachstum (1). Verstärkte Verzweigung der Hyphen in der Nähe der Wirtswurzel (2) und Bildung des Appressoriums an der Wurzeloberfläche (3). Penetration und Wachsen der intraradikalen Hyphen (IRH) in der Wurzelrinde (4). Durchwachsen der Hyphen und Bildung im inneren Rindenbereich von Arbuskeln und Vesikeln (5). Bildung von Sporen und extraradikalem Myzel (ERM) (6). (verändert nach Marsh und Schultze, 2001).

1.2 Mechanismen der Schwermetalltoleranz bei höheren Pflanzen

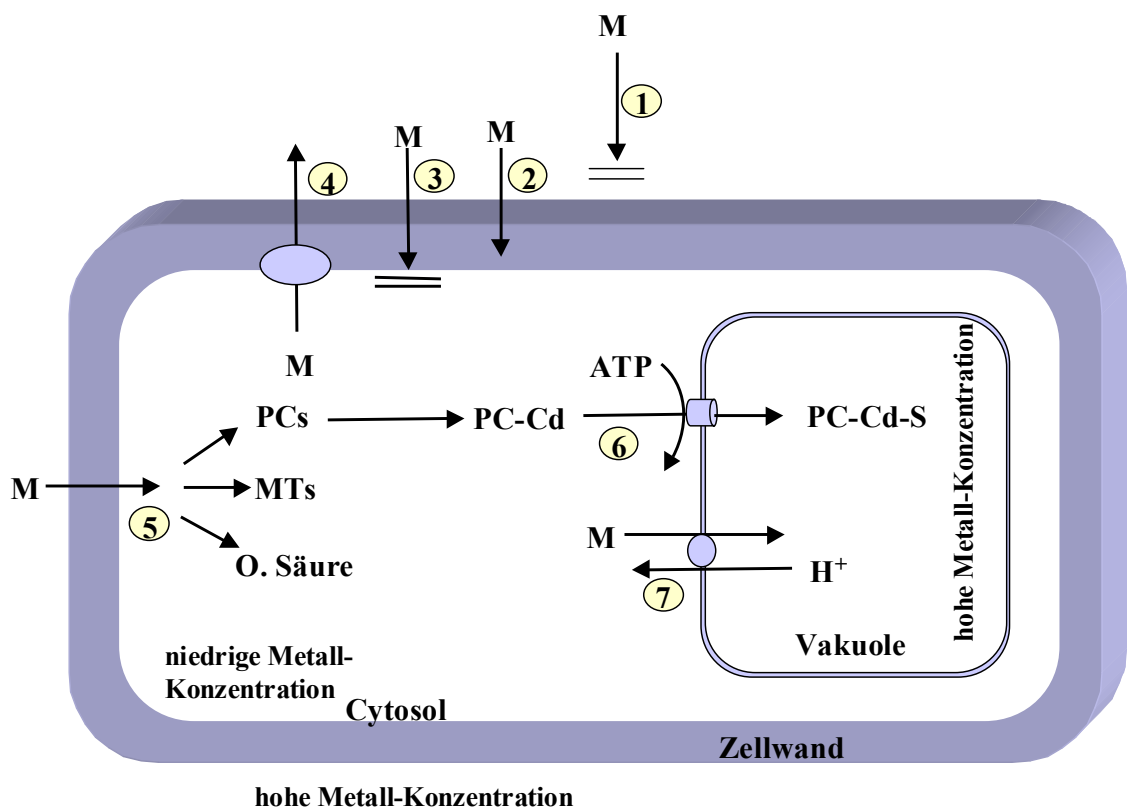
Schwermetalle zeichnen sich durch ein spezifisches Gewicht $> 5\text{g/cm}^3$ aus (Holleman und Wiberg, 1960; Lapedes, 1974). Zu den Schwermetallen gehören biologisch wichtige Elemente wie die Mikronährstoffe Eisen, Mangan, Zink, Kupfer, Kobalt und Molybdän (Marschner, 1995), Elemente mit eingeschränkter physiologischer Bedeutung wie Nickel und Vanadium und Elemente ohne bekannte bzw. ohne physiologische Funktion wie Cadmium, Arsen, Uran, Blei, und Chrom. Überschreitet die Konzentration der Schwermetalle im Boden einen bestimmten Wert, so können sie sehr toxisch sein. Ihre Toxizität beruht auf der Blockierung von funktionellen Gruppen (SH-Gruppen), Veränderung von Molekülkonformationen und Verdrängung essentieller Metalle aus Enzymen. Einige Schwermetalle sind in der Lage, freie Sauerstoffradikale zu bilden und damit zu einem oxidativen Stress zu führen (Dietz et al., 1999). Dadurch kommt es zu schädlichen Veränderungen des Stoffwechsels, die bis zum Absterben der Pflanzen führen können (Ernst, 1996). Cd-Stress ruft eine Beeinträchtigung der Photosynthese, Inhibition von Enzymaktivität, Proteindenaturierung und Veränderungen der Eigenschaften des Membrantransports hervor (Das et al., 1997; Hernandez und Cooke, 1997;

Williams et al., 2000). Durch Zn-Stress kommt es zur Beeinträchtigung der CO₂-Fixierung und des photosynthetischen Elektronentransports (Wallnöffer und Engelardt, 1995).

Äußerlich zeigt sich der Schwermetallstress durch ein verringertes Längenwachstum, eine Abnahme der Biomasseproduktion, Nekrosen und Chlorosen (Wallnöffer und Engelhand, 1995).

Pflanzen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um gegen den Schwermetallstress tolerant zu werden: Bindung der Schwermetalle an die Zellwand, verringerte Aufnahme durch die Plasmamembran, aktiver Transport aus der Zelle, Kompartimentierung in die Vakuole und Chelatierung im Cytoplasma (s. Abb. 2).

Abbildung 2:



Darstellung der möglichen Mechanismen der Schwermetalltoleranz in höheren Pflanzen. 1: Komplexierung durch Phytosiderophore. 2: Bindung an der Zellwand. 3: Verringerte Aufnahme durch die Plasmamembran. 4: Aktiver Transport aus der Zelle. 5: Komplexierung von Schwermetallen im Cytoplasma durch unterschiedliche Chelatoren. 6: Transport von PC-Cd-Komplexen in die Vakuole mittels ABC-Transporter. 7: Vakuolärer Transport von Metallionen durch Metall/H⁺-Antiporter. PC = Phytochelatine, M = Metallionen, MTs = Metallothioneine, o. Säure = organische Säure. (verändert nach Marschner, 1995).

1.2.1 Komplexierung der Schwermetalle im Cytoplasma durch Chelatoren

Einer der wichtigsten Toleranzmechanismen beruht auf einer Verminderung der Menge an freien Schwermetallen im Cytosol durch Bildung von Chelat-Komplexen. Mögliche Chelatoren im Cytosol sind organische Säuren, Glutathion, Phytochelatine und Metallothioneine.

1.2.1.1 Metallothioneine

Das Strukturprinzip der Metallothioneine zeigt eine mehrfach geknickte Polypeptidkette mit cysteinreichen N- und C-Terminalbereichen. Metallothioneine zeichnen sich durch das niedere Molekulargewicht (< 10 kD) und durch das Fehlen von aromatischen Aminosäuren und Histidin aus (Rauser 1990). Nach ihrer Struktur werden zwei Typen von Metallothioneinen unterschieden (Robinson et al., 1993). Bei Typ I sind die Cysteine (C) immer in der Folge C-X-C angeordnet, wobei X für Aminosäuren außer Cystein steht. Typ I MT-Gene wurde bei Mais, *Pisum sativum* und *Triticum aestivum* isoliert (De Framond, 1991; Evans et al., 1990; Snowden und Gardner, 1993). Metallothioneine vom Typ II besetzen neben dem C-X-C zwei weitere Motive (C-C und C-X-X-C) und wurden bei *Glycin max* und *Arabidopsis* beschrieben (Kawashima et al., 1991; Zhou und Golsbrough, 1995).

Das erste isolierte pflanzliche Metallothionein-Protein ist das Ec-Protein (Lane et al., 1987). Ec-Protein (early Cys-labeled), das eine Rolle bei der Embryogenese zu spielen scheint, wurde aus Weizen-Embryos gereinigt und ist in der Lage, Zn und Cd zu binden. Die Expression des Ec-Gens wird durch Abscisinsäure, nicht jedoch durch Zn, induziert (Reynolds und Crawford, 1996). Bis heute sind mehr als 50 Metallothionein-Sequenzen in verschiedenen Pflanzen beschrieben worden (Rauser, 1999). Die genaue Funktion dieser Proteine in der Schwermetalltoleranz ist noch unklar (Zhou und Golsbrough 1994; Schat et al., 2000). Zahlreiche Hinweise deuten aber daraufhin, dass Metallothioneine Schwermetalle komplexieren können und somit zu deren Entgiftung in der Zelle beitragen können (Dameron und Harrison, 1998). *MT2*-Gen aus *Arabidopsis* wird durch Kupfer, Zink und Cadmium induziert (Zhou und Golsbrough, 1994). Heterologe Expression des *MT2*-Gens führte bei MT-defizienten Hefe-Mutanten zu gesteigerter Cd-Toleranz. Murphy und Taiz (1995) konnten zeigen, daß verschiedene MT-Gene von verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen unterschiedlich reguliert sind. Während *MT1* konstitutiv exprimiert ist, wird die Transkription des *MT2*-Gens durch Cu induziert. Es wurde ebenso eine Korrelation zwischen der Toleranz der Ökotypen und der Transkriptmenge des *MT2*-Gens festgestellt.

1.2.1.2 Phytochelatine

Eine ähnliche Rolle wie den Metallothioneine bei der Komplexierung der Schwermetalle in der Zelle wird den Phytochelatinen (PC) zugeschrieben. Phytochelatine, mit der allgemeinen Formel (Glu-Cys)_n-Gly (n = 2 bis 11), wurden zum erstenmal aus Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* gereinigt und deren Aminosäuresequenz aufgeklärt (Grill et al., 1985). Danach wurden sie in allen untersuchten

Pflanzen und einigen Pilze nachgewiesen (Grill et al., 1987; Gekeler et al., 1988; Rauser, 1990; Kneer et al., 1992). In der Literatur gibt es Untersuchungen, die die Rolle der Phytochelatine bei der Schwermetallentgiftung nachweisen. Howden et al. (1995) zeigten, daß die Konzentrationen an gebildeten Phytochelatinen in Cd-sensitiven-Mutanten aus *Arabidopsis* mit dem Grad der Sensivität korreliert. Die Hemmung der PC-Synthese erhöht bei *Rauwolfia serpentina* und Tabak die As-Sensitivität (Nakazawa et al., 2000; Schmöger et al., 2000). Die Synthese der Phytochelatine wird bei Schwermetallstress induziert (Rauser, 1995; Zenk, 1996; Cobbett, 2000). Dabei fungieren Cd, As, Zn und Cu als starke Induktoren der PC-Synthese (Schat et al., 2002). Die Synthese der Phytochelatine geht vom Glutathion aus, wobei es zur Bildung von Phytochelatinen mit zwei (γ -Glu-Cys)-Einheiten kommt oder durch Kettenverlängerung höher molekulare Phytochelatine entstehen (Grill et al., 1989). Die Reaktion wird durch die Phytochelatin synthase (PCS) katalysiert. Das Enzym wurde zum erstenmal aus Zellkulturen von *Silene vulgaris* isoliert und charakterisiert (Grill et al., 1989). Die Phytochelatin synthase, deren Aktivität bei *Pisum sativum* (Klapheck et al., 1995), Tomate (Chen et al., 1997) und *Arabidopsis* (Howden et al., 1995) festgestellt wurde, wird durch Schwermetalle wie Cd, Ag, Pd, Zn und As stimuliert (Grill et al., 1987; Maitani et al., 1996). PCS-Gene wurden aus *Arabidopsis*, Weizen und *Schizosaccharomyces* isoliert (Clement et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). Das Protein ist charakterisiert durch konservierte Cysteinreste im N-Terminus und durch eine hohe Zahl Cysteinreste am C-Terminus. Die Expression der PCS-cDNA aus Weizen und *Arabidopsis* in *Saccharomyces cerevisiae* führte zu einer gesteigerten Cd-Toleranz (Clement et al., 1999).

1.2.2 Verminderte Aufnahme der Metallionen durch die Plasmamembran und Kompartimentierung in der Vakuole

Eine weitere Möglichkeit, die Schwermetallkonzentration im Cytoplasma niedrig zu halten, ist die verminderte Aufnahme durch die Plasmamembran und die Kompartimentierung von Metallionen in die Vakuole. Hierbei können Metalltransporter, die in der Plasmamembran oder in den Tonoplasten lokalisiert sind, eine wesentliche Rolle spielen.

Bei höheren Pflanzen ist eine ganze Reihe von Metallionen-Transportern identifiziert worden (Guerinot, 2000; Williams et al., 2000; Clement et al., 2001). ZIP-Transporter (ZRT, IRT related protein) wurden zunächst bei Pflanzen identifiziert (Eide et al., 1996) und vermitteln die Aufnahme von Fe und Zn (Grotz et al., 1998). Die CPx-ATPasen ist eine weitere Transporter-Familie, die metallbindende Domänen aufweist, und die Aufnahme von Schwermetallen wie Cu und Cd gewährleistet (Williams, 2000). Aus *Schizosaccharomyces pombe* wurde ein ABC-Transporter (ATP-binding cassette) identifiziert (HTM1), der den Cd-Phytochelatin-Komplex in die Vakuole transportiert (Ortiz et al., 1992, 1995). Dieser abhängige Tonoplast-Transport des PC-Cd-Komplexes und die Kompartimentierung in der Vakuole wurde ebenso bei Hafer und Tabak beobachtet (Vögeli-Lange und Wagner, 1990; Salt und Rauser, 1995).

Nramp-Transporter repräsentieren eine konservierte Proteinfamilie, die bei Bakterien, Pilzen, Tieren und Pflanzen identifiziert wurde (Cellier et al., 1995). Der *Nramp1* aus der Maus ist das erste identifizierte Transportergen dieser Familie (Vidal et al., 1993).

Er ist ausschließlich in Makrophagen und polymorphonuklären Leucocyten exprimiert und kodiert für ein integrales Membranprotein (Vidal, 1993). *Nramp1* spielt eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle von Infektionen durch intrazelluläre Parasiten (Govoni und Gros, 1998). Das *Nramp2*-Gen aus der Ratte, auch *DCT1* (divalent cation transporter 1) genannt, ist in der Lage, eine Vielzahl von Metallionen wie Zn, Mn, Cu, Ni und Cd zu transportieren (Gunshin et al., 1997). Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurden drei Nrampttransporter (*SMF1*, *SMF2* und *SMF3*) identifiziert, deren Rolle bei der Metallionenaufnahme und Translokation beschrieben wurde (Liu et al., 1997; West et al., 1992; Portnoy et al., 2000). Untersuchungen zur Expression der *Nramp*-Gene bei den höheren Pflanzen sind auf Reis und *Arabidopsis* beschränkt (Belouchi et al., 1997; Thomine et al., 2000; Curie et al., 2000). Die Nrampttransportergene *OsNramp1*, *OsNramp2* und *OsNramp3* aus Reis weisen eine organspezifische Expression auf (Belouchi et al., 1997), ihre Funktion bei dem Metallionentransport ist bislang nicht untersucht worden. Bei *Arabidopsis* wurde bei dem *Nramp*-Gen *EIN2* (ethylen-insensitive 2), das eine Rolle bei der Signaltransduktion spielt, keine Metalltransport-Funktion festgestellt (Alonso et al., 1999). Im Gegensatz dazu sind *AtNramp1*, *AtNramp3* und *AtNramp4*, aber nicht *AtNramp2*, durch Eisenmangel induziert und sind möglicherweise in der Lage, Fe und Mn zu transportieren (Thomine et al., 2000, Curie et al., 2000). Darüber hinaus führt die Expression von *AtNramp1*, 3 und 4 in der Hefe zu Cd-Akkumulation (Thomine et al., 2000). Dies könnte ein Hinweis auf eine multispezifische Funktion dieser Transportproteine sein.

1.2.3 Einfluß der AM-Pilze auf die Schwermetalltoleranz der Wirtspflanze

AM-Pilze sind ein wesentlicher Bestandteil der Pflanzenwurzeln und stellen eine direkte Verbindung zwischen dem Boden und der Wurzel dar. Die Pilze scheinen in besonderem Maße dafür geeignet zu sein, im Boden, vor allem wenig mobile Elemente mit geringen Diffusionsraten, stärker aufnehmen zu können als Pflanzen, was eine bessere Exploration des Bodenraumes durch ihre feinverzweigten Hyphen bedeutet. Dies ist in Bezug auf die im Boden als Mikronährstoffe vorhandenen Metalle von hoher Bedeutung. AM-Pilze tragen zum Wachstum der Pflanze nicht nur durch eine verbesserte Versorgung mit Nährelementen (Harrison, 1999) sondern auch durch eine Schutzfunktion gegen unterschiedlichen biotischen und abiotischen Stress einschließlich den Schwermetallstress (Leyval et al., 1997) bei. Viele Arbeiten weisen auf eine höhere Toleranz von mykorrhizierten Pflanzen gegenüber toxischen Metallkonzentrationen im Boden hin (Shetty et al., 1994.; Hildebrandt et al., 1999; Gonzalez-Chavez et al., 2002). Der Einfluß aber von AM-Pilzen auf die Schwermetallaufnahme ihrer Wirtspflanze ist in der Literatur zum Teil widersprüchlich. Bei hohen Schwermetallgehalten zeigten einige Untersuchungen eine erhöhte Schwermetallaufnahme bei den mykorrhizierten Pflanzen (Gildon und Tinker, 1983; Killham und Firestone, 1983; Weissenhorn und Leyval, 1995). Andere Autoren fanden im Gegenteil eine Reduzierung der Schwermetallkonzentration in den Pflanzen aufgrund der Mykorrhizierung (Schüepp et al., 1987; Elkherbawy et al., 1989, Weissenhorn et al., 1995; Kaldorf et al., 1999). Diaz et al. (1996) untersuchten den Einfluß der Mykorrhizierung auf die Zn- und Pb-Aufnahme bei *Lygeum spartum* und *Anthyllis cytisoides* innokuliert mit *Glomus mossae* und *Glomus macrocarpum* unter verschiedenen Metallkonzentrationen. Die

Ergebnisse zeigten, daß bei geringeren Metallkonzentrationen die mykorrhizierten Pflanzen eine höhere Zn- und Pb-Konzentration aufwiesen als die Kontrollen. Bei höheren Metallkonzentrationen aber waren die Metallgehalte in den mit *Glomus mosseae* inokulierten Pflanzen niedriger als in den Kontrollpflanzen, während die mit *Glomus macrocarpum* inokulierten Pflanzen eine höhere Metallaufnahme als die nicht mykorrhizierten Pflanzen aufwiesen. Es läßt sich jedoch sagen, daß bei geringen Konzentrationen der Schwermetalle die Aufnahme in den mykorrhizierten Pflanzen in nahezu allen Fällen erhöht ist. Steigen aber die Metallgehalte stark an, nehmen die mykorrhizierten Pflanzen aber allgemein weniger auf als die Kontrollpflanzen. Die Bestimmungen von Schwermetallgehalten in mykorrhizierten und Kontroll-Maispflanzen unter Schwermetallbelastung wiesen darauf hin, daß das verbesserte Wachstum der mykorrhizierten Maispflanzen im Schwermetallboden auf eine mögliche Immobilisierung der Metalle innerhalb der pilzstrukturenthaltenden Wurzelzellen zurückgeführt werden könnte (Kaldorf et al., 1999). Neben der Konzentration der Schwermetalle im Boden kann die Toleranz der Pilzart gegenüber Schwermetallen und vor allem seine Effizienz bei der Aufnahme und Festlegung von Schwermetallionen von großer Bedeutung sein. Das *Glomus*-Isolat BrI, isoliert von den Wurzeln des Galmeiveilchens (*Viola calaminaria*) aus dem Schwermetallstandort Breinigerberg, trug zu einem verbesserten Wachstum der Maispflanzen in schwermetallbelasteter Erde im Vergleich zu dem Isolat *Glomus intraradices* Sy167 bei (Hildebrandt et al., 1999).

1.3 Mechanismen der Salztoleranz bei höheren Pflanzen

Das gemeinsame Merkmal aller Salzstandorte ist ein erhöhter Gehalt von leicht löslichen Salzen. Ein großes Problem in der Landwirtschaft stellt die Versalzung durch die Bewässerung dar. Wasser verdunstet in Form von Wasserdampf durch Evaporation aus dem Boden. Dadurch steigt der Salzgehalt des Bodens an. Enthält das Bewässerungswasser hochkonzentrierte gelöste Mineralien, erreicht der Bodensalzgehalt Werte, die für salzempfindliche Pflanzen toxisch sind. Man schätzt, daß etwa ein Drittel des bewässerten Landes auf der Erde versalzen sind.

Belastung durch Salz, die zu erhöhten Salzkonzentrationen in der Zelle führt, ruft bei den Pflanzen Funktionsstörungen und Schädigungen hervor. Ein Überschuss an Na^+ und Cl^- im Protoplasma führt zu Einschränkung der Photosynthese (Seemann und Critchley, 1985; Locy et al., 1996), Herabsetzung der Proteinsynthese (Hurkman und Tanaka, 1987), Veränderung der Zellwand (Iraki et al., 1989) und der Membraneigenschaften, was wiederum zu einer Herabsetzung der Aufnahme mineralischer Nährstoffe, vor allem von K^+ und Ca^{2+} führen kann.

Gegen erhöhten Salzgehalt im Boden haben die sogenannten Halophyten, in salinen Habitaten lebende Pflanzen, verschiedene Schutzmechanismen entwickelt, um tolerant gegenüber dieser Streßsituation zu werden. So können manche Pflanzen durch eine Erweiterung des Speichervolumens der Zelle eine Verdünnung des Zellsaftes erreichen und die toxisch wirkende Salzkonzentration erniedrigen (Salzsukkulenz). Eine weitere Strategie zur Vermeidung von Salzstress ist die Salzausscheidung durch Salzdrüsen und Blasenhaare und Entsalzung durch Abwurf von Pflanzenteilen (Salzelimination). Manche Pflanzen produzieren unter Salzstress kompatible organische Osmolyten wie Proline, Glycinbetain, um Polyole (Greenway und Munns, 1980; Yancey et al, 1982;

Delauney und Verma, 1993). Diese Osmolyten dienen dem Ausgleich des osmotischen Gleichgewichtes zwischen Cytoplasma und Zellkompartimenten.

Die Entlastung des Cytosols durch Entfernung der Na^+ -Ionen aus dem Cytoplasma in die Vakuole und in den Apoplasten geschieht hauptsächlich über Na^+/H^+ -Antiporter, sowohl im Plasmalemma als auch im Tonoplasten (Zhang et al., 2001; Blumwald et al., 2000). Na^+/H^+ -Antiporter regulieren den Na^+/H^+ -Austausch durch die Membran und tragen zur Regulation von pH-Wert, Zellvolumen und Natriumkonzentration im Cytoplasma bei (Orlowski und Grinstein, 1997). Ihre Beteiligung an der Salztoleranz wurde in verschiedenen Untersuchungen beschrieben (Fukuda et al., 1999; Xia et al., 2002). Diese Antiporter wurden durch erhöhte cytosolische NaCl-Konzentrationen induziert. Die Überexpression eines vakuolären Na^+/H^+ -Antiporter-Gens in *Arabidopsis* erhöhte deutlich dessen Salztoleranz (Apse et al., 1999).

Neben der ionenspezifischen toxischen Wirkung weisen saline Böden ein niedriges Wasserpotential auf, und dementsprechend ist die Wasserverfügbarkeit gering. Salinitätsstress ist somit zugleich ein Trockenstress. Hierbei können Aquaporine, die den Wassertransport durch die Membran erleichtern (Schäffner, 1998), durch die Regulation des pflanzlichen Wasserhaushaltes, an der Salztoleranz beteiligt sein (Bohnert und Jensen, 1996). Die Aquaporine gehören zu der MIP (major intrinsic protein)-Familie und sind bei den Pflanzen sowohl in der Plasmamembran (PIP: plasma membrane intrinsic protein) als auch im Tonoplast (TIP: tonoplast intrinsic protein) lokalisiert (Höfte et al., 1991; Kammerloher et al., 1994). Einige Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Aktivität von Aquaporinen durch Phosphorylierung reguliert wird (Maurel et al., 1997; Johanson et al., 1998). Die Phosphorylierung erhöht die Aktivität der Plasmamembran-Aquaporin PM28A aus Spinat. Unter Wasserstress ist die PM28A wenig phosphoryliert. Dies läßt vermuten, daß die pflanzlichen Zellen unter Wasserdefizit die Aquaporine partiell verschließen und dadurch einen Wasserverlust verhindern. Die differentielle Expression mancher Aquaporingene unter Salzbelastung wurde von einigen Arbeitsgruppen beschrieben (Guerrero et al., 1990; Yamada et al., 1995; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992). Bei *Arabidopsis* wird das Aquaporingen *RD28*-Gen unter Wasserstress induziert (Yamaguchi et al., 1992). Im Gegensatz dazu haben Yamada et al. (1995) eine Salzrepression eines Aquaporingens aus *Mesembryanthemum crystallinum* beobachtet. Parallel zur der Regulation der Aktivität von Aquaporinen durch Phosphorylierung (Maurel et al., 1995) könnte die Modulation deren Expression ein wichtiger Faktor zur Änderung der Wasserpermeabilität der Membran bei den pflanzlichen Zellen als Reaktion auf den osmotischen Streß sein.

Das Vorkommen von AM-Pilzen in salinen Habitaten (Hildebrandt et al., 2001; Carvalho et al., 2001; Landwehr et al., 2002) könnte ein Hinweis auf ihre Beteiligung an der Salztoleranz der Wirtspflanze sein. Dieses wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Al-Karaki et al. (2001) zeigten, daß mykorrhizierte Tomatenpflanzen, im Gegensatz zu den Kontrollpflanzen, unter zunehmender Salz-Konzentration ein verbessertes Wachstum aufwiesen. Solch positiver Einfluß der Mykorrhizierung auf das Wachstum der Wirtspflanze wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt (Gupta und Krishnamurthy, 1996; Ruiz-Lozano et al., 1996; Cantrell und Linderman, 2001).

Der Mechanismus des positiven Einflusses von AM-Pilzen auf die Wirtspflanze bleibt unklar. Poss et al. (1985) und Pfeiffer und Bloss (1988) haben beobachtet, daß die

erhöhte Salztoleranz der Wirtspflanze auf die verbesserte Phosphataufnahme durch den AM-Pilz zurückgeführt werden könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß der AM-Pilz zur Erhaltung der Membranintegrität der Wirtszelle unter Salzbelastung beiträgt, was zu einer effizienten Kompartimierung in der Vakuole und selektiven Aufnahme von Ionen führen könnte (Rinaldelli und Mancuso, 1996; Mancuso und Rinaldelli, 1996). Diese gesteigerte Salztoleranz der Wirtspflanze könnte möglicherweise auf eine durch den AM-Pilz verbesserte Versorgung mit Nährstoffen (Al-Karaki und Al-Raddad, 1997; Al-karaki und Clark, 1998) und eine erhöhte Wasseraufnahme (Ruiz-Lozano und Azcon, 1995), was zu einer Wachstumstimulierung der Wirtspflanze und einer Verdünnung der toxischen Ionen führen könnte (Juniper und Abbott, 1993), zurückzuführen sein.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Der positive Einfluß der Mykorrhizierung auf die Schwermetall- und Salztoleranz der Wirtspflanze wurde bisher hauptsächlich durch physiologische und biochemische Ansätze untersucht. Eine andere Herangehensweise ist der molekularbiologische Ansatz. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, diese durch den symbiotischen Pilz vermittelte Toleranz anhand Transkriptanalysen von Genen, die möglicherweise an der Schwermetall- und Salztoleranz beteiligt sind, zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene Methoden wie Northern-Blot, RT-PCR, quantitative Real-Time-PCR und *In situ*-Hybridisierung eingesetzt. Ein PCR basierender Ansatz erlaubte die Herstellung von Sonden aus Tomate für Phytochelatase-, Metallionentransporter-, Metallothionein-, Aquaporin-, und Na^+/H^+ -Antiporter gene. Durch den Vergleich der Expression dieser Gene zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen, die unter Schwermetall- bzw. Salzbelastung angezogen wurden, wird in der vorliegenden Arbeit der Einfluß einer Mykorrhizierung auf die Schwermetall- und Salz-Toleranz der Wirtspflanze untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsobjekte

2.1.1 Organismen

Als Versuchspflanze wurde *Lycopersicon esculentum* MILL.var.Tamina, GS (Schmitz und Laux, Hilden) verwendet.

Zwei arbuskuläre Mykorrhizapilze aus der Gattung *Glomus* wurden zum Inokulieren der Versuchspflanzen eingesetzt:

- *Glomus intraradices* BrI, isoliert von den Wurzeln des Galmeiveilchens (*Viola calaminaria*) aus dem Schwermetallstandort Breinigerberg (Stolberg-Breinigerberg, bei Aachen)
- *Glomus geosporum*-Mischinokulum, dieser AM-Pilz wurde aus Vermehrungskulturen eines Salzbodens bei Jerxheim (Südost-Niedersachsen) gewonnen. Vermutlich durch eine Kontamination im Gewächshaus ist neben *Glomus geosporum* auch *Glomus intraradices* Sy 167 (*Glomus intraradices* Schenck & Smith INVAM Sy167, isoliert in Syrien) in diesem Inokulum enthalten.

Von folgenden Schwermetallstandorten wurden Bodenproben zur Anzucht der Pflanzen unter Schwermetallbelastung entnommen:

- Stolberg-Breinigerberg bei Aachen
- Abraumhalde der Erzabbaufläche Kalenberg (Bleibergbau) bei Mechernich

Als Wirtsbakterium für die eingesetzten Klonierungsvektoren wurde der Stamm *Escherichia coli* XL1-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1 lac*⁻) F'[*proAB⁺laqI^r lacZ ΔM15Tn10(ter^r)*] (Sambrook et al., 1989) benutzt.

2.1.2 Oberflächensterilisierung von Saatgut

Die Tomatensamen wurden durch eine Behandlung mit 70% EtOH (5 min) und 0.1% HgCl₂ (5 min) sterilisiert (Neuer et al., 1985). Das Saatgut wurde dann fünfmal für je 5 min mit destilliertem Wasser gespült und anschließend zur Keimung in Petrischalen gelegt, die ein mit sterilem Wasser befeuchtetes Filterpapier enthielten. Nach ca. sieben Tagen wurden die Tomatenkeimlinge für die Versuche eingesetzt.

2.1.3 Oberflächensterilisierung der AM-Sporen

Die Oberflächensterilisierung der AM-Sporen erfolgte nach einem modifizierten Verfahren zur Sterilisierung von Wurzelsegmenten (Gryndler et al., 1997). Die AM-Sporen wurden in 0,1% MgSO₄ Lösung fünfmal für 2 min gewaschen. Anschließend folgte die Behandlung mit einer Antibiotikallösung:

Penicillin G (Kaliumsalz, Sigma)	5 mg/l
Streptomycinsulfat (Calbiochem)	5 mg/l
Neomycinsulfat (Sigma)	5 mg/l
Tetracyclhydrochlorid (Boeringer Mannheim)	2,5 mg/l

Dieser Lösung wurde 50 µl Tween 80 (Sigma) hinzugefügt. Die Sporen wurden für 4h in dieser Lösung bei RT inkubiert, anschließend für 4 min in 0,3% NaOCl-Lösung inkubiert und zehnmal mit 250 ml sterilem H₂O gewaschen. Die Sporen wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für die PCR-Experimente eingesetzt.

2.1.4 AM-Pilz-Inokulumproduktion

Zur Gewinnung des Inokulums wurde das Blähtonverfahren (Dehne und Backhaus, 1986) benutzt. Dabei kann die Gefahr von Fremdinfection verringert werden, wenn zur Inokulumproduktion eine andere Wirtspflanze benutzt wird als die spätere Versuchspflanze (Menge, 1983, 1986). Als Pflanze wurde *Tagetes* gewählt, da diese von AM-Pilzen schnell besiedelt wird und die Verbreitung von *Pythium* über das Inokulum verhindert (v. Alten et al., 1990). Die Anzucht erfolgte in Plastiktöpfen, die mit 1,1 l Leca-ton® (Ø 2-4 mm, Porenvolumen 75%; Leca Deutschland, Halstenbek) und 0,1 l Inokulum gefüllt wurden. In jedem Topf wurden jeweils mehrere *Tagetes*-Samen ausgelegt. Nach drei Monaten wurden die Pflanzen nicht mehr begossen, wodurch die Sporulation der AM-Pilze stimuliert wird. Drei Wochen später wurden die Pflanzen geerntet. Das Inokulum wurde in Plastiktüten bei Raumtemperatur gelagert, wobei die Vitalität mehrere Jahre erhalten bleiben soll (Grunewaldt-Stöcker, 1989).

2.1.5 Kulturbedingungen und Ernte der Versuchspflanzen

Die Versuchspflanzen wurden im Gewächshaus bei einer Temperatur von ca. 20-35°C und einer relativen Luftfeuchte von etwa 70% angezogen. Als zusätzliche Lichtquellen zum normalen Tageslicht dienten Hochdruck-Quecksilberdampf lampen (HPL-N, 400W, Phillipps) und Hochdruck-Metallhalogendampflampen (HPL-T, 400W, Phillipps). Dadurch wurde eine künstliche Tageslänge von 12 h gewährleistet. Bei künstlicher Beleuchtung lag die Lichtintensität 30 cm über den Töpfen bei ca. 150 µE/s x m². Bei starker Sonneneinstrahlung wurden bis zu 600 µE/s x m² erreicht.

Die eingesetzten Tomatenpflanzen wurden entweder in Töpfen oder Kompartimentssystemen angezogen. Die Kompartimentsysteme erlauben die Isolierung von extraradikalen Sporen und Hyphen von AM-Pilzen. Sie bestehen aus einem Wurzel- und einem Hyphen-Kompartiment. Beide Kompartimente sind durch eine mehrfach perforierte PVC-Platte und ein Nylonnetz (Maschenweite 30 µm) getrennt. Dadurch können nur die Hyphen, aufgrund ihres kleinen Durchmessers, das Netz penetrieren und in das Hyphen-Kompartiment hineinwachsen. Als Substrat wurde für das Hyphen-Kompartiment autoklavierter Quarzsand eingesetzt.

Die Versuchspflanzen wurden täglich mit Wasser begossen. Einmal pro Woche wurde mit phosphatfreier und einmal im Monat mit phosphathaltiger Hoagland-Nährlösung (s. Tabelle 1) gedüngt. Das Düngen erfolgte erstmals vier Wochen nach der Aussaat.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Hoagland-Nährlösung

Makroelemente	Verbindung	Konzentration(μM)
K, N	KNO_3	5000
Ca, N	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5000
Mg, S	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2000
K, P	K_2HPO_4	1000*
Mikroelemente		
Cl	KCl	50
B	H_3BO_3	25
Mn	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	5
Zn	$\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	2
Cu	$\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,5
Mo	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,014
Fe	Fe-EDTA	40**

* K_2HPO_4 wurde nur für die phosphathaltige Nährlösung zugegeben; sonst wurden 6000 statt 5000 μM KNO_3 eingesetzt.

** Für die Fe-EDTA-Stammlösung wurden 3,72 Na₂EDTA und 2,78g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ bei 80°C in 1l H_2O gelöst.

2.1.5.1 Anzucht der Tomatenpflanzen unter Schwermetallstress

Zur Anzucht der mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen wurden zwei verschiedene Substrate verwendet. Ein Substrat mit einer Mischung aus 10% Einheitserde, 10% Lecaton® (\varnothing 2-4 mm, Porenvolumen 75%; Leca Deutschland, Halstenbek), 70% sterilisierter Schwermetallerde aus dem Standort Breinigerberg bzw. Mechernich und 10% Inokulum (bei Kontrollpflanzen: 20% Lecaton®). In einem zweiten Versuch wurden die Tomatenpflanzen in einer Mischung aus 10% Einheitserde, 10% Inokulum und 80% Lecaton® bzw. 90% bei Kontrollpflanzen herangezogen. Dabei wurden die Pflanzen in diesem zweiten Versuch ab der dritten Woche jeden zweiten Tag mit CdCl_2 -Lösungen begossen (0 mM, 0,5 mM und 1 mM). Als Inokulum wurde für beide Versuche *Glomus intraradices* Br1 eingesetzt.

2.1.5.2 Anzucht der Versuchspflanzen unter Salzbelastung

Die Anzucht der Tomaten erfolgte mit 10% Einheitserde, 15% Inokulum bzw. Lecaton® (bei den Kontrollansätzen) und 75% autoklaviertem Quarzsand. Drei verschiedene NaCl-Konzentrationen (0, 8 und 12 g NaCl/l Bodensubstrat) wurden eingestellt. Für die 8 und 12 g NaCl-Konzentrationen wurde im Alter von sieben Wochen eine NaCl-Konzentration von 1 g/l Bodensubstrat eingesetzt. Danach wurde die Endkonzentrationen durch wöchentliches Verdoppeln des NaCl-Gehaltes erreicht, um einen osmotischen Schock bei den Pflanzen zu vermeiden. *Glomus geosporum*-Mischinokulum wurde zum Inokulieren der Pflanzen eingesetzt.

Ein Leitfähigkeitsmessgerät (IMAG-DLO; Institut of Agricultural and Environmental Engineering, Department of Instrumentation and Measurement Technology, Neder-

lands), das eine *In situ*- Messung des Salzgehaltes ermöglichen sollte, erlaubte die Einstellung und die wöchentliche Überprüfung des erwünschten NaCl-Gehaltes pro Topf.

2.1.5.3 Ernte der Versuchspflanzen

Nach 14 Wochen Anzucht wurden die oberirdischen Pflanzenteile unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Wurzeln wurden gründlich mit fließendem Wasser ausgewaschen, um die haftenden Bodenpartikel zu entfernen. Danach wurden Wurzelproben für die Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades entnommen und das restliche Wurzelmaterial sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.1.6 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades

2.1.6.1 Färbung der Wurzeln mit Lactophenolblau

Die Wurzelstücke wurden nach gründlichem Spülen in Schnappdeckelgläschen überführt. Zur Fixierung wurden 5 ml FAA-Fixierlösung (nach Phillips und Hayman, 1970) zugegeben und die Wurzelproben bis zur Färbung bei RT gehalten.

Zusammensetzung der FAA-Fixierlösung:

- 45,85% H₂O
- 45,85% (v/v) Ethanol
- 6% (v/v) Formaldehyd
- 2,3% (v/v) Eisessig

Die Färbung der fixierten Wurzelstücke mit Lactophenolblau erlaubt die Identifizierung von AM-Strukturen. Nach 35 min Inkubation der Proben in 10% KOH bei 90°C wurden die aufgehellten Wurzeln mit H₂O gespült und 10 min bei RT in 3,7% HCl angesäuert. Anschließend wurde das Wurzelmaterial 90 min in Lactophenolblau (C.I.Nr 47780; 1g/l; pH 2,3; Merck) angefärbt. Die Wurzeln wurden danach in 50% Lactat gelagert, was zur Entfärbung des Pflanzenmaterials führte. Die mit Lactophenolblau gefärbten Wurzelstücke wurden bei 125-facher Vergrößerung unter einem Mikroskop (Zeiss PM6) auf das Vorhandensein von AM-Strukturen (Mycel, Arbuskel und Vesikel) geprüft, indem man die mit Lactophenolblau gefärbten Wurzelstücke auf einen Objektträger überführte und unter dem Mikroskop (Zeiss PM6) bei 125-facher Vergrößerung untersuchte.

2.1.6.2 Mikroskopische Bonitierung der gefärbten Wurzeln

Zur Bonitierung des Verpilzungsgrades wurde eine Modifizierung (Schmitz et al., 1991) der “grid-line-intersect”-Methode nach Ambler und Young (1977) herangezogen. Die gefärbten Wurzelstücke wurden auf einen Objektträger ausgelegt und unter dem Mikroskop (Zeiss PM6) bei 100-facher Vergrößerung betrachtet. Der bei der Vergrößerung vorliegende Bildausschnitt, der einer Wurzellänge von 1,4 mm entsprach, wurde systematisch auf das Vorhandensein von Vesikeln, Arbuskeln sowie Innen- und Außenmyzel untersucht. Ein Wurzelabschnitt gilt als mykorrhiziert, wenn mindestens eine der erwähnten Strukturen vorliegt. Der prozentuale Gesamtmykorrhizierungsgrad ergab sich aus dem Verhältnis der infizierten Segmente zur Gesamtmenge aller betrachteten Wurzelabschnitte. Zur statistischen Absicherung mußten mindestens 300 Wurzelabschnitte pro Probe untersucht werden.

2.1.6.3 Isolierung von AM-Sporen

Das hier beschriebene Verfahren wurde, wie bei Esch et al. (1994) publiziert, durchgeführt. Das mit dem Pilzmaterial infizierte Substrat wurde in ca. 5 Liter Wasser aufgenommen. Ein gründliches Rühren ermöglicht das Ablösen der Sporen vom Substrat. Das Wasser-Substrat-Gemisch wurde auf einer Kombination von mehreren Sieben mit absteigender Porenweite getrennt (1 mm; 0,5 mm; 0,08 mm; 0,045 mm). Die auf dem 0,045 mm- und/oder 0,08 mm-Sieb zurückgebliebene Fraktion wurde in eine Petrischale gespült und mit Wasser aufgefüllt. Die Sporen wurden durch vorsichtiges Schütteln der Fraktion aufgewirbelt und mit einer 20 ml-Spritze, an deren Spitze ein Gummischlauch befestigt war, abgesaugt. Etwa 60 ml dieser Sporen-Suspension wurden auf zwei große Glaszentrifugenröhrchen verteilt, mit der gleichen Menge 70%iger Saccharose unterschichtet und 10 min bei 1400 g zentrifugiert (Hettich Rotixa KS). Die in der Wasser/Saccharose-Grenzschicht befindlichen Sporen wurden mit einer 20 ml-Spritze abgenommen und zur Entfernung der Saccharose auf das 45 µm-Sieb gegeben und gründlich mit Wasser gewaschen. Die Sporenfraktion, in der sich noch Wurzelreste befanden, wurde zur weiteren Reinigung in eine Petrischale gespült. Mittels einer Pasteurpipette, deren unteres Ende mit einem Gummischlauch versehen wurde, konnten die Sporen leicht von den kleinen Wurzel- und Schmutzpartikeln getrennt werden. Die Sporen wurden in Wasser bei 4°C gelagert.

2.1.6.4 Ernte von Pilzmaterial aus den Kompartimentsystemen

Die Hyphen und Sporen, die im mit Quarzsand gefülltem Hyphen-Kompartiment gewachsen sind, wurden in 2 l Wasser aufgeschwemmt und durch starkes Rühren von dem Quarzsand getrennt. Das Wasser-Quarzsand-Gemisch wurde anschließend über eine Sieb-Kombination absteigender Porenweite gegeben (1 mm; 0,5 mm; 0,08 mm; 0,045 mm). Die in der 0,5 und 0,08 mm Maschenweite isolierten Hyphen und Sporen wurden in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Ein Teil der gewonnenen Sporen wurde anschließend sterilisiert und für die PCR-Experimente eingesetzt. Der Andere Teil des isolierten Pilzmaterials wurde in flüssigem Stickstoff zur Nukleinsäureextraktion eingefroren.

2.1.7 Bestimmung der Schwermetallverfügbarkeit im Boden mittels *Lux*-Reporter-System

Die Metallkonzentration von Bodenproben aus den Schwermetallstandorten Breinigerberg und Mechernich wurde unter der Verwendung des *Lux*-Reporter-Systems gemessen. Die *Lux*-Konstrukte sind in *Ralstonia eutropha* Stämme eingebaut. Das Bakterium fungiert als Biosensor-System für verschiedene toxische Metalle wie Kupfer, Kobalt, Kadmium, Zink, Nickel und Chrom.

5 g Bodenprobe wurde in 30 ml RM-Lösung (s. Tabelle 2) für 10 min gevortext, in RM-Lösung verdünnt (1:1, 1:2, 1:4) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die verdünnten Bodenproben wurden mit einem Nickel-Biosensor-Stamm (AE 2515), einem Zink-Biosensor-Stamm (AE 1433) und einem Pb-Biosensor-Stamm (AE 2450) getestet. Dazu wurde pro Ansatz 180 µl Bakterien-Kultur und 20 µl verdünnte Bodenprobe gemischt. In jedem Versuch wurde eine Metall-Standard-Lösung sowie eine negative Kontrolle (bidistilliertes Wasser) durchgeführt. Die Lumineszenz wurde mit einem ANTHOS LUCY 1 Luminometer (Anthos Labtech b.v., Heerhugowaard, the Netherlands) bei 23°C über 8 h in 30 min Zeitabständen gemessen. Für die Quantifizierung der Ergebnisse wurde eine Standardreihe mit bekannter Menge der zu untersuchenden Metalle (Zink, Pb und Ni) in dem Versuch mitgeführt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der RM (reconstitution medium)-Lösung:

Lösung	Konzentration (mg/l)
NaCl	4680
KCl	1490
NH ₄ Cl	1070
Na ₂ SO ₄	430
MgCl ₂ x 6H ₂ O	200
CaCl ₂ x 2H ₂ O	30
β-Glycerophosphate	294
Fe(NH ₄)-Citrate	4,8
Gluconate	1000
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,1
H ₃ BO ₃	0,062
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,19
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,017
NiCl ₂ x 6H ₂ O	0,024
NaMoO ₄ x 2H ₂ O	0,036
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,144

2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1 Isolierung genomischer DNA

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA mit CTAB nach Doyle und Doyle

Das Pflanzenmaterial der Versuchspflanzen (0,5 g) wurde in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff eingefroren und zu feinem Pulver gemörsert. Danach wurde das Material in 5 ml 60°C warmem CTAB-Puffer aufgenommen und auf Reaktionsgefäße verteilt. Nach 30 min Inkubation bei 60°C unter leichtem Schütteln wurde mit gleichem Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) ausgeschüttelt und die Ansätze anschließend 5 min bei 1600 g abzentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und zur Fällung der DNA mit 0,7 x Vol. kaltem Isopropanol versetzt. Die DNA wurde nach 15 min Zentrifugation bei 18300 g mit 70% EtOH gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer gelöst.

CTAB-Puffer: 2% (w/v) CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid; Sigma)
1,4 M NaCl
20 mM EDTA
100 mM Tris/HCL pH 8,0
0,2% (v/v) β-Mercaptoethanol

2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA nach Raeder und Broda

Mit flüssigem Stickstoff wurde das Pflanzenmaterial zu feinem Pulver gemörsert. In einem Reaktionsgefäß wurden je 100 mg des Pulvers mit 500 µl Extraktionspuffer gemischt und anschließend mit 500 µl PCI (TE-gesättigtes Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol; 25:24:1) homogenisiert und 20 min bei 13000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 5 µl RNase-Lösung versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit gleichem Volumen PCI ausgeschüttelt und 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Die Oberphase wurde zur selektiven Fällung hochmolekularer DNA mit 0,6 x Vol. eiskaltem 100% Isopropanol versetzt und 15 min bei 1800 g zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde die DNA 2 min bei 3000 g zentrifugiert, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und dann in 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 gelöst. Die isolierte DNA wurde bei 4°C gelagert.

Extraktionspuffer: 200 mM Tris/HCl pH 8,5
250 mM NaCl
25 mM EDTA
0,5% (v/v) SDS
0,2% (v/v) β-Mercaptoethanol

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA

RNase-Lösung: 10 mg RNase A (Merck) wurden in 15 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gelöst. Vorhandene DNasen wurden durch 15 min Inkubation bei 100°C inaktiviert.

2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA aus den Tomatenpflanzen wurde nach der Methode von Nagy et al. (1988) in Kombination mit einer von Eggermont et al. (1996) publizierten Methode isoliert. Alle zur RNA-Isolierung verwendeten Lösungen mit Ausnahme des Extraktionspuffers wurden mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt (Fedorcak und Ehrenberg, 1966), um einen Schutz vor RNasen zu gewährleisten. Dazu wurden sowohl destilliertes Wasser als auch 8 M Lithiumchlorid mit 0,1% DEPC (v/v) für 1 h inkubiert und danach autoklaviert (Sambrook et al., 1989). Das Tomatenmaterial wurde mit Flüssigstickstoff zu feinem Pulver gemörsert und 100 mg mit 1 ml Extraktionspuffer und 1 ml wassergesättigtem PCI (pH 4-4,5) gemischt. Es wurde weiter gemörsert bis zum Auftauen des Puffers. Danach wurde das Material auf Reaktionsgefäße verteilt, kurz ausgeschüttelt, 5 min auf Eis gestellt und bei 20°C und 10000 g 5 min abzentrifugiert. In frischen Gefäßen wurde der Überstand mit gleichem Vol. PCI 1 min kräftig ausgeschüttelt und 3 min bei 10000 g und 20°C zentrifugiert. Nach einer erneuten Überführung des Überstandes in neue Reaktionsgefäße und kräftigem Ausschütteln mit gleichem Vol. CI (1 min) wurde bei 20°C und 10000 g 2 min zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen und zur Fällung mit 0,6 x Vol. 8 M LiCl 1 h bei -20°C inkubiert. Die RNA wurde danach 10 min bei 10000 g abzentrifugiert, mit 100% EtOH gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O_{DEPC} gelöst. Das Extinktionsverhältnis 260 nm/280 nm (s. Kap 2.2.4) lag meistens bei ca. 1,7-2. Damit konnte diese isolierte RNA für Northern-Analysen eingesetzt werden. Die Ausbeute lag zwischen 100 und 400 µg RNA pro g Frischgewicht.

Extraktionspuffer: 100 mM Natriumacetat
1 mM EDTA
4% SDS
pH 5,0

2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus AM-Sporen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus isolierten Sporen erfolgte nach dem RNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden).

Das Pilzmaterial (ca. 1000 Sporen) wurde in ein Mikro-Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Abziehen von Wasser wurde das Reaktionsgefäß kurz in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend wurden die Sporen mit einer an der Spitze angeschmolzenen Pasteurpipette zerquetscht. Danach wurden die zerquetschten Sporen mit 450 µl RLC-Lysis-Puffer (mit 1% β-Mercaptoethanol) versetzt und gemischt. Das Gemisch wurde in eine QIAshredderTM-Säule überführt und 2 min bei RT und 18300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,5 x Vol. EtOH versetzt, in eine RNeasy-Säule pipetiert und 15 s bei 10000 g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend mit 700 µl RW1-Puffer (15 s,

10000 g) und 500 µl RPE-Puffer (15 s, 10000 g) gewaschen. Nach erneuter Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und 2 min Zentrifugation bei 18300 g wurde die RNA durch Aufpipettieren von 50 µl H₂O und 1 min Zentrifugation bei 18300 g eluiert. Die isolierte RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.2.4 Isolierung von Plasmiden aus transformierten Kulturen von *E. coli*

Die verwendete Methode (Birnboim und Doly, 1979) erlaubt die Isolierung von Plasmid-DNA in ausreichender Menge und Reinheit für Restriktionsanalysen und *in Vitro*-Transkription.

Übernachtskulturen der Bakterien wurden in 5 ml LB-Medium auf einem Schüttler bei 37°C angezogen. In einem Reaktionsgefäß wurden 1,5 ml dieser Kulturen 2 min bei 18300 g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien in 100 µl BD1 resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 200 µl BD2 hinzugefügt und 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 150 µl BD3 wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 18300 g abzentrifugiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Vol. PCI versetzt. Nach 10 min Zentrifugation bei 18300 g wurde die wässrige Oberphase abgenommen und mit 2,5-fachem Vol. Ethanol versetzt. Zur Fällung der DNA wurde 30 min bei -20°C inkubiert, das Präzipitat dann 15 min bei 18300 g abzentrifugiert. Der DNA enthaltende Rückstand wurde mit 70% Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert.

LB-Medium: 10 g/l Bacto Trypton (Difco)
5 g/l Hefeextrakt (Difco)
10 g/l NaCl

BD1: 50 mM Glukose
10 mM EDTA
25 mM Tris/HCl pH 8,0
4 mg/ml Lysozym

BD2: 0,2 N NaOH
1% (v/v) SDS

BD3: 5 M Kaliumacetat pH 4,8

2.2.5 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren

Anhand eines Photometers (Lambda 15 UV-VIS Spektrophotometer, Fa. Perkin-Elmer) wurde die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäuren durch Bestimmen der Absorption bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten gemessen. Das Absorptionsmaximum von DNA und RNA liegt bei 260 nm. Aus dem Verhältnis der OD_{260 nm} und OD_{280 nm} erhält man eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Eine

proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf (Sambrook et al., 1989). Eine $OD_{260\text{ nm}}$ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ bei doppelsträngiger DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ bei RNA und 20 $\mu\text{g/ml}$ bei einzelsträngiger DNA.

2.3 Amplifizierung von DNA-Bereichen durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer (Saiki et al., 1985). Ein PCR-Verlauf besteht in der Regel aus Wiederholungen dreier Schritte: Denaturierung, Annealing (Primer-Bindung) und Elongation (Polymerisation).

2.3.1 Oligonukleotid-Primer

Bei der PCR hängen Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit im wesentlichen von der Sequenz der verwendeten Oligonukleotid-Primer ab. Im allgemeinen sollten sowohl die Schmelztemperatur und die Nukleotidzusammensetzung des Primers als auch die Primer-Primer-Wechselwirkungen betrachtet werden. Ein Primer sollte weder stabile Sekundärstrukturen noch Dimere bilden können, da sonst beim Annealing ein großer Teil der Oligonukleotide für die Bindung an die Zielsequenz nicht verfügbar wäre. Die beiden in der PCR eingesetzten Primer sollten die gleiche Schmelztemperatur besitzen, um optimale Bindungen einstellen zu können.

2.3.1.1 Auswahl geeigneter Sequenzbereiche zur Entwicklung von Oligonukleotidprimern

Zur Herstellung von Oligonukleotid-Primern, für die in dieser Arbeit untersuchten Gene aus Tomate, dienten als Datenbasis die in der Tabelle 3 aufgelisteten Sequenzen:

Tabelle 3:

	Organismus	Name	EMBL-Eintrag
Phytochelatin synthase	<i>Lycopersicon esculentum</i>		AW154892
	<i>Arabidopsis thaliana</i>		AJ006787
	<i>Zea mays</i>		AF160475
Metallothioneine	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Lemt1</i>	Z68138
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Lemt2</i>	Z68185
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Lemt3</i>	Z68309
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Lemt4</i>	Z68310
Nramptransporter	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtNramp1</i>	AC004401
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtNramp2</i>	AF141204
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtNramp3</i>	AB007645
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtNramp4</i>	AL035526
	<i>Oryza sativa</i>	<i>OsNramp1</i>	L412117
	<i>Oryza sativa</i>	<i>OsNramp2</i>	L81152
	<i>Oryza sativa</i>	<i>OsNramp3</i>	U60767
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Nramp</i>	AI637357
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>SMF1</i>	P38925
Zink-Transporter	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ZIP1</i>	T52183
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ZIP3</i>	T52185
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ZRT1</i>	P32804
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ZRT3</i>	CAA97701
Plasmamembran-aquaporinen	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Aqp2</i>	AF218774
	<i>Zea mays</i>	<i>PiP1-2</i>	AF131201
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>NtPIP1</i>	AF440271
	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>MIP1</i>	Y18311
Tonoplastaquaporinen	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>RB7</i>	U95008
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>RB7-5</i>	P21653
	<i>Arabidopsis thaliana</i>		P21652
	<i>Oryza sativa</i>		P50156
Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter	<i>Atriplex gmelini</i>	<i>AgNHX1</i>	BAB11940
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtNHX1</i>	AAM34759
	<i>Ipomea tricolor</i>	<i>ItNHX1</i>	BAB60901
	<i>Suaeda maritima subsp. salsa</i>		AAK53432
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>NHX1, Iso-form1</i>	AJ306630
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>NHX2, Iso-form2</i>	CAC83608

Die oben aufgeführten Sequenzen wurden auf konservierte Bereiche miteinander verglichen. Aus derartigen Bereichen wurden degenerierte Oligonukleotid-Primer entwickelt.

Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Oligonukleotid-Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)
PC1	ATG GGA GCT CAA ACA ACA GAG	21
PC2	CAR TTR TCN CCR TTR AAR TA	20
META	ATG TCT KGC TGY GGA GGA AGY TGT	24
MET1	GTT AAA ATT AAC AGA TGC	18
MET2	CAT CAA TTA GTT GCT TAA	18
MET22	ACT TTC ATT ATT ATT AAG TCT	21
METR2	TGG CTG TGG AGG AAG CTG TAA	21
METR22	AGG TGC AAC TCC CTC GAT GAT	21
MET3	CTA AAA CAA GAA GTG ATT AAA C	22
MET33	TTC TTA TTT CCC AAA ACA	18
MET4	TAT TGA TAA AGA TGT GAA	18
NrmA	GAY ATH CMN GAR GTN ATH GG	20
NrmB	RAA NAV RTT RTG NGG CAT	18
Nrm1	GAC AGC ATT TGC TCT TAA TAT	21
Nrm11	GAG TTC TTT GCA CTG GTG TTA	21
Nrm2	TGA GTC GAG GGT TCT TGC CT	20
Nrm22	TGG TGT TGT CAT CAC TGC TCT TG	23
Nrm3	AAG GAC CTT TTA GCA GGT CTCT	22
Nrm33	TCA GTT CAA GGA CAG TTC G	19
NrmR1	GTT GTG ACC TAC ATT GAT CCA ATC A	25
NrmR11	TCA GCA AGA TCC TCT CTA TAA GGC A	25
NrmR2	TGT GCT ATC GTC CCA ACT CTG AT	23
NrmR22	TGG ACA CAC TGA AGA ACG TTG AG	23
ZP1	TTY CAY CAR WNN TTY GAR GG	20
ZP2	RTA NAD NAR DAT NCC NGC	18
PMA	CAC ATT AAC CCT GCT GTG ACA	21
PMB	AGG TCC CAC CCA GAA AAT CCA	21
PM1	GGC AAG AAA AGT ATC ACT AAT CA	23
PM2	TGG TGG TGC TAA TGT TGT TA	20
TPA	GGT GGA CAT TTG AAT CCA GCT GT	23
TPB	ATG TTG GCA CCA ACA ATA AA	20
TP1	GGG TTG CTC AAT TAC TTG G	19
TPR1	TCA TTG GTG GAG GAT TGG CT	20
TPR2	ACA CTG TTG AAG ACT TGT TCT TTC TTC T	28
NHA1	AAR AAR AAR CAR TTY TTY	18
NHA2	CAT NAC DAT NCC RCA RAA RAA	21
ISO1	TCC TGG AAA ATC TGT TGG GG	20
ISO11	TGA ATC CCC TTT AGC TCC GC	20
ISO2	ATT TAT CTT CTT CTC AAT TC	20
ISO22	CTT ACA ATC AAC AAG CCA CT	20
Race1	CCA CGA GTC GAC TCT AGA GCT CGG ATC CTT TTT TTT TTT TTT TTT	46
Race2	CCA CGA GTC GAC TCT AG	17
Race3	CTC TAG AGC TCG GAT CC	17
T17S1	ATT CCT AGT AAG CGC GAG TCA T	22
T17S2	GTT CAC CTA CGG AAA CCT TGT T	22

Wobble-Positionen sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet: R = A + G, Y = C + T, M = A + C, H = A + T, V = A + C + G, N = A + C + G + T

Die Primer (Gibco BRL Custom Primers, Palo Alto, USA; SIGMA-ARK, Darmstadt) wurden in sterilem H₂O aufgelöst und auf eine Konzentration von 50 pmol/μl eingestellt. Die Primer für die Real-Time quantitativen PCR wurden in einer Konzentration von 5 pmol /μl eingesetzt.

2.3.2 Reaktionsbedingungen für die PCR

Die PCR-Experimente wurden mit einem "Personal Cycler Version 3.02"(Biometra) mit Heizdeckel durchgeführt. Die Reaktionen wurden in 0,5 ml Mikroreaktionsgefäßen angesetzt.

Reaktionsansatz: 34 μl H₂O_{bidest} steril
 5 μl PCR-Reaktionspuffer (Promega)
 4 μl 25 mM MgCl₂ (Promega)
 4 μl dNTP-Mischung; je 10 nmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP
 (MBI-Fremontas)
 1 μl Primer 1, 50 pmol
 1 μl Primer 2, 50 pmol
 1 μl DNA als Matrize, ca. 1-50 ng

Die Ansätze wurden für 5 min bei 95°C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der Template-DNA zu ermöglichen. Die Zugabe der Taq-DNA Polymerase (2U) erfolgte bei 90°C. Diese „hot start“-Methode wurde verwendet, um zu vermeiden, dass die Taq-Polymerase beim ersten langen Denaturierungsschritt inaktiviert wird. Danach folgten 35 bis 40 Zyklen mit der entsprechenden Primerbindungsphase für 30-60s, die Synthesephase bei 72°C für 1-2 min und die Denaturierungsphase bei 94°C für 30s. Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine Endelongation für 10 min bei 72°C, so dass möglichst viele Fragmente vervollständigt werden konnten.

In den PCR-Experimenten, in denen der Grad der Homologie zwischen Primer und Zielsequenz völlig unbekannt war, wurde eine sukzessive Herabsetzung der Primerbindungstemperatur um jeweils 1°C in den ersten 10 PCR-Zyklen vorgenommen. Diese sogenannte „touch-down“-Methode wurde eingesetzt, um eine unspezifische Bindung der Oligonukleotide bei niedrigeren Temperaturen gerade während der ersten PCR-Zyklen zu vermeiden. Die anfängliche Primerbindungstemperatur sollte ca. 10°C über dem berechneten optimalen T_m-Wert liegen. Auf diese Weise hybridisieren nur die optimal bindenden Oligonukleotide an die denaturierten Template, so dass die Bindung von unspezifischen Fragmenten minimiert wird.

2.3.3 Die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren. Dabei erfolgt zuerst eine cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Matrize, darauf folgt eine PCR, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Diese Methode ist besonders dann von Bedeutung, wenn seltene Transkripte nachgewiesen und analysiert werden sollen. Im Vergleich zu RNA-Nachweisverfahren, wie die Northern-Blot-Analyse (s. Kap 2.6),

ist die Sensitivität der RT-PCR wesentlich größer. Weiterhin ist sie der Ausgangspunkt der RACE-PCR (s.Kap. 2.3.3.2) und der Real-Time-PCR (s. Kap. 2.3.4).

2.3.3.1 Erststrangsynthese mit isolierter RNA aus Tomate

Ein modifiziertes Protokoll, das auf dem Handbuch zum "SUPERSCRIPTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis" (Gibco BRL) basiert, wurde zur Synthese von cDNA verwendet.

Um eine Kontamination durch genomische DNA auszuschliessen, erfolgte ein DNase-Verdau der isolierten Gesamt-RNA.

DNase-Verdau-Ansatz : 2 µg Gesamt-RNA
 5 µl 5x Erststrangpuffer
 1 µl DNaseI (Amplification Grade, Gibco)
 H₂O ad 25 µl

Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 µl 25 mM EDTA abgestoppt, die RNA durch 10 min Inkubation bei 65°C denaturiert und unmittelbar auf Eis gestellt. Die Reverse-Transkription wurde mit dem Primer RACE1 eingeführt. Dieser ist ein Oligo(dT)-Primer, der im Bereich des Poly(A)-Schwanzes der mRNA-Moleküle hybridisiert und zusätzlich eine Adaptorsequenz trägt, was die Amplifikation von nichttranslatierten mRNA 3'-Enden ermöglicht (s. Kap. 2.3.3.2).

In 0,5 µl Reaktionsgefäßen wurden folgende Komponenten gemischt:

13 µl DNase-verdaute RNA
 1 µl RACE1 (1 µg/µl)
7,5 µl 5 x Erststrangpuffer (Gibco)
10 µl dNTP's (2,5 mM pro dNTP)
 5 µl 0,1 M DTT
 1 µl SUPERSKRIPTM II Reverse Transkriptase (200U/µl, Gibco)
12,5 µl H₂O_{DEPC}

Die Ansätze wurden 1,5 h bei 42°C inkubiert und die Reverse Transkriptase wurde anschließend durch 15 min bei 70°C inaktiviert. Die Verwendung der cDNA in der PCR entsprach dem in Kapitel 2.3.2 aufgeführten Protokoll.

2.3.3.2 3'-RACE (Rapid Amplifikation of cDNA Ends)

Die Methode der RACE-PCR (Frohman, 1988) erlaubt die Vervollständigung der Sequenzen von Transkripten mit unbekannter Sequenz am 5' oder 3'-Ende, ausgehend von einer bekannten Sequenz.

Bei der 3'-RACE führt man die cDNA-Synthese mit einem Oligo-dT-Adapterprimer (RACE1) durch. Die cDNA-Enden der entsprechenden Zieltranskripte amplifiziert man

in aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen unter Verwendung von Transkriptprimern und zueinander komplementären Adapterprimern (RACE1, RACE2, RACE3). Zur Zweitstrangsynthese wurden folgende Komponenten gemischt:

2 µl cDNA (Erststrang)
1 µl RACE1 (1 µg/µl)
1 µl RACE2 (5 pmol/µl)
2 µl Transkriptprimer1 (50 pmol)
5 µl 10 x PCR-Thermo-Reaktionspuffer (Promega)
4 µl dNTP-Mischung; je 10 nmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP (MBI-Freemontas)
30 µl H₂O

Die Ansätze wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Zugabe von 2 U Taq-DNA-Polymerase (Promega) pro Ansatz und einer weiteren Inkubation von 10 min Dauer bei der optimalen Primerbindungstemperatur erfolgte eine erste Elongationsphase bei 72°C für 30 min (Frohman, 1990) und ein normaler PCR-Verlauf (s. Kap. 2.3.2). Die gelelektrophoretische Analyse von RACE-PCR-Produkten zeigt einen Produktschmier. Dies liegt daran, dass bereits die Produkte der RT-Reaktion unterschiedliche Größen haben. Hinzu kommt, daß es auch zu unspezifischen Produktbildungen kommt.

1 µl einer 1:100 Verdünnung dieses Reaktionsansatzes wurde in einer darauffolgenden Standard-PCR-Reaktion (s. Kap. 2.3.2) eingesetzt. Dabei wurde das erwartete spezifische Produkt durch Verwendung eines stromabwärts von der Bindungsstelle des Transkriptprimers1 befindlichen Transkriptprimers 2 und RACE 3 amplifiziert.

2.3.4 PCR mit einzelnen *Glomus*-Sporen

Einzelne *Glomus*-Sporen wurden mittels einer Pasteurpipette, deren unteres Ende verengt wurde, auf einen mit Ethanol gereinigten sterilen Objektträger überführt und anschließend mehrfach mit sterilem Wasser gewaschen. Nach dem Abziehen des Wassers wurden die Sporen mit einer an ihrer Spitze angeschmolzenen Pasteurpipette zerquetscht, in 5 µl Reaktionsansatz aufgenommen und in die Mikroreaktionsgefäße überführt. Um das Verdampfen des Wassers zu vermeiden, wurde der komplette Ansatz mit 40 µl sterilem Mineralöl (Sigma) überschichtet.

2.3.5 Real-Time quantitative PCR

Die Real-Time PCR ist eine Methode zur Quantifizierung der PCR-Produkte während ihrer Bildung in den Reaktionsgefäßen. Dafür wurde die SYBRGreenTM-Detektion zum Realtime-Nachweis eingesetzt. Die SYBRGreenTM-Detektion beruht auf der Fähigkeit von SYBRGreenTM (Interkalator), zwischen doppelsträngigen Nukleinsäuren eingebunden zu werden. Daraufhin emittieren diese Moleküle unter Anregung von kurzwelligem UV-Licht längerwelliges Licht (530 nm). In Abhängigkeit der Quantität amplifizierter DNA steigt die Fluoreszenzintensität an. Der Vorteil dieser Methode ist die universale Verwendbarkeit, weil damit jede beliebige PCR-Reaktion verfolgt werden kann. Außer-

dem ist die Signalstärke hoch, weil jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoffmoleküle bindet. Der Nachteil liegt darin, daß spezifische und unspezifische PCR-Produkte Signale erzeugen können. Daher ist die Primer-Herstellung von Bedeutung, damit unspezifische Produkte oder Primer-Artefakte vermieden werden können.

2.3.5.1 Entwicklung von Oligonukleotidprimer-Sequenzen

Die Herstellung der Primer erfolgte mit dem Primer Express[®]-Programm. Die Oligonukleotidprimer waren mindestens 18 bp-lang, mit einem T_m-Wert von 60°C und einem GC-Gehalt zwischen 30-80%. Die Primer sollten keine Primer-Dimere bilden und maximal 2 C und/oder G in den 5 letzten Basen am 3'-Ende haben, um eine mögliche Bildung von unspezifischen Produkten zu vermeiden, die wiederum zu nicht spezifischen Signalen führen können. Vor dem Einsatz der Primer für die Realtime-Versuche wurden diese in einer normalen PCR-Reaktion auf die Bildung von Primer-Dimeren oder Nebenprodukten geprüft.

2.3.5.2 Reaktionsbedingungen für die Real-Time quantitativen PCR

Als erster Schritt erfolgte eine cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Matrize (s. Kap. 2.3.3.1). Die synthetisierte cDNA diente anschließend als Matrize für die Real-Time-PCR. Die Reaktionen wurden in Mulden einer Mikrotiterplatte bei RT angesetzt.

Reaktionsansatz:

- 7 µl H₂O_{bidest} steril
- 1 µl Primer 1 (5 pmol/µl)
- 1 µl Primer 2 (5 pmol/µl)
- 1 µl c-DNA
- 10 µl SYBR Green Master Mix (10 x SYBR Green PCR-Puffer, AmpErase[®]UNG, AmpliTaq Gold[®]DNA Polymerase, dNTP Mix und 25 mM MgCl₂)

Die Ansätze wurden 2 min bei 50°C inkubiert. Die anschließende 10 min Inkubation bei 95°C dient der Aktivierung der AmpliTaq Gold[®]DNA Polymerase. Die Eigenschaft der AmpliTaq Gold[®]DNA Polymerase bei RT inaktiv zu sein, ermöglicht während der Probenvorbereitung die Vermeidung von Primer-Dimere-Bildung. Nach der Aktivierung der AmpliTaq Gold[®]DNA Polymerase erfolgten 40 Zyklen mit einer Denaturierungsphase bei 92°C für 15 s und einer Primerbindung-Elongationsphase bei 60°C für 1 min.

Die Detektion der Fluoreszenz während der PCR wurde mittels eines GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection Systems (PE Biosystems) durchgeführt. Die 96 PCR-Reaktionsgefäße einer Mikrotiterplatte werden mit einer weißen Lichtquelle bestrahlt und die resultierende Fluoreszenz, die zu der in jedem PCR-Zyklus amplifizierten DNA proportional ist, wird durch eine CCD-Kamera aufgezeichnet. Die Auswertung der Daten erfolgt in einem Computer durch die mitgelieferte GeneAmp 5700 Sequence Detection System (SDS) Software.

2.3.5.3 Quantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse

Die Auswertung der Analyse erfolgte über den sogenannten Ct-Wert („threshold cycle“). Der Ct-Wert gibt die Zyklenzahl an, bei der die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Dieser Fluoreszenzwert liegt im linearen Bereich der Reaktion. Je höher die in der PCR eingesetzte DNA-Menge ist, desto geringer ist der Ct-Wert.

Für die absolute Quantifizierung wurde eine Standardreihe mit bekannter DNA-Menge der Zielsequenz bei der PCR mitgeführt. Die erstellte Standardkurve erlaubte dann, aus einem Ct-Wert, die Matrize-Menge zu bestimmen. Zur Normalisierung der Ergebnisse diente die 18S rRNA.

2.3.6 Analyse der PCR-Produkte

Im Anschluß an die PCR wurden je 8 µl der Ansätze mit 1 µl Blaumarker [0,1% (w/v) Bromphenolblau in 50% (v/v) Glycerin] auf 1%igen Agarosegelen aufgetragen. Als Längenstandard diente eine 100 bp-DNA-Leiter (Gibco). Nach 30 min Elektrophorese bei 10 V/cm ermöglichte eine Intas-Geldokumentationsanlage unter UV-Licht, Bilder von den Gelen anzufertigen.

2.3.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Das im Agarose-Gel aufgetrennte DNA-Fragment wurde bei Betrachtung unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Elution erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Das Verfahren beruht auf der Adsorption von DNA an Glasmilch. Zu dem ausgeschnittenen Gelfragment wurden 3 Vol. QX1-Puffer und 15 µl QIAEX II Glasmilch zugegeben, 10 min bei 50°C inkubiert und 1 min bei 18300 g zentrifugiert. Danach wurde der Rückstand einmal mit 500 µl QX1 und zweimal mit PE-Lösung gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Die DNA wurde durch Zugabe von 20 µl H₂O oder Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) von der Glasmilch eluiert. Nach 1 min Zentrifugation bei 18300 g wurde der DNA enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.4 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Durch die Transferaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase entstehen PCR-Produkte, deren beide Enden ein ungepaartes Desoxyadenosin aufweisen. Der Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy (Promega; s. Abb. 3) besitzt an beiden Enden überhängende Thymin-Reste, an die die adenylierten Produkte ligiert werden können. Der Vektor trägt ein Resistenzgen für Ampicillin. Diese Resistenz wurde für die Selektion transformierter Klone genutzt.

2.4.1 Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pGEM[®]-T Easy

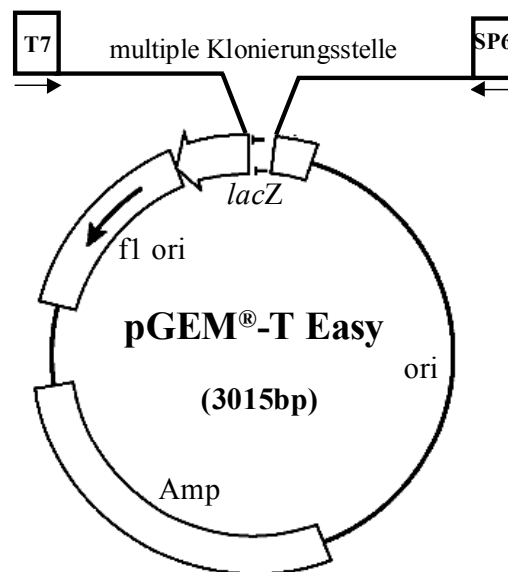
Die Ligationen wurden nach dem angegebenen Protokoll des pGEM[®]-T Easy Systems (Promega) durchgeführt.

Die Ligationsansätze enthielten:

- 1 µl 10 x T4 DNA-Ligase Puffer
- 1 µl pGEM[®]-T Easy Vektor (50 ng)
- 1 µl PCR-Produkt
- 1 µl T4 DNA-Ligase
- 6 µl H₂O_{bidest}, steril

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Abbildung 3: Karte des Klonierungsvektors pGEM[®]-T Easy; vereinfachte Darstellung nach Herstellerangaben. Größe 3015 bp mit Ampicillinresistenzgen (Amp)



2.4.2 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Präparation kompetenter Zellen nach einem modifizierten Verfahren von Chung und Miller (1993) wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet. Eine Vorkultur dieses Bakteriums wurde in 2 ml LB-Medium mit 5 µl Tetracyclin (50 µg/ml) gegeben. Die Inkubation dieser Kultur erfolgte unter Schütteln bei 37°C über Nacht. Danach wurden 40 ml LB-Medium mit der Vorkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von etwa 0,3 bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden danach 5 min bei 1000 g und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 10 ml TSS-Puffer aufgenommen und 5 min auf Eis gestellt. Die kompetenten Zellen wurden in Mikroreaktionsgefäßen aliquotiert (je 100 µl) in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

Zur Herstellung des TSS-Puffers wurden 5 g PEG (Polyethylenglykol, Merck) mit 45 ml LB-Medium gelöst. Nach Zugabe von 0,75 ml 2 M $MgCl_2$ -Lösung wurde anschließend der pH-Wert mit HCl auf 6,5 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert (durch einen Sterilfilter, \varnothing 0,2 μm ; Pall Acrodisc) und mit 2,5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck) gemischt. Danach wurde der Puffer mit sterilem LB-Medium zu einem Endvolumen von 50 ml aufgefüllt.

Für die Transformation wurden 100 μl kompetente *E. coli* Zellen zu 2 μl der Ligationssätze gegeben und für 20 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Ansätze einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C ausgesetzt, um die Permeabilität der Bakterienzellwände für die DNA zu erhöhen.

2.4.3 Selektion der transformierten Klone

Die Selektion der positiven Klone erfolgte auf ampicillinhaltigen 1,5%igen LB-Agarplatten mit 4 μl IPTG-Lösung (200 mg/ml) und 20 μl X-Gal-Lösung (20 mg/ml). Der *E. coli* Wirtstamm XL1-blue besitzt kein funktionsfähiges β -Galaktosidase-Gen. Durch Transformation mit einem Plasmid, das den Teil des lacZ-Gens enthält, der für den N-Terminalen Bereich der β -Galaktosidase kodiert, kann durch Komplementation eine aktive β -Galaktosidase-Aktivität gebildet werden (Sambrook et al., 1989). Die Transkription dieses Gens kann durch IPTG (Isopropylthiogalactosid) induziert werden. Zum Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität dient das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -galaktopyranosid), dessen Umsetzung zur Bildung eines blauen Produktes führt, so daß Kolonien mit β -Galaktosidase-Aktivität blau gefärbt sind. Nach einer erfolgreichen Ligation zwischen Vektor und PCR-Produkt ist das β -Galaktosidase-Gen unterbrochen, da sich die Klonierungsstelle innerhalb des Gens befindet. Kolonien, die ein solches Plasmid enthalten, setzen X-Gal nicht um und erscheinen weiß.

Die transformierten Zellen wurden mit 900 μl LB-Medium verdünnt und 1,5 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 2 min bei 18300 g abzentrifugiert und in 100 μl LB-Medium resuspendiert. Je 90 μl der konzentrierten und der verdünnten Bakterien-Suspension wurden auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Um das Ergebnis der Transformation überprüfen zu können, wurden ausgewählte weiße Kolonien in 5 ml LB-Medium mit 100 $\mu g/ml$ Ampicillin über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C angezogen. Die Isolierung der Plasmide aus diesen Kulturen ist in Kap. 2.2.3 beschrieben.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (10 U/ μl , MBI-Fermentas) geschnitten. Beim anschließenden Auftragen auf ein 1%iges Agarosegel konnten die gewünschten Klone anhand der Fragmentgröße selektioniert werden.

2.4.4 DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Fragmente wurde mit einem ABI Prism 310 Genetic Analyser durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Die Plasmid-DNA wurde zunächst einem RNase-Verdau unterworfen, mit CI (24:1 (v/v) Chloroform/Isoamylalkohol) extrahiert, bei Raumtempera-

tur mit Ethanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Resuspendierung des Präzipitats erfolgte in 50 µl Wasser.

Sequenz-PCR-Ansatz: 4 µl Prämix (Puffer, dNTP-Mix, ddNTP-Mix, Taq-DNA-Polymerase)
1 µg Plasmid-DNA
1 µl Primer (5 pmol)
ad 10 µl H₂O

Folgende Primer wurden für die Sequenzierungsansätze verwendet:

pUC/M13 forward
pUC/M13 reverse
Sp6-Primer
T7-Primer

Die spezifische Markierung des zu sequenzierenden DNA-Fragments wurde in einer zyklischen Sequenzierung im Thermocycler (Personal Cyler Version 3.02 Biometra) durchgeführt. Nach einer ersten Denaturierung (20 s bei 96°C) erfolgten 30 Zyklen, die eine Denaturierungsphase (10 s bei 96°C), eine Primerbindungsphase (5 s bei 50°C) und eine Synthesephase (4 min bei 60°C) enthielten. Anschließend wurden dem Sequenzierungsansatz 10 µl Wasser, 2 µl Na 3M Natriumacetat pH 5,0 und 55 µl Ethanol zugegeben. Zur Fällung der DNA wurden die Ansätze bei RT für 30 min bei 18300 g abzentrifugiert, mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TSR (Template Suppression Reagent)-Puffer (Perkin Elmer) aufgenommen. Vor der Sequenzierung wurde die Probe für 2 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis überführt.

2.5 Herstellung markierter DNA-und RNA-Sonden für Hybridisierungsexperimente

2.5.1 Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin durch PCR

Digoxigenin markierte DNA-Sonden wurden für die Hybridisierung der *Southern*-Blot-Filter verwendet. In die Sonden eingesetzte PCR-Produkte kann Digoxigenin-11-dUTP mit hoher Effizienz mittels PCR eingebaut werden. Dazu wurde der PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) verwendet, um die Dig-markierten Sonden herzustellen. Isolierte Plasmid-DNA wurde in einer Konzentration von 10 ng/µl als Matrize in der PCR-Reaktion eingesetzt. Nach einer ersten Denaturierung (5 min bei 95°C) erfolgten 35 Zyklen mit 30 s bei 94°C, 1 min bei 54°C und 90 s bei 72°C. Der Einbau des Dig-dUTP wurde durch eine gelelektrophoretische Analyse der PCR-Ansätze mit und ohne Dig-dNTP überprüft. Mit Dig markierte Amplifikate wandern im Gel langsamer als nicht markierte Amplifikate. Die mit Digoxigenin markierten PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

2.5.2 Herstellung von RNA-Sonden durch *in vitro*-Transkription

Für Northern-Blot- und *In situ*-Hybridisierungs-Experimente wurden RNA-Sonden eingesetzt. Dazu wurde der Vektor mit der klonierten Gensonde linearisiert. Restriktionsenzyme wurden gewählt, die 5'-überstehende Enden produzieren, um eine nicht spezifische Bindung der RNA-Polymerase an freie 3'-Enden zu vermeiden. Durch die flankierenden RNA-Polymerase-Promotoren des Klonierungsvektors pGEM[®]-T Easy ist es möglich, mit der entsprechenden Polymerase, Sense- und Antisense-RNA herzustellen. Sowohl die Northern-Blots als auch die *In situ*-Hybridisierungen wurden mit Digmarkierten RNA-Sonden hybridisiert, die mit dem Lumineszenz-System von Roche detektiert wurden.

2.5.2.1 Linearisierung der als Matrize verwendeten Vektoren

Isolierte Plasmid-DNA wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym 4 h bei 37°C verdaut und zur Inaktivierung des Enzymes weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden die Restriktionsansätze mit gleichem Vol. PCI (24:24:1) ausgeschüttelt (Zentrifugation 15 min bei 18300 g) und die Oberphase mit 2,5 Vol. 100% Ethanol und 0,05 Vol. 3 M Natriumacetat 1 h bei -20°C gefällt. Die DNA wurde nach 20 min Zentrifugation bei 18300 g mit 70% EtOH gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl H₂O gelöst, so daß die Konzentration der linearisierten Plasmide bei 1 µg/µl lag.

Restriktionsansatz: 30 µg isolierte Plasmid-DNA
2 µl RNase Lösung
5 µl Restriktionsenzym (*Bsp120I* und *MLU I*, 10U/µl)
20 µl 10 x Restriktionspuffer
ad 200 µl H₂O

2.5.2.2 Markierung von RNA-Sonden mit Digoxigenin durch *In vitro*-Transkription

In 0,5 ml Reaktionsgefäßen wurden folgende Komponenten gemischt:

2 µl 10 x Transkriptionspuffer
2 µl RNA-Polymerase (Sp6 oder T7, 10 U/µl Roche)
2 µl rNTP (je 10 mM ATP, CTP, GTP; 6,5 mM UTP, 3,5 mM Dig-UTP)
1 µl RNaseOUT[™] (40 U/µl, Gibco)
1 µg linearisierte Matrizen-DNA
ad 20 µl H₂O_{DEPC}

Nach 2,5 h Inkubation bei 37°C wurde den Ansätzen 2 µl DNaseI (Amplification Grade, 1U/µl, Gibco) zugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 gestoppt. Die hergestellten Sonden wurden bei -70°C gelagert.

2.5.2.3 Kontrolle der Transkriptgröße und partielle Hydrolyse der hergestellten RNA-Sonden

Die Größenbestimmung erfolgte, indem die Transkripte zusammen mit einem RNA-Längenstandard (Promega, 0,8-6,58 kb) auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und anhand von Vakuum-Blot auf Hybond-N-Membran (Amersham) transferiert wurden (s. Kap. 2.6.4).

Für die Größenbestimmung erfolgte die Behandlung der Filter nach dem Protokoll des Roche Chemilumineszenz-Detektionssystems (s. Kap. 2.6.5).

Für die *In situ*-Hybridisierung wurden die hergestellten Sonden einer partiellen Hydrolyse unterzogen, um eine optimale Fragmentgröße von ca. 200 bp zu erreichen. Kleine Sonden in dieser Größenordnung geben stärkere Signale und einen schwachen Hintergrund.

Die Zeitdauer der Hydrolyse wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Hydrolysezeit (min)} = (L_A - L_E) / 0,11(\text{kb/min}) \times L_A \times L_E$$

L_A : Ausgangslänge der Fragmente (in kb)

L_E : Endlänge der Fragmente (in kb)

Die Dig-markierten Transkripte wurden mit dem gleichen Vol. Hydrolysepuffer (80 mM NaHCO₃, 120 mM Na₂CO₃ pH 10,2) gemischt und bei 60°C für die berechnete Zeit inkubiert. Nach der Hydrolyse wurde der Ansatz mit 1 µl 1 M Essigsäure, 7 µl 3 M Natriumacetat_{DEPC} pH 6,0 und 210 µl kaltem Isopropanol versetzt und zur RNA-Fällung über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach 45 min Zentrifugation bei 18300 g wurde das Präzipitat mit 80% EtOH gewaschen und die RNA in 50 µl H₂O_{DEPC} gelöst. Nach der neuen Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die RNA-Sonden bei -70°C gelagert.

2.6 Hybridisierung von DNA und RNA mit Dig-markierten Sonden

2.6.1 Restriktion genomischer DNA für "Southern Blots"

Für die Restriktion genomischer DNA aus Tomate wurden 15-20 µg DNA mit 10 U Restriktionsenzym und dem entsprechenden Puffer in 500 µl Reaktionsvolumen verdaut. Die Restriktionsansätze wurden 6 h in einem Heizblock bei 37°C inkubiert. Eine weitere Inkubation bei 65°C für 10 min diente der Inaktivierung des Enzyms.

2.6.2 Agarose-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarose-Gele der Konzentration 1,0-2,0% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer bereitet. Die Gele enthielten 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, welches eine Betrachtung der DNA unter UV-Licht und eine Dokumentation mit einer Geldokumentationsanlage der Firma Intas ermöglichte. Vor

dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese mit 1/5 Vol. Bromphenolblau-Glycerin [0,1% Bromphenolblau (w/v) in 50% Glycerin (v/v)] versetzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 10-14 V/cm über eine Zeitdauer von 30-120 min gegen einen 100bp bzw. 1 kb DNA-Längenstandard (Gibco).

TAE-Puffer: 40 mM Tris
2 mM Eisessig
1 mM EDTA/pH 8 gelöst in Eisessig

2.6.3 Auftrennung von RNA auf denaturierenden Agarosegelen

Zur Auftrennung von isolierter RNA unter denaturierenden Bedingungen wurden formaldehydhaltige Agarosegele verwendet (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden folgende Lösungen angesetzt:

Northern-Puffer 10 x konzentriert: 200 mM MOPS (Sigma), 50 mM Natriumacetat und 10 mM EDTA in H₂O; der pH des Puffers wurde mit 10 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Der Puffer wurde nach dem Autoklavieren bei 4°C gelagert.

Probenpuffer: 570 µl deionisiertes Formamid wurde mit 170 µl 37% Formaldehyd, 150 µl 10 x Northern-Puffer und 1,5 µl EtBr gemischt.

Für die denaturierenden Agarosegele wurden 0,6 g Agarose mit 35 ml H₂O und 5 ml 10 x Northern-Puffer gemischt und in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 60°C wurden 10 ml 37% Formaldehyd zugegeben und in die entsprechenden Gel-Kammern gegossen.

Die RNA-Proben wurden mit gleichem Vol. Probenpuffer versetzt und nach 10 min Denaturierung sofort auf Eis gestellt und anschließend auf das Gel aufgetragen. In einer Parallelspur wurde als Laufmarkierung 5 µl Bromphenolblau-Glycerin aufgetragen. Das RNA-Gel wurde bei einer Spannung von 2-5 V/cm nach 2/3 der Laufstrecke der Bromphenolblau-Front gestoppt.

2.6.4 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembran

Zur Übertragung von Nukleinsäuren auf Nylonmembrane (HybondN, Amersham) wurde ein 2016 VacuGeneXL Vakuum Blotting System (Pharmacia LKB) verwendet. Durch die Erzeugung eines Niederdruckvakuums mittels dieses Systems ist die Übertragung von Nukleinsäuren auf eine Transfermembran schneller als das Kapillarblotverfahren von Southern (1975). Die Transferzeit beträgt für RNA etwa 4 h und für DNA nur ca. 1h.

2.6.4.1 Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembran (Southern-Blot)

Der Transfer von PCR-Fragmenten dauerte ca. 30 min bei 50 mbar Vakuum. Die Übertragung auf die Membran (Biodyne B, Pall) erfolgte alkalisch mit 0,4 N NaOH als Transferlösung, sodass eine Vorbehandlung des Gels nicht notwendig war. Hierbei wurde die Denaturierung der DNA während des Transfers erreicht. Die Membran wurde danach kurz in 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7,0) gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde danach durch UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert. Zum Transfer verdauter genomischer DNA aus Tomate wurde ein modifiziertes Protokoll der Firma Pall verwendet. Dazu wurde das Agarose-Gel auf eine mit 20 x SSC angefeuchtete Membran (Biodyne B, Pall) gelegt und ein Vakuum von ca. 40 mbar erzeugt. Sofort danach wurde 50 ml Depurinierungslösung (0,25 M HCl) auf das Gel gegeben und nach 4 min wieder entfernt. Anschließend wurde das Gel mit 50 ml einer Denaturierungslösung für 3 min bedeckt. Darauf folgte eine einstündige Übertragung mit 20 x SSC als Transferpuffer. Die Membran wurde luftgetrocknet und die Bindung der DNA an die Membran durch Inkubation für 40 min bei 80°C ermöglicht.

2.6.4.2 Transfer von RNA auf Nylonmembran (Northern-Transfer)

Der Transfer der RNA auf Filter (Hybond N, Amersham) wurde ohne Vorbehandlung des Gels mit 20 x SSC (bzw. 10 x SSC) durchgeführt. Nachdem das denaturierende Agarosegel auf die mit 20 x SSC angefeuchtete Membran gelegt wurde, dauerte der Transfer bei 60 mbar Vakuum ca. 4h. Anschließend wurde die Membran bei RT getrocknet und durch 5 min UV-Bestrahlung die RNA an die Membran fixiert.

2.6.5 Hybridisierung der Filter mit digoxigeninmarkierten DNA- und RNA-Sonden

Die Hybridisierungen mit Dig-markierten Sonden sowie die Detektion von Hybriden wurde anhand der Arbeitsanleitung der Firma Boehringer (Roche) "The DIG System User 's Guide for Filter Hybridisation" durchgeführt.

Die Herstellung der Vorhybridisierungs- und Hybridisierungspuffer wurde durch das Lösen von DIG Easy Hyb Granules (Roche) in der vorhergesehenen Menge H₂O_{DEPC} durchgeführt. Zur Vorhybridisierung wurden die Filter mit ca. 20 ml DIG Easy Hyb (Roche) pro 100 cm² Membranfläche für 2h im Schüttelwasserbad inkubiert und dann über Nacht in ca. 3 ml Hybridisierungspuffer pro 100 cm² Filter hybridisiert. Sowohl bei der Vorhybridisierung als auch bei der Hybridisierung wurden die Filter in Folien eingeschweisst und bei 42°C für die DNA bzw. 68°C für die RNA inkubiert. Der Hybridisierungspuffer enthielt 20 ng/ml Dig-markierte DNA-Sonde oder 100 ng/ml Dig-markierte RNA-Sonde. Die Sonden wurden erst nach der Hitzedenaturierung bei 95°C für 10 min in 50 µl H₂O_{DEPC} dem Hybridisierungspuffer zugegeben.

2.6.6 Waschen der Filter und Detektion der mit Digoxigenin markierten Sonden

Der Nachweis der mit Digoxigenin markierten Sonden beruht auf einer enzymatisch gekoppelten Antikörperreaktion. Es wird ein Konjugat aus alkalischer Phosphatase und polyklonalen Schafantikörpern gegen das Alkaloid Digoxigenin eingesetzt. Der Nachweis der Signale erfolgte durch Zugabe von kolorimetrischen oder Chemilumineszenzsubstraten der alkalischen Phosphatase. Im Falle eines kolorimetrischen Substrates katalysiert die Phosphatase die Dephosphorylierung von 5-Brom-4-chlor-3-Indolylphosphatase (X-Phosphat), wobei es in Gegenwart von Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) zu einer violetten Farbkombildung kommt. Die Verwendung eines Chemilumineszenzsubstrates erfordert den Einsatz von Lumineszenz-Detektionsfilmen.

Das Herunterwaschen der nicht gebundenen Sonden erfolgte zunächst für 2 x 5 min bei RT in 2 x SSC/0,1% SDS, dann für weitere 2 x 15 min bei 68°C in 0,5 x SSC/0,1% SDS in einem Volumen von 50 ml/100 cm² Membranfläche. Die folgenden Schritte wurde bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt. Es kamen dabei folgende Puffer und Lösungen zum Einsatz:

Puffer1:	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, eingestellt mit NaOH _{Konz}
Puffer2:	Puffer1 mit 0,3% (v/v) Tween20 (Sigma)
Puffer3:	Puffer1 mit 1% (w/v) Blockierungsreagenz
Puffer4:	100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5
Antikörperlösung:	Anti-Dig-AP-Konjugat/Fab-Fragmente (Roche) Kolorimetrischer Nachweis: 1:5000 (150 mU/ml) in Puffer3 Chemilumineszenznachweis: 1: 10000 (75 mU/ml) in Puffer3
NBT-Lösung:	75 mg/ml NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz), gelöst in 70% Dimethylformamid
BCIP-Lösung:	50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphatase), gelöst in 100% Dimethylformamid
CSPD [®] -Lösung:	1:100 in Puffer4 verdünnte 25 mM CSPD [®] (Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2dioxetan3,2'(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat)-Stammlösung (Roche)

Die Filter wurden 1 min in Puffer 2 gewaschen, 30 min in 50 ml/100 cm² Puffer 3 und danach 30 min in Antikörperlösung inkubiert. Es folgten zwei 15-minütige Waschschrte in 100 ml/100 cm² Puffer 2, die Äquibrierung des Filters in Puffer 4 für 2 min sowie die Zugabe der Substratlösungen. Für die kolorimetrische Detektion wurden die Filter mit 10 ml/100 cm² Färbelösung (45 µl NBT-/35 µl BCIP-Lösung in 10 ml Puffer4) in Kunststoffolie eingeschweißt. Bei RT im Dunkeln konnte sich die Farbreaktion entwickeln. Je nach Stärke des Hybridisierungssignals konnte die Reaktion nach 5 min bis 18 h durch Waschung in TE-Puffer gestoppt werden. Die Filter wurden luftgetrocknet. Bei Chemilumineszenz-Detektion mit CSPD[®] wurden die Filter nach der Äquibrierung in Puffer 4 für 10 min in 5 ml/100 cm² CSPD-Lösung inkubiert. Danach wurden die Filter in Folien eingeschweißt, 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Lumi-Film (Roche) belegt. Die Auflage der Filme dauerte 5 min bis 24 h. Die Filme

wurden durch 5 min Inkubation in Eukobrom-Entwickler (Tetenal) und weitere 5 min in Superfix-Fixierer (Tetenal) entwickelt.

2.6.7 Quantifizierung der Hybridisierungssignale

Die Bilder der Röntgenfilme bzw. der gefärbten Filter wurden mit der Intas-Geldokumentationsanlage digitalisiert und gespeichert. Die quantitative Auswertung der Signale wurde mittels des Computerprogramms „NIH Image“ 1.61 („Public domain“-Programm von W. Rasband, U.S. National Institute of Health, Bethesda, USA) vorgenommen. Die Signalstärke als Differenz der Mittelwerte der Farbtintensitäten in der Bande und dem Hintergrund kann in relativen Einheiten angegeben werden.

2.6.8 Entfernen der gebundenen RNA-Sonden

Zur vollständigen Entfernung des Chemiluminenszenzsignals und der RNA-Sonde wurden die Filter mit sterilem Wasser für 5 min gewaschen. Die darauf folgende Inkubation von 10 min mit heißer 0,1% SDS-Lösung und unter starkem Schütteln ermöglichte das Entfernen der Sonde. Der Filter konnte nach anschließender Inkubation 5 min in 2 x SSC/0,1% SDS für eine neue Hybridisierung verwendet werden.

2.7 RNA-*In situ*-Hybridisierung von Wurzellängsschnitten

Die *In situ*-Hybridisierung erlaubt die Detektion gewebespezifischer Genexpression. Die *Dig-In situ*-Hybridisierung wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Coen et al. (1990) durchgeführt. Die unterschiedlichen Schritte beinhalten die Fixierung des frischen Gewebes, dessen Einbettung in Paraffin, die Herstellung der Schnitte sowie die Detektion der Transkripte mittels Dig-markierter RNA-Sonden.

2.7.1 Fixierung und Einbettung des Pflanzenmaterials für die *In situ*-RNA-Hybridisierung

2.7.1.1 Fixierung von Pflanzenmaterial mit Paraformaldehyd

Wurzelabschnitte aus Tomate von ca. 0,5-0,8 mm Länge wurden in ein Fixativ aus 4% Formaldehyd in 100 ml PBS-Puffer (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄) gelegt und für 3 x 2 min in einem Vakuum-Exsikkator infiltriert. Danach wurden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert.

Herstellung des Fixativs:

100 ml PBS-Puffer wurden mit NaOH auf pH 11 eingestellt und in der Mikrowelle auf 70°C erhitzt. Nach Zugabe von 4 g Paraformaldehyd und kräftigem Schütteln, wurde

der pH-Wert mit H₂SO₄ auf 7 eingestellt und das Fixativ auf Eis gestellt. Das Fixativ wurde unmittelbar vor dem Gebrauch hergestellt.

2.7.1.2 Einbettung des Wurzelmaterials in Paraffin

Zur Einbettung in Paraffin wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend gefärbt und in Paraffin überführt. Dazu wurde das Probenmaterial nacheinander in den folgenden Lösungen in 50 ml Reaktionsgefäßen inkubiert:

1 h 50% EtOH auf Eis
1 h 70% EtOH auf Eis
30 min 80% EtOH bei 4°C
30 min 90% EtOH bei 4°C
2 h 100% EtOH + Eosin Y (2-3 ml 1% Eosin Y-Lösung in 100% EtOH)
30 min 100% EtOH bei RT
1 h EtOH/Xylol (3 + 1) bei RT
1 h EtOH/Xylol (1 + 1) bei RT
1 h EtOH/Xylol (1 + 3) bei RT
1 h Xylol bei RT
Xylol mit Paraffin gesättigt bei RT über Nacht
6 h Xylol mit Paraffin gesättigt bei 30°C
4 h Xylol mit Paraffin gesättigt bei 42°C
Xylol mit Paraffin gesättigt bei 60°C über Nacht

Danach wurden die Proben in reinem Paraffin für 2 Tage inkubiert, dabei wurde das Paraffin 2 x am Tage erneuert. Nach vollständiger Infiltration des Pflanzenmaterials mit Paraffin wurden die Wurzelstücke mit reinem Paraffin in Petrischalen überführt und zum Aushärten des Paraffins bei RT stehen gelassen. Die eingebetteten Wurzelproben konnten für mehrere Monate bei 4°C gelagert werden.

2.7.2 Beschichtung der Objektträger zur Bindung von Gewebe

Eine feste Bindung der Gewebeschnitte an die Objektträger ist eine notwendige Voraussetzung während der *In situ*-Hybridisierung. Um diese Voraussetzung erfüllen zu können, wurden die Objektträger silanisiert.

Die Objektträger wurden 1 h in 1 M HCl gereinigt und danach 2 x 5 min in H₂O und weitere 5 min in 96% EtOH gespült. Anschließend wurden die Objektträger für 10 s in eine Lösung von 2% (v/v) 3-Aminopropyl-trimethoxysilan in Aceton getaucht, je 2 x 10 s mit Aceton und H₂O gespült und bei RT getrocknet. Die silanisierten Objektträger konnten bei RT ca. zwei Monate gelagert und verwendet werden.

2.7.3 Schneiden der eingebetteten Wurzeln

Die in den Petrischalen eingebetteten Wurzelproben wurden in kleine Blöcke geschnitten. Der Gewebeblock wurde dann auf einem Halter fixiert und parallel zum Messer im

Mikrotom eingespannt. Es wurden Schnitte mit einer Breite von 12 μm hergestellt, die mit Hilfe eines feinen Pinsels auf beschichtete mit sterilem H_2O benetzte Objektträger überführt wurden und auf einer 42°C Heizplatte über Nacht getrocknet. Es wurden sechs bis 12 Wurzellängsschnitte von jedem Präparat auf einen Objektträger aufgetragen.

2.7.4 *In situ*-Hybridisierung mit Dig-markierten RNA-Sonden

2.7.4.1 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Um das Gewebe für die RNA-Sonden zugänglich zu machen und unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurden die Gewebeschnitte vor der Hybridisierung vorbehandelt. Die auf Objektträger aufgezogenen Gewebeschnitte wurden in einen Träger gestellt und nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

Tabelle 5: Lösungen zur Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Lösungen	Inkubationszeit (min)
2 x 100% Xylol	2 x 10
2 x 100% EtOH	2 x 10
95% EtOH	1
85% EtOH	1
70% EtOH	1
50% EtOH	1
30% EtOH	1
H_2O	1
0,2 M HCl	10
H_2O	5
PBS(130 mM NaCl, 7 mM Na_2HPO_4 , 3 mM NaH_2PO_4)	2
*Pronase-Puffer (0,05 M Tris-HCl pH 7,5, 0,005 M EDTA) mit 0,125 mg/ml Pronase	7
Glycin (0,2% in PBS)	2
PBS	2
Formaldehyd (4% in PBS)	10
2 x PBS	2 x 2
Essigsäureanhydrid (1 ml in 100 ml 0,1 M Triethanolamin pH 8,0)	10
PBS	2

* durch einen Pronaseverdau der Schnitte wurde der Zugang der Sonde zur zellulären RNA verbessert. Hierbei wurden die Schnitte für 7 min bei 37°C in einer Lösung aus Pronase (0,125 mg/ml) inkubiert.

Die Gewebeschnitte wurden danach in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 95% und 100% EtOH) dehydriert, dann nochmals in 100% EtOH gewaschen und luftgetrocknet.

2.7.4.2 RNA-*In situ*-Hybridisierung mit Dig-markierten RNA-Sonden

Die Dig-markierten RNA-Sonden wurden in einer Konzentration von 1 ng/μl eingesetzt. Es wurde insgesamt 100 μl Hybridisierungsgemisch verwendet, um eine vollständige Bedeckung der auf den Objektträgern aufgezogenen Schnitte zu gewährleisten.

Ansatz des Probegemischs:

- 1 ng/μl hydrolysierte Dig-markierte RNA-Sonde
- 8 μl deionisiertes Formamid
- ad 18 μl H₂O

Der Ansatz wurde gemischt, bei 95°C für 10 min inkubiert und dann auf Eis gestellt.

Herstellung des Hybridisierungspuffers (für 24 Objektträger):

- 200 μl 10 x Salzlösung (3 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 M NaPO₄, 0,05 M EDTA)
- 800 μl Formamid (deionisiert)
- 400 μl 50% Dextransulfat
- 20 μl 100 mg/ml tRNA
- 40 μl 50 x Denhard's (2 g BSA, 2 g Ficoll, 2 g Polyvinylpyrrolidone in 100 ml H₂O)
- 140 μl H₂O

18 μl Probegemisch wurden mit 82 μl Hybridisierungspuffer versetzt und auf den Gewebeschnitt aufgetragen. Die Hybridisierungsreaktion fand in einem mit 2 x SSC/50% Formamid-Lösung getränkten Papiertüchern ausgelegten Kasten über Nacht bei 49°C statt.

2.7.5 Waschen der Schnitte

Zum Waschen der Schnitte wurden die Objektträger nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

2 x SSC, 50% Formamid	2 x 60 min	50°C
NTE (0,5 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl pH 7,5, 0,001 M EDTA)	2 x 5 min	37°C
NTE + 20 μg/ml RNase A	30 min	37°C
NTE	2 x 5 min	RT
2 x SSC, 50% Formamid	60 min	50°C
PBS	5 min	RT

2.7.6 Detektion der Hybridisierungssignale

Der Nachweis der hybridisierten Proben-RNA erfolgte mit einem Anti-Dig-Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Alle Inkubationen wurden in kleinen Schalen auf einem Schüttler bei RT durchgeführt. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß der Puffer während des Schüttelns die Objektträger gleichmäßig bedeckte.

Das Protokoll zur Detektion der Hybridisierungssignale umfasste die folgenden Inkubationsschritte:

Tabelle 6: Inkubationsschritte zur Detektion der Hybridisierungssignale

Lösungen	Inkubationszeit
Puffer 1: 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl	5 min
Puffer 2: Puffer 1 mit 0,5% Blockierungsreagenz	60 min
Puffer 3: Puffer1 mit 1% BSA, 0,3% Triton X 100	60 min
Puffer 4: Puffer 3 mit Anti-Dig-AP-Konjugat/Fab-Fragment (Roche) 1:2000	60 min
Puffer 1 mit 0,3% Triton X100	4 x 20 min
Puffer 1	5 min
Puffer 5: 0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl ₂	5 min
Puffer 6: Puffer 5 mit 10% Polyvinylalkohol, 1,5 µl/ml NBT und 1,5 µl/ml BCIP	bis zu 3 Tagen im Dunkeln

Die Inkubation in Puffer 6 fand in Glasschalen statt, so daß die Reaktion leicht unter dem Binokular verfolgt werden konnte. Inkubationszeiten von mehr als drei Tagen Dauer führten zu einem starken Hintergrund.

Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Schnitte jeweils 5 min mit H₂O, 70% EtOH, 95% EtOH, 70% EtOH und H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet und mit einem Deckglas versiegelt.

2.7.7 Fotografische Dokumentation der Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierungen und Quantifizierung der Hybridisierungssignale

Bildaufnahmen der Schnitte wurden mit einer digitalen Kamera (Hamamatsu digital camera C 4742-95) angefertigt.

Um eine genaue Aussage über die unterschiedlichen Signalstärken von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln machen zu können, wurden die Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierungen mittels des Bildbearbeitungsprogrammes „Image tool“ quantifiziert.

3. Ergebnisse

3.1. PCR-Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus Genen, die an der Schwermetall- und Salz-Toleranz beteiligt sind

Zur Entwicklung von Oligonukleotidprimern wurden die in den Datenbanken vorhandenen AS-Sequenzen auf konservierte Bereiche miteinander verglichen. Dabei sind jene konservierte Aminosäuren von besonderer Bedeutung, die nur durch ein oder zwei Triplets kodiert sind (Methionin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Histidin, Lysin, Glutamin, Glutaminsäure). Je niedriger die Degeneration der ausgewählten Aminosäuren ist, desto höher ist die Spezifität der zu synthetisierenden Primer. Darüberhinaus wurde beim Konstruieren von degenerierten Primern darauf geachtet, daß die drei letzten Basen am 3'-Ende eine 100%ige Übereinstimmung mit der Zielsequenz haben, um die Wahrscheinlichkeit der Bindung von Primern an der Zielsequenz erhöhen zu können.

3.1.1 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von Genen, die an Schwermetalltoleranz beteiligt sind

3.1.1.1 Vergleich von Aminosäuresequenzen der Phytochelatin synthase

Der Vergleich der abgeleiteten AS-Sequenzen der Phytochelatin synthase-Teilsequenz aus Tomate mit zwei AS-Sequenzen der Phytochelatin synthase aus *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* diente der Synthese von zwei Nukleotidprimern PC1 und PC2 (Abb. 4), die die Amplifizierung eines Teilbereiches der Phytochelatin synthase aus Tomate von ca. 900 bp auf cDNA-Ebene ermöglichen sollten.

Abbildung 4: Vergleich von publizierten Aminosäuren-Sequenzen der Phytochelatin synthasen aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) und Mais (*Zea mays*)

Tomate	MMGAQTTE QGDCSKFKGNIPHCCKRDPTVVDLLPGTPYNQQIANCCKGGVINSWGQDPET
<i>Arabidopsis</i>	MVGAQTTE QGDCSKYKGNIPHCCKDPTVVDLLPGTPYNQQIANCCKGGVMNSWQDPAT
Mais	MVGAQTTE QGDCSKFKSSPPHCCKDPTIVDLLPGTPYNMQIANCCKAGVVNTFNQDPAN
	PCI →
Tomate	ADSSFQVSVGAAGTTNKTVRVPKNFTLKAPGGYTCGP-----
<i>Arabidopsis</i>	AASSFQISVGAAGTTNKTVRVPRNFTLMGPGPGYTCGPAKIVRPTKFTVTTDTRRTQAMM
Mais	AASSFQISVGLAGTTNKTVKVPRNFTLKTGPGPGYTCGRAIVGRPTKFFTADGRRATQALM
Tomate	-----
<i>Arabidopsis</i>	TWNITCTYSQFLAQRTPCCVLSLSFYNETIVGCP TCACGCQNNRTESGACLDPDTPHLA
Mais	TWNV TCTYSQFLAQT PSCCVLSLSFYNDTIVNCPTCSCGCQNP SGN--CVNEDSPNLQ
Tomate	-----
<i>Arabidopsis</i>	SVVSPPTKKGTVLPLVQCTRHMCPIRVHWHVKQNYKEYWRVKITITNFNYRLNYTQWNL
Mais	AAIDGPGK--WTGQPLVQCTSHMCPIRIHWHVKLNYKDYWRVKITITNFNFRMNYTQWNL
Tomate	-----
<i>Arabidopsis</i>	VAQHPNLDNITQIFSFNYKSLTPYAG-LNDTAMLWGVKFYNDLSEAGPLGNVQSEILFR
Mais	VAQHPNFDNITQLFSFNYKPLTPYGGGINDTAMFWGVKFYNDLLMQAGKLGNVQSELLLR

```

Tomate -----
Arabidopsis  KDQSTFTFEKGWAFPRRIYFNGDNCVMPPDPSYPFLPNG-----GSRG
Mais         KDSRTFTFEKGWAFPRRVYFNGDNCVMPSPENYPWLPNASPLTKPLALPLLGLGLGCSV
                ←
                PC2
    
```

Darstellung der zur Synthese der Primerpaare PC1 und PC2 ausgewählten Aminosäuresequenzen. Die Positionierung der PCR-Primer wird mittels Pfeilen unterhalb der Sequenzen angegeben, und die für die Herstellung der Oligonukleotide ausgewählten Aminosäuren sind in Fettdruck wiedergegeben.

3.1.1.2 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von Nramtransportern

Als Basis zur Herstellung von degenerierten Olinukleotidprimern NrmA und NrmB dienten die AS-Sequenzbereiche der Nramtransportergene aus *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), Reis (*Oryza sativa*) und *Saccharomyces cerevisiae*. Die synthetisierten Primer erlauben mittels PCR die Amplifizierung eines 300 bp-langen cDNA-Bereiches.

Abbildung 5: Vergleich der publizierten AS-Sequenzen unterschiedlicher Nramtransportergene aus *Arabidopsis*, Reis und *Saccharomyces cerevisiae*

```

OsNramp1      116 LAELAVIASDIPEVIGTGFANLL140
OsNramp3      81 LAELAVVACDIPEVIGTAFALNML104
AtNramp1     137 MAELALIGSDIQEVIGSAIAIKIL161
AtNramp3     133 MAEIALIGADIQEVIGSAIAIKIL157
AtNramp2     153 MAELALIGADIQEVIGSAIAIQIL179
AtNramp4     152 MAEVALIGADIQEVIGSAIALQIL178
OsNramp2     92 MTELALVGADIQEVIGSAIAIKIL116
SMF1         158 FAECAVIATDIAEVIGTAIALNIL182
                →
                NrmA

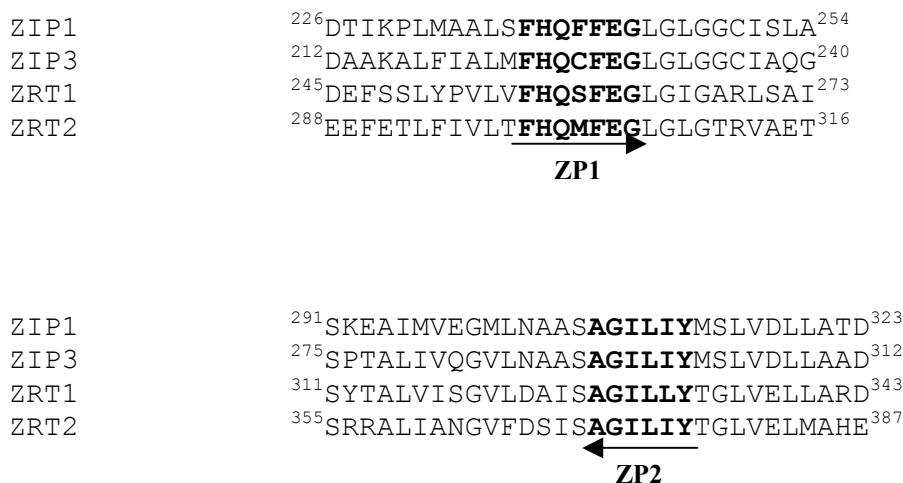
OsNramp1     216 SIALLGALVMPHNLFLHSAVLRSRNT241
OsNramp3     181 AISLLGAMVMPHNLFLHSELVLSRKE207
AtNramp1     239 AVGVVGCIMPHNVFLHSAVQSREV265
AtNramp3     235 AVGIVGCIMPHNVFLHSAVQSREV261
AtNramp2     258 AVGVVGCVMPHNVFLHSAVQSRKI284
AtNramp4     253 AVGVVGCVTPHNVFLHSAVQSRKT277
OsNramp2     191 AVGIVGCIMPHNVFLHSAVESRKI217
SMF1         267 AISILGATVMPHSLFLGSALVQPRLL293
                ←
                NrmB
    
```

Konservierte AS-Sequenz-Bereiche der Nramtransporter AtNramp1 (AC004401), AtNramp2 (AF141204), AtNramp3 (AB007645), AtNramp 4 (AL035526) aus *Arabidopsis*, OsNramp1 (L412117), OsNramp2 (L81152), OsNramp3 (U60767) aus Reis und SMF1 (P38925) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Lage der zur Amplifikation verwendeten Primer NrmA und NrmB wird mittels Pfeilen unterhalb der Sequenzen angegeben, und die für die Herstellung der Oligonukleotide ausgewählten Aminosäuren sind durch den fettgedruckten Teil dargestellt.

3.1.1.3 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von Zink-Transportern

Zur Herstellung von degenerierten Primern (ZP1 und ZP2) für eine mögliche Amplifizierung von Zink-Transportern aus Tomate und aus AM-Pilze dienten die Aminosäure-Sequenzen der Zink-Transporter aus *Arabidopsis* und *Saccharomyces cerevisiae*.

Abbildung 6: Vergleich der publizierten AS-Sequenzen unterschiedlicher Zink-Transportergene aus *Arabidopsis* und *Saccharomyces cerevisiae*

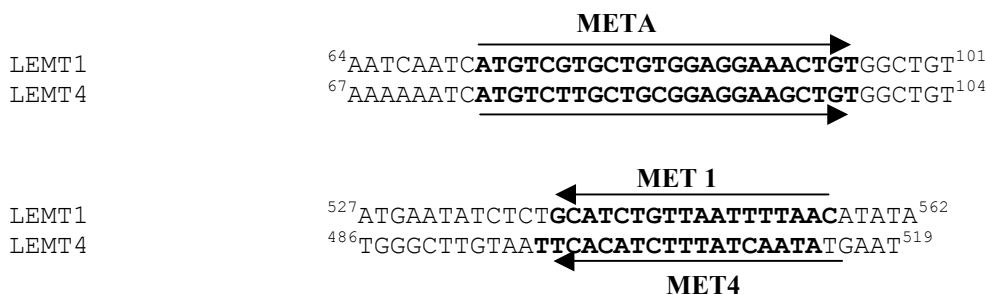


Konservierte AS-Sequenz-Bereiche der Zink-Transporter *ZIP1* (T52183), *ZIP3* (T52185) aus *Arabidopsis* und *ZRT1* (P32804), *ZRT2* (CAA97701) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Lage der zur Amplifikation verwendeten Primer ZP1 und ZP2 wird mittels Pfeilen unterhalb der Sequenzen angegeben, und die für die Herstellung der Oligonukleotide ausgewählten Aminosäuren sind durch den fettgedruckten Teil dargestellt.

3.1.1.4 Vergleich von Nukleotidsequenzen der Metallothioneine aus Tomate

Zur Herstellung von Primern für die Amplifizierung von Metallothionein-Nukleotidsequenzen aus Tomate dienten die in der Arbeit von A.Giritch et al., 1998 publizierten Nukleotidsequenzen. Unter Verwendung der Primerpaare META/MET1 und META/MET4 (Abb. 7) sollten mittels PCR Nukleotid-Teilsequenzen von ca. 480 bp und 440 bp auf cDNA-Ebene erhalten werden.

Abbildung 7: Vergleich der publizierten Nukleotidsequenzen zweier Metallothionein-gene *Lemt1* und *Lemt4* aus Tomate



Darstellung der zur Synthese der Primerpaare META/MET1 und META/MET4 ausgewählten Olinukleotidsequenzen der Metallothioneine *Lemt 1* (Z68138) und *Lemt 4* (Z68310) aus Tomate. Die Positionierung der PCR-Primer wird mittels Pfeilen unterhalb der Sequenzen angegeben, und die für die Herstellung der Primer ausgewählten Nukleotide sind in Fettdruck wiedergegeben.

3.1.2 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von Genen, die an der Salztoleranz beteiligt sind

3.1.2.1 Vergleich von Aminosäuresequenzen der Plasmamembran (PIP)- und Tonoplast (TIP)-Aquaporine

Die Aquaporine gehören zu der MIP (major intrinsic protein)-Familie und sind bei den Pflanzen sowohl in der Plasmamembran (PIP: plasma membrane intrinsic protein) als auch im Tonoplast (TIP: tonoplast intrinsic protein) lokalisiert (Höfte et al., 1991; Kammerloher et al., 1994). Diese Protein-Familie spielt eine Rolle bei dem Wassertransport (Maurel et al., 1993), somit könnten Aquaporine an der Salztoleranz beteiligt sein (Bohnert und Jensen, 1996).

Als Grundlage für die Konstruktion von Oligonukleotiprimern zur Amplifizierung von Tomaten-Aquaporinteilsequenzen dienten die in der Abbildung 8 dargestellten Aminosäuresequenzen der PIP- und TIP-Aquaporine aus höheren Pflanzen. Die Primerpaare PMA/PMB und TPA/TPB umfassen auf cDNA-Ebene ein zu amplifizierendes Stück von ca. 450 bp bzw. 330 bp.

Abbildung 8: Vergleich der publizierten AS-Sequenzen unterschiedlicher PIP- und TIP-Aquaporine aus höheren Pflanzen

A: PIP-Aquaporine

<i>Nicotiana tabacum</i>	105 YCTAGISGG HINPAV TFGLFLARKL ¹³⁰
<i>Solanum tuberosum</i>	104 YCTAGISGG HINPAV TIWSVLGKKL ¹²⁹
<i>Lycopersicon esculentum</i>	102 YCTAGISGG HINPAV TFGLFLARKL ¹²⁷
<i>Zea mays</i>	106 YCTAGISGG HINPAV TFGLFLARKL ¹³¹

<i>Nicotiana tabacum</i>	251 QAWDDH WIFWVGP FIGAALAAVYHQ ²⁷⁶
<i>Solanum tuberosum</i>	250 QAWDDH WIFWVGP FIGQALAAVYHQ ²⁷⁵
<i>Lycopersicon esculentum</i>	248 HAWDDH WIFWVGP FIGAALAAVYHQ ²⁷³
<i>Zea mays</i>	252 HAWNDH WIFWVGP FIGAALAAIYHQ ²⁷⁷

B: TIP-Aquaporine

<i>Arabidopsis thaliana</i>	71VAVSVGANIS GGHVNP AVTFGAFVGGN ⁹⁸
<i>Oryza sativa</i>	71VAVSVGANIS GGHVNP AVTFGAFVGGN ⁹⁸
<i>Lycopersicon esculentum</i>	69VGVSMANIS GGHLNP AVTLGLAVGGN ⁹⁶
<i>Nicotiana tabacum</i>	68VGVSIAANIS GGHLNP AVTLGLAVGGN ⁹⁵
	→ TPA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	171LGTIAPIAIG FIVGANI LAGGAFSGAS ¹⁹⁸
<i>Oryza sativa</i>	171LGTIAPIAIG FIVGANI LVGGAFDGAS ¹⁹⁸
<i>Lycopersicon esculentum</i>	169LGTIAPIAIG FIVGANI LAAGPFSGGS ¹⁹⁶
<i>Nicotiana tabacum</i>	168LGTIAPIAIG FIVGANI LAAGPFSGGS ¹⁹⁵
	← TPB

A: Konservierte AS-Sequenzbereiche der PIP-Aquaporingene aus *Lycopersicon esculentum* (AF218774), *Zea mays* (AF131201), *Nicotiana tabacum* (AF440271) und *Solanum tuberosum* (Y18311). **B:** Konservierte AS-Sequenzbereiche der TIP-Aquaporingene aus *Lycopersicon esculentum* (U95008), *Nicotiana tabacum* (P21653), *Arabidopsis thaliana* (P21652) und *Oryza sativa* (P50156). Die Lage der zur Amplifikation verwendeten Primerpaare PMA/PMB und TPA/TPB wird mittels Pfeilen unterhalb der Sequenzen angegeben, und die für die Herstellung der Oligonukleotide ausgewählten Aminosäuren sind durch den fettgedruckten Teil dargestellt.

3.1.2.2 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von Na⁺/H⁺-Antiporter

Zur Herstellung von Nukleotidprimern, die die Amplifizierung von Teibereichen der Na⁺/H⁺-Antiportergene erlauben sollten, wurden die publizierten AS-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, *Atriplex gmelini*, *Ipomea tricolor* und *Suaeda maritima* miteinander verglichen (Abb. 9). Mittels PCR-Experimenten sollte unter Verwendung der synthetisierten Primer NHA1 und NHA2 ein 600 bp-langen cDNA-Bereich amplifiziert werden.

Abbildung 9: Vergleich der zur Herstellung von Oligonukleotidprimern eingesetzten AS-Sequenzbereiche

<i>Atriplex gmelini</i>	95IFNAGFQV KKKQFF RNFITIVLFGAV ¹²¹
<i>Suaeda maritima</i>	95IFNAGFQV KKKQFF RNFITIIILFGAV ¹²¹
<i>Arabidopsis thaliana</i>	91IFNAGFQV KKKQFF RNFVTIMLFGAV ¹¹⁷
<i>Ipomea tricolor</i>	93IFNAGFQV KKKQFF VNFMTIMLFGAI ¹¹⁹
	→ NHA1
<i>Atriplex gmelini</i>	272FYLSGILTV FFCGIVM SHYTWHNVTESSR ³⁰¹
<i>Suaeda maritima</i>	272FYLSGILTV FFCGIVM SHYTWHNVTESSR ³⁰¹
<i>Arabidopsis thaliana</i>	268FDLSGILTV FFCGIVM SHYTWHNVTESSR ²⁹⁶
<i>Ipomea tricolor</i>	270FYLSGILTV FFCGIVM SHYTWHNVTESSR ²⁹⁸
	← NHA2

Darstellung der zur Synthese der Primerpaare NHA1/NHA2 ausgewählten AS-Sequenzen. Die Positionierung der PCR-Primer wird mittels Pfeilen unterhalb der Sequenzen angegeben, und die für die Herstellung der Oligonukleotide Aminosäuren sind im Fettdruck wiedergegeben. Die Genbank-Zugangsnummern der ausgewählten Sequenzen sind, für *Atriplex gmelini* (BAB11940), *Suaeda maritima* (AAK53432), *Arabidopsis thaliana* (AAM34759), *Ipomea tricolor* (BAB60901).

3.1.3 Resultate der PCR-Experimente zur Amplifikation von Genen, die möglicherweise an der Schwermetall- bzw. Salz-Toleranz beteiligt sind

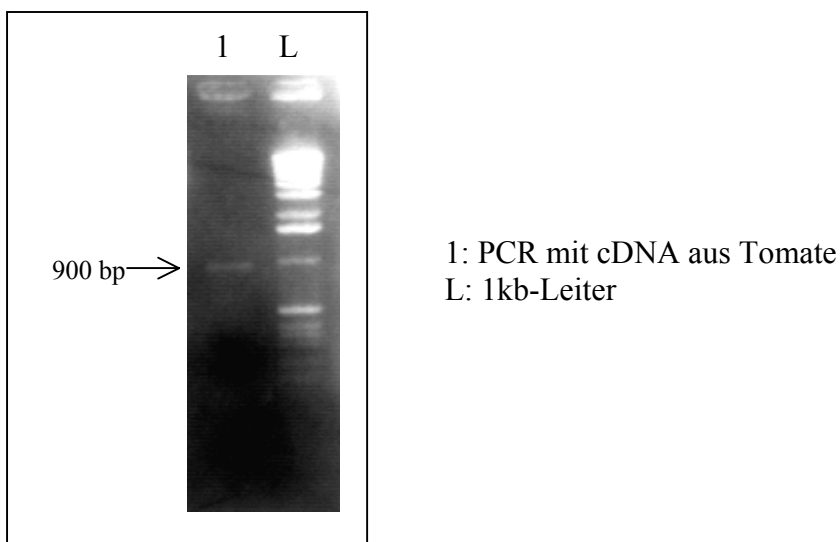
3.1.3.1 Amplifikation eines Teilbereiches von Phytochelatin synthase aus Tomate

Das Primerpaar PC1/PC2 wurde anhand der publizierten Phytochelatin synthase-Sequenzen aus Tomate, *Arabidopsis* und Mais ausgewählt. PC1 wurde spezifisch aus der Tomate-Nukleotidteilsequenz hergestellt. PC2 ist ein degenerierter Primer, der aus dem Vergleich der AS-Sequenzen von *Arabidopsis* und Mais konstruiert wurde. Mit cDNA aus Tomate konnte in einem PCR-Experiment ein Amplifikat von ca. 900 bp erhalten werden (Abb. 10).

Um zu überprüfen, ob es sich bei der in der PCR erhaltenen 900 bp großen Bande wirklich um ein Teilstück des Gens der Phytochelatin synthase aus Tomate handelte, wurde das PCR-Amplifikat in dem Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert und anschließend sequenziert.

Die Sequenzierung des Inserts des erhaltenen Klons PT1 ergab unter Verwendung des BLAST-Programms eine Identifizierung des Amplifikates als Teil der Phytochelatin synthase. Die abgeleitete Aminosäuresequenz enthielt keine Stop-Codons und konnte daher als offenes Leseraster des Gens betrachtet werden (Abb. 11). Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des PCR-Fragments mit der publizierten Sequenz aus *Arabidopsis* ergab, daß 79% der Aminosäuren identisch sind. Zu der publizierten Aminosäure-Teilsequenz aus Tomate wurde eine 100%ige Identität erhalten.

Abbildung 10: PCR zur Amplifizierung eines Teilbereiches des Phytochelatin synthasegens aus Tomate



Als Matrize für die PCR diente die cDNA aus Tomate. Es wurden die Oligonukleotidprimer PC1 und PC2 verwendet. Die PCR Methode umfaßte in den ersten 10 Zyklen eine Reduzierung der Bindungstemperatur von 56°C auf 46°C, gefolgt von weiteren 35 Zyklen mit 52°C Bindungstemperatur. 6 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

Abbildung 11: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Phytochelatinsynthasen aus *Arabidopsis*, Tomate und Mais mit der Sequenz des Klons PT1 aus Tomate

```

Tomate      GMMGAQTTEQGDCSKFKGNIPHCCKRDPTVVDLLPGTPYNQQIANCCCKGGVINSWGQDPE
PT1        --MGAQTTEQGDCSKFKGNIPHCCKGDPTVVDLLPGTPYNQQIANCCCKGGVINSWGQDPE
Arabidopsis -MVGAQTTEQGDCSKYKGNIPHCCKDPTVVDLLPGTPYNQQIANCCCKGGVMNSWVQDPA
Mais      -MVGAQTTEQGDCSKFKSSPPHCCKKDPTIVDLLPGTPYNMQIANCCKAGVVNTFNQDPA
          ***** *      ***** ** ***** ***** ***** * *      ***

Tomate      TADSSFQVSVGAAGTTNKTVRVPKNFLLKAPGPGYTCGP-----
PT1        TAVSSFQVSVGAAGTTNKTVRVPKNFLLKAPGPGYTCGPAKVVKPTKFSGGDGRRTQAM
Arabidopsis TAASSFQISVGAAGTTNKTVRVPRNFTLMGPGPGYTCGPAKIVRPTKFVTTDRRTTQAM
Mais      NAASSFQISVGLAGTTNKTVKVRNFTLKTGPGYTCGRAIVGRPTKFFTADGRRTQAL
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Tomate      -----
PT1        MTWNVCTHSQFLAQKTPCCVSLSSFYNDTIVPCPTCTCGCQKNGTQHGNVCVDQDEPHL
Arabidopsis MTWNVCTYSQFLAQKTPCCVSLSSFYNETIVGCPTCACGCQNNRTESGACLDPDTPHL
Mais      MTWNVCTYSQFLAQKTPSCCVSLSSFYNDTIVNCPCTSCGCQN--PSGSNCVNEDSPNL

Tomate      -----
PT1        ASVVSGLGKN--NYAPLVQCTSHMCPIRIHWHVKLNKEYWRVKVITITNFNYNMNYTQWN
Arabidopsis ASVVSPPTKKGTVLPPLVQCTRHMCPIRVHWHVKQNYKEYWRVKITITNFNYRLNYTQWN
Mais      QAAIDGPGK--WTGQPLVQCTSHMCPIRIHWHVKLNKYDYWRVKITITNFNFRMNYTQWN

Tomate      -----
PT1        LVVQHPNFDNLTQLFSFHYKSLTPYGA-INDTAMLWGMKFYNDLLMQAGPLGNVQSEILF
Arabidopsis LVAQHPNLDNITQIFSFNYKSLTPYAG-LNDTAMLWGVKFYNDLSEAGPLGNVQSEILF
Mais      LVAQHPNFDNITQLFSFNYKPLTPYGGGINDTAMFWGVKFYNDLLMQAGKLGNVQSEILL

Tomate      -----
PT1        RKDMST
Arabidopsis RKDQST
Mais      RKDSRT

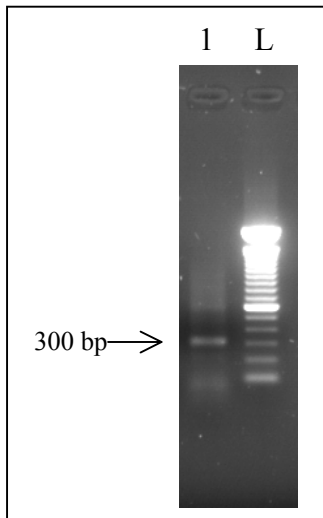
```

Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des erhaltenen Klons PT1 mit Phytochelatinsynthase-Sequenzen aus *Arabidopsis* (AJ006787), Tomate (AW154892) und Mais (AF160475). Die Positionen, an denen identische Nukleotide vorkommen, sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Sequenz des Klons PT1 ist in Fettdruck angegeben.

3.1.3.2 PCR-Amplifizierung eines Bereiches von Nramtransportergenen aus Tomate

Durch Verwendung der degenerierten Primer NrmA und NrmB wurde in einer „touch down“-PCR mit cDNA als Matrize ein PCR-Fragment von ca. 300 bp amplifiziert (Abb. 12). Zwei Klone (NT1 und NT2) des erhaltenen PCR-Produktes wurden zur Identifizierung sequenziert. Beide Klone weisen zueinander auf Aminosäureebene 42% Identität und 57% Homologie auf. Der Tomate-Klon NT1 zeigt auf Aminosäureebene in einem Bereich von 108 AS eine 75%ige Identität und eine 86%ige Homologie zu einer Nramtransportersequenz aus Reis (OsNramp1). Der Klon NT2 weist auf AS-Ebene über einen Bereich von 109 AS 77% Identität und 88% Homologie zu AtNramp2 aus *Arabidopsis thaliana* auf. Bei den Klonen NT1 und NT2 handelt es sich sehr wahrscheinlich um Teilbereiche zweier bisher unbekannter Nramtransportergene aus Tomate.

Abbildung 12: PCR zur Amplifizierung eines Teilbereiches aus Nramtransportergenen aus Tomate



1: PCR mit Wurzel-cDNA aus Tomate
L: 100 bp-Leiter

Die Wurzel-cDNA aus Tomatenpflanzen, die in Breinigerbergerde angezogen wurden, diente als Matrize für die PCR. Es wurden die degenerierten Oligonukleotidprimer NrmA und NrmB verwendet. Die PCR Methode umfaßte in den ersten 10 Zyklen eine Reduzierung der Bindungstemperatur von 58°C auf 48°C, gefolgt von weiteren 35 Zyklen mit 53°C Bindungstemperatur. 6 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

Abbildung 13: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Nramtransporter aus *Arabidopsis* und Reis mit den Sequenzen der Klone NT1 und NT2

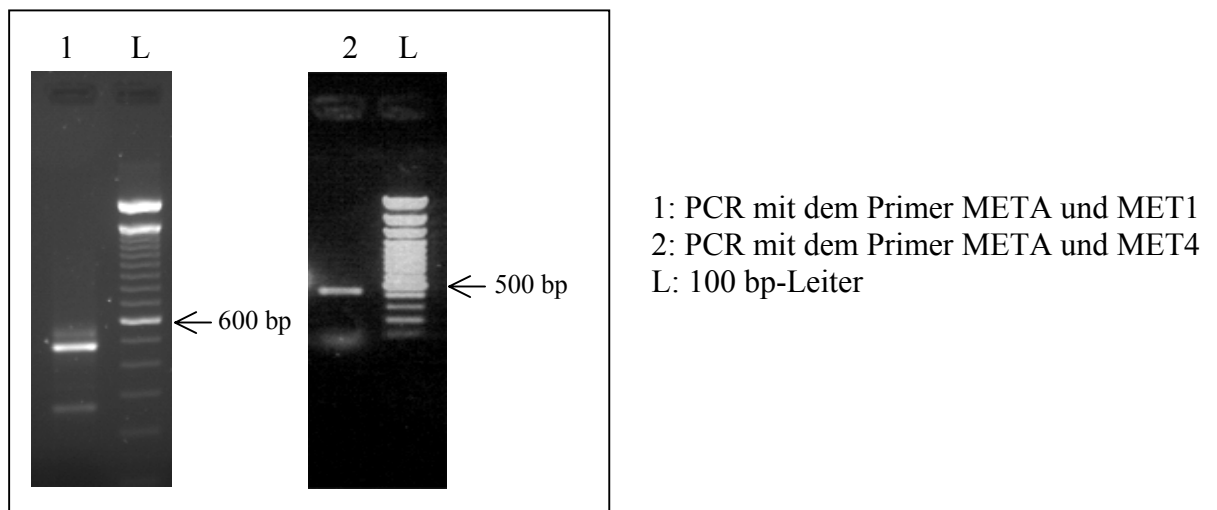
OsNramp2	DIQEVIG SAIAIKILSAGTVPLWGGVVITAFDCFI FLFLENYGVRKLEAFFGVLIAMAV
AtNramp3	DIQEVIG SAIAIKILSNGLVPLWAGVVITALDCFI FLFLENYGIRKLEAVFAILIATMAL
AtNramp1	DIQEVIG SAIAIKILSNGILPLWAGVVITALDCFVFLFLENYGIRKLEAVFAVLIATMGV
AtNramp2	DIQEVIG SAIAIQILSRGFLPLWAGVVITASDCFLFLFLENYGVRKLEAVFAVLIATMGL
NT2	DIPEVIW SAITCKILMPGVLPLWAGVLTASDCFLLLVLENYGIRKLEAVFAVLISTMAL
NT1	DIPEVIG TAFALNLFH--IPVWAGVLC TGVSTLLF IGLQRYGVRKLELLIAILVFMMAA
OsNramp1	DIPEVIG TGFAFNLLFH--IPVWTGVLIAGSSTLLLLGLQRYGVRKLEVVALLVFMAG
	** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OsNramp2	SFAIMFGETKPSGKDLLIGLVV PKLSS-RTIKQAVGIVGCI IMPHNVFLH
AtNramp3	AFAWMFGQTKPSGTELLVGALV PKLSS-RTIKQAVGIVGCI IMPHNVFLH
AtNramp1	SFAWMFGQAKPSGSELLIGILV PKLSS-RTIQKAVGVVGC I IMPHNVFLH
AtNramp2	SFAWMFGETKPSGKELMIGILLPRLSS-KTIRQAVGVVGC V IMPHNVFLH
NT2	SFAWMFGDAKPNGKELLAGLLI PKLSS-RTVRQAVGVVGC V IMPHNVFLH
NT1	CFFGEMSYVKPPANELFKGMFI PKLNGDGATADAIALLGALV MPHNLFH
OsNramp1	CFFVEMSVKPPVNEVLQGLFI PRLSGPGATGDSIALLGALV MPHNLFH
	* ** * * * * * * * * * * * * * * * * *

Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der erhaltenen Klone NT1 und NT2 mit den Aminosäuresequenzen der Nramtransporter AtNramp1 (AC004401), AtNramp2 (AF141204), AtNramp3 (AB007645) aus *Arabidopsis* und OsNramp1 (L412117), OsNramp2 (L81152) aus Reis. Die Positionen, an denen identische Aminosäure vorkommen, sind durch einen Stern gekennzeichnet. Der fettgedruckte Teil der Sequenzen gibt die für die Herstellung der degenerierten Primer NrmA und NrmB ausgewählten Aminosäuren an.

3.1.3.3 PCR-Amplifizierung eines Bereiches von Metallothioneinen aus Tomate

Zur Isolierung einer Gensonde für die Metallothioneine aus Tomate in PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar META/MET 1 und META/MET 4 wurde cDNA aus Tomate als Matrize verwendet. Während das Primerpaar META/MET1 zur Amplifikation von einem PCR-Produkt von ca. 480 bp führen konnte, wurde mittels META/MET4 ein PCR-Fragment von etwa 440 bp erhalten (Abb. 14). Nach dem Eluieren aus dem Gel, Klonieren und Sequenzieren, erwies sich der Insert des Klons MT1 (480 bp-Fragment), mit 100%iger Identität, als Teilsequenz des Metallothioneingens *Lemt1* (Giritch et al.1998). Der Klon MT4 (440 bp-Fragment) zeigte eine 100%ige Übereinstimmung mit der von Giritch et al.(1998) publizierten cDNA-Sequenz des Metallothioneingens *Lemt4*.

Abbildung 14: PCR zur Amplifizierung von Teilbereichen der Metallothioneingene aus Tomate



Die Wurzel-cDNA aus Tomate diente als Matrize für die PCR. Es wurden das Primerpaar META/MET1 (Spur 1) und META/MET4 (Spur 2) verwendet. Die PCR Methode umfaßte 35 Zyklen mit 56°C Bindungstemperatur. 6 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

Abbildung 15: Vergleich der cDNA-Sequenzen beider Klone MT1 und MT4

```

MT1      ATGTCGTGCTGTGGAGGAACTGTGGCTGTGGATCTAGCTGCAAGTGCGACAACGGCTGT
MT4      ATGTCTTGCTGCGGAGGAAGCTGTGGCTGTGGATCTGGCTGCAAGTGCGGCAGTGGCTGT
          *****
MT1      GGAGGTTGCAAGATGTACCCAGACATGAGCTACACCGAAAGCAGCACAACCACTGAGACT
MT4      GGAGGATGTGGGATGTACCCCAGACTGGAGAGACCACTACCTTTACCATCATTGAG---
          ***** **
MT1      TTGGTGCTTGGGGTGGGACCTGAGAAGACAAGCTTCGGCGCCATGGAGATGGGTGAATCC
MT4      --GGTGT-----GCACCTATGAAGA---ACTATGGAGTGGCTGAGA-----AAGCA
          **** *
    
```

```

MT1      CCTGTTGCTGAGAATGGCTGCAAATGTGGATCTGACTGCAAGTGAACCCCTTGCACTTGT
MT4      ACAGAAGGAGGAAATGGCTGCAAATGTGGATCAAACCTGCACATGTGACCCCTTGCAACTGT
          * * * * *
MT1      TCTAAGTGAACGAAAATATAGTTGAAACAGAGCAGAGATCATGGTGTAGCCTTCTATGG
MT4      TGAGAC---ACCAAATGTCTCTTTTTC----TATTAATTAT--TACTAG---TGTGTGT
          * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MT1      CTGAAGAAAAATAGTTGAAAAATGTGTGTCTAGTGTTTTAGTGTGTCTGTCTGTTGA
MT4      TTAATAAAAATTA-CTAAGCCAATTGAACCTGACCA-----TCTGCAAATCTTTTTTACAA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MT1      AAACAGGGAAAAAATGTGTCTTTT--TTCCCTGTAATAAGAAATATA-GTAATGGAGT
MT4      AAGGTTTGTCTGATGTTTAGTCCATGGCTTTTTTATGTTTGGTTGTCTATGTTCTCAATT
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MT1      CTTTATGTGTAAGTAACAGTAAATGGTTGTGTAACATGAATATCTCTGCATCTGTT
MT4      AGTTATAATTGTATTG-----AAGGAAGTTTATTTGGGCTTGTA-ATTACATCTTTATC
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MT1      AATTTTAA
MT4      AATA----
          ***

```

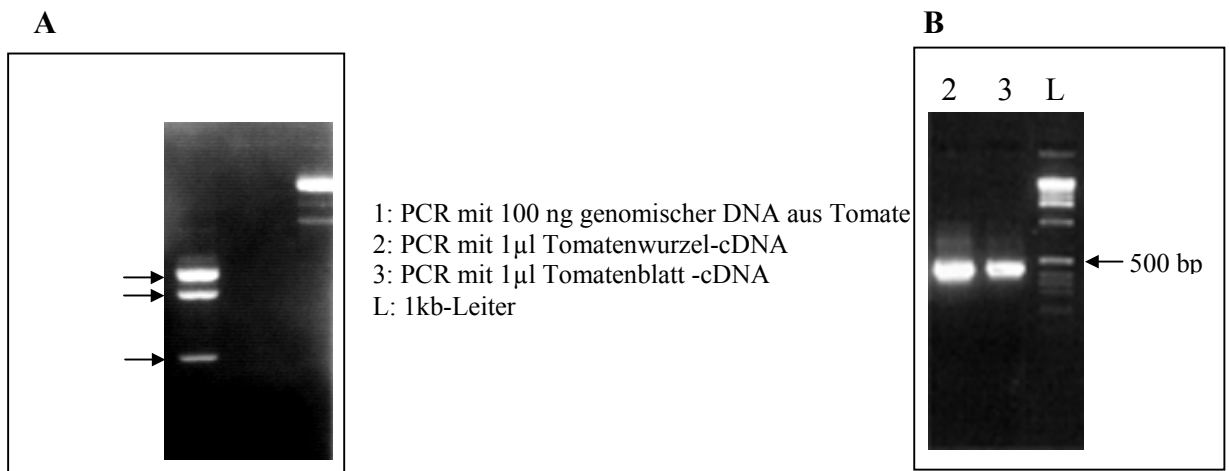
Der Vergleich der Nukleotidsequenzen der erhaltenen Klone MT1 und MT4 wurde mit dem Programm Clustal X (1.8) durchgeführt. Die Positionen, an denen identische Nukleotide vorkommen, sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Sequenzen des degenerierten Primers META und der spezifischen Primer MET1 und MET4 sind in Fettdruck wiedergegeben.

3.1.3.4 Amplifikation von Teilbereichen von PIP-Aquaporinen aus Tomate

Der Einsatz des Primerpaares PMA/PMB zur Isolierung einer Gensonde für die PIP-Aquaporine mit genomischer und cDNA aus Tomate führte zu unterschiedlichen PCR-Ergebnissen. Die PCR mit genomischer DNA führte zur Amplifizierung von drei PCR-Produkten von etwa 500 bp, 800 bp und 1000 bp (Abb.16 A). Bei Verwendung von cDNA wurde nur ein Amplifikat von etwa 400 bp erhalten (Abb.16 B). Dieses Resultat deutet darauf hin, daß das Primerpaar mehr als eine Aquaporinsequenz erfassen könnte. Das Amplifizieren von PCR-Fragmenten mit unterschiedlichen Größen unter Verwendung von genomischer DNA könnte wahrscheinlich auf das Vorhandensein von Introns zurückgeführt werden.

Die mit genomischer DNA erhaltenen Amplifikate wurden aus dem Gel eluiert, kloniert und sequenziert. Die 1000 bp-Amplifikatbande zeigte keine Homologie zu den bekannten PIP-Sequenzen und war damit ein unspezifisches PCR-Produkt. Die Sequenzierung des 500 bp- (Klon PT1) und 800 bp-Insertes (Klon PT2) erlaubte unter Verwendung des BLAST-Programms eine Identifizierung der klonierten Segmente als Teil von PIP-Aquaporinsequenzen. Das Amplifikat von 500 bp wies auf Nukleotidebene und über zwei Bereiche von 285 bp und 128 bp eine 85%ige bzw. 90%ige Identität zu einer PIP-Aquaporinsequenz aus *Nicotiana glauca* auf und enthielt ein Intron von 87 bp. Die Insertsequenz des Klones PT2 zeigte über zwei Bereiche von 237 bp und 141 bp eine 91%ige bzw. 90%ige Identität zu einer PIP-Aquaporinsequenz aus *Solanum tuberosum*. Das Fragment enthält aufgrund der Verwendung von genomischer DNA als Matrize für die PCR zwei Introns (283 bp und 133 bp).

Abbildung 16: PCR zur Amplifizierung eines Teilbereiches von Plasmamembran-aquaporinen

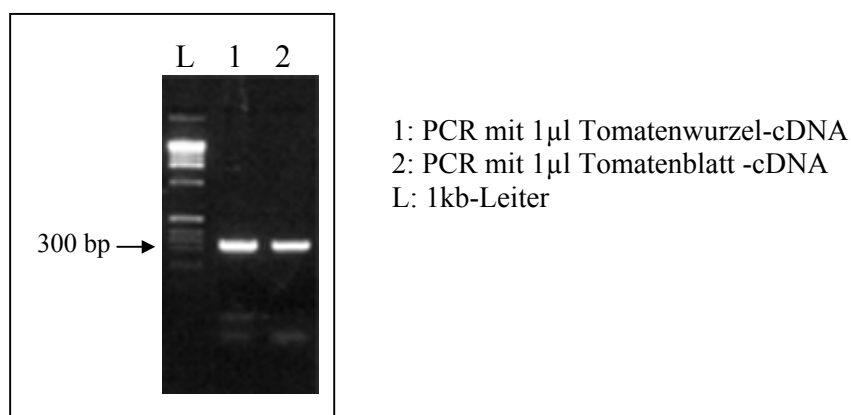


Genomische DNA (A) und Wurzel-cDNA (B) aus Tomate dienten als Matrizen für die PCR. Es wurden die Oligonukleotidprimer PMA und PMB verwendet. Die PCR Methode umfaßte 35 Zyklen mit 57°C Bindungstemperatur. 6 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

3.1.3.5 Amplifikation von Teilbereichen von TIP-Aquaporinen aus Tomate

Zur Amplifizierung eines Teilstückes des TIP-Aquaporinens wurden PCR-Experimente mit den Primern TPA und TPB durchgeführt. Dabei ließ sich mit Tomaten cDNA ein PCR-Produkt von ca. 300 bp amplifizieren (Abbildung 17). Durch Klonieren und Sequenzieren wies das klonierte Fragment (Klon TT1) eine 100%ige Identität auf Nukleotidebene zu der bereits publizierte TIP-Aquaporinsequenz aus Tomate (U95008) auf.

Abbildung 17: Ergebnisse der PCR zur Amplifizierung eines Teilbereiches des TIP-Aquaporinens mit den Primern TPA und TPB

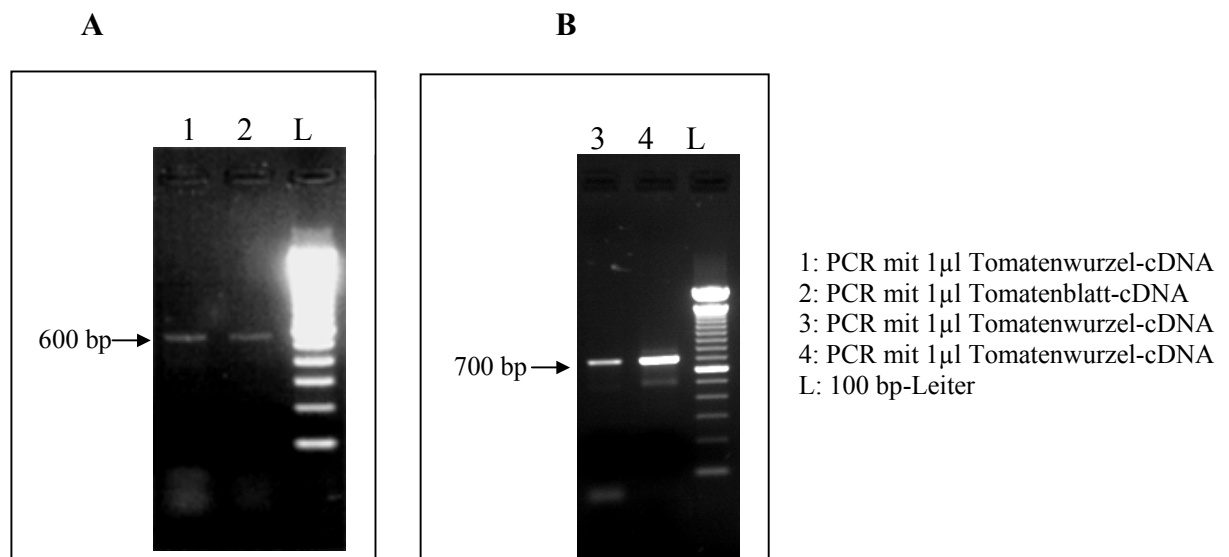


Das Produkt der PCR-Reaktion (PCR: 34 Zyklen mit einer Bindungstemperatur von 54°C) wurde mit Wurzel- (Spur 1) und Blatt-cDNA (Spur 2) aus Tomate unter Verwendung der Primer TPA und TPB erhalten. 6 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

3.1.3.6 Amplifikation von Teilbereichen aus Na^+/H^+ -Antiportergenen aus Tomate

Das degenerierte Primerpaar NHA1/NHA2 wurde anhand der zu dieser Zeit publizierten Sequenzen des Na^+/H^+ -Antiporter aus *Atriplex gmelini*, *Arabidopsis thaliana*, *Ipomea tricolor* und *Suaeda maritima* ausgewählt. In einem PCR-Experiment und unter Verwendung von cDNA aus Tomate konnte bei einer Primerbindungstemperatur von 52°C und 35 Zyklen ein Amplifikat von ca. 600 bp erhalten werden (Abb. 18 A). Das PCR-Amplifikat wurde in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert. Die anschließende Sequenzierung des Inserts HT1 ergab eine Identifizierung des Amplifikates als Teil eines Na^+/H^+ -Antiporters. cDNA-Sequenzen zweier Isoformen (Iso1 und Iso2) eines Na^+/H^+ -Antiporters aus Tomate wurden publiziert. Der Vergleich der Iso1-Sequenz mit der Insert-Sequenz des Klonen HT1 ergab auf Nukleotidebene eine 100%-ige Identität. Darauf folgend wurden zwei neue spezifische Primerpaare ISO1/ISO11 und ISO2/ISO22 entwickelt, um beide Isoformsequenzen erfassen zu können. Die PCR-Reaktion mit cDNA aus Tomate ergab jeweils ein Amplifikat von 700 bp (Abb. 18 B). Nach der Klonierung und Sequenzierung wurden zwei Klone HT2 und HT3 erhalten. HT2 wies auf Nukleotidebene eine 100%ige Identität zu der publizierten Isoformesequenz 1 auf. Der Klon HT3 zeigte eine 100%ige Übereinstimmung zu der Isoformesequenz 2 des Na^+/H^+ -Antiporters aus Tomate.

Abbildung 18: Ergebnisse der PCR zur Amplifizierung eines Teilbereiches aus Na^+/H^+ -Antiportergenen aus Tomate



Sowohl Wurzel- als auch Blatt-cDNA aus Tomate dienen als Matrize für die PCR. **A:** Es wurden die degenerierten Oligonukleotidprimer NHX1 und NHX2 verwendet. Die PCR Methode umfaßte 35 Zyklen mit einer Bindungstemperatur von 52°C . **B:** PCR-Reaktion (40 Zyklen mit einer Bindungstemperatur von 55°C) mit dem spezifischen Primerpaar ISO1/ISO11 (Spur 3) und ISO2/ISO22 (Spur 4). 6 μl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

Abbildung 19: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Na⁺/H⁺-Antiporter aus höheren Pflanzen und den Sequenzen der Klone HT2 und HT3

<i>Atriplex gmelini</i>	PGISVAVSSILLGLVMVGRAAFVFPFLSWMNFAKKSQSEKVTFNQQIIVIWWAGLMRGAVS
<i>Suaeda maritima</i>	PGTSVAVSSILLGLHMVGRAAFVFPFAFLMNLSKKSNSEKVTFNQQIIVIWWAGLMKSAVS
<i>Triticum aestivum</i>	PGKSIGISSILLGLVLVGRAAFVFPFLSFLSNLTKKTELEKISWRQQIIVIWWAGLMRGAVS
HT2	PGKSVGVSAAALLGLVLVGRACFVFPFLSFLSNCLKRSEHDKFGLKQQVTIWWAGLMRGSVS
	** * * **** ** ** * * ** ***** **
<i>Atriplex gmelini</i>	MALAYNQFTRSGHTQLRGNAIMITSTISVVLFSTMVFGLLTKPLIMFLLPQPKHFTSCST
<i>Suaeda maritima</i>	VALAYNQFSRSGHTQLRGNAIMITSTITVVFSTMVFGLLTKPLILFMLPQPKHFTSAST
<i>Triticum aestivum</i>	IALAYNKFTRSGHTQLHGNAIMITSTITVVFSTMVFGILTKPLIRFLLPAS----SNGA
HT2	MALAYNQFTRFGHTQQPGNAVMITSTITIVLFSTVVFGKITKPLVRFLLPSS----QGF
	***** * * **** ** ***** ***** * * **** * **
<i>Atriplex gmelini</i>	VSDVGSFKSYSLPLEGNQDYEVVDVGNHEDTTEPRTIVRPSLRLMLLNAPHTVHHYW
<i>Suaeda maritima</i>	VSDLGSPKSFSLPLEDRQDSEADLGN-DDEEAYPRGTIARPTSLRMLLNAPHTVHHYW
<i>Triticum aestivum</i>	ASDPASPKSLHSPLLT----S--QLGS----DLEAPLPIVRPSSLRMLITKPTHTIHHYW
HT2	NNLISSEQSFARPLLTNEQELELMGN-----VDPVRPSGLSILLKEPSYTIHNNHW
	* * ** * * ** * * * * * ** * * * *
<i>Atriplex gmelini</i>	RKFDDSFMRPVFGRGGRGFVPFVFP-----
<i>Suaeda maritima</i>	RRFDDYFMRPVFGRGGRGFVFPVPGSPTEQSI TNFVTENIS
<i>Triticum aestivum</i>	RKFDDALMRPMPFGRGGRGFVPYSPGSPDP---NVLVE---
HT2	RRFDDAFMRPPLFGRGGRFVDPAPELSKGG-----CDQY-
	* ** * ** ***** *
HT3	FIFFSILFIVIARAANVFGCAYLVNLVLRPPHQKIPAKHQKALWYSGLRGAMAFALALQSV
<i>Arabidopsis</i>	FIFFSILFIVIARAANVFGCYLVNLARPAHRKIPMTHQKALWYSGLRGAMAFALALQSV
	***** ** * ** *
HT3	HDLPEGHGQTI FTATTAIVVLTVLLIIGGSTGTMLEALEVVGDSHDTSLGDGFEVNSSRYM
<i>Arabidopsis</i>	HDLPEGHGQTI FTATTAIVVLTVLLIIGGSTGTMLEALEVVGDSHDTSLGDGFEVNSSRYM
	***** * ** *
HT3	PSYSDSYDGEPSGNRFRMMLKLFHKSITTSFSALDKNYLTPFFTTQGGDEDEDEPIMHS
<i>Arabidopsis</i>	TSYDDE--DTPPGSG--FRTKLREFHKSAASTELDRNYLTPFFTTSNNGDYD-DEGNMEQ
	** ** * * ** ** ** * * ** ***** ** * * ** *
HT3	SRRAGYDGH
<i>Arabidopsis</i>	HGNNIIL-

Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der erhaltenen HT2 und HT3 mit den Aminosäuresequenzen der Na⁺/H⁺-Antiporter aus *Atriplex gmelini* (BAB11940), *Suaeda maritima* (AAK53432), *Triticum aestivum* (AAK76738) und *Arabidopsis thaliana* (NP178079). Die Positionen, an denen identische Aminosäure vorkommen, sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Sequenzen der Klone HT2 und HT3 sind in Fettdruck angegeben.

3.1.3.7 Amplifikation eines Teilbereiches von Zink- und Nramp-Transportern aus AM-Pilzen

Es konnten durch PCR-Experimente sowohl mit isolierten Sporen als auch mit cDNA aus *Glomus intraradices* BrI und *Glomus intraradices* Sy167 unter Verwendung von degenerierten Primern für Zink- und Nramp-Transporter keine Amplifikate erhalten werden, die eine Homologie zu den bekannten pflanzlichen oder pilzlichen Genen aufweisen.

3.1.4 Entwicklung von Sonden mittels 3'-RACE-Verfahrens

Die Methode der 3'-RACE-PCR ermöglicht die Vervollständigung der Sequenzen von Transkripten am 3'-Enden. Die Bereiche, die am 3'-Ende der Gene liegen, werden nicht translatiert und sind weniger stark konserviert. Daher sollten diese Bereiche als Sonden während der Hybridisierungsversuche eingesetzt werden, um eine Kreuzhybridisierungen zu vermeiden und die Unterscheidung von Transkripten bei den Expressions-Analysen zu ermöglichen. Darüberhinaus dienen diese 3'-Ende-Bereiche als Grundlage zur Entwicklung von genspezifischer Oligonukleotidprimern, die in der Real-Time-PCR eingesetzt werden sollen.

3.1.4.1 3'-RACE-Experimente zur Amplifizierung von 3'-cDNA-Enden von zwei Metallothioneinen aus Tomate

Zur Auswahl geeigneter Sequenzbereiche zur Herstellung von spezifischen Oligonukleotidprimern, um Teilsequenzen zweier Metallothioneingene mit den 3'-Ende amplifizieren zu können, wurden die publizierten cDNA-Sequenzen von zwei Metallothioneinsequenzen (*Lemt2* und *Lemt3*) aus Tomate (Giritch et al., 1998) als Basis verwendet (Abb. 20).

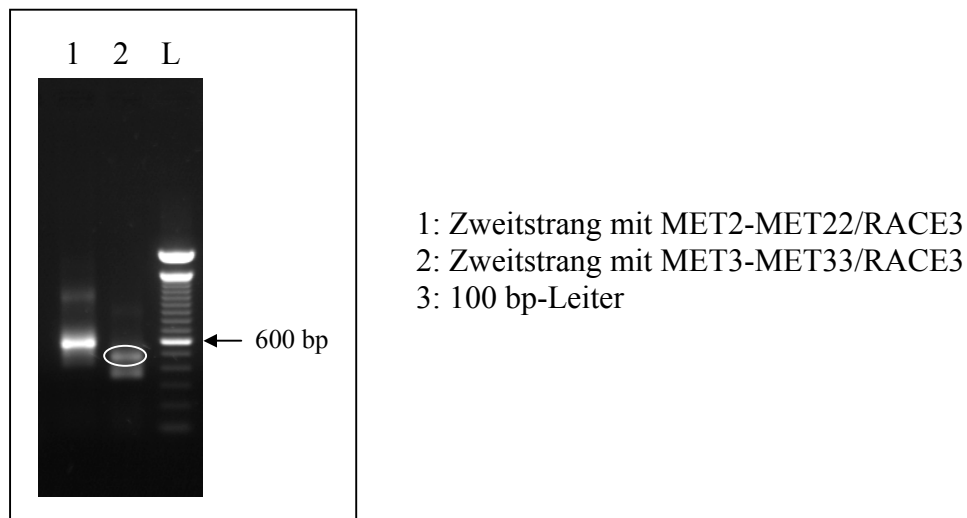
Abbildung 20:



Darstellung der zur Synthese der Primerpaare MET2/MET22 und MET3/MET33 ausgewählten Oligonukleotidsequenzen der Metallothioneine *Lemt2* (Z68185) und *Lemt3* (Z68309) aus Tomate. Die Positionierung der PCR-Primer wird mittels Pfeilen unterhalb der Sequenzen angegeben, und die für die Herstellung der Primer ausgewählten Nukleotide sind in Fettdruck wiedergegeben.

Die Primer RACE1/RACE2 wurden in Kombination mit dem Primer MET2 bzw. MET3 in der Zweitstrangsynthese (s. Kap. 2.3.3.2) eingesetzt, um Metallothionein-cDNA *Lemt2* und *Lemt3* zu amplifizieren. Die darauffolgende Drittstrangsynthese-PCR erlaubte mittels der Primer MET22 und MET33 die Amplifizierung von PCR-Produkten (Abb.21), die anschließend kloniert und sequenziert wurden. Der erhaltene Klon MT2 (570 bp) erwies eine 100%ige Identität zu den Metallothionein *Lemt2* (Giritch et al., 1998) auf. Bei dem mit dem Primer MET33 erhaltenen Amplifikat von ca. 460 bp Länge (Klon MT3) handelt es sich um eine Teilsequenz des Metallothioneingens *Lemt3* (Giritch et al., 1998).

Abbildung 21: Ergebnisse der RACE-PCR (Drittstrang-PCR) zur Amplifizierung von Teilbereichen der Metallothioneingene *Lemt2* und *Lemt3*



Für die RACE-PCR wurde 1 µl von einer 1/100 verdünnten Zweitstrangsynthese eingesetzt. Die PCR-Methode umfaßte 35 Zyklen mit einer Bindungstemperatur bei 52°C. 6 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt. Das mit dem Primerpaar MET33/RACE3 erhaltene PCR-Fragment, das aus dem Gel eluiert und kloniert wurde, ist weiß umrandet dargestellt.

Abbildung 22: Vergleich der cDNA-Sequenzen beider Klone MT2 und MT3

```

MT2      ACTTTCATTATTATTAAGTCTTTC AAGTTCAAATATTATAATGTCTGGCTGTGGAGGAAG
MT3      ---TTCTTATTTCCAAAACA---AAAATTAAGTG--AACATGTCTTGCTGTGGTGGAAAG
          * * * * *
MT2      CTGTAATTGTGGTTCTAGCTGCAGTTGCGGCAAGGGC---GGAGGGTGCAACATGTACCC
MT3      CTGTGGCTGTGGATCTGGCTGCAAGTGCAGCAACGGCTGTGGAGGATGTGGAATGTACCC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MT2      TGATTTGGAGAAGTCAACTACCTTACCATCATCGAGGGAGTTGCACCTATGAACAACAA
MT3      AGACATGGAGAAGTCTGCCACGTTTAGCATCGTTGAAGGTGTGCACCCGTCCACAACATA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MT2      GGGAAATGGTTGAAGGATCAATTGAGAAAGCTACAGAAGGGGGGAATGGGTGCAAGTGTGG
MT3      TGGAAGGGTTGAGG-----AGAAGGCAGCTGGAGAAGG-A-----TGCAAATGTGG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MT2      CTCAAGCTGCAAGTGTGACCCTTGCAACTGTTGTAGTGCTTCCACTATATGGACATGAAA
MT3      ATCAAACAGCACTTGTGACCCTTGCAATTGCT--A-----
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MT2      ATAAATAAATTGTGTTTTTATGTATTTATATCAAGTGTGTTATGTAATATGTGTTGTA
MT3      -----AGTTTAATTTAAGTGTGTTTTAT-----GTTATAAAAGCTTA-ATTCTG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MT2      TAATAATTTGAATAAGACTATAGTCATGTAATTAATAGTGTGGGATGCTACTATACACTA
MT3      CAATAATA-AAGTACAATCATGG--GACTGATCAATTCTTATGTTTGTGCCCTTCTTCTA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MT2      TACTCTCATGGCTTT-TGTGTTTTGGTTATTTAATTTGATGTTTGTGTTGAAGGAGGCTTA
MT3      TGTTTGTGTTGAAGTGACATATTTCTGTAGTGTGATTTGAATTTGGGGGTGTACACAGA--A
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

```

MT2          TTATCTGAGCTATAACATAAACCTTATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
MT3          ATATACAAATCATATAACTTACCTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
              ***      *      ***      *      ***** *****

```

Der Vergleich der Nukleotidsequenzen der erhaltenen Race-Klone MT2 und MT3 wurde mit dem Programm Clustal X (1.8) durchgeführt. Die Positionen, an denen identische Nukleotide vorkommen, sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Primersequenzen MET22 und MET33 sind in Fettdruck wiedergegeben.

3.1.4.2 3'-RACE-Experimente zur Amplifizierung von 3'-cDNA-Enden von Nrampttransportergenen aus Tomate

Sequenzbereiche der Klone NT1 und NT2 wurden zur Synthese von Oligonukleotidprimern (Nrm1/Nrm11 und Nrm2/Nrm22) eingesetzt (Abb.23 A und B). Darüberhinaus wurde aus einer publizierten 164 bp-langen Nukleotid-Teilsequenz eines Nrampt Transportergens aus Tomate (AI637357) ein weiteres Primerpaar Nrm3/Nrm33 (Abb. 23 C) konstruiert, um einen größeren Sequenzbereich mit dem 3'-Ende amplifizieren zu können.

Abbildung 23:

A: Klon NT1

```

          TGATCGGGGACAGCATTGCTCTTAATTATTGTTCT
                          Nrm1
          TGGGCTGGGAGTTCTTTGCACTGGTGTTAGTACTCT
                          Nrm11

```

B: Klon NT2

```

          AATGGGAAGGAGCTTTTAGCAGGTCTCTTGATTCT
                          Nrm3
          CAAAACTCAGTTCAAGGACAGTTTCGGCAGGCTGT
                          Nrm33

```

C: *LeNrampt*

```

          ATTTTGAGTCGAGGGTTCTTGCCTCTAT
                          Nrm2
          GGTCTTGGTGTGTCATCACTGCTCTTGATTG
                          Nrm22

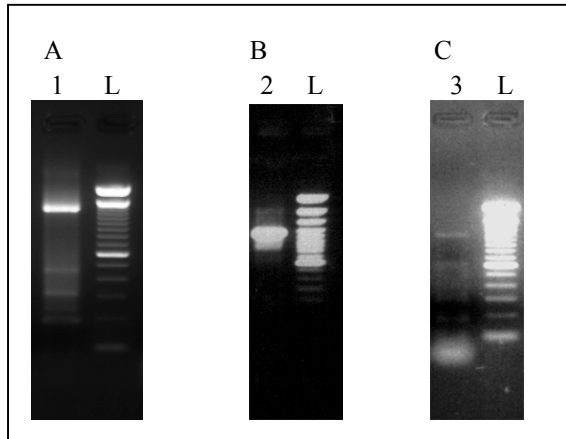
```

Darstellung der zur Synthese der Primerpaare Nrm1/Nrm11, Nrm3/Nrm33 und Nrm2/Nrm22 ausgewählten Olinukleotidsequenzen der Klone NT1 (A), NT2 (B) und der Teilsequenz (C) des Nrampt-Transporters (AI637357) aus Tomate. Die Positionierung der PCR-Primer wird mittels Pfeilen unterhalb der Sequenzen angegeben, und die für die Herstellung der Primer ausgewählten Nukleotide sind in Fettdruck wiedergegeben.

Zur Amplifizierung von Nrampttransporter-cDNA wurden in Kombination mit den Primern RACE1/RACE2, die Primer Nrm1, Nrm2 und Nrm3 verwendet. In einer weiteren PCR-Reaktion (Drittstrangsynthese-PCR) konnten mit den Primern Nrm11, Nrm22 und Nrm33 spezifische PCR-Produkte erhalten werden (Abb. 24). Die PCR-Produkte wurden zunächst kloniert. Die Identifizierung der Klone erfolgte dann, nach der Sequenzierung, durch den Vergleich mit publizierten Sequenzen. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des mit dem Primer Nrm11 erhaltenen 1300 bp-Fragmentes (Klon NT3) ergab eine 57%ige Identität und 69%ige Homologie zu dem Nrampttransporter 1 aus Reis (*OsNrampt1*). Das 1100 bp PCR-Produkt (Klon NT4), das mit dem Primer

Nrm33 erhalten wurde, zeigte eine 81%ige Identität und 93%ige Homologie zu dem Nramtransporter 2 aus *Arabidopsis* (AtNramp2). Das Insert des Klons NT5 (1130 bp) ist auf Aminosäure-Ebene zu 71% mit dem Nramtransporter 3 (AtNramp3) aus *Arabidopsis* identisch.

Abbildung 24: Ergebnisse der RACE-PCR (Drittstrang-PCR) zur Amplifizierung von Teilbereichen der Nramtransportergene aus Tomate



1: Zweitstrang mit Nrm1-Nrm11/RACE3
 2: Zweitstrang mit Nrm3-Nrm33/RACE3
 3: Zweitstrang mit Nrm2-Nrm22/RACE3
 L: 100 bp-Leiter

Für die RACE-PCR wurde 1µl von einer 1/100 verdünnten Zweitstrangsynthese eingesetzt. Die PCR-Methode umfaßte 40 Zyklen mit einer Bindungstemperatur bei 51°C (A), 54°C (B) und 57°C (C). 6 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

Abbildung 25: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Nramtransporter aus *Arabidopsis thaliana* (At) und *Oryza sativa* (Os) mit den Sequenzen der Klone NT3, NT4 und NT5

	<u>M5</u>
AtNramp2	SRGFLPLWAGVVITASDCFLFLFLENYGVRKLEAVFAVLIATMGLSFAWMFGETKPSGKE
AtNramp4	TRGFLPIWVGVIITSFDCFLISYLEKCGMRKLEGLFAVLIATMALSFAWMFNETKPSVEE
OsNramp2	SAGTVPLWGGVVITAFDCFI FLFLENYGVRKLEAFFGVLI AVMAVSFAIMFGETKPSGKD
AtNramp1	SNGILPLWAGVVITALDCFVFLFLENYGIRKLEAVFAVLIATMGVSFAWMFQGAKPSGSE
AtNramp3	SNGLVPLWAGVVITALDCFI FLFLENYGIRKLEAVFAVLIATMALAFAWMFQGTKPSGTE
NT5	----- GVVITALDCFVFLFLENYGVRKLEALFAVLI AVMAVSFAWMFGVVRNQMEW
NT4	-----
OsNramp1	FH--IPVWTGVLIAGSSTLLLLGLQRYGVRKLEVVVALLVFMAGCFFVEMSI V KPPVNE
sNramp3	FK--SLCGVVILITGLSTLMLLLLQYQY GVRKLEFLIAILVSLIATCFLVELGYSKPNSSV
NT3	----- VLCTGVSTLLFLIGLQRYGVRKLELLIAILVFMACFFGEMSYVKPPANE

	<u>M6</u>
AtNramp2	-LMIGILLPRLSSKTIR-QAVGVVGCVIMPHNVFLHSALVQSRKID--PKRKSrvQeALN
AtNramp4	-LFIGI IIPKLGSKTIR-EAVGVVGCVITPHNVFLHSALVQSRKTD--PKEINRVQeALN
OsNramp2	-LLIGLVVPKLSSRTIK-QAVGIVGCIIMPHNVFLHSALVESRKID--TNKKSrvQeAVF
AtNramp1	-LLIGILVPKLSSRTIQ-KAVGVVGCVIMPHNVFLHSALVQSREVD--KRQKYRVQeALN
AtNramp3	-LLVGLVPKLSSRTIK-QAVGIVGCIIMPHNVFLHSALVQSREVD--PKRFRrvKeALK
NT5	YLLVGVVVVPKLR LQNNKDRQWELSGCDIMPHNVLLHSALDAGPETYDNSNRFGRVREALN
NT4	----- KLSSRTV R-QAVGVVGCVIMPHNVFLHSALVQSREID--LKKKQVQeALN
OsNramp1	-VLQGLFIPRLSGPGATGDSIALLGALVMPHNFLHSALVLSRNTP---ASAKGMKDACR
sNramp3	-VVRGLFVPELKGNGATGLAISLLGAMVMPHNFLHSELVLSRKEK---RSVHGikeACR
NT3	-LFGKMFIPKLN GDATADAIALLGALVMPHNFLHSALVLSRKIP---NSVRGVNDACK
	* * * * *

M7

AtNramp2 YYLIESS-VALFISFMINLFVTTVFARGFYGTEK-----ANNIGLVNAGQYLQEKFGG
 AtNramp4 YYTIESS-AALFVFSFMINLFVTAVFAKGFYGTQK-----ADSIGLVNAGYYLQEKYGG
 OsNramp2 YYNIEST-LALVVSFFINICVTTVFAGKGFYGSEQ-----ADGIGLENAGQYLQQKYGT
 AtNramp1 YYTIEST-IALFISFLINLFVTTVFAGKGFYNTDL-----ANSIGLVNAGQYLQEKYGG
 AtNramp3 YYSIEST-GALAVSFIINVVTTVFAGKGFYGTET-----ADTIGLANAGQYLQDKYGG
NT5 YYSIEST-IALAISFMINLFVTTVFAGKGFYGSEI-----ANSIGLENAGQYLQDKYGG
NT4 YYSIESS-FALLISFMINLFVTTVFAGKGFYGSEQ-----AGSLGLVNAGQFLQDKYGG
 OsNramp1 FFLFESG-IALFVALLVNIAIISVSGTVCNATNLSPEDAVKCSDLTLDSSSFLLRNVLKG
 sNramp3 FYMIESAFLALTI AFLINISII SVNNTVCGSDNLSPEQMNCSDDLNLKASFLLNKVLGN
NT3 FFLIESG-FALFVSFLINVAVVSVSGTVCGADNLSQNKESCGDITLILCFSSQECTWK
 * * * * *

M8

M9

AtNramp2 GLLPILYIWGIGLLAAGQSSTITGTYAGQFIMGGFLNLRLLKMMRAVITRSCAIVPTMIV
 AtNramp4 GVFPILYIWGIGLLAAGQSSTITGTYAGQFIMEGFLDLQMEQWLSAFITRSFAIVPTMFV
 OsNramp2 AFFPILYIWAIGLLASGQSSTITGTYAGQFVMGGFLNLRLLKMWLRAMITRSFAIIPTMIV
 AtNramp1 GVFPILYIWAIGLLAAGQSSTITGTYAGQFIMGGFLNFKMKKWLRLALITRSCAIIPTIIV
 AtNramp3 GFFPILYIWAIGVLAAGQSSTITGTYAGQFIMGGFLNLMKKWVRALITRSCAIIPTMIV
NT5 GSFPIYIWAIGLLAAGQSSTITGTYAGQFIMGGFLHMLRLLKWKQRALITRSCAIVPTLIV
NT4 GLFPILYIWGIGLLAAGQSSTITGTYAGQFIMGGFLDLRLLKWLRLALITRSCAIVPTIIV
 OsNramp1 SS---ATVYGVALLASGQSSTITGTYAGQYVMQGFLLDKMKQWLRLNLMTRSAIVPSLIV
 sNramp3 WS---SKLFAVALLASGQSSTITGTYAGQYVMQGFLLDRMTPWIRNLLTRSLAILPSLIV
NT3 IKF--YCLCPALLASGQSSTITGTYAGQFIMQGFLLDKMKTWLRNLFTRLIATITPSLIV
 *

M10

M11

AtNramp2 AIVLNTSVASLDVLEWLNVLQSVQIPFALLPLLTLSKKEIMGVFKIGPILQRIATVA
 AtNramp4 AIMFNTSEGLDVLNEWLNILQSMQIPFAVILLMTVSNHIMGVFKIGPISLEKLAWTVA
 OsNramp2 ALFFDTEPTMDILNEALNVLQSIQIPFALIPLITLVSKEQVMGSFVVGPIITKVISWIVT
 AtNramp1 ALVFDSSSEATLDVLEWLNVLQSIQIPFALIPLLCVLSKEQIMGSFKIGPLYKTIAWLVA
 AtNramp3 ALVFDSSDMLDELNEWLNVLQSVQIPFAVILLCLVSNQIMGSFKIQPLVQITISWIVA
NT5 ALAFDTSEKSLDVLNEWLNVLQCVQIPFALIPLLCVLSREEIMGVFKIGSTMKVISWLVA
NT4 ALIFNRSESSLDALNEWLNVLQSIQIPFALIPLLTLSKEDIMGTFMPLPIGSTYSAQKDI
 OsNramp1 SIIIGSS--GAGRLIVIASMILSFELPFALIPLLKFSSSSNKMGENKNSIYIVGFSWVLG
 sNramp3 SIIIGSS--AAGQLIIIASMILTFEPSFA-----SSSTPKIHKQD-----
NT3 SIIIGSS--GAGRLIIIASMILSFELPFALIPLLKFSRSSTKVGTTQELNLYYRISWILG
 * * * * *

M12

AtNramp2 ALVMIIN-----GYLLLDFFVSEVDGFLFGVTVCVWTTAYIAFIVYLISHSN-FFP
 AtNramp4 VFVMMIN-----GYLLLDFFMAEVEGFLVGFVFGVVGYSFIIYLVSYRS-SQS
 OsNramp2 VFLMLIN-----GYLILSFYATEVRGALVRSLLCVVLAVYLAFFIVYLIMQNT-SLY
 AtNramp1 ALVIMIN-----GYLLEFFSNEVSGIVYTGFTVLTASYGAFILYLIARG--ITF
 AtNramp3 ALVIAIN-----GYLMVDFFSGAATNLILLVPVIFAIAYVVVFLYLIIRG--LTY
NT5 VLVMLIN-----GYLLMDSLSSAVK---WDVVYICCSCFYRCIHCLHCIPH-FTG
NT4 AMLVNET-----SKQYIQSNPDVVS--IVNHYIAERPWPWGLSITEAFFSSEEVPI
 OsNramp1 FVIIGINIYFLSTKLVGWILHNLALPTFAN-VLIGIVLFPMLLYVVAVIYLTFRKDTVKF
 sNramp3 -----KNG--AA-----HKE
NT3 LGIIGINIYYLSTAFVWGLISNNLPKVG-N-VLIGIVVFPMLAIYILAVIYLMFRK--DKV

AtNramp2 SPWSSSSI-----ELPKRVSVSNS-----
 AtNramp4 SSWS--SL-----EMSERVVSTET-----
 OsNramp2 SRLR--S-----AMTKST-----
 AtNramp1 TPWP--FK-----AESSH-----
 AtNramp3 TPWQ--LV-----ASSHKEPQRDDE-----
NT5 NYLP-----QLVC-----
NT4 SLCPNCHN-----SFSETASVCF-----
 OsNramp1 VSRRELQAGDDTEK-----AQVATCVAEDSKEPPV-----
 sNramp3 KTR-----
NT3 VTYIDPIKDDHMENGINSMELVDRVPYREDLADIPLPQKGFSSFVVIHFNFHS

Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der erhaltenen RACE-Klone NT3, NT4 und NT5 mit den Aminosäuresequenzen der Transmembrandomänen M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11 und M12 der Nrampttransporter AtNramp1 (AC004401), AtNramp2 (AF141204), AtNramp3 (AB007645), AtNramp4 (AL035526) aus *Arabidopsis* und OsNramp1 (L412117), OsNramp2 (L81152), OsNramp3 (U60767) aus

Reis. Die Positionen, an denen identische Aminosäure vorkommen, sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Sequenzen der Klone NT3, NT4 und NT5 sind in Fettdruck angegeben.

3.1.4.3 3'-RACE-Experimente zur Amplifizierung von 3'-cDNA-Enden von Aquaporinen aus Tomate

Das Primerpaar PMA/PMB erlaubte die Amplifizierung von zwei unterschiedlichen PIP-Aquaporin-Teilsequenzen (Klon PT1 und PT2) unter Verwendung von genomischer DNA (Abb. 16). Auf cDNA-Ebene konnte aber nur ein PCR-Produkt erhalten werden. Es wurde die RACE-PCR eingesetzt, um beide Sequenzen mit ihren 3'-Enden amplifizieren zu können. Dafür wurden Sequenzbereiche der Klone PT1 und PT2 zur Herstellung von zwei spezifischen Primern PM1 und PM2 verwendet (Abb. 26).

Darüberhinaus wurde bei dem Klon TT1 ebenso versucht durch einen RACE-PCR das 3'-Ende zu amplifizieren, indem ein spezifischer Primer TP1 von dem Insert des Klons TT8 hergestellt wurde (Abb. 26).

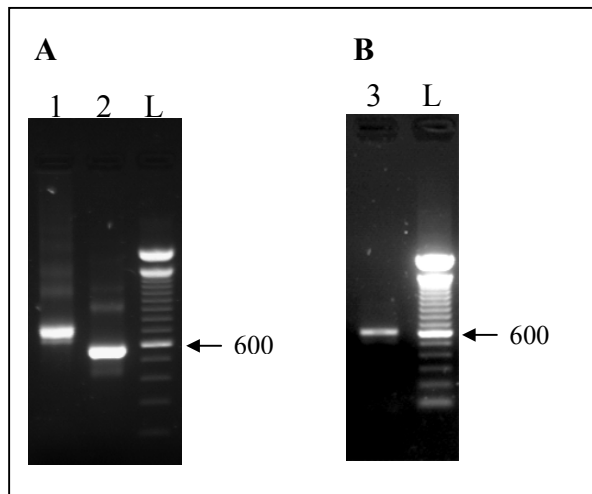
In der Zweistrangsynthese dienten in Kombination mit den Primern RACE1/RACE2, die Primer PMA zur Amplifizierung von PIP-, und TPA zur Amplifizierung von TIP-Aquaporinen. Die darauffolgende Drittstrangsynthese mit den Primern PM1, PM2, TP1 und RACE3 ermöglichte die Amplifizierung von PCR-Produkten (Abb. 27). Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des mit dem Primer PM1 erhaltenen 722 bp-Fragments (Klon PT3) ergab eine 88%ige Identität und 92%ige Homologie zur PIP-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana*. Das 527 bp PCR-Produkt (Klon PT4), das mit dem Primer PM2 erhalten wurde, zeigte eine 94%ige Identität und 96%ige Homologie zu einer PIP-Sequenz aus *Solanum tuberosum*. Der erhaltene Insert (606 bp) des Klons TT2 ist zu 100% mit einer TIP-Aquaporinsequenz aus Tomate identisch.

Abbildung 26:

Klon PT1	TGTTTTT GGCAAGAAAAGTATCACTAATCAGAG CAGTA PM1
Klon PT2	AGACTGG TGGTGGTGCTAATGTTGTTA CTCCTGGT PM2
Klon TT1	CTACT GGGTTGCTCAATTACTTGGC TCCA TP1

Darstellung der zur Synthese der Primer PM1, PM2 und PT1 ausgewählten Olinukleotidsequenzen der Klone PT1, PT2 und TT1 aus Tomate. Die Positionierung der PCR-Primer wird mittels Pfeilen unterhalb der Sequenzen angegeben, und die für die Herstellung der Primer ausgewählten Nukleotide sind in Fettdruck wiedergegeben.

Abbildung 27: Ergebnisse der RACE-PCR (Drittstrang-PCR) zur Amplifizierung von Teilbereichen der PIP- und TIP-Aquaporingene aus Tomate.



1: Zweitstrang mit PMA-PM1/RACE3
 2: Zweitstrang mit PMA-PM2/RACE3
 3: Zweitstrang mit TPA-TP1/RACE3
 4: 100 bp-Leiter

Für die RACE-PCR wurde 1µl von einer 1/100 verdünnten Zweitstrangsynthese eingesetzt. Die PCR-Methode umfaßte 35 Zyklen mit einer Bindungstemperatur bei 52°C (A) und 58°C (B). 6 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

Abbildung 28: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener Plasmamembranaquaporine aus höheren Pflanzen mit den erhaltenen Klonen PT3 und PT4 aus Tomate

<i>Lycopersicon esculentum</i>	GGMIFALVYCTAGISGGHINPAVTFGLFLARKKLSLTRAVFYIVMQCLGAI
<i>Zea mays</i>	GGMIFALVYCTAGISGGHINPAVTFGLFLARKKLSLTRALFYIIMQCLGAV
<i>Solanum tuberosum</i>	GGMIFALVYCTAGISGGHINPAVTIWSVLGKKLSLTRAVFYIVMQCLGAI
PT4	-----
<i>Nicotiana tabacum</i>	GGMIFVLVYCTAGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLLRVAVGYIIAQSLGAI
PT3	-----ARKVSLIRAVLYMVAQCLGAI
<i>Lycopersicon esculentum</i>	CGAGVVVKGFQPSLFGTKGGANVVAHGTYTKGDGLGAEIIGTFVLVYTVFS
<i>Zea mays</i>	CGAGVVVKGFQQGLYMGNGGGANVVAPGYTKGDGLGAEIVGTFILVYTVFS
<i>Solanum tuberosum</i>	CGAGVVVKGFVMGYPYERLNGGANVVNPGYTKGDGLGAEIIGTFVLVYTVFS
PT4	----- GGANVVNPGYTKGDGLGAEIIGTFVLVYTVFS
<i>Nicotiana tabacum</i>	CGVGLVKGFMKHYNTLGGGANFVQPGYNKGTALGAEIIGTFVLVYTVFS
PT3	CGVGFVKAFMTHPYNALGGGANFVQSGYNNGTALGAEIIGTFVLVYTVFS
	**** * ** * ***** ** *
<i>Lycopersicon esculentum</i>	ATDAKRNARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAI
<i>Zea mays</i>	ATDAKRNARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAI
<i>Solanum tuberosum</i>	ATDAKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGTNPARSIGAAI
PT4	ATDAKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAI
<i>Nicotiana tabacum</i>	ATDPKRSARDSHVPVLAAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARTFGAAV
PT3	ATDPKRSARDSHIPVLAAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAV
	*** ** ***** * ***** ***** ***** ** *

<i>Lycopersicon esculentum</i>	VYNKEHAWDDHWIFWVGPFFIGAALAALYHQVIRAI PFKSGN-----
<i>Zea mays</i>	IYNRDHAWNDHWIFWVGPFFIGAALAAYHQVIRAI PFKSRS-----
<i>Solanum tuberosum</i>	IYNQDQAWDDHWIFWVGPFFIGQALAAVYHQIIRAI PFKSSRS-----
PT4	IFNKDEAWDDHWIFWVGPFFIGAALAAYVYHQIIRAI PFKSSRS-----
<i>Nicotiana tabacum</i>	IYNTEKIWDQWIFWVGPFVVGALVAAYVYHQYILRGSAILKALGSFRSNPTN
PT3	IADNKNVWDDQWIFWVGPFVVGALLAAAYHQYILRAAAIKALGSFRSNATN
	* *

Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der erhaltenen RACE-Klone PT3 und PT4 mit Plasmamembranaquaporinsequenzen aus *Lycopersicon esculentum* (AF218774), *Nicotiana tabacum* (AF440271), *Solanum tuberosum* (Y18311) und *Zea mays* (AF131201). Die Positionen, an denen identische Aminosäure vorkommen, sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Sequenzen der Klone PT3 und PT4 sind in Fettdruck angegeben.

Abbildung 29: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener Tonoplastaquaporine aus höheren Pflanzen mit dem erhaltenen Klon TT2 aus Tomate

<i>Lycopersicon esculentum</i>	LTGLFYWVAQLLGGSTVACLLKLVYVINGLAVPTHGVAAGMSGAEVVMIEIV
TT2	----- VAQLLGGSTVACLLKLVYVINGLAVPTHGVAAGMSGAEVVMIEIV
<i>Nicotiana tabacum</i>	LTGFFYWIAQLLGGSTVACLLKLVYVINGLAVPTHGVAAGLNGLQGVMEI I
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LRGILYWIAQLLGSVVACLILKFATGGLAVPPFGLSAGVGVLNAFVFEIV
<i>Orysa sativa</i>	FRGLLYWIAQLLGGSTVACFLLRFFSTGGLATGTFGLTG-VSVWEALVLEIV
	* *
<i>Lycopersicon esculentum</i>	ITFALVYTVYATAADPKKGSGLGTIAPIAIGFIVGANILAAGPFSGGSMNP
TT2	ITFALVYTVYATAADPKKGSGLGTIAPIAIGFIVGANILAAGPFSGGSMNP
<i>Nicotiana tabacum</i>	ITFALVYTVYATAADPKKGSGLGTIAPIAIGFIVGANILAAGPFSGGSMNP
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTFGLVYTVYATAIDPKNGSLGTIAPIAIGFIVGANILAGGAFSGASMNP
<i>Orysa sativa</i>	MTFGLVYTVYATAVDPKKGSGLGTIAPIAIGFIVGANILVGGAFDGDGSMNP
	* *
<i>Lycopersicon nesculentum</i>	ARSFGPAVVAGDFSQNWIIYWGPLIGGGLAGFIYGDVFIGCHTPLPTSED
TT2	ARSFGPAVVAGDFSQNWIIYWGPLIGGGLAGFIYGDVFIGCHTPLPTSED
<i>Nicotiana tabacum</i>	ARSFGPAVVAGDFSQNWIIYWAGPLIGGGLAGFIYGDVFIGCHTPLPTSED
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AVAFGPAVVSWTWNHWYVWAGPLVGGGIAGLIYEVFFINTHTSSSNHR
<i>Orysa sativa</i>	AVSFGPALVSWSWESQWVYVWGPLIGGGLAGVIYEVLFISHTHEQLPTTD
	* *
<i>Lycopersicon esculentum</i>	YA-
TT2	YA-
<i>Nicotiana tabacum</i>	YA-
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LLN
<i>Orysa sativa</i>	Y--

Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des erhaltenen RACE-Klons mit Tonoplastaquaporinsequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (P21652), *Nicotiana tabacum* (P21653), *Lycopersicon esculentum* (U95008) und *Orysa sativa* (P50156). Die Sequenz des Klons TT2 ist in Fettdruck angegeben.

Tabelle 7:

	PCR-Fragment	Bezeichnung	Länge (bp)	Homologie
Phytochelatin Synthase	PT1	<i>LePCS</i>	903	<i>LePCS</i> : 100% (97 AS)
Metallothioneine	MT1	<i>Lemt1</i>	480	<i>Lemt1</i> : 100% (480 bp)
	MT2	<i>Lemt2</i>	570	<i>Lemt2</i> : 100% (570 bp)
	MT3	<i>Lemt3</i>	460	<i>Lemt3</i> : 100% (460 bp)
	MT4	<i>Lemt4</i>	440	<i>Lemt4</i> : 100% (440 bp)
Nramptransporter	NT3	<i>LeNramp1</i>	1300	<i>OsNramp1</i> : 69% (376 AS)
	NT4	<i>LeNramp3</i>	1100	<i>AtNramp2</i> : 93% (208 AS)
	NT5	<i>LeNramp2</i>	1130	<i>AtNramp3</i> : 83% (302 AS)
PIP-Aquaporine	PT3	<i>LePIP1</i>	722	<i>SIMIP</i> : 92 % (171 AS)
	PT4	<i>LePIP2</i>	527	<i>MIP1</i> : 96% (125 AS)
TIP-Aquaporine	TT2	<i>LeTIP</i>	606	<i>TIPRb7</i> : 100% (145 AS)
Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter	HT2	<i>LeNHX1</i>	692	<i>NHX1</i> : 100% (692 bp)
	HT3	<i>LeNHX2</i>	692	<i>NHX2</i> : 100% (692 bp)

Darstellung der klonierten PCR-Produkte, deren Länge und der Sequenzen, zu denen die jeweils höchste Homologien in einer BLAST-Analyse auftreten. Die Längen dieser Bereiche sind in Klammern angegeben. *LePCS* (AW154892), *Lemt1* (Z68138), *Lemt2* (Z68185), *Lemt3* (Z68309), *Lemt4* (Z68310), *OsNramp1* (L412117), *AtNramp2* (AF141204), *AtNramp3* (AB007645), *MIP1* (Y18311), *TIPRb7* (U95008), *NHX1* (AJ306630), *NHX2* (CAC83608).

3.2 Einfluß der AM-Pilze auf das Wachstum von Tomate unter Schwermetallbelastung

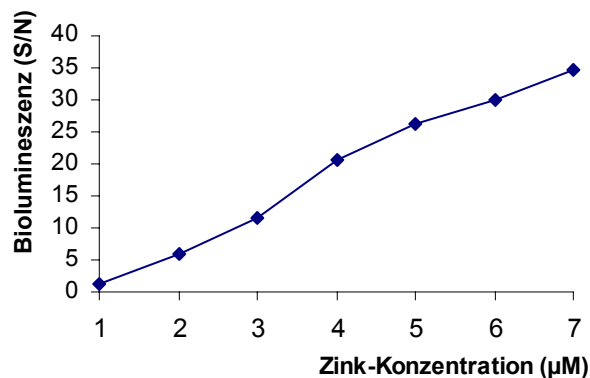
Zur molekularbiologischen Untersuchung der Übertragung von Schwermetalltoleranz durch AM-Pilze auf die Wirtspflanze wurden zunächst mykorrhizierte und nicht mykorrhizierte Tomatenpflanzen unter Schwermetallstress angezogen. Zum Inokulieren der Versuchspflanzen wurde *Glomus intraradices* BrI, isoliert von den Wurzeln des Galmeiveilchens (*Viola calaminaria*) vom Schwermetallstandort Breinigerberg (Stolberg-Breinigerberg bei Aachen) verwendet. Die Fähigkeit dieses AM-Pilzes, Schwermetalltoleranz auf Wirtspflanzen zu übertragen, wurde von Hildebrandt et al. (1999) gezeigt. Eine Schwermetallbelastung in den durchgeführten Versuchen wurde entweder durch Zusatz von Schwermetallen (CdCl₂) als lösliches Salz oder durch Verwendung von Schwermetallerde aus dem Standort Breinigerberg und Mechernich gewährleistet.

3.2.1 Bestimmung der Schwermetallverfügbarkeit im Boden mittels *Lux*-Reporter-System

Zur quantitativen Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Zink, Pb und Ni wurden Bodenproben aus Breinigerberg und Mechernich mittels des *Lux*-Reporter-System-Verfahrens untersucht (s. Kap. 2.1.7). Für die Quantifizierung der Ergebnisse wurde eine Standardreihe mit bekannter Menge der zu untersuchenden Metalle (Zink, Pb und Ni) in den Versuch mitgeführt. Die erstellte Standardkurve (s. Abb. 30) erlaubte aus einem Lumineszenz-Wert die Metall-Konzentration zu bestimmen.

Aus der Tabelle 8 geht hervor, daß im Boden aus Mechernich die Konzentration an verfügbarem Pb sehr hoch ist (991 mg/Kg Boden). Die Werte an verfügbarem Zink und Ni lagen in der Mechernicherde bei 93 und 29 mg/kg Boden. Die Bodenproben aus Breinigerberg wiesen mit 31 und 6 mg/kg niedrigere Werte an verfügbaren Zink und Ni im Vergleich zu den Proben aus Mechernich auf. Die Erde aus Mechernich erwies sich als zu toxisch, daß es nicht möglich war, Kontrollpflanzen zur Gewinnung der RNA für die Northern-Analysen in ausreichender Masse anzuziehen. Für weitere Versuche konnte somit nur die Breinigerbergerde verwendet werden.

Abbildung 30: Standardkurve zur Bestimmung der Zink-Konzentration



Darstellung der Korrelation zwischen Zink-Konzentration (μM) und der Lumineszenz ($\text{S/N} = \text{Signal/Noise}$). Der Versuch wurde mit dem Zink-Biosensor Stamm (AE 1433) aus *Ralstonia eutropha* durchgeführt. Dazu wurde pro Ansatz 180 μl Bakterien-Kultur und 20 μl der entsprechenden Konzentration gemischt. Die Lumineszenz wurde mit einem ANTHOS LUCY 1 Luminometer (Anthos Labtech b.v., Heerhugowaard, the Netherlands) bei 23°C über 8 h in 30 min Zeitabständen gemessen.

Tabelle 8: Bestimmung der Bioverfügbarkeit der Metallionen Zink, Pb und Ni in der Schwermetallerde aus Breinigerberg und Mechernich

	Metall	Bioverfügbarkeit (mg/kg Boden)
Mechernich	Pb	$991 \pm 0,3$
	Zn	$93 \pm 0,06$
	Ni	$29 \pm 0,5$
Breinigerberg	Pb	$59 \pm 0,2$
	Zn	$31 \pm 0,4$
	Ni	$6 \pm 0,9$

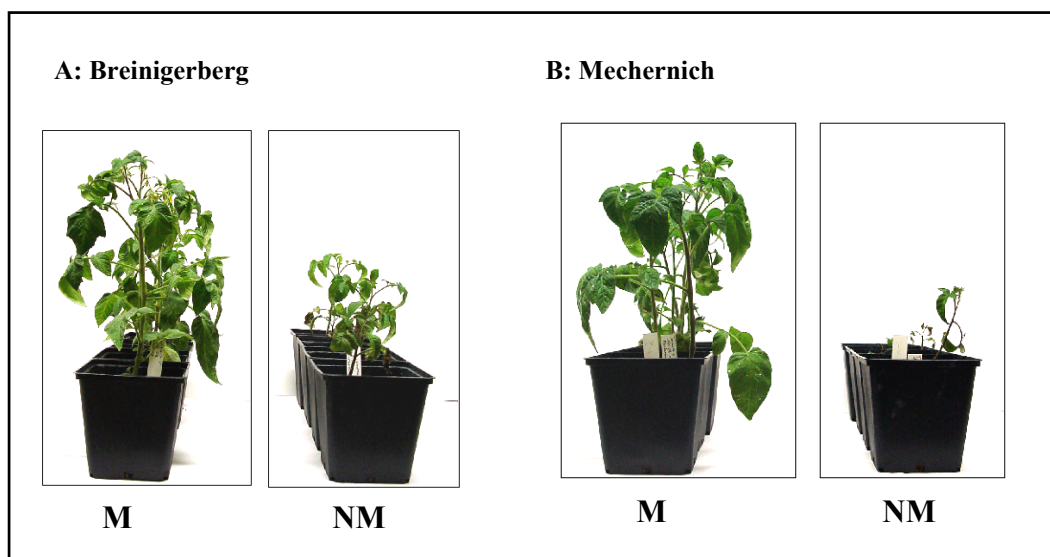
Die Bestimmung der Zink-, Pb- und Ni-Konzentrationen in den Bodenproben wurde mittels Biosensoren aus *Ralstonia eutropha*-Stämmen durchgeführt. Dazu wurde pro Ansatz 180 μl Bakterien-Kultur und 20 μl verdünnte Bodenprobe gemischt. Die Lumineszenz wurde mit einem ANTHOS LUCY 1 Luminometer (Anthos Labtech b.v., Heerhugowaard, Netherlands) bei 23°C über 8 h in 30 min Zeitabständen gemessen. Angegeben sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen bezogen auf zwei unabhängige Ansätze.

3.2.2 Wachstum der mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen in der Schwermetallerde aus Breinigerberg und Mechernich

Tomatenpflanzen wurden in der Schwermetallerde der Standorte Mechernich und Breinigerberg mit und ohne *Glomus intraradices* BrI kultiviert. Die Wachstumsunterschiede zwischen 14 Wochen alten mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen wurden durch Bestimmung des Frischgewichtes der Pflanzen ermittelt. Beim Vergleich der Frischgewichte der Versuchspflanzen ist ein deutlicher Wachstumsvorteil für die mykorrhizierten Pflanzen sowohl in dem Boden aus Breinigerberg als auch aus Mechernich festzustellen (Abb. 31). So weisen die mykorrhizierten Pflanzen des Breinigerbergversuchs ein etwa zweifaches Gesamtgewicht im Vergleich zu den Kontrollpflanzen auf (Tabelle 9). Bei dem Mechernichversuch ist das Frischgewicht der mykorrhizierten Tomaten sogar um ca. den Faktor 5,5 höher als bei den Kontrollen (Tabelle 9). Der Wert des Verhältnisses Sproß/Wurzel liegt in Mechernicherde bei 1 für den Kontrollpflanzen und 2,4 für die mykorrhizierten Pflanzen. In Breinigerbergerde liegt der Wert Sproß/Wurzel bei den nicht mykorrhizierten Pflanzen mit 1 ebenso unter dem der mykorrhizierten Pflanzen, die einen Spross/Wurzel-Wert von 1,9 aufweisen.

Aus Tabelle 10 geht hervor, daß die Mykorrhizierungsgrade der in Breinigerberg- bzw. Mechernicherde angezogenen Pflanzen und der Kontrollpflanzen (ohne Schwermetallbelastung) keine signifikanten Unterschiede zeigen. Die mit Lactophenolblau gefärbten Wurzelabschnitte von nicht mykorrhizierten Pflanzen wiesen unter dem Mikroskop keine AM-Pilzstrukturen auf.

Abbildung 31: Anzucht der mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen in der Schwermetallerde



Tomatenpflanzen wurden in der Schwermetallerde der Standorte Mechernich und Breinigerberg mit und ohne *Glomus intraradices* BrI kultiviert. Die Anzuchtbedingungen sind im Kap. 2.1.5.1 dargestellt. Die Ernte der Versuchspflanzen erfolgte nach 14 Wochen. M = mykorrhiziert, NM = nicht mykorrhiziert.

Tabelle 9: Frischgewichte der in Breinigerberg- und Mechernicherde angezogenen Tomatenpflanzen

		Gesamt	Wurzel	Spross
Breinigerberg	nicht mykorrhiziert	12,7 ± 1,1	5,5 ± 0,6	7,2 ± 0,5
	mykorrhiziert	25,6 ± 1,3	8,8 ± 0,4	16,8 ± 1
Mechernich	nicht mykorrhiziert	5,5 ± 0,9	2,7 ± 0,4	2,8 ± 0,5
	mykorrhiziert	30,7 ± 1,5	8,9 ± 0,7	21,8 ± 1,6

Die Bestimmung der Frischgewichte der in Schwermetallerde (Breinigerberg und Mechernich) angezogenen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen wurde nach 14 Wochen Anzucht durchgeführt. Angegeben sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen, bezogen auf je vier Pflanzen pro Ansatz.

Tabelle 10: Gesamt-Mykorrhizierungsgrad von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen in Abhängigkeit von der Schwermetallbelastung

		Breinigerberg	Kontrolle	Mechernich	Kontrolle
Gesamt-Mykorrhizierungsgrad (%)	M	76 ± 4	74 ± 6	79 ± 3	72 ± 5
	NM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Mykorrhizierung der in Schwermetallerde (aus den Standorten Breinigerberg und Mechernich) angezogenen Tomatenpflanzen und der Kontrollpflanzen (ohne Schwermetallstress). Angegeben sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen, bezogen auf je vier Pflanzen pro Ansatz. M = mykorrhiziert, NM = nicht mykorrhiziert.

3.2.3 Wachstum der mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Cadmiumbelastung

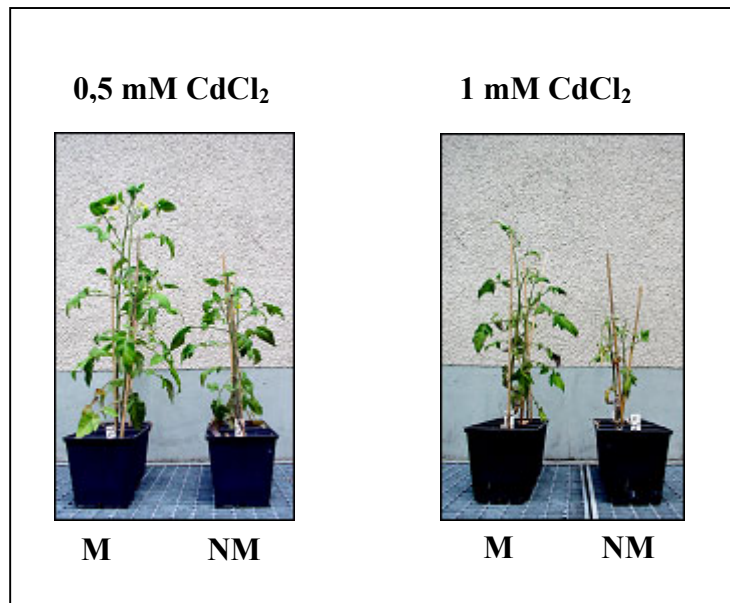
Um den Einfluss der AM-Pilze auf die Wirtspflanzen unter Cadmiumbelastung zu untersuchen wurden mykorrhizierte und nicht mykorrhizierte Tomatenpflanzen ab der dritten Woche jeden zweiten Tag mit CdCl₂-Lösungen begossen (0 mM, 0,5 mM und 1 mM). Als Inokulum wurde *Glomus intraradices* Br1 eingesetzt.

Der Cadmium-Versuch zeigt ein ähnliches Bild wie bei dem Schwermetallerde-Ansatz. Unter Cadmiumstress wiesen die mykorrhizierten Pflanzen ein deutlich verbessertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollpflanzen auf (Abb. 32).

Sowohl bei der mykorrhizierten als auch bei den Kontrollpflanzen konnte eine Reduzierung der Wurzel- und Blattfrischgewicht in Abhängigkeit von der ansteigenden Cd-Konzentration festgestellt werden (Abb. 33A und 33B). Ohne Cadmiumbelastung zeigten die Frischgewichte von Wurzel und Sproß zwischen mykorrhizierten und Kontrollpflanzen keine relevanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu besaßen die inokulierten Pflanzen ein etwa viermal (bei 0,5 mM) bzw. zweimal (bei 1 mM) höheres Wurzel-Frischgewicht als die nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen (Abb. 33A). Der Wert

des Spross-Frischgewichts bei den Kontrollpflanzen liegt um ca. 75% (bei 0,5 mM) bzw. 50% (bei 1 mM) niedriger als bei den mykorrhizierten Pflanzen (Abb. 33B).

Abbildung 32: Anzucht der mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Cadmiumstress



Die Tomatenpflanzen wurden in einer Mischung aus 10% Einheitserde, 10% Inokulum und 80% Leca-ton® bzw. 90% bei Kontrollpflanzen herangezogen. Dabei wurden die Pflanzen ab der dritten Woche jeden zweiten Tag mit CdCl_2 -Lösungen begossen (0,5 mM und 1 mM). Als Inokulum wurde *Glomus intraradices* Br1 verwendet. Die Anzuchtbedingungen der Versuchspflanzen sind dem Kap. 2.1.5.1 zu entnehmen.. M = mykorrhiziert, NM = nicht mykorrhiziert.

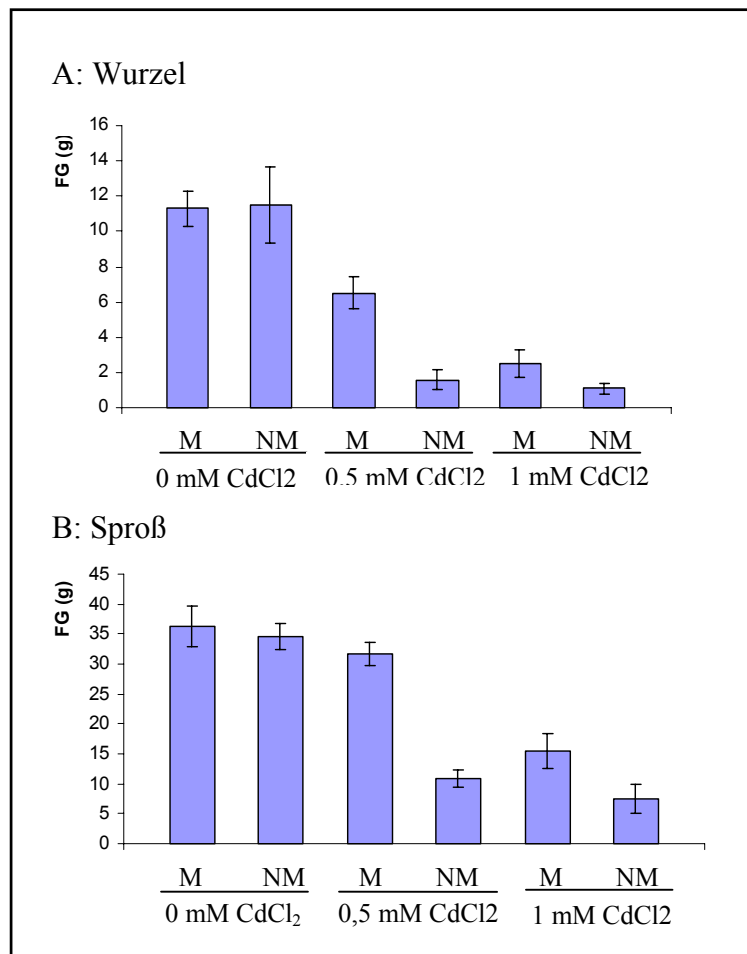
Tabelle 11: Mykorrhizierungsgrad von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des Bodensubstrates

		Kontrolle	0,5 mM CdCl_2	1 mM CdCl_2
Gesamt-Mykorrhizierungsgrad (%)	M	71 ± 8	73 ± 6	69 ± 3
	NM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Mykorrhizierung der unter Cadmium-Belastung angezogenen Tomatenpflanzen und der Kontrollpflanzen (ohne Cadmium-Stress). Angegeben sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen, bezogen auf je vier Pflanzen pro Ansatz. M = mykorrhiziert, NM = nicht mykorrhiziert

Tabelle 11 zeigt, daß die Mykorrhizierungsgrade der Tomatenpflanzen unter Einfluß der ansteigenden Cadmium-Konzentrationen keine wesentlichen Unterschiede aufwiesen. Die nicht mykorrhizierten Pflanzen zeigten, wie zu erwarten, keine AM-Strukturen.

Abbildung 33: Frischgewicht von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen in Abhängigkeit von der CdCl_2 -Konzentration des Bodensubstrates



Die Bestimmung der Frischgewichte der unter Cadmiumbelastung angezogenen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen wurde nach 16 Wochen Kultur durchgeführt. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichungen, bezogen auf je vier Pflanzen pro Ansatz. NM = nicht mykorrhiziert, M = mykorrhiziert.

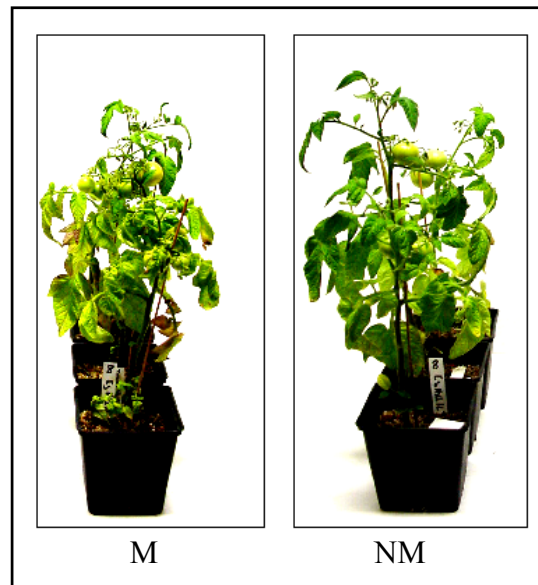
3.3 Einfluß von AM-Pilzen auf das Wachstum von Tomatenpflanzen unter Salzstress

Zur Untersuchung möglicher Übertragung von Salztoleranz der AM-Pilze auf Wirtspflanzen wurden mykorrhizierte und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Salzstress angezogen. Die Anzucht der Versuchspflanzen erfolgte unter drei verschiedenen NaCl -Konzentrationen (0, 8 und 12 g NaCl/l Bodensubstrat). Zum Inokulieren wurde *Glomus geosporum*-Mischinokulum (beinhaltet *Glomus intraradices* Sy 167 als Kreuzkontamination) eingesetzt. *Glomus geosporum* wurde ursprünglich aus Vermehrungskulturen aus dem Boden des Salzstandortes Seckertrift bei Jerxheim isoliert. Die unter der höchsten Salzkonzentration (12 g NaCl/l Bodensubstrat) angezogenen Tomatenpflanzen sind innerhalb einer Woche abgestorben. Daher konnten aus diesem Ansatz keine Daten ermittelt werden.

Aus Tabelle 12 geht hervor, daß eine Reduzierung des Wurzelfrischgewichtes in Abhängigkeit von der angesetzten Salzkonzentration sowohl bei den mykorrhizierten als auch bei den Kontrollpflanzen festgestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu bewirkte der Salzstress keine relevante Reduzierung des Sprossfrischgewichtes weder bei den i-nokulierten Tomatenpflanzen noch bei den Kontrollpflanzen.

Unter Salzstress wiesen die mykorrhizierten Pflanzen kein verbessertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollpflanzen auf (Abb. 34). Beim Vergleich der Frischgewichte der mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen unter Salzstress (8 g/l NaCl) ist kein signifikanter Unterschied feststellbar (Tabelle 12). Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Schwermetallversuches bewirkt die Mykorrhizierung unter den angegebenen Versuchsbedingungen keinen Wachstumsvorteil unter Saltstress.

Abbildung 34: Anzucht der mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Salzstress



Darstellung der unter 8 g NaCl-Konzentration angezogenen mykorrhizierten (M) und nicht mykorrhizierten (NM) Tomatenpflanzen. Es wurde im Alter von 7 Wochen eine NaCl-Konzentration von 1 g/l Bodensubstrat eingesetzt. Danach wurde die 8 g NaCl-Endkonzentration durch wöchentliches Verdoppeln des NaCl-Gehaltes erreicht, um einen osmotischen Schock bei den Pflanzen zu vermeiden. *Glomus geosporum*-Mischinokulum wurde zum Inokulieren der Pflanzen eingesetzt.

Tabelle 12: Frischgewicht von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration des Bodensubstrates

		Gesamt	Wurzel	Sproß
0 g NaCl/l	M	53,8 ± 14,6	13,6 ± 6,1	40,2 ± 8,5
	NM	61,3 ± 6,9	16,5 ± 3	44,8 ± 5,1
8 g NaCl/l	M	54,5 ± 6,6	8,4 ± 0,5	46,1 ± 6,7
	NM	55,6 ± 7,3	9,6 ± 1,5	46 ± 7,4

Bestimmung der Frischgewichte der unter 0 und 8 NaCl/l angezogenen mykorrhizierten (M) und nicht mykorrhizierten (NM) Tomatenpflanzen. Angegeben sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen, bezogen auf je fünf Pflanzen pro Ansatz.

3.4 Kreuzhybridisierung zwischen den unterschiedlichen Nramtransporter-Sonden

Die klonierten PCR-Amplifikate aus den Nramtransportergenen und Metallothioneinengen von Tomate sollten als Gensonden verwendet werden, um die Expression dieser Gene bei der Symbiose und unter Schwermetallbelastung zu untersuchen. Dabei sollen zwischen den verschiedenen Nramtransporter-Sonden bzw. Metallothionein-Sonden keine Kreuzhybridisierungen auftreten oder die Signale wesentlich schwächer als bei den homologen Hybridisierungen sein.

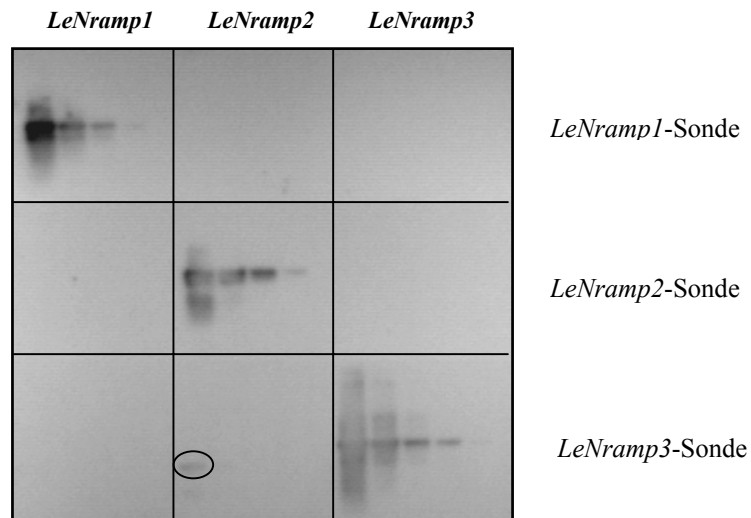
Auf ein 1% Agarosegel wurden 100, 10, 1, 0,1 und 0,001 ng PCR Produkte der jeweiligen Genfragmente eingetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit den Digmarkierten PCR-Fragmenten hybridisiert.

Der Vergleich der Signalstärke (Abb. 35) zeigt, daß eine Kreuzhybridisierung zwischen den Fragmenten aus Nramtransportergenen nur im Fall der Hybridisierung von *LeNramp2* mit der Sonde von *LeNramp3* auftrat. Die Signalintensität der homologen Hybridisierung liegt um 10^3 höher als die des heterologen Hybridisierungssignals. Die Homologien zwischen den verschiedenen Sonden sind so gering, daß man die Expression einzelner Nramtransportergene untersuchen kann.

Zwischen den Fragmenten aus Metallothioneinengen *Lemt1*, *Lemt2*, *Lemt3* und *Lemt4* traten keine Kreuzhybridisierungssignale auf (Abbildung 36).

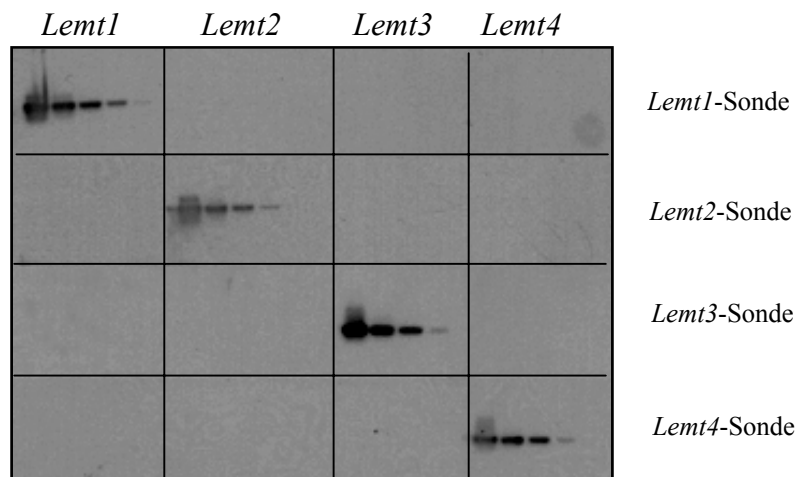
Kreuzhybridisierungsversuche zwischen den Fragmenten der Aquaporingene *LePIP1*, *LePIP2* und *LeTIP* waren nicht notwendig, da die Hybridisierungen der eingesetzten RNA-Sonden mit isolierten RNA aus Wurzeln und Blättern der mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen zu deutlich unterschiedlichen Expressionsmustern in den Northern-Analysen geführt haben (s.Kap 3.6.2).

Abbildung 35: Kreuzhybridisierung zwischen den Nramprtransportersonden *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3*



Nylonmembran mit jeweils drei Reihen der PCR-Produkte *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3* mit je 100, 10, 1, 0,1 und 0,01 ng DNA. Die Membran wurde durch drei geteilt und über Nacht bei 42°C mit den Dig-markierten Sonden *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3* hybridisiert. Die drei Filter wurden danach gewaschen und gefärbt (s. Kap. 2.6.6). Die auftretende Kreuzhybridisierung zwischen dem Fragment aus Nramtransportergen 2 mit der Sonde von *LeNramp3* ist schwarz umrandet dargestellt.

Abbildung 36: Kreuzhybridisierung zwischen den Metallothionein-Sonden *Lemt1*, *Lemt2*, *Lemt3* und *Lemt4*



Nylonmembran mit jeweils drei Reihen der PCR-Produkte *Lemt1*, *Lemt2*, *Lemt3* und *Lemt4* mit je 100, 10, 1, 0,1 und 0,01 ng DNA. Die Membran wurde durch vier geteilt und über Nacht bei 42°C mit den Dig-markierten *Lemt1*, *Lemt2*, *Lemt3* und *Lemt4* Sonden hybridisiert. Die vier Filter wurden danach gewaschen und gefärbt (s. Kap. 2.6.6).

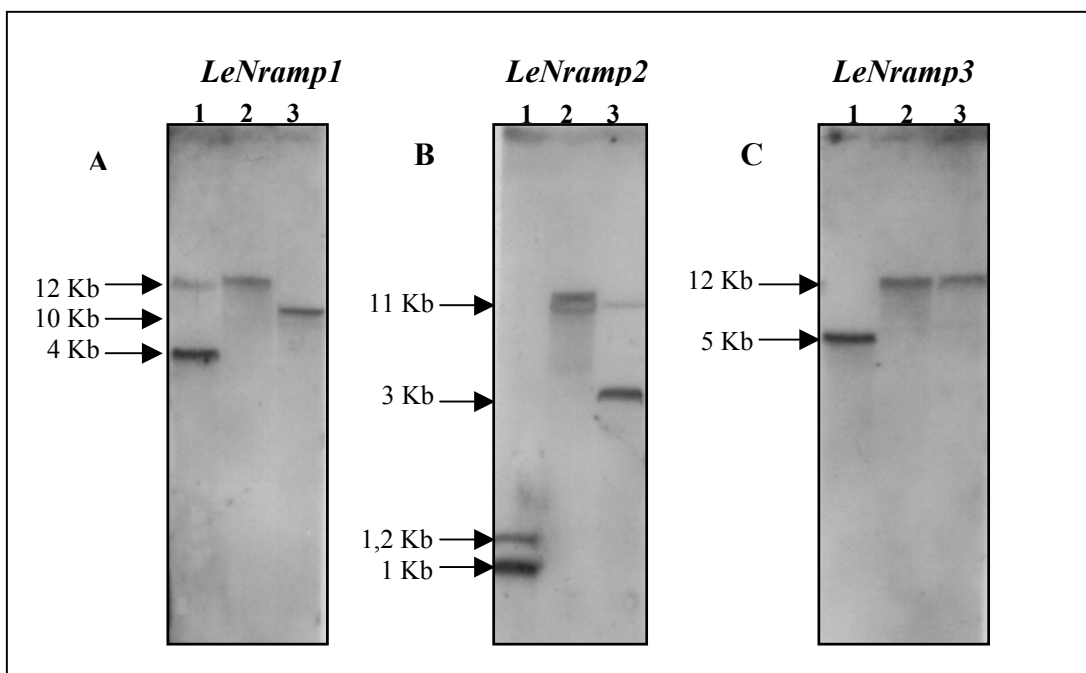
3.5 Southern-Analyse der klonierten Nrampttransportergene aus Tomate

Um die Nrampttransporter *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3* in einer Southern-Analyse zu vergleichen, wurde genomische DNA aus Tomate mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *EcoRV* und *HindIII* geschnitten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der geschnittenen DNA und dem Transfer auf eine Nylon-Membran (s. Kap 2.6.4.1) wurde mit den Dig-markierten (s. Kap 2.5.1) PCR-Fragmenten *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3* hybridisiert.

Nach der Hybridisierung mit der Sonde für *LeNramp1* führt die Restriktion mit *EcoRI* zu Signalbanden bei 12 Kb und 4 Kb (Abb.37). Bei *HindIII*-Verdau ist eine einzige Bande bei 12 Kb zu erkennen. *EcoRV* führt zu einer Bande bei 10 Kb. Die Hybridisierung mit der Sonde für *LeNramp2* weist ein Signalbandenmuster auf, das von dem bei der Hybridisierung mit *LeNramp1* erhaltenen Muster unterschiedlich ist. *EcoRI*-Verdau zeigt eine starke 1Kb-Bande und eine schwächere bei 1,2 Kb. Die Restriktion mit *HindIII* läßt zwei Banden bei 11 Kb und 10 Kb erkennen. In Spur 3 (*EcoRV*-Verdau) treten Banden von 3 Kb und 10 Kb auf. Die Hybridisierung mit der Sonde für *Nramp3* zeigt zwar bei der Spur 2 (*HindIII*-Verdau) eine 12 Kb-Bande wie bei der Hybridisierung mit *Nramp1*, weist aber bei dem Verdau mit *EcoRI* und *EcoRV* ein anderes Signalbandenmuster auf. Bei der Restriktion mit *EcoRI* tritt eine Signalbande bei 5 Kb auf. Im *EcoRV*-Verdau ist ein Signal bei 12 Kb zu erkennen.

Die Hybridisierungen mit den Sonden *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3* führten zu unterschiedlichen Signalbandenmustern. Damit wurde gezeigt, daß im Genom von Tomate mindestens drei unterschiedliche zu Nrampttransportern homologe Gene vorhanden sind.

Abbildung 37:



Es wurden 20 µg genomischer DNA aus Tomate mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* (Spur1), *HindIII* (Spur 2) und *EcoRV* (Spur 3) geschnitten. Nach dem elektrophoretischen Auftrennen in einem 1%igen Agarosegel wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert. Die Dig-markierten PCR-

Fragmente *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3* wurden bei 42°C über Nacht jeweils zur Hybridisierung der Filter A, B und C eingesetzt. Das Waschen und Färben der Filter wurde nach der in Kap. 2.6.6 beschriebenen Methode durchgeführt.

3.6 Expression der Gene von Tomate für Schwermetall- und Salztoleranz

Aus Blättern und Wurzeln wurde Gesamt-RNA von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen, die unter Schwermetall- bzw. Salzbelastung angezogen wurden, isoliert, um mögliche Expressionsunterschiede von Genen, die möglicherweise an der Schwermetall- oder Salztoleranz beteiligt sind, feststellen zu können. Dazu wurden Northern-Experimente durchgeführt. Nach Chemilumineszenzdetektion der spezifischen Transkripte (s. Kap. 2.6.6) wurden die erhaltenen Signale densitometrisch vermessen und mit den Signalen der 18S-rRNA normalisiert. Die Signalstärke des schwächeren Hybridisierungssignals wurde auf 1 gesetzt, um einen Vergleich der erhaltenen Signale zu ermöglichen.

Vergleichende Untersuchungen zur Expression dieser Gene wurden zusätzlich mittels Real-Time quantitativen PCR ebenso durchgeführt (s. Kap. 3.6.3).

Durch *In Situ*-Hybridisierung wurde versucht, die Transkriptlokalisierung und eine mit der Mykorrhizierung mögliche Änderung der räumlichen Expression mit dem Metallothioneingen *Lemt2* und dem Nramtransportergen *LeNramp1* in den Tomatenwurzeln festzustellen (s. Kap 3.7).

3.6.1 Northern-Analysen zur Untersuchung der Expression der Gene, die an der Schwermetalltoleranz beteiligt sind

Zur Untersuchung der Expression der Gene, die möglicherweise an der Schwermetalltoleranz beteiligt sind, wurden mykorrhizierte und nicht mykorrhizierte Tomatenpflanzen für 14 Wochen unter Schwermetallbelastung angezogen. Der Schwermetallstress wurde entweder durch das Anziehen der Pflanzen in Schwermetallerde aus Breinigerberg oder durch Gießen mit einer CdCl₂-Lösung (500 µM und 1 mM) erreicht. Nach Isolierung von Gesamt-RNA aus Wurzeln oder Blättern wurden Northern-Versuche durchgeführt.

3.6.1.1 Northern-Analyse zur Expression der Phytochelatinsynthese- und Metallothioneingene in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen

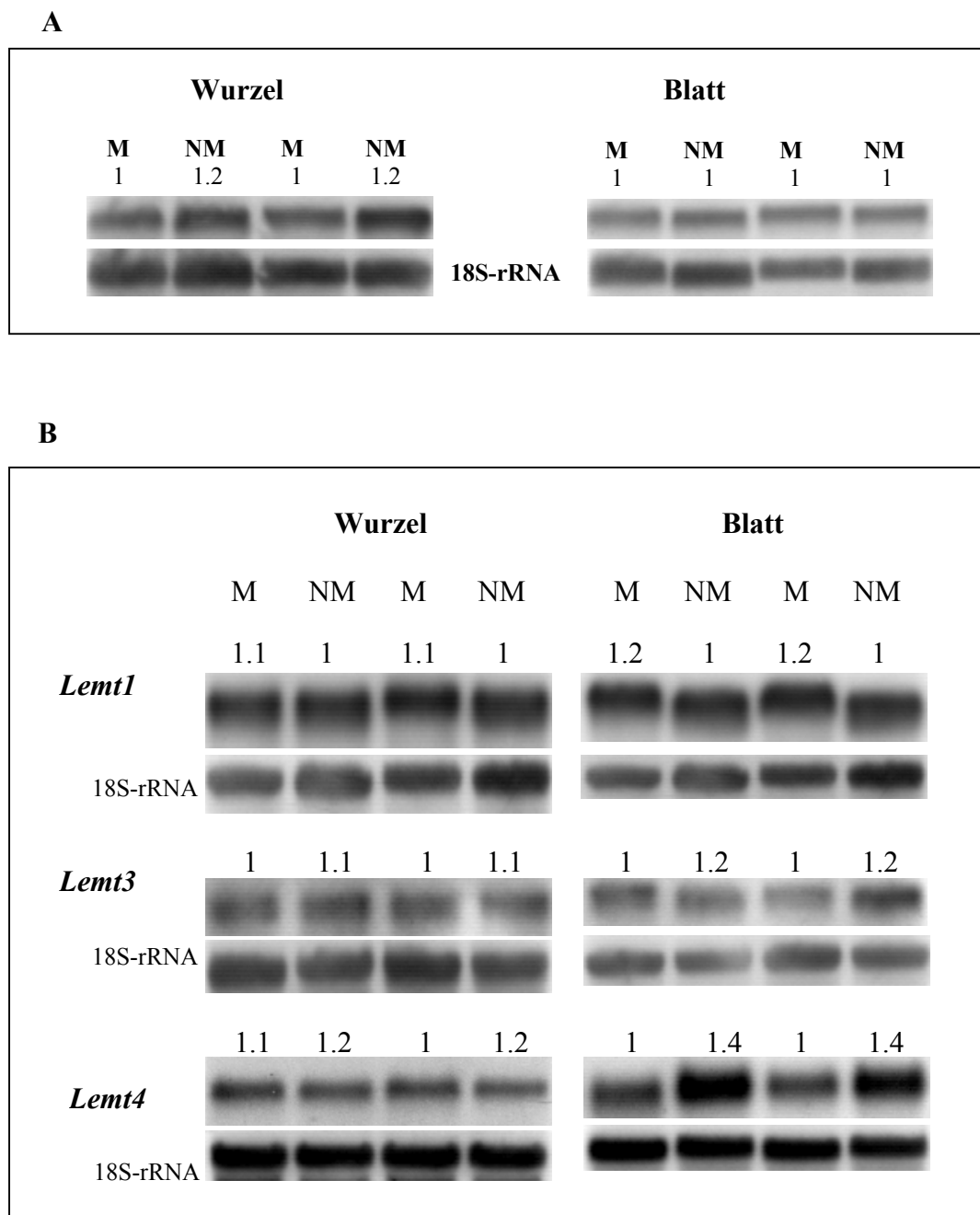
Mit der Sonde für Phytochelatin synthase und mit der für Metallothioneine *Lemt1*, *Lemt2* und *Lemt3* spezifischen Sonden konnte in Northern-Experimenten sowohl mit RNA aus Wurzeln als auch aus Blättern von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 38). Im Gegensatz dazu konnten mit der Sonde für das Metallothioneingen *Lemt2* Hybridisierungssignale nur mit RNA aus Wurzeln von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomaten erhalten werden (Abb.39). Transkripte mit der Blatt-RNA waren nicht nachweisbar (Abb. 39).

Weder in den Wurzeln noch in den Blättern konnte durch den Vergleich der erhaltenen Signalstärken bei der Hybridisierung mit der Sonde *LePCS* (Phytochelatin synthase) mit der RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen, ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 38 A). Das Expressionsmuster der Metallothioneingene *Lemt1*, *Lemt3* und *Lemt4* (Abb. 38 B) ähnelt dem des Phytochelatin-

synthasegens. Allerdings ist bei *Lemt4* eine Tendenz der Reduzierung der Expression (ca. um den Faktor 1,4) in den Blättern der mykorrhizierten Tomatenpflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen unter Schwermetallstress zu beobachten.

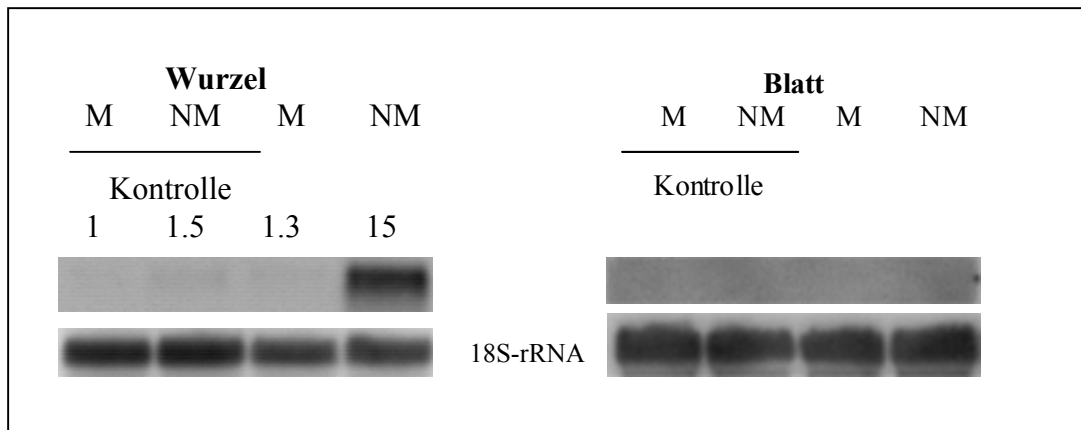
Im Gegensatz dazu ergaben die Northern-Analysen mit RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln unter Schwermetallbelastung einen deutlichen Unterschied in der Expression des Metallothioneingens *Lemt2* (Abb.39). Mit der Mykorrhizierung der Tomatenpflanzen wird im Breinigerbergboden, nicht aber in nicht belasteten Böden, die Transkriptmenge ca. um den Faktor 12 reduziert (Abb. 39).

Abbildung 38: Expression des Gens für die Phytochelatin synthase *LePCS* und Metallothioneine *Lemt1*, *Lemt3* und *Lemt4* in Wurzeln und Blättern von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen.



Darstellung der Northern-Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Tomatenpflanzen mit und ohne *Glomus intraradices* BrI wurden 14 Wochen in der Schwermetallerde aus Breinigerberg angezogen. Danach wurde aus Blättern und Wurzeln die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde die RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran (HybondN-Nylon-Membran, Amersham) transferiert. Die Filter wurden mit den Dig-markierten Antisense-RNA-Sonde *LePCS* (Phytochelatin synthase) (A) bzw. mit den Dig-markierten spezifischen RNA-Sonden für die Metallothioneine *Lemt1*, *Lemt3*, und *Lemt4* (B) bei 68°C über Nacht hybridisiert. Die Detektion der Hybridisierungssignale wurde, wie in Kap. 2.6.6 beschrieben, durchgeführt. Danach wurden die Sonden entfernt und die Filter mit einer Sonde für die 18S-rRNA aus Tomate hybridisiert. Die Signalstärken wurden densitometrisch vermessen und gegen die Signale der 18S-rRNA normalisiert. Die Signalstärke des schwächeren Hybridisierungssignals wurde auf 1 gesetzt, um einen Vergleich der erhaltenen Signale zu ermöglichen. (NM = nicht mykorrhiziert, M = mykorrhiziert).

Abbildung 39: Expression des Gens Metallothionein *Lemt2* in Wurzeln und Blättern von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen



Tomatenpflanzen mit und ohne *Glomus intraradices* BrI wurden 14 Wochen in der Schwermetallerde aus Breinigerberg bzw. Lecaton® (Kontrollpflanzen) angezogen. Danach wurde aus Blättern und Wurzeln die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde die RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran (HybondN-Nylon-Membran, Amersham) transferiert. Der Filter wurde mit der Dig-markierten spezifischen RNA-Sonde für die Metallothionein *Lemt2* bei 68°C über Nacht hybridisiert. Das Vermessen und Normalisieren der Signalstärke sind der Legende in der Abb. 38 zu entnehmen. (NM = nicht mykorrhiziert, M = mykorrhiziert, Kontrolle = angezogene Tomatenpflanzen in nicht schwermetallbelasteten Substrat).

3.6.1.2 Northern-Analyse zur Expression der Nramtransportergene in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen

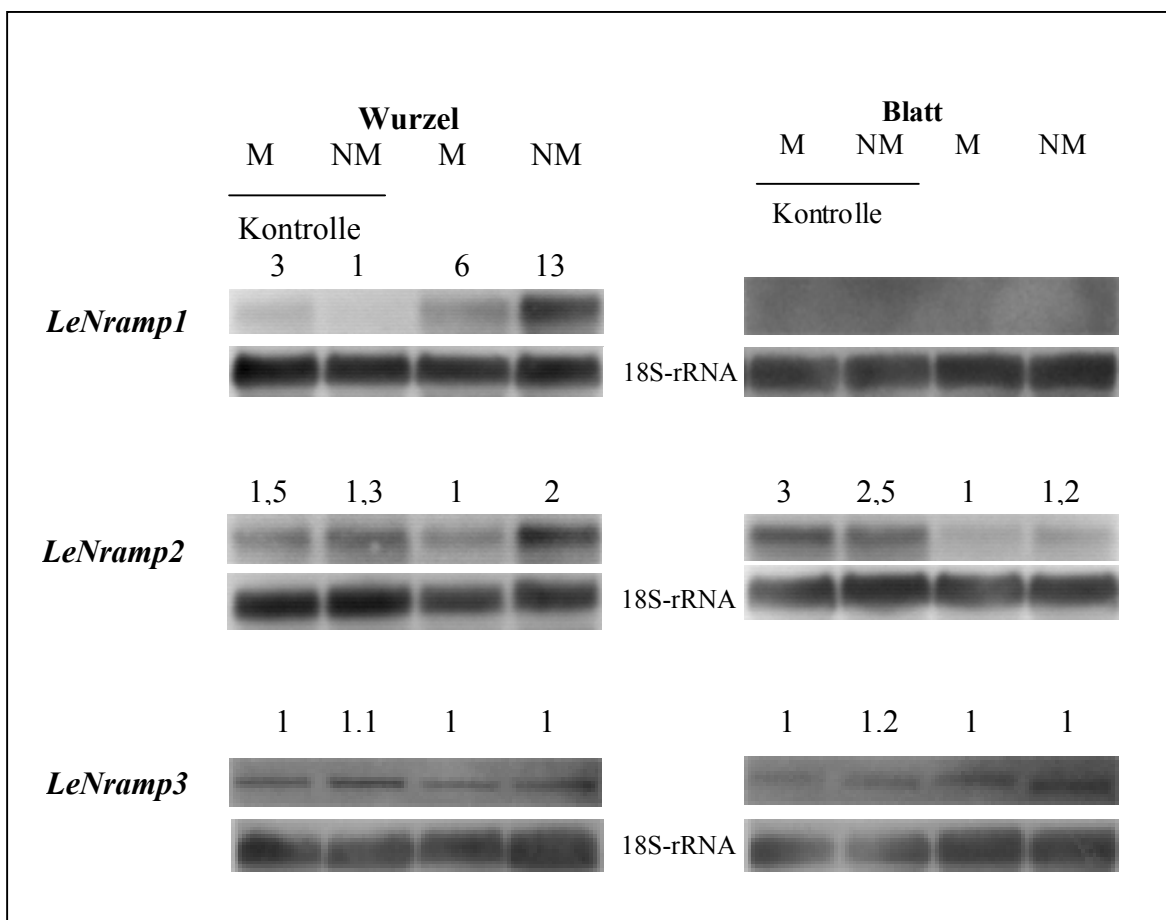
Northern-Analysen wurden durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Expression von Nramtransportergenen in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Schwermetallbelastung untersuchen zu können. Während Transkripte der Nramtransportergene 2 und 3 mit der RNA aus Wurzeln und Blättern in Northern-Experimenten nachgewiesen werden konnten (Abb.40), traten mit der Sonde für den *LeNram1* Hybridisierungssignale nur mit der RNA aus Wurzeln auf (Abb.40).

Die Expression des Nramtransportergens1 zeigt mit RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln einen deutlichen Unterschied. Bei den Kontrollpflanzen (ohne Schwermetalle) sind die mit der RNA aus mykorrhizierten Wurzeln er-

haltenen Signale dreifach stärker als die Signale mit isolierter RNA aus nicht mykorrhizierten Wurzeln. Im Gegensatz dazu wird die Transkriptmenge des Tomaten-Gens *LeNramp1* deutlich unter Schwermetallbelastung mit der Mykorrhizierung um den Faktor 2 herunterreguliert. Bei der Hybridisierung mit der Sonde für *LeNramp2* ist mit Wurzel-RNA ein ähnliches Expressionsmuster wie bei *LeNramp1* zu beobachten. Die Mykorrhizierung führt unter Schwermetallbelastung zu einer Reduzierung der Expression des Nrampttransportergens 2 in den Wurzeln. Darüberhinaus zeigt die Hybridisierung mit der Blatt-RNA eine Reduzierung der Transkriptmenge in Breinigerbergerde sowohl in den mykorrhizierten als auch in den nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen.

Im Gegensatz zu den Nrampttransportergenen 1 und 2 weisen die Hybridisierungen mit der spezifischen RNA-Sonde für *LeNramp3* keine signifikanten Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen auf.

Abbildung 40: Expression von Nrampttransportergenen in Wurzeln und Blättern von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen



Darstellung der Northern-Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Tomatenpflanzen mit und ohne *Glomus intraradices* Bri wurden 14 Wochen in der Schwermetallerde aus Breinigerberg bzw. Lecaton® (Kontrollpflanzen) angezogen. Danach wurde aus Blättern und Wurzeln die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde die RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran (HybondN-Nylon-Membran, Amersham) transferiert. Die Filter wurden mit den Dig-markierten spezifischen RNA-Sonden für die Nrampttransportergene *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3* bei 68°C über Nacht hybri-

disiert. Das Vermessen und Normalisieren der Signalstärke sind der Legende in der Abb. 38 zu entnehmen. (NM = nicht mykorrhiziert, M = mykorrhiziert, Kontrolle = angezogene Tomatenpflanzen in nicht schwermetallbelastetem Substrat).

3.6.1.3 Northern-Analyse zur Expression der Phytochelatin synthase-, Metallothionein *Lemt2*- und Nrampttransportergene 1, 2 und 3 in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Cadmium-Stress

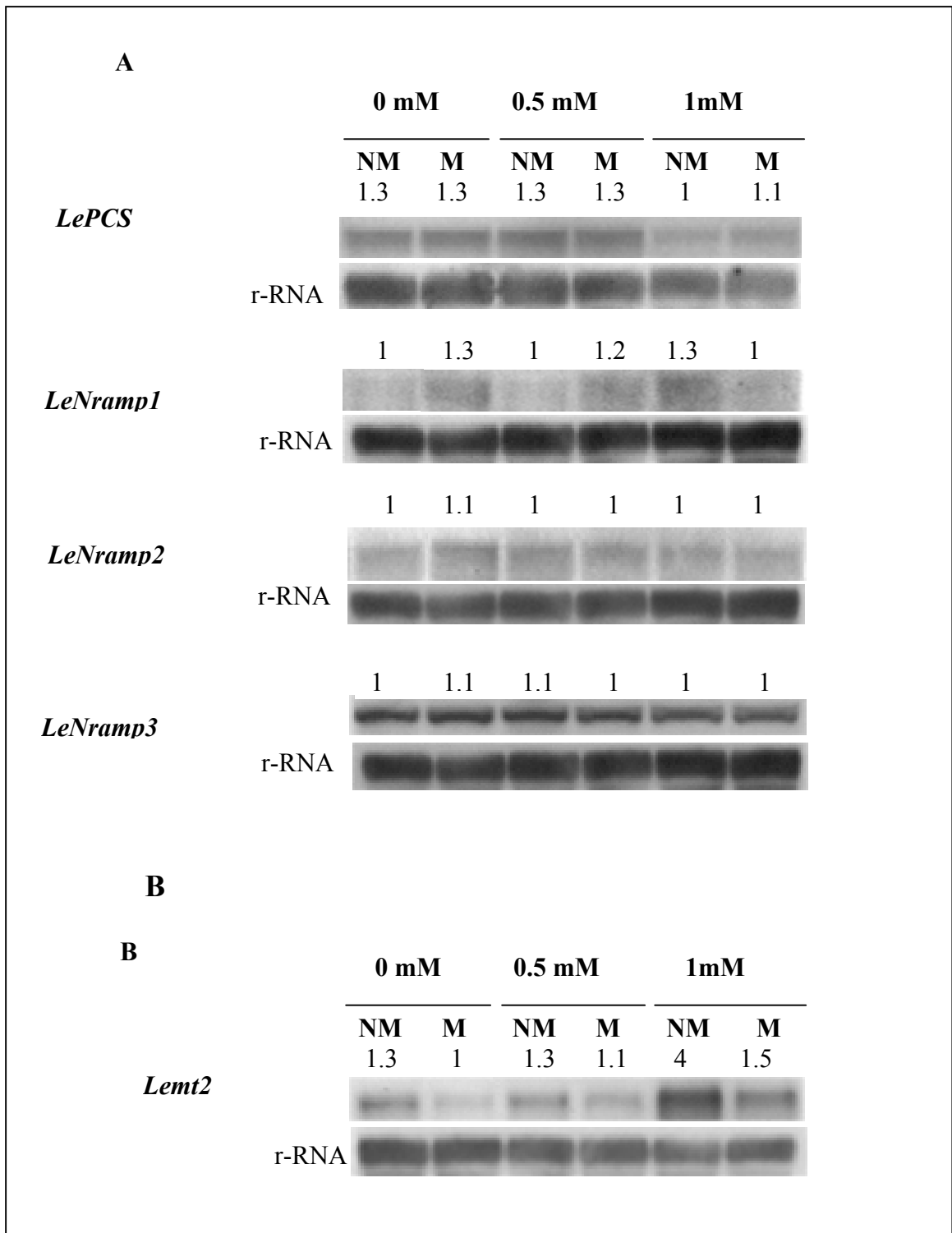
Zur Untersuchung des Einflusses von Cadmium auf die Expression der Schwermetalltoleranzgene wurden mykorrhizierte und nicht mykorrhizierte Tomatenpflanzen für 16 Wochen unter Cadmium-Belastung angezogen. Dafür wurden die Pflanzen ab der dritten Woche jeden zweiten Tag mit drei unterschiedlichen Cadmium-Lösungen begossen (0 mM, 0,5 mM und 1 mM). Sowohl die mykorrhizierten als auch die Kontrollpflanzen wiesen eine Abnahme des Wurzel- und Blattfrischgewichts in Abhängigkeit von der ansteigenden Cd-Konzentration auf, wobei die mykorrhizierten Tomatenpflanzen ein deutlich verbessertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigten (s. Abb. 32). Der Mykorrhizierungsgrad der Tomatenpflanzen lag bei 71% (0 mM), 73% (0,5 mM) und 69% (1 mM). Eine wesentliche Reduzierung der Mykorrhizierung unter Cd-Belastung trat nicht auf.

Nach Ernte der Pflanzen und Isolierung der RNA aus Blättern und Wurzeln wurden Northern-Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Untersuchungen auf die Gene beschränkt, die bei dem Breinigerberg-Versuch eine signifikante differentielle Expression zeigten. Das Gen für die Phytochelatin synthase wurde in den Versuch miteinbezogen, da die Phytochelatine eine bedeutende Rolle bei der Cadmium-Entgiftung in der Zelle spielen (Grill et al., 1985; Zenk, 1996).

Durch den Vergleich der erhaltenen Signalstärken konnte bei der Hybridisierung der Sonden für die Phytochelatin synthase, *Nramp1*, *Nramp2* und *Nramp3* mit der RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomaten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb.41 A). Die Tendenz aber, die bei dem Versuch mit der Breinigerbergerde festgestellt wurde, nämlich eine leichte Reduzierung der Expression mit der Mykorrhizierung, wurde auch in dem Cadmium-Versuch und besonderes bei der 1 mM Konzentration bestätigt.

Die Expression des Metallothioneingens *Lemt2* zeigt einen deutlichen Unterschied (Abb. 41 B). Dabei ist eine Abhängigkeit der Transkriptmenge sowohl von der Mykorrhizierung als auch von der Cadmium-Konzentration zu beobachten. Bei der 0 mM und 1 mM Konzentrationen sind die mit der RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Wurzeln erhaltenen Signale etwa gleich stark. Im Gegensatz dazu wird die Transkriptionsmenge des Gens *Lemt2* mit ansteigender CdCl₂-Konzentration deutlich mit der Mykorrhizierung um den Faktor 2,6 reduziert.

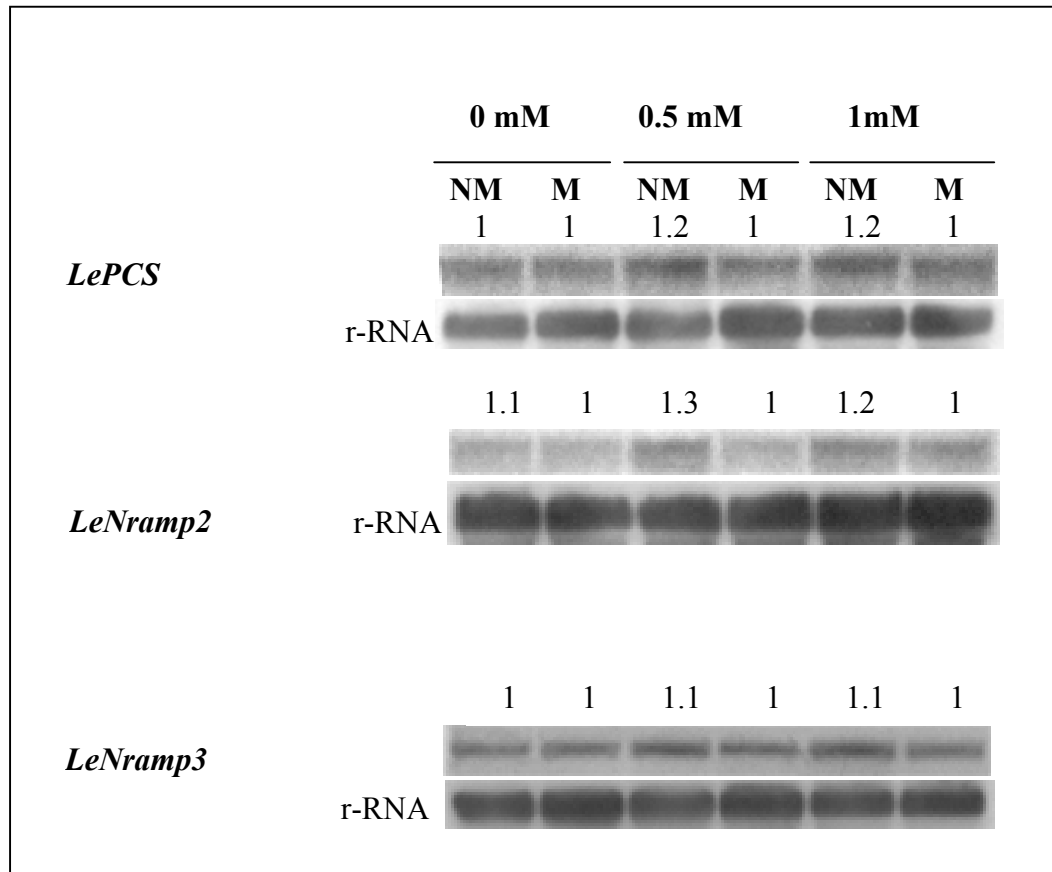
Abbildung 41: Northern-Analyse zur Untersuchung der Expression der Nrampttransportergene, des Metallothioneingens *Lemt2* und des Phytochelatin synthasegens *LePCS* in den Wurzeln von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Cadmium-Stress.



Glomus intraradices BrI wurden 16 Wochen in einer Mischung aus Lecaton® und Einheitserde angezo- gen. Dabei wurden die Pflanzen ab der dritten Woche jeden zweiten Tag mit CdCl₂-Lösungen begossen (0 mM, 0,5 mM und 1 mM). Danach wurde aus den Wurzeln die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend

wurde die 20 µg RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran (HybondN-Nylon-Membran, Amersham) transferiert. Die Filter wurden mit der Dig-markierten spezifischen RNA-Sonden für die Nrampttransportergene (1, 2 und 3), Phytochelatin synthasegen *LePCS* und für das Metallothionein *Lemt2* bei 68°C über Nacht hybridisiert. Das Vermessen und Normalisieren der Signalstärke sind der Legende in der Abb. 38 zu entnehmen. (NM = nicht mykorrhiziert, M = mykorrhiziert).

Abbildung 42: Northern-Analyse zur Untersuchung der Expression der Nrampttransportergene 2 und 3 und des Phytochelatin synthasegens in den Blättern von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Cadmium-Stress.



Tomatenpflanzen mit und ohne *Glomus intraradices* BrI wurden 16 Wochen in einer Mischung aus Leca-ton® und Einheitserde angezogen. Dabei wurden die Pflanzen ab der dritten Woche jeden zweiten Tag mit CdCl₂-Lösungen begossen (0 mM, 0,5 mM und 1 mM). Danach wurde aus Blättern die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde die 20 µg RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran (HybondN-Nylon-Membran, Amersham) transferiert. Die Filter wurden mit der Dig-markierten spezifischen RNA-Sonden für das Phytochelatin synthasegen *LePCS* und die Nrampttransportergene 2 und 3 bei 68°C über Nacht hybridisiert. Das Vermessen und Normalisieren der Signalstärke sind der Legende in Abb. 38 zu entnehmen. (NM = nicht mykorrhiziert, M = mykorrhiziert).

3.6.2 Northern-Analyse zur Expression von PIP-, TIP-Aquaporinen und Na⁺/H⁺-Antiportergenen in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Salzstress

Zur Untersuchung der Expression der Salztoleranzgene wurden mykorrhizierte und nicht mykorrhizierte Tomatenpflanzen unter Salzstress angezogen. Drei verschiedene NaCl-Konzentrationen wurden eingestellt (0, 8 und 12 g NaCl/l Bodensubstrat). Die 8 und 12 g NaCl-Konzentrationen wurden schrittweise erreicht, um einen osmotischen Schock bei den Pflanzen zu vermeiden. Dafür wurde ab der siebten Woche eine NaCl-Konzentration von 1 g/l Bodensubstrat eingesetzt. Danach wurde die Endkonzentrationen durch wöchentliches Verdoppeln des NaCl-Gehaltes erreicht. Nach 16 Wochen wurden die Pflanzen geerntet, die Gesamt-RNA aus Wurzeln und Blättern isoliert und Northern-Analysen durchgeführt.

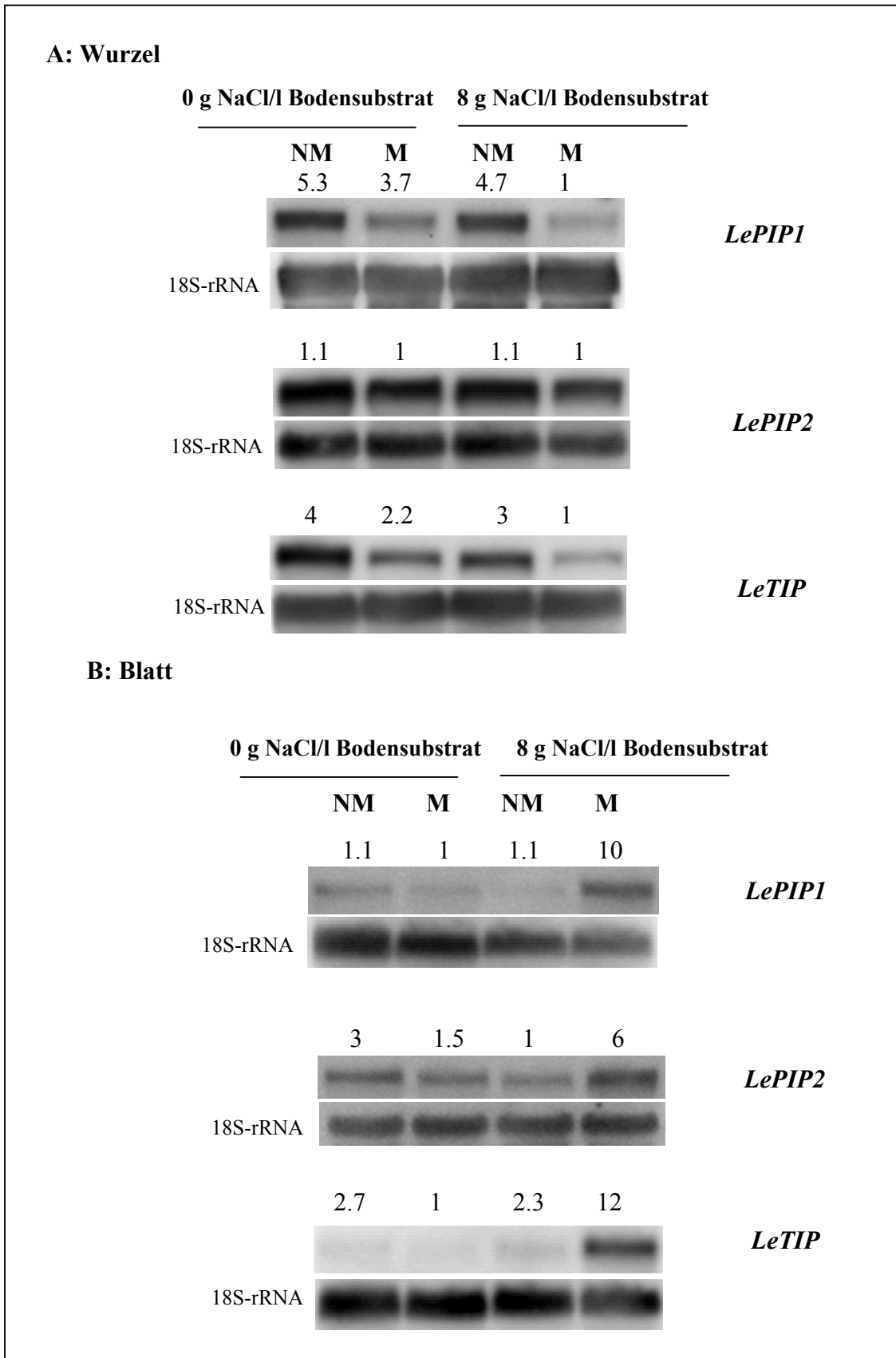
Mit den Sonden für die Aquaporine (*LePIP1*, *LePIP2* und *LeTIP*) und mit der für die Na⁺/H⁺-Antiportergene (*LeNHX1* und *LeNHX2*) spezifischen Sonden wurde in Northern-Experimenten sowohl mit isolierter RNA aus den Wurzeln als auch aus den Blättern von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen Transkripte erhalten (Abb. 43 und 44).

Die Expression der Aquaporine weist mit RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen deutliche Unterschiede zwischen Blatt und Wurzel auf. Auf Wurzelebene zeigen *LePIP1* und *LeTIP* ein ähnliches Expressionsmuster und zwar eine Reduzierung der Transkriptmenge mit der Mykorrhizierung (Abb. 43A). Diese Reduzierung ist sowohl bei den unter Salzstress angezogenen Pflanzen als auch bei den Kontrolltomaten (ohne Salzbelastung) zu beobachten. Unter Salzstress sind bei *LePIP1*-Gen die mit der RNA aus nicht mykorrhizierten Wurzeln erhaltenen Signale 4,5 x stärker als die Signale mit isolierter RNA aus mykorrhizierten Pflanzen. Im Gegensatz dazu konnte durch den Vergleich der Signalstärke bei der Hybridisierung der Sonde für das *LePIP2*-Gen mit der RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln keine Unterschiede festgestellt werden.

Auf Blattebene und unter Salzbelastung ähneln sich die Expressionmuster der *LePIP1*-, *LePIP2*- und *LeTIP*-Gene und zeigen im Gegensatz wie bei den Wurzeln eine Erhöhung der Transkriptmenge mit der Mykorrhizierung (Abb. 43 B). Beispielsweise wird die Transkriptionsmenge des Gens *LeTIP* in der isolierten Blatt-RNA aus mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Salzstress um den Faktor 6 deutlich erhöht im Vergleich zu den nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen.

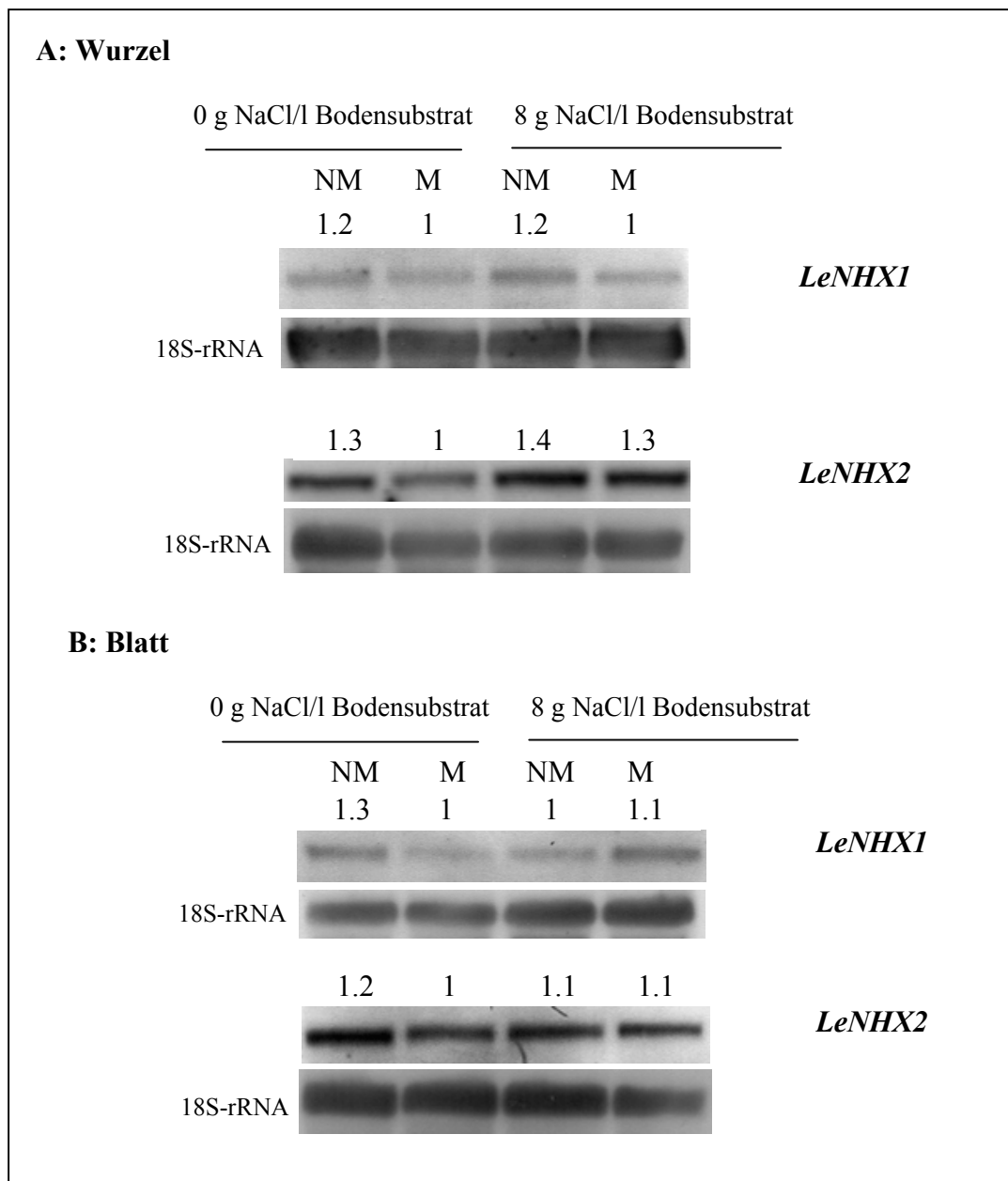
Bei der Hybridisierung der Sonden für Na⁺/H⁺-Antiporter (*LeNHX1* und *LeNHX2*) mit der RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomaten konnten durch den Vergleich der erhaltenen Signale keine Unterschiede beobachtet werden (Abb. 44).

Abbildung 43: Northern-Analyse zur Untersuchung der Expression der PIP- und TIP-Aquaporingene in Wurzeln und Blättern von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Salzstress



Darstellung der Northern-Analysen von zwei unabhängigen Versuchen. Tomatenpflanzen mit und ohne *Glomus geosporum* (Mischinokukum) wurden 16 Wochen unter Salzbelastung angezogen. drei NaCl-Konzentrationen wurden eingestellt (0, 8 und 12 g NaCl/l Bodensubstrat). Danach wurde aus Wurzeln und Blättern die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde die 20 µg RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran (HybondN-Nylon-Membran, Amersham) transferiert. Die Filter wurden mit der Dig-markierten spezifischen RNA-Sonden für die PIP-, TIP-Aquaporine (*LePIP1*, *LePIP2* und *LeTIP*) bei 68°C über Nacht hybridisiert. Das Vermessen und Normalisieren der Signalstärke sind der Legende in der Abb. 38 zu entnehmen. (NM = nicht mykorrhiziert, M = mykorrhiziert).

Abbildung 44: Northern-Analyse zur Untersuchung der Expression der Na⁺/H⁺-Antiportergene (*LeNHX1* und *LeNHX2*) in Wurzeln und Blättern von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Salzstress



Darstellung der Northern-Analysen von zwei unabhängigen Versuchen. Tomatenpflanzen mit und ohne *Glomus geosporum* (Mischinokukum) wurden 16 Wochen unter Salzbelastung angezogen. Drei NaCl-Konzentrationen wurden eingestellt (0, 8 und 12 g NaCl/l Bodensubstrat). Danach wurde aus Wurzeln

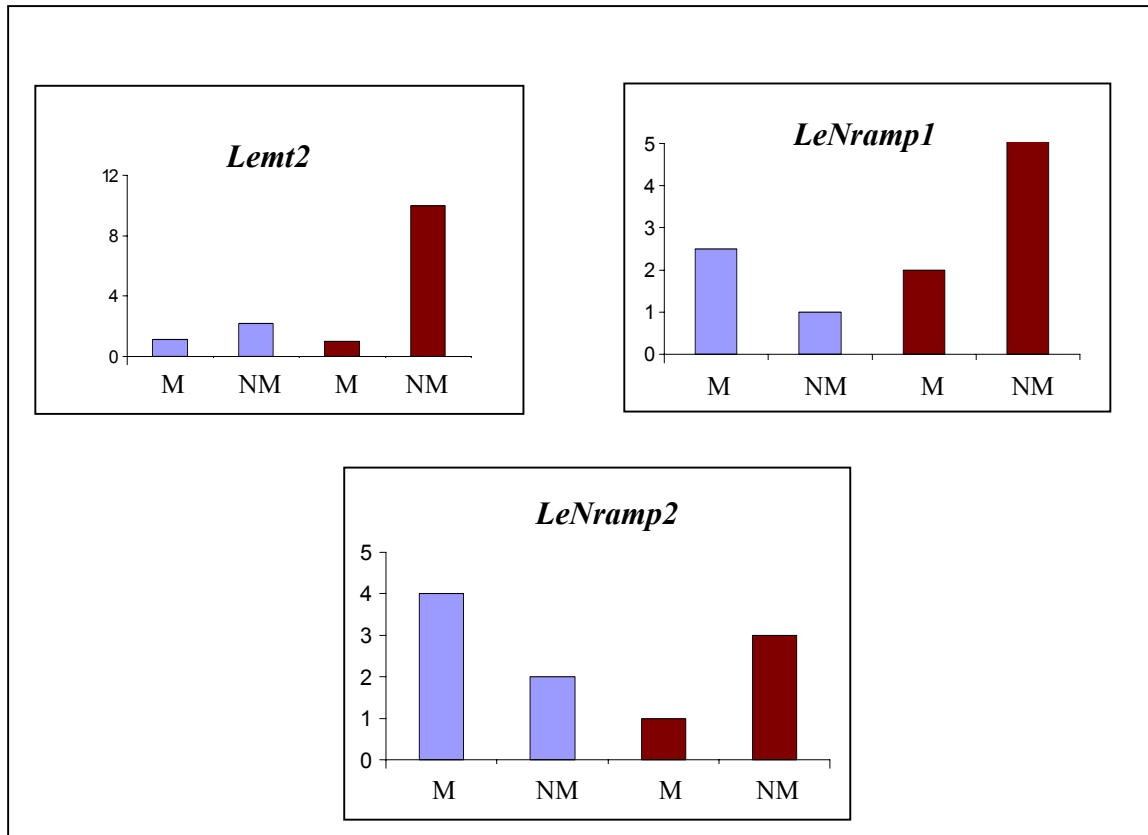
und Blättern die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurden die 20 µg RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran (HybondN-Nylon-Membran, Amersham) transferiert. Die Filter wurden mit den Dig-markierten spezifischen RNA-Sonden für die Na⁺/H⁺-Antiportergene (*LeNHX1* und *LeNHX2*) bei 68°C über Nacht hybridisiert. Das Vermessen und Normalisieren der Signalstärke sind der Legende in Abb. 38 zu entnehmen. (NM = nicht mykorrhiziert, M = mykorrhiziert).

3.6.3 Quantitative Real-Time PCR-Ergebnisse zur Untersuchung der Expression der an der Schwermetall- und Salztoleranz beteiligten Gene

Vergleichend wurden die Transkriptmengen der Gene, die bei den Northern-Analysen eine differentielle Expression in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen aufwiesen, mit der quantitativen RT-PCR untersucht. Die Versuche wurden mit dem GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems) durchgeführt. Hierbei wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I verwendet. Dieser Fluorophor hat die Eigenschaft, unspezifisch in Doppelstrang-DNA zu interkalieren. Dieses führt mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Anschließend wurde die ursprünglich in die Reaktion eingesetzte Kopienzahl in einem Computer durch ein GeneAmp 5700 Sequence Detection System (SDS) Software bestimmt. Als Parameter für die Bestimmung der Startkopienzahl wird der Ct-Wert (threshold cycle) berechnet, der die Zahl angibt, bei der die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Die absolute Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte durch das Mitführen von Standards, die eine bekannte Menge der Zielsequenz enthalten. Zur Normalisierung der Ergebnisse diente die 18S-RNA.

Zur Untersuchung der Expression des Metallothioneingens *Lemt2* und der Nramtransportergene *LeNramp1* und *LeNramp2* wurde Wurzel-cDNA sowohl aus der in dem Boden aus Breinigerberg angezogenen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen als auch aus den Kontrollpflanzen (ohne Schwermetallbelastung) als Matrize für die quantitative Real-Time PCR eingesetzt. Das Expressionmuster des Metallothioneingens *Lemt2* ähnelt dem bei der Northern-Analyse erhaltenen Muster. Die Transkriptmenge des Gens *Lemt2* wird unter Schwermetallbelastung mit der Mykorrhizierung ca. um den Faktor 10 reduziert (Abb. 45). Die Expression beider Nramtransportergene *LeNramp1* und *LeNramp2* zeigt einen ähnlichen Verlauf. In den mykorrhizierten Wurzeln der Kontrollpflanzen (ohne Schwermetallstress) ist die Expression beider Gene ca. zweifach stärker als in den nicht mykorrhizierten Wurzeln (Abb. 45). Im Gegensatz dazu wird die Transkriptionsmenge von *LeNramp1* und *LeNramp2* deutlich mit der Mykorrhizierung unter Schwermetallbelastung ca. um den Faktor drei herunterreguliert (Abb. 45).

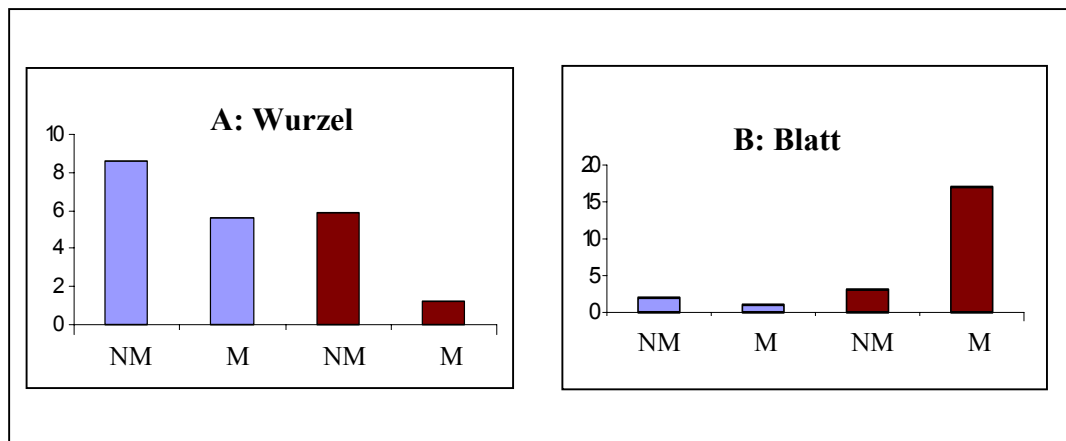
Abbildung 45: Quantitative RT-PCR-Ergebnisse des Metallothioneingens *Lemt2* und der Nramtransportergene *LeNramp1* und *LeNramp2*



Als Matrize für die quantitativen Real-Time PCR wurde Wurzel-cDNA aus den in der Breinigerbergerde angezogenen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen eingesetzt. Nach 2 min Inkubation bei 50°C und 10 min bei 95°C folgten 40 Zyklen mit einer Bindungstemperatur bei 60°C. Die Detektion der Fluoreszenz während der PCR wird durch ein GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgt in einem Computer durch eine GeneAmp 5700 Sequence Detection System (SDS) Software. (M = mykorrhizierte Pflanzen, NM = nicht mykorrhizierte Pflanzen, □ ohne Schwermetallbelastung, ■ unter Schwermetallbelastung. Der niedrigste Wert der erhaltenen Kopienzahl wurde auf 1 gesetzt, um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen)

Zur Untersuchung des Tonoplast-Aquaporings *LeTIP* diente die Wurzel- und Blatt-cDNA aus der unter 0 und 8 g NaCl/l Konzentration kultivierten Tomatenpflanzen.

Aus der Abbildung 46 (A) geht hervor, daß die Expression des *LeTIP*-Gens in den Wurzeln mit der Mykorrhizierung herabgesetzt ist. Diese Reduzierung findet sowohl bei den unter Salzstress angezogenen mykorrhizierten Tomatenpflanzen als auch bei den mykorrhizierten Kontrollpflanzen (ohne Salzbelastung) statt. Auf Blattebene und unter Saltstress wies das *LeTIP*-Gen eine deutliche Erhöhung der Expression mit der Mykorrhizierung auf. Im Blatt wird die Transkriptionsmenge des *LeTIP*-Gens bei den mykorrhizierten Tomaten unter Salzbelastung ca. um den Faktor 6 erhöht im Vergleich zu den nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen (Abb. 46 B).

Abbildung 46: Real-Time PCR-Ergebnisse des Tonoplast-Aquaporings *LeTIP*

Als Matrize für die quantitativen Real-Time PCR wurde Wurzel- und Blatt-cDNA aus der unter 0 und 8 g NaCl/l Konzentration kultivierten mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen eingesetzt. Nach 2 min Inkubation bei 50°C und 10 min bei 95°C folgten 40 Zyklen mit einer Bindungstemperatur bei 60°C. Die Detektion der Fluoreszenz während der PCR wird durch ein GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgt in einem Computer durch eine GeneAmp 5700 Sequence Detection System (SDS) Software. (M = mykorrhizierte Pflanzen, NM = nicht mykorrhizierte Pflanzen, □ ohne Salzbelastung, ■ unter Salzbelastung, A: Wurzel; B: Blatt). Der niedrigste Wert der erhaltenen Kopienzahl wurde auf 1 gesetzt, um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

3.7 RNA-*In Situ*-Hybridisierungen zur Lokalisierung der mRNA für das Metallothioneingens *Lemt2* und das Nramtransportergen *LeNramp1*

Anhand der RNA-*In situ*-Hybridisierung mit Dig-markierten Sense- und Antisense-Sonden wurde die Lokalisierung der Expression des Metallothioneingens *Lemt2* und des Nramtransportergens *LeNramp1* in den mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln untersucht, die für 14 Wochen in der Schwermetallerde aus Breinigerberg angezogen wurden. Die räumlichen Expressionsmuster beider untersuchten Gene (*Lemt2* und *LeNramp1*) sind in den Abbildungen 47, 48 und 49 dargestellt.

Die *In situ*-Hybridisierung mit der Antisense-Sonde für *Lemt2* führte zu deutlichen Unterschieden in der Signalstärke zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln. Die Signale der Transkripte von *Lemt2* treten in den Wurzelabschnitten von nicht mykorrhizierten Wurzeln stark auf und sind gleichmäßig sowohl in den Rhizodermis- als auch in den Rindenparenchymzellen verteilt (Abb. 47 A, B und C). Im Gegensatz dazu ist die Signalstärke bei den mykorrhizierten Wurzeln auf einige Rindenparenchymzellen beschränkt (Abb. 48, A und B). Diese Ergebnisse bestätigen die Aussage der Northern-Analysen, daß die Expression des Metallothioneingens *Lemt2* in den nicht mykorrhizierten Wurzeln wesentlich stärker ist als in den mykorrhizierten Wurzeln. Mit der Sense-Sonde wurden weder in den mykorrhizierten noch in den nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln Signale erhalten (Abb. 47 D und 48 D und E).

Bei der Hybridisierung mit der Antisense-Sonde für *LeNramp1* wurden schwache Signale nur in den nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln festgestellt. Wie in der Abbildung 49 A dargestellt ist, sind die Signale in unmittelbarer Umgebung der Zentralzylinder lokalisiert. In den mykorrhizierten Wurzeln konnten keine Signale mit der Antisense-Sonde festgestellt werden (Abb. 49 C und E). Bei der Hybridisierung mit der

Sense-Sonde wurden in den mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Wurzeln keine Signale erhalten (Abb. 49 B, D und F).

In unmittelbarer Nähe der pilzlichen Arbuskeln traten weder bei *Lemt2* (Abb. 48 C) noch bei *LeNramp1* (Abb. 49 E) Signale auf.

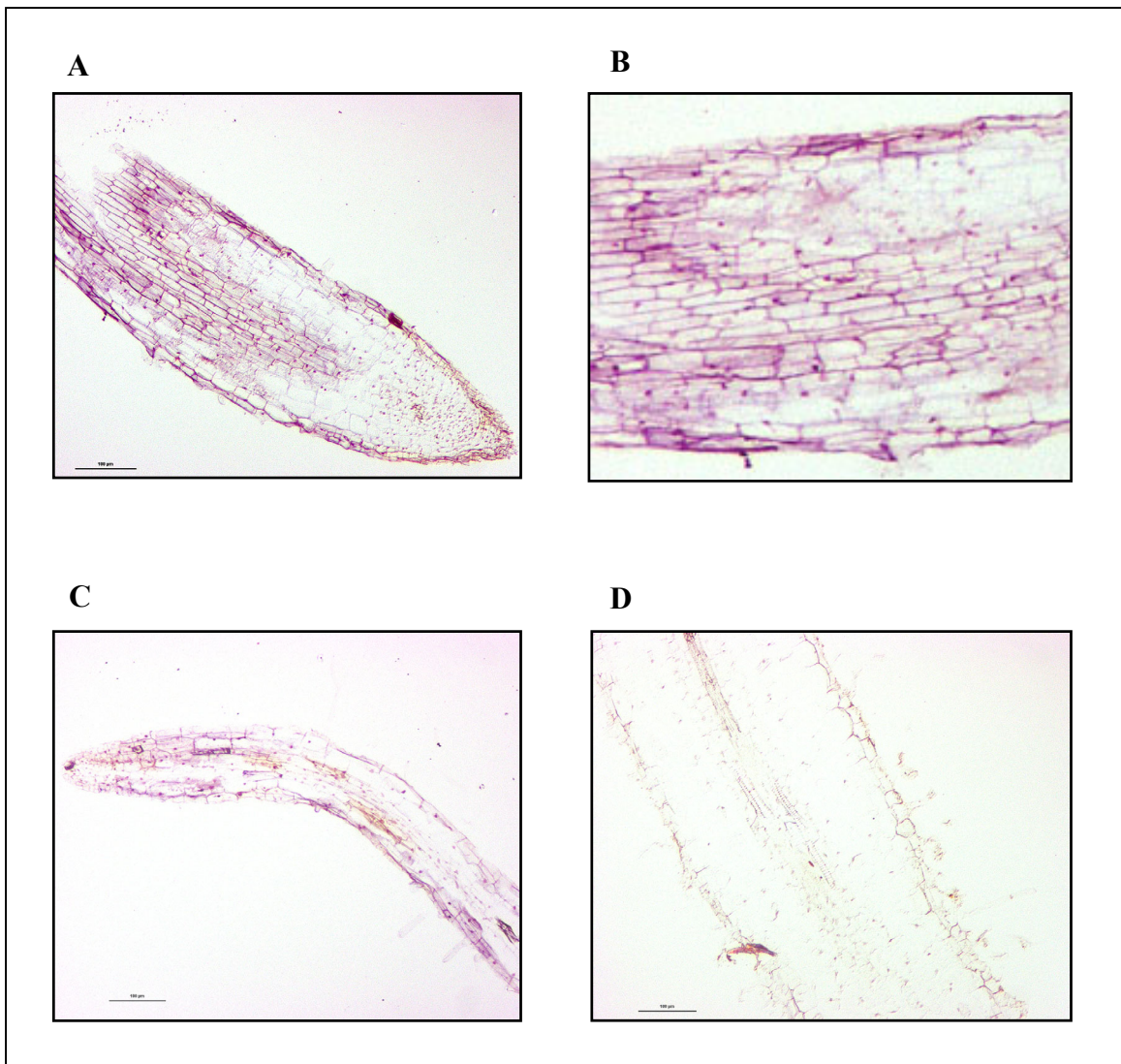
Um eine genaue Aussage über die Signalstärke zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln machen zu können, wurden die Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierungen quantifiziert. Mittels eines Bildbearbeitungsprogramms „Image tool“ können die Signalstärke als Mittelgrauwerte ermittelt werden. Mit Hilfe dieses Programms können Grauwerte zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß) bestimmt werden. Als problematisch erwiesen sich die Wurzelschnitte mit einem starken Hintergrund, da die optische Unterscheidung zwischen Signalen und Hintergrund erschwert wird. Daher wurde die Quantifizierung der Signale auf Wurzelabschnitte mit einem schwachen Hintergrund beschränkt.

Tabelle 13: Quantifizierung der *In situ*-Hybridisierung

	Mittelgrauwert	
	Antisense-Sonde	Sense-Sonde
<i>Lemt2</i>		
Nicht mykorrhiziert	160 ± 21	232 ± 6
mykorrhiziert	208 ± 14	229 ± 5
<i>LeNramp1</i>		
Nicht mykorrhiziert	185 ± 26	235 ± 5
mykorrhiziert	234 ± 8	231 ± 7

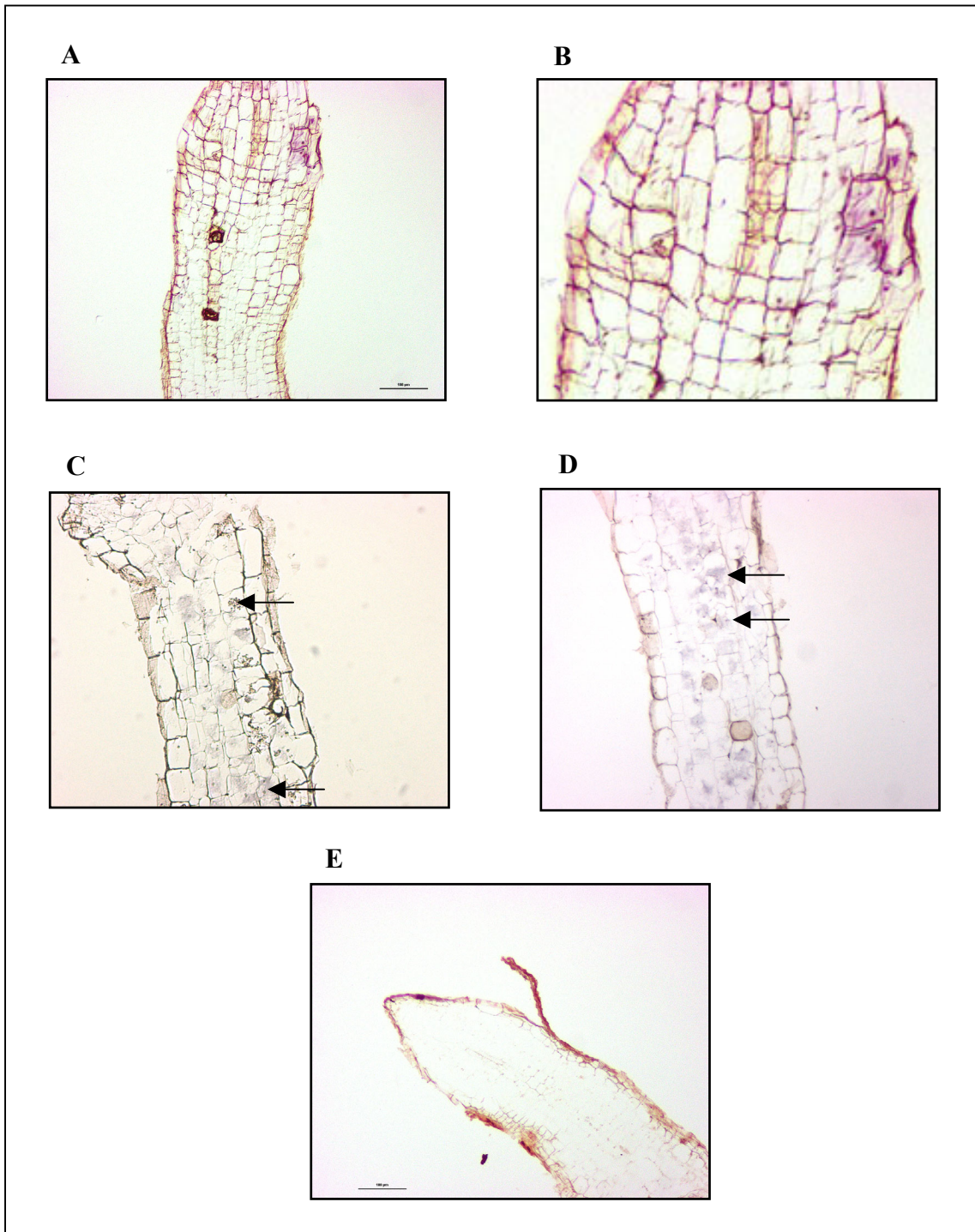
Längsschnitte von in Paraffin eingebetteten Tomatenwurzeln wurden *In situ* mit Sense-, bzw. Antisense-RNA-Sonde für *Lemt2* oder *LeNramp1* hybridisiert. Mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms „Image tool“ wurden die erhaltenen Signale als Grauwerte zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß) ermittelt. Angegeben sind die Mittelgrauwerte und die jeweiligen Standardabweichungen.

Abbildung 47: Lokalisation der Transkripte von Metallothioneinen *Lemt2* durch *In situ*-Hybridisierung in nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln



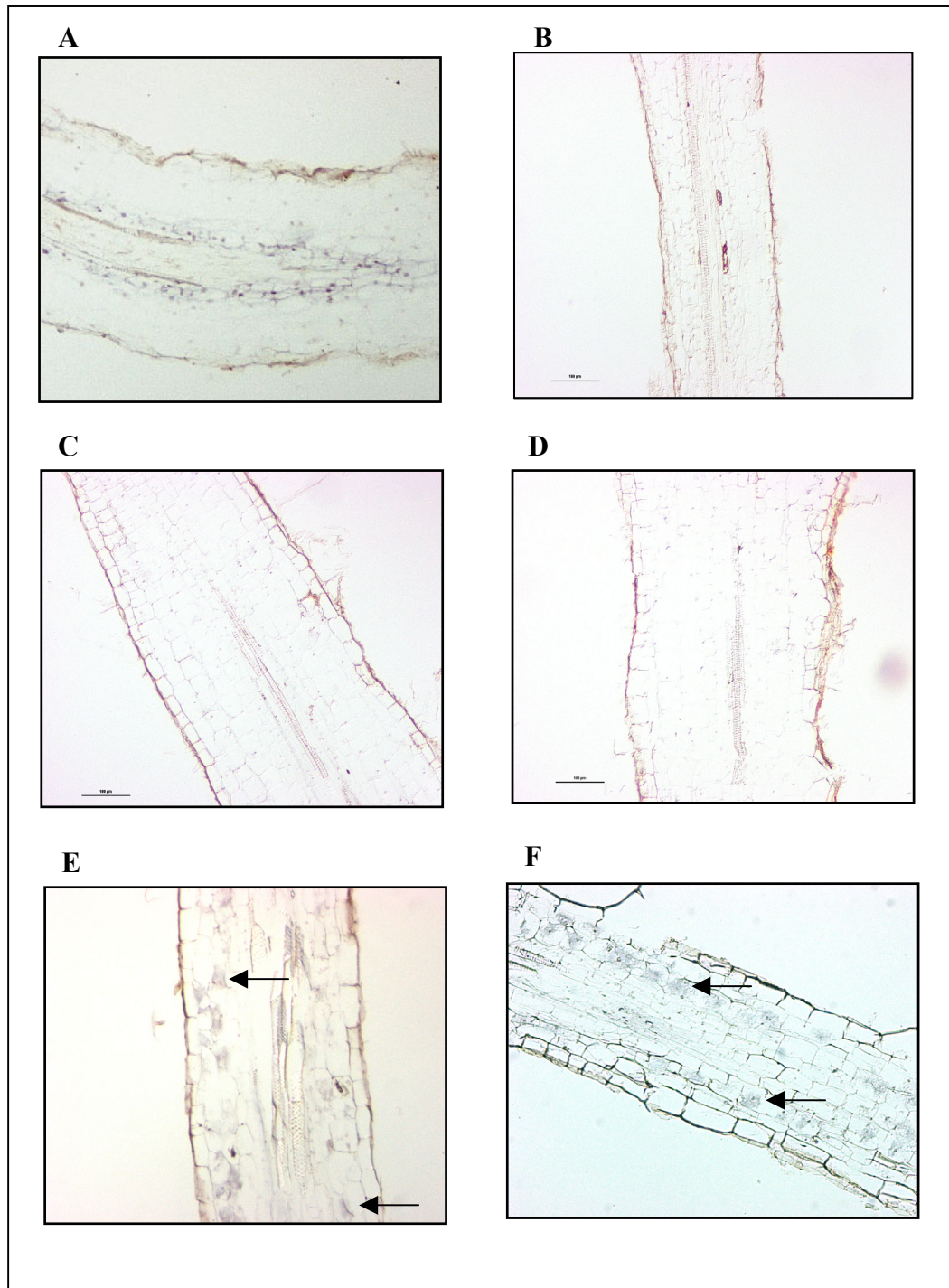
In situ Lokalisation der Transkripte des Metallothioneingens *Lemt2* in Tomatenwurzel-Längsschnitten nicht mykorrhizierter Wurzelbereiche. Diese wurden mit der Dig-markierten Antisense-RNA-Sonde für *Lemt2* (A, B und C) oder der entsprechenden Sense-RNA-Sonde (D) bei 49°C über Nacht hybridisiert. Der Nachweis der hybridisierten Proben-RNA erfolgte mit einem Anti-Dig-Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist (s. Kap. 2.7.6).

Abbildung 48: Lokalisation der Transkripte von Metallothioneingen *Lemt2* durch *In situ*-Hybridisierung in den mykorrhizierten Tomatenwurzeln



In situ Lokalisation der Transkripte des Metallothioneingens *Lemt2* in Tomatenwurzel-Längsschnitten mykorrhizierter Wurzelbereiche. Diese wurden mit der Dig-markierten Antisense-RNA-Sonde für *Lemt2* (A, B und C) oder der entsprechenden Sense-RNA-Sonde (D und E) bei 49°C über Nacht hybridisiert. Der Nachweis der hybridisierten Proben-RNA erfolgte mit einem Anti-Dig-Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist (s. Kap. 2.7.6). Einige Arbuskeln sind durch schwarze Pfeile markiert.

Abbildung 49: Lokalisation der Transkripte von *LeNramp1* durch *In situ*-Hybridisierung in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln



In situ Lokalisation der Transkripte des Nramtransportergens *LeNramp1* in Tomatenwurzel-Längsschnitten mykorrhizierter und nicht mykorrhizierter Wurzelbereiche. Diese wurden mit der Digmarkierten Antisense-RNA-Sonde für *LeNramp1* (A, C und E) oder der entsprechenden sense-RNA-Sonde (B, D und F) bei 49°C über Nacht hybridisiert. Der Nachweis der hybridisierten Proben-RNA erfolgte mit einem Anti-Dig-Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist (s. Kap. 2.7.6). Einige Arbuskeln sind durch schwarze Pfeile markiert.

4 Diskussion

In der Literatur wurden verschiedene Ansätze zur Untersuchung des Einflusses von AM-Pilzen auf das Wachstum der Wirtspflanze unter Schwermetall- und Salzstress beschrieben. Bislang erfolgten vor allem Wachstumsversuche, Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades und Vergleiche der Metallionen-Konzentration in den mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen. In dieser Arbeit hingegen wurde ein molekularbiologischer Ansatz herangezogen. So ist es in dieser Arbeit gelungen, den Einfluß der Mykorrhizierung auf die Expression von Genen zu untersuchen, die möglicherweise eine Rolle bei der Schwermetall- bzw. Salztoleranz bei den Pflanzen spielen.

4.1 Gewinnung von Sonden zu Untersuchungen der Expression von den an Schwermetall- bzw. Salztoleranz beteiligten Genen aus Tomate

Ziel der in Kap. 3.1 dargestellten PCR-Experimente war die Gewinnung von Gensonden, um die Expression der an den Schwermetall- bzw. Salztoleranz beteiligten Genen in der arbuskulären Mykorrhiza zu untersuchen. Vor allem sollten Sonden für eine Phytochelatin synthase-, Metallothionein-, *Nramp*-Transporter-, Aquaporin- und Na^+/H^+ -Antiportergene entwickelt werden.

Zu Beginn dieser Arbeit waren eine Teilsequenz des Phytochelatin synthase-Gens aus Tomate (AW154892) und zwei Sequenzen aus *Arabidopsis* und Mais publiziert. Durch Verwendung eines spezifischen Primers aus einer Tomate-Teilsequenz und eines degenerierten Primer aus den Sequenzen von *Arabidopsis* und Reis konnte mittels PCR ein größeres Segment des publizierten Phytochelatin synthase-Gens aus Tomate (AW154892) amplifiziert werden.

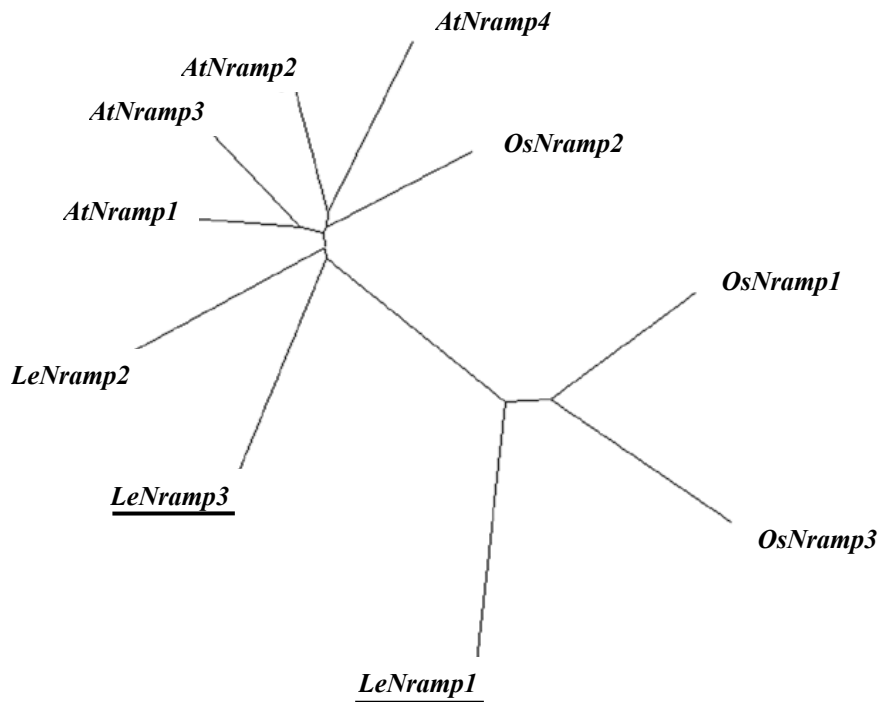
Die Amplifikation von Teilsequenzen der von Giritch et al. (1998) publizierten Metallothioneingene *Lemt1*, *Lemt2*, *Lemt3* und *Lemt4* erfolgte durch Verwendung sowohl von spezifischen als auch von 3'RACE-Primern. Die Aminosäuresequenzen der vier Metallothioneingene weisen das Strukturprinzip der Metallothioneine mit zwei cysteinreichen N- und C-terminalen Bereichen auf. Nach der Verteilung der cysteinreichen Bereiche werden Metallothioneine in Typ 1- und Typ 2-Metallothioneine unterteilt (Robinson et al., 1993). *Lemt1*, *Lemt3* und *Lemt4* zeigen eine charakteristische Verteilung der Cysteine-Reste des Types 2 (Giritch et al., 1998). Das Cystein-Verteilungsmuster des *Lemt2*-Gens, das ein ungewöhnliches Cys-X-Cys-Cys Motiv am C-Terminus besitzt, entspricht weder Typ 1 noch Typ 2 und könnte somit als Vertreter einer bis lang noch nicht beschriebenen Gruppe von Metallothioneinen gelten (Giritch et al., 1998).

Durch Vergleiche der publizierten *Nramp*-Transporter-Sequenzen von *Arabidopsis* und Reis konnten aus den konservierten Bereichen degenerierte Primer entwickelt werden. Die eingesetzten Primer ermöglichten mittels PCR die Amplifikation von zwei 310 bp-langen Segmenten von *Nramp*-Transportergenen aus Tomate *LeNramp1* und *LeNramp3*. In Kombination von spezifischen Primern aus diesen beiden Sequenzen als auch aus einer publizierten 164 bp-langen Nucleotid-Teilsequenz eines *Nramp*-Transportergens aus

Tomate (*LeNramp2*) mit den 3'-RACE-Primern konnten größere Sequenzbereiche der 3' nicht translatierten Bereiche der Gene amplifiziert werden.

Aufgrund der Sequenzvergleiche lassen sich die pflanzlichen Nrampttransporter in zwei Gruppen unterteilen (Williams et al., 2000). Nach Sequenzvergleichen auf AS-Ebene gehört *LeNramp1* zu der Gruppe I und *LeNramp2* und *Nramp3* zu der Gruppe II (s. Abb. 50).

Abbildung 50:



Darstellung der Sequenzverwandtschaften der Nrampttransporter (Teilsequenzen) aus *Arabidopsis AtNramp1* (AC004401), *AtNramp2* (AF141204), *AtNramp3* (AB007645), *AtNramp4* (AL035526), Reis *OsNramp1* (L412117), *OsNramp2* (L81152), *OsNramp3* (U60767) und Tomate *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3*. Bei den unterstrichenen Nrampttransportern *LeNramp1* und *LeNramp3* handelt sich um bisher unbekanntene Gene aus Tomate.

Zur Überprüfung der erhaltenen RACE-Amplifikate aus Nrampttransportergenen wurden Southern-Hybridisierungen mit genomischer DNA aus Tomate durchgeführt. Die Hybridisierungen mit den Sonden *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3*, deren ausreichende Spezifität durch einen Kreuzhybridisierungstest bestätigt werden konnte (s. Kap. 3.4), führten zu unterschiedlichen Signalbandenmustern. Damit wurde gezeigt, daß im Genom von Tomate mindestens drei unterschiedliche, zu Nrampttransportern homologe, Gene vorhanden sind. Die Nrampttransporter-Familie besteht in verschiedenen Pflanzenfamilien aus mehr als zwei Mitgliedern. Bislang wurden drei Mitglieder der Nrampttransporter aus Reis (Belouchi et al., 1997) und sechs aus *Arabidopsis* (Williams et al., 2000) kloniert.

Die genaue Funktion und die Metallionenspezifität der Nrampttransporter *LeNramp1*, *LeNramp2* und *LeNramp3* aus Tomate müßten in weiteren Untersuchungen überprüft

werden. Dafür eignet sich die Untersuchung der Expression dieser Gene unter Schwermetallbelastung, die durch Zusatz von unterschiedlichen Metallen als lösliches Salz gewährleistet ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, die heterologe Expression dieser Gene in einem Metallionentransporter-defizienten Hefemutanten zu überprüfen (Curie et al., 2000).

Für die Aquaporingene aus höheren Pflanzen waren mehrere Sequenzen in den Datenbanken vorhanden. Der Vergleich dieser Sequenzen erlaubte die Herstellung von Primern, die die Amplifikation von Teilsequenzen von Aquaporingen ermöglichen sollten. Aufgrund der hohen Homologie zu bekannten Aquaporinen und aus dem Vorhandensein des für die Aquaporine-Familie charakteristischen AS-Sequenzmotivs NPA (Park und Saier, 1996), gehören die erhaltenen Klone PT3 (*LePIP1*), PT4 (*LePIP2*) und TT2 (*LeTIP*) aus Tomate zu der Aquaporin-Familie. Dieses Sequenzmotiv ist hoch konserviert und spielt möglicherweise eine Rolle beim Wassertransport (Jung et al., 1994). Während PT3 und PT4 auf AS-Ebene eine hohe Homologie zu den Plasmamembran-Aquaporinen zeigten, wies der Klon TT2 eine 100%ige Identität auf Nukleotidebene zu einem Tonoplast-Aquaporin aus Tomate auf.

Die Aquaporine sind multifunktionelle Proteine und können neben Wasser andere Moleküle, Glycerin und Formamid transportieren (Maurel und Chrispeels, 2001). Die genaue Transport-Spezifität der Aquaporingene *LePIP1*, *LePIP2* und *LeTIP* müßte in zukünftigen Versuchen untersucht werden. Hierzu bietet sich das *Xenopus*-Oocyten-System an (Miller und Zhou, 200). Für diesen Ansatz wäre aber eine vollständige Klonierung der cDNA dieser Gene notwendig.

Die spezifischen Primerpaare ISO1/ISO11 und ISO2/ISO22 wurden zu Amplifizierung von Segmenten aus Na⁺/H⁺-Antiportern aus Tomate eingesetzt. Der mit dem Primerpaar ISO1/ISO11 erhaltene Klon HT2 wies auf cDNA-Ebene eine 100%ige Identität zu dem publizierten Na⁺/H⁺-Antiporter gen *NHX1* (AJ306630) aus Tomate auf. Die PCR-Reaktion mit den Primern ISO2 und ISO22 ergab ein Amplifikat HT3, das eine 100%ige Übereinstimmung zu dem Na⁺/H⁺-Antiporter gen *NHX2* (CAC83608) aus Tomate zeigte.

Es sollten Gene der AM-Pilze erfaßt werden, die möglicherweise an der Schwermetall- bzw. Salztoleranz beteiligt sind. Allerdings konnten durch PCR-Experimente unter Verwendung von degenerierten Primern keine Amplifikate erhalten werden, die eine Homologie zu den bekannten pflanzlichen oder pilzlichen Genen aufweisen. Das Fehlen von Amplifikaten in der PCR könnte darin begründet sein, daß die Sequenzen der AM-Pilze möglicherweise sehr unterschiedlich zu den pflanzlichen und pilzlichen Sequenzen sind, die zur Entwicklung von degenerierten Primer einbezogen wurden. Ein weiterer Grund für das Fehlen von Amplifikaten könnte auf eine große Distanz zwischen den beiden eingesetzten Primern, möglicherweise durch das Vorhandensein von langen Intronsequenzen, zurückgeführt werden.

4.2 Einfluß der Mykorrhizierung auf die Schwermetalltoleranz von Tomatenpflanzen

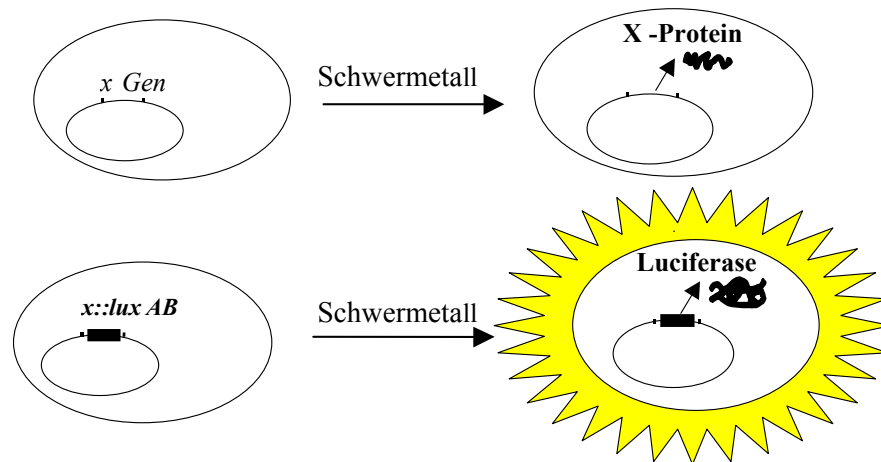
4.2.1 Bestimmung der Schwermetallverfügbarkeit im Boden mittels *Lux*-Reporter-System

Im Boden liegen Schwermetalle sowohl in der wässrigen Phase als auch in Adsorptionskomplexen vor. Die toxische Wirkung dieser Metalle hängt von ihrer Bioverfügbarkeit ab. Diese ist definiert als die Fähigkeit der Ionen aus dem Boden zu den lebenden Organismen transferiert zu werden (Juste, 1988). Die Bioverfügbarkeit der Metallionen hängt sowohl von deren Gesamtkonzentration als auch von physiko-chemischen (pH, Redoxpotential, organisches Material) und biologischen (Biosorption, Bioakkumulation) Faktoren ab (Berthelinet al., 1995).

Zur Ermittlung der Bioverfügbarkeit von Metallen im Boden sind, neben chemischen Extraktionsverfahren, biologische Methoden mit Mikroorganismen als Biosensoren von großer Bedeutung (Hertz, 1991). Metallspezifische Biosensorverfahren auf der Basis der Biolumineszenz-Reporter-Systeme wurden von verschiedenen Autoren entwickelt und verwendet (Van der Lelie et al., 1994; Brown et al., 1998; Corbisier et al., 1999). Dieses Verfahren beruht auf der Fähigkeit bestimmter Enzyme, Photonen als Nebenprodukte ihrer Reaktionen zu emittieren. Bekannt ist dieser Vorgang als Biolumineszenz. Die bakterielle Luciferase ist ein solches Enzym. Sie katalysiert die Oxidation des reduzierten FMNH₂ (Flavinmononukleotid) und eines aliphatischen Aldehydes mit molekularem Sauerstoff [$\text{FMNH}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FMN} + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{h.v (490 nm)}$]. Die bakterielle Luciferase ist ein heterodimeres Enzym. Neben den strukturellen Genen *lux A* und *lux B*, die die Untereinheiten α und β kodieren, sind drei weitere Gene (*lux C*, *D* und *E*) bei allen Lumineszenz-Bakterien gefunden worden.

Die Schwermetallresistenz bei Bakterien wird in manchen Fällen durch Metalle induziert. Diese Resistenzgene werden unter Schwermetallbelastung aktiviert und verleihen den Bakterien eine Resistenz gegen Schwermetalle. Eine Vielzahl solcher Gene ist bei verschiedenen Bakterien identifiziert worden und kann der Detektion von Schwermetallen dienen.

Die *lux*-Gene werden, wenn sie hinter die Promotoren der Schwermetallgene eingebaut sind, in Anwesenheit von Metallen transkribiert und die Reaktion wird ausgelöst (Abbildung 51). Die Aktivität der Luciferase kann danach in einem Lumineszenz-Test gemessen werden und ist proportional zum Schwermetallgehalt.

Abbildung 51 :

Darstellung des *Lux*-Reporter-Systems für die Bestimmung der Bioverfügbarkeit der Schwermetalle. X: = Schwermetallresistenz-Gen, *luxAB*: = Luciferase-Gene.

Zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Zink, Pb und Ni wurden Bodenproben aus Breinigerberg und Mechernich mittels des *lux*-Reporter-System-Verfahrens untersucht. Die *lux*-Konstrukte sind in *Ralstonia eutropha* Stämme eingebaut. Die Konzentration an verfügbarem Pb im Boden aus Mechernich erwies sich als sehr hoch (991 mg/Kg Boden) im Vergleich zur Breinigerbergerde (59 mg/Kg Boden). Die Werte an verfügbarem Zink und Nickel waren in der Mechernicherde ebenfalls höher als in dem Boden aus Breinigerberg.

4.2.2 Einfluß der Mykorrhizierung auf das Wachstum von Tomatenpflanzen unter Schwermetallbelastung

Zur molekularbiologischen Untersuchung des Einflusses der AM-Pilze auf das Wachstum der Tomatenpflanzen unter Schwermetallstress wurde *Glomus intraradices* BrI eingesetzt. Dieser AM-Pilz, der in der Lage ist, die Schwermetalltoleranz auf die Wirtspflanze zu übertragen (Hildebrandt et al., 1999), wurde aus den Wurzeln des Galmeiveilchens (*Viola calaminaria*) aus dem Schwermetallstandort Breinigerberg isoliert. Die Schwermetallbelastung der Tomatenpflanzen wurde entweder durch Zusatz von Schwermetallen (CdCl_2) als lösliches Salz oder durch Verwendung von Schwermetallerde vom Standort Breinigerberg und Mechernich gewährleistet. Der Einsatz von Schwermetallerde bietet die Möglichkeit, die Komplexbildung von Schwermetallen mit anderen Bodenbestandteilen berücksichtigen zu können. Die Verwendung von CdCl_2 hat den Vorteil, gezielt den Einfluß dieses Metalles auf die Expression der ausgewählten Gene, mit und ohne den AM-Pilz, zu untersuchen. Cadmium ist eines der mobilsten Schwermetalle im Boden. Direkte Folgen der Cd-Belastung sind eine Störung des Ionengleichgewichts der Zellen und die Änderung der Permeabilität der Plasmamembran

für Ionen und Wasser (Williams et al., 2000). Cadmium ist besonders durch seine Bindung an Protein und seine hohe Affinität zu SH-Gruppen sehr giftig. Entsprechend führen hohe Cadmium-Gehalte in der Zelle zur Inaktivierung von Enzymen mit SH-haltigen reaktiven Gruppen und zur Proteindenaturierung (Das et al., 1997). Als weitere Folgen von Cd-Stress wurden eine Abnahme der Chlorophyll-Synthese, Hemmung der Rubisco-Aktivität im Calvin-Zyklus, ein Abbau der inneren Chloroplastenstruktur und eine Verringerung der Aktivität vom Photosystem I und II (Siedlecka et al., 1997; Krupa et al., 1993; Siedlecka und Krupa, 1996) beobachtet.

Bei der Kultivierung der Tomatenpflanzen in Breinigerberg- und Mechernicherde, mit und ohne *Glomus intraradices* BrI, wurden die Pflanzen regelmäßig mit Hoagland-Nährlösung gedüngt und somit, mit Ausnahme von Phosphat, optimal mit Nährstoffen versorgt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eine deutliche Stimulierung des Wachstums von mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Schwermetallbelastung im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.

In einem von Hildebrandt et al. (1999) durchgeführten Versuch konnte ebenfalls eine Stimulierung des Pflanzenwachstums mit der Mykorrhizierung festgestellt werden. Dabei führte die Inokulation von verschiedenen Pflanzen (Mais, Gerste, *Medicago*) mit *Glomus intraradices* BrI und *Glomus intraradices* Sy 167 zu einer deutlichen Erhöhung des Wachstums von mykorrhizierten Pflanzen in schwermetallbelasteter Erde aus Breinigerberg und Mechernich im Vergleich zu nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen. Derart deutliche positive Effekte der Mykorrhizierung auf das Pflanzenwachstum unter Schwermetallstress traten bei den von Weissenhorn et al. (1995) durchgeführten Versuche mit *Zea mays* und zwei *Glomus mosseae*-Isolaten nicht auf, wobei die erzielten Mykorrhizierungsgrade mit maximalen 37% relativ niedrig waren. Sowohl die in dieser Arbeit verwendete Inokulationsmethode als auch die optimale Düngung der Pflanzen führten zu relativ hohen Mykorrhizierungsgraden (bis zu 79%) der Tomatenpflanzen unter Schwermetallstress.

Im Cadmium-Versuch trat eine Frischgewichtsreduzierung mit steigender Cd-Konzentration sowohl bei den mykorrhizierten als auch bei den nicht mykorrhizierten Pflanzen auf. Dabei ist aber ein Stimulierungseffekt des Pflanzenwachstums mit der Mykorrhizierung deutlich feststellbar. Das Gesamtfrischgewicht der nicht mykorrhizierten Pflanzen liegt um etwa 73% (bei 0,5 mM) und 81% (bei 1mM) niedriger als ohne Cd-Belastung. Im Gegensatz dazu zeigen die mykorrhizierten Pflanzen nur eine 19%ige (bei 0,5 mM) bzw. 62%ige (bei 1mM) Reduzierung des Gesamt-Frischgewichts. Eine Abnahme der Mykorrhizierungsgrade mit steigender Cd-Konzentration (Weissenhorn und Leyval, 1995; Gildon und Tinker, 1983) trat nicht auf. Dies könnte auf eine hohe Cadmium-Toleranz der verwendeten *Glomus intraradices* BrI und auf die optimale Nährstoffversorgung der Versuchspflanzen zurückgeführt werden.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen zeigen Vergleiche der Werte vom Frischgewicht von mykorrhizierten und Kontrollpflanzen einen deutlichen positiven Einfluß der Mykorrhizierung auf das Wachstum der Wirtspflanze unter Schwermetallstress. Dieses verbessertes Wachstum der Tomatenpflanzen durch die Mykorrhizierung trat sowohl bei der Anzucht der Pflanzen in der Schwermetallerde (Breinigerberg, Mechernich) als auch unter Cadmium-Belastung auf. Es ist möglich, daß durch die Mykorrhizierung die Aufnahme der Schwermetalle verhindert wird, oder die aufgenommenen Me-

talle in den mykorrhizierten Wurzeln zurückgehalten werden und nicht zu dem oberirdischen Teil der Pflanze weiter transportiert werden, was zu einer Wachstumsstimulierung der Wirtspflanze beitragen könnte. Dabei könnte der symbiotische Pilz die Schwermetalle komplexieren oder aber eine Komplexbildung durch die Wirtspflanze induzieren, indem er die Expression von pflanzlichen Genen beeinflusst, die eine mögliche Rolle bei der Schwermetalltoleranz spielen.

4.2.3 Expression der Nrampttransportergene aus Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza unter Schwermetallbelastung

Nramp-Proteine bilden eine große Metallionentransporter-Familie, die sowohl bei Bakterien, Pilzen und höheren Pflanzen konserviert ist (Cellier et al., 1995; 1996). Meist wurde ihnen eine Rolle beim Eisen- und Mangan-Transport zugeschrieben (Fleming et al., 1998; Forbes und Gros, 2001; Kehres et al., 2000). Darüber hinaus sind sie in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Metallionen (Nickel, Zink, Kupfer, Kobalt und Cadmium) zu transportieren (Gunshin et al., 1997; Chen et al., 1999). Bei der Hefe wurden drei Nramptransportergene (*SMF1*, *SMF2* und *SMF3*) identifiziert (Supek, 1996; Portnoy et al., 2002). Das SMF1-Protein (suppressor of mitochondria import function) ist in der Plasmamembran lokalisiert und wurde ursprünglich als high-affinity Mangan-Transporter charakterisiert (Supek, 1996). Spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß Fe, Mn, Zn, Cd, Co und Cu als Substrate für dieses Protein fungieren können (Liu et al., 1997). SMF2 ist in der Membran von intrazellulären Vesikeln lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Mangan-Mobilisierung im Cytoplasma (Cohen et al., 2000; Luk und Culotta, 2001). Beide Gene, *SMF1* und *SMF2*, werden durch Mangan- und Eisen-Mangel induziert (Liu und Colotta, 1999; Portnoy et al., 2000). SMF3-Protein ist im Tonoplasten lokalisiert, und das *SMF3*-Gen wird unter Eisen-Mangel induziert (Portnoy et al., 2000). Bei den höheren Pflanzen waren die Untersuchungen von Nramptransportergenen bislang auf Reis und *Arabidopsis* beschränkt. Die Funktion der Nrampproteine aus *Arabidopsis* bei dem Transport von Metallionen ist in unterschiedlichen Untersuchungen gezeigt worden (Alonso et al., 1999; Curie et al., 2000; Thomine et al., 2000). Die Fähigkeit, Mangan und Eisen zu transportieren, wurde für *AtNramp1*, 3 und 4 aus *Arabidopsis* durch heterologe Expression in Mangan- und Eisentransporterdefizienten Hefemutanten nachgewiesen (Curie et al., 2000; Thomine et al., 2000). Darüber hinaus führt die heterologe Expression von *AtNramp1*, 3 und 4 in der Hefe zu Cd-Sensitivität, Cd-Aufnahme und Akkumulation (Thomine et al., 2000). Dies deutet daraufhin, daß diese Nramptransporter aus *Arabidopsis* eine Vielzahl von Metallionen transportieren können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Transkripte des Nramptransportergens *LeNramp1* durch Northern-Analysen nur in Wurzel-RNA nachgewiesen werden. Für *LeNramp2* und *LeNramp3* dagegen wurden Hybridisierungssignale sowohl mit Wurzel- als auch mit Blatt-RNA erhalten. Eine organspezifische Expression der pflanzlichen Nramptransportergene wurde bei *Arabidopsis* und Reis festgestellt. Belouchi et al. (1997) konnten mittels Northern-Analysen Transkripte von *OsNramp1* hauptsächlich in der Wurzel, Transkripte von *OsNramp2* in Blatt und von *OsNramp3* gleichmäßig in Wurzel und Blatt-RNA nachweisen. *AtNramp1* aus *Arabidopsis* ist überwiegend in der Wurzel exprimiert, während die Transkripte von *AtNramp3* und 4 gleichermaßen in

Wurzel- und Blatt-RNA nachgewiesen wurden (Thomine et al., 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte sowohl in den Northern-Analysen als auch in der quantitativen Real-Time PCR eine deutliche Reduktion der Transkripte von *LeNramp1* und *LeNramp2* mit der Mykorrhizierung in Breinigerbergerde beobachtet werden. Unter Cadmiumstress lassen die Northern-Ergebnisse keine relevanten Unterschiede der Transkriptmengen von *LeNramp1* und *LeNramp2* zwischen mykorrhizierten und Kontrollpflanzen erkennen. Für *LeNramp3* wurden keine Unterschiede der in den Northern-Analysen erhaltenen Signalstärken zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen, weder in dem Boden aus Breinigerberg noch unter Cd-Belastung festgestellt. Möglicherweise könnte diese mit der Mykorrhizierung herunterregulierte Expression dieser Gene zu einer Einschränkung der Metallaufnahme durch die Wurzel führen, und somit eine gesteigerte Schwermetalltoleranz der Wirtspflanze ermöglichen. In *Arabidopsis* führt das Ausschalten des *AtNramp3* Gens zu einer gesteigerten Cd-Toleranz, während dessen Überexpression zu einer zunehmenden Cd-Sensitivität führte (Thomine et al., 2000).

Eine ähnliche Reduzierung der Transkriptmenge wie bei *LeNramp1* und 2 in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung wurde von Burleigh und Bechmann (2002) für einen Zink-Transporter aus *Medicago truncatula* beschrieben. Hier wurde die Expression dieses Gens unter Zink-Düngung in den mykorrhizierten Wurzeln herunterreguliert. Es wäre auch möglich, daß der Transport von Metallionen in der Symbiose unter Metallstress im wesentlichen vom AM-Pilz übernommen werden könnte und somit durch diese veränderte Nährstoffsituation in den mykorrhizierten Pflanzen die direkte Aufnahme über die Wurzeln reduziert werden könnte. Die Klonierung eines pilzlichen Phosphattransporters aus *Glomus versiforme* (Harrison und Buuren, 1996) zeigte, dass die Transkripte dieses Gens auf das externe Pilzmyzel beschränkt sind. So scheint dieser Transporter im wesentlichen für die Phosphataufnahme in den Pilz zuständig zu sein. Parallel dazu werden Phosphattransporter von *Medicago truncatula* in den mykorrhizierten Wurzeln herunterreguliert (Liu et al., 1998). So scheint die direkte Aufnahme über die Wurzeln reduziert zu sein (Harrison, 1999).

Die zur Transkriptlokalisierung des Gens *LeNramp1* durchgeführten RNA-*In situ*-Hybridisierungen erfolgten mit Tomatenwurzeln von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen, die in Breinigerbergerde angezogen wurden. Bei der Hybridisierung mit der Antisense-Sonde für *LeNramp1* wurden Signale in den nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln festgestellt, die in unmittelbarer Umgebung des Zentralzylinders lokalisiert sind. In den mykorrhizierten Wurzeln konnten keine Transkripte des Nrampttransportergens *LeNramp1* nachgewiesen werden. Dies könnte möglicherweise auf eine nicht ausreichende Sensitivität der verwendeten Detektion-Methode zurückgeführt werden. Das Fehlen von Signalen in den mykorrhizierten Wurzeln erlaubte keine Aussagen über eine mögliche Akkumulation von Transkripten des *LeNramp1*-Gens in den Arbuskeln-enthaltenden Zellen, wie es für das Phosphattransportergen *LePT1* aus Tomate beobachtet wurde (Rosewarne et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit zeigen die Versuchsergebnisse der Northern-Analysen eine organspezifische Expression der Nrampttransportergene aus Tomate, was möglicherweise daraufhin deutet, daß sie unterschiedliche Metallionen transportieren, die für bestimmte physiologische Prozesse in den unterschiedlichen Teilen der Pflanze benötigt

werden (Williams et al, 2000). Die Reduzierung der Transkriptmenge der Gene *LeNramp1* und *LeNramp2* in der Wurzel und die Vermutung der Übernahme der Metallion-Aufnahme unter Metallstress durch den AM-Pilz würde implizieren, daß parallel zu der Reduzierung der pflanzlichen Metallionentransporter eine Verstärkung der Expression der entsprechenden pilzlichen Gene zu erwarten wäre. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit erlauben keine Aussage zur Expression der pilzlichen Metallionentransporter, da die PCR-Experimente mit den entwickelten degenerierten Primern in keinem Fall zur Amplifikation von Genbereichen führte, die eine Homologie zu den publizierten Sequenzen von Metallionentransportern aufwies. Weitere Ansätze wie der „differential display“ und die Erstellung von subtraktiven cDNA-Banken, ausgehend von Pilzmaterial mit und ohne Schwermetalle, könnten zur Identifizierung von pilzlichen Genen beitragen.

4.2.4 Expression der Metallothioneingene aus Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza unter Schwermetallbelastung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Transkripte des Metallothioneingens *Lemt2* durch Northern-Analysen nur in Wurzel-RNA nachgewiesen werden. Bei *Lemt1*, *Lemt3* und *Lemt4* wurden Hybridisierungssignale sowohl mit Wurzel- als auch mit Blatt-RNA erhalten. Vergleichbare Resultate wurden von Giritch et al. (1998) publiziert. Dort wurden mittels Northern-Analysen Transkripte von *Lemt2* ausschließlich mit Wurzel-RNA aus Tomate erhalten, während Transkripte von *Lemt1*, *Lemt3* und *Lemt4* in Wurzel und Blatt nachgewiesen wurden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Northern-Analysen lassen für *Lemt1*, *Lemt3* und *Lemt4* keine deutlichen Unterschiede der erhaltenen Signalstärken zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen unter Schwermetallbelastung feststellen. Im Gegensatz dazu wird die Transkriptmenge von *Lemt2* mit der Mykorrhizierung in der Schwermetallerde aus Breinigerberg etwa um den Faktor 12 reduziert. Diese deutliche Herabsetzung der Transkriptmenge des *Lemt2*-Gens in der schwermetallbelasteten Erde aus Breinigerberg konnte ebenso durch die quantitativen Real-Time PCR bestätigt werden.

Unter Cadmium-Stress wurde das Gen *Lemt2* in Abhängigkeit von der ansteigenden Cd-Konzentration sowohl in den mykorrhizierten als auch in den nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln induziert. Giritch et al. (1998) konnten eine differentielle Expression des *Lemt2* Gens unter Einfluß von Schwermetallen nachweisen: *Lemt2* wurde durch Mangan und Zink hochreguliert, während Kupfer zu einer Reduzierung der Transkriptmenge dieses Gens führte. Die Regulation der Expression von Metallothioneingenen durch Metalle wurde von mehreren Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Pflanzen untersucht. Bei *Mimulus guttatus* und *Glycine max* wurde unter Schwermetallstress eine Reduzierung der Transkripte von Metallothioneingenen festgestellt (De Miranda et al., 1990; Kawashima et al., 1991). Im Gegensatz dazu wurden Metallothioneingene aus Weizen (Snowden und Gardner, 1993), Erbse (Robinson et al., 1993), *Arabidopsis* (Zhou und Goldsbrough, 1994) und Reis (Hsieh et al., 1995) durch Schwermetallbelastung induziert. Foley und Singh (1994) fanden keinen signifikanten Einfluß von Kupfer, Zink und Cadmium auf die Expression eines Metallothioneingens aus *Vicia faba*.

Ein vergleichbares Ergebnis hinsichtlich des Einflusses der Mykorrhizierung auf die

Expression von *Lemt2* wie beim Breinigerberg-Versuch, trat unter der Cd-Belastung deutlich bei der höchsten Cd-Konzentration (1mM) auf. Bei dieser Konzentration ist die Transkriptmenge des *Lemt2*-Gens mit der Mykorrhizierung um den Faktor 2,7 herunterreguliert. Es besteht daher die Möglichkeit, daß *Glomus intraradices* BrI die Schwermetalle durch Komplexbildung zurückhält und somit ihre toxische Wirkung und ihre Translokation zu Wurzel und Sproß reduzieren. Diese Möglichkeit wird durch Ergebnisse von Schüepp et al. (1987), Turnau et al. (1993) und Kaldorf et al. (1999) untermauert. Die von Kaldorf et al. (1999) durchgeführten Elementmikroanalysen von in Breinigerbergerde gewachsenen mit *Glomus intraradices* BrI inokulierten Maiswurzeln, ergab eine Anreicherung der Schwermetalle vor allem in den pilzstrukturenhaltenden Wurzelzellen. Die Metallkonzentration in den mykorrhizierten Maiswurzeln und vor allem in dem Zentralzylinder waren gegenüber den Kontrollpflanzen geringer, wo die Anreicherung der Schwermetalle in den inneren Cortexbereichen und im Zentralzylinder stattfand. Möglicherweise durch die Filterfunktion des AM-Pilzes findet in der pflanzlichen Zellen keine hohe Anreicherung der Metalle und somit keine Induktion der Gene statt, die eine Rolle in der Schwermetalldetoxifikation und Komplexbildung spielen können.

Die zur Transkriptlokalisierung des Gens *Lemt2* durchgeführten *In situ*-Hybridisierungen erfolgten mit Wurzeln von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen, die in Breinigerbergerde angezogen wurden. Die *In situ*-Hybridisierung mit der Antisense-Sonde für *Lemt2* bestätigte die Northern-Analysen. In den Wurzeln der mykorrhizierten Pflanzen ist die Expression des *Lemt2* Gens im Vergleich zu den Kontrollpflanzen deutlich niedriger. Die Signale bei den mykorrhizierten Wurzeln sind auf einige Rindenparenchymzellen beschränkt. In unmittelbarer Nähe der pilzlichen Arbuskeln traten keine Signale auf. Bei den Wurzeln der Kontrollpflanzen waren deutliche Signale im Bereich des Rindenparenchyms und der Rhizodermiszellen zu erkennen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte erhöhte Transkriptmenge des *Lemt2* Gens in Abhängigkeit von der ansteigenden Cd-Konzentration spricht für eine mögliche Rolle des Gens in der Schwermetalltoleranz bei Tomate. Bei der deutlichen Reduzierung der Expression von *Lemt2* mit der Mykorrhizierung unter Schwermetallbelastung wäre eine Induzierung der Expression der entsprechenden pilzlichen Gene zu erwarten. Bislang sind nur zwei Metallothioneingene von AM-Pilzen bekannt (Stommel et al., 2001; Lanfranco et al., 2002). Die Expression des Metallothioneingens aus *Gigaspora rosea* (Stommel et al., 2001) wurde bislang nicht untersucht. Lanfranco et al. (2002) konnten ein Metallothioneingen *GmarMTI* aus dem AM-Pilz *Gigaspora margarita* identifizieren (2002). Ohne Schwermetallstress wird das Gen *GmarMTI* sowohl in den presymbiotischen Sporen als auch im symbiotischen Myzeln konstitutiv exprimiert. Die Transkriptmenge des Gens wird unter Cu-Stress nur in den mykorrhizierten Wurzeln hochreguliert, während dessen Expression in den presymbiotischen Sporen unverändert bleibt. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche spezifische Expression des pilzlichen Gens in den intraradikalen Hyphen durch Anreicherung von Schwermetallen sein. Hierbei könnte das Anziehen von mykorrhizierten Pflanzen unter Schwermetallstress in einem Kompartiment-System, das aus einem Wurzel- und einem Hyphen-Kompartiment besteht und somit die Isolierung von extraradikalen Hyphen ermöglicht, verwendet werden, um die Expression des Gens in den extraradikalen und intraradikalen Hyphen vergleichen zu können. Dieser Vergleich erlaubt es, eine mögliche differentielle Expression in den

intra- und extraradikalen Hyphen festzustellen und somit eine Schutzfunktion des Pilzes innerhalb der Wurzel aufklären zu können.

4.2.5 Expression des Phytochelatin synthasegens aus Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza unter Schwermetallbelastung

Phytochelatine (PC) sind eine Familie metallkomplexierender Peptide. Ihre Synthese wird bei Pflanzen durch Schwermetalle wie, Cd, Ni, Cu, Zn und Pb induziert (Rauser, 1995; Cobbett, 2000). Es wurde durch biochemische und genetische Verfahren bestätigt, daß Glutathion (GSH) als Substrat für die PC-Biosynthese fungiert (Rauser, 1995; 1999; Zenk, 1996). Glutathion wird aus einem Glutamylrest, einem Cysteinylrest und Glycin in zwei Reaktionsschritten synthetisiert. Diese Synthese wird durch zwei Enzyme, die γ -Glu-Cys-Synthetase und die Glutathion-Synthetase katalysiert. GSH-defiziente *Arabidopsis*-Mutanten zeichnen sich durch das Fehlen der PC-Biosynthese und ihre Cd-Sensitivität aus (Cobbett et al., 1998). Die Reaktion der PC-Synthese aus Glutathion wird durch das Enzym Phytochelatin synthase (PCS) katalysiert (Grill et al., 1989). Das Enzym wird durch viele Metalle wie Cd, Ag, Pb, Cu, Hg, Zn aktiviert (Grill et al., 1989; Maitani et al., 1996), wobei Cd als der effektivste Aktivator beschrieben wird (Cobbett, 2000). In vielen Untersuchungen wurde die Funktion der Phytochelatin synthase in Schwermetall- und besonders Cd-Toleranz beschrieben (Clement et al., 1999; Ha et al., 1999). Heterologe Expression des PCS-Gens aus *Arabidopsis* in der Hefe führt zu einer gesteigerten Schwermetalltoleranz und zu Cd-abhängiger intrazellulärer Akkumulation von Phytochelatinen (Vatamaniuk et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Transkripte des *LePCS*-Gens aus Tomate durch Northern-Analysen sowohl in Wurzeln als auch in Blättern nachgewiesen werden. Eine Induktion der Expression des Gens wurde unter Schwermetallbelastung nicht beobachtet. Dies steht im Einklang mit dem von einigen Arbeiten beschriebenen Befund, daß das PCS-Gen konstitutiv exprimiert wird und die Menge des Enzymes unter Cd-Belastung unverändert bleibt (Grill et al., 1989; Klapheck et al., 1995). Vatamaniuk et al. (2000) konnten unter verschiedenen Cd- und Cu-Konzentrationen keine Unterschiede in der Expression des PCS-Gens *AtPCS1* aus *Arabidopsis* feststellen. Interessanterweise zeigten RT-PCR-Analysen des Phytochelatin synthase-Gens aus Weizen eine Heraufregulierung der Expression des Gens unter Cd-Belastung (Clemens et al., 1999). Dies könnte darauf schließen lassen, daß bei manchen Pflanzen die Regulation der Phytochelatin synthase sowohl auf der transkriptionalen als auch auf der posttranslationalen Ebene stattfinden könnte.

Aus den Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Northern-Analysen ergab sich unter Schwermetallbelastung kaum ein Einfluß der Mykorrhizierung auf die Expression des PCS-Gens. Weder in den Wurzeln noch in den Blättern konnte durch den Vergleich der erhaltenen Signalstärken bei der Hybridisierung mit der Sonde *LePCS* mit RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen, die in Breinigerbergerde angezogen wurden, ein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Dies könnte auf das Fehlen von hoher Cd-Konzentration in dem Boden aus Breinigerberg, der im wesentlichen einen hohen Zink-Gehalt aufweist, zurückgeführt werden. Allerdings wurden unter Cd-Belastung ebenso keine Unterschiede in der Expression des PCS-Gens zwi-

schen mykorrhizierten und Kontrollpflanzen festgestellt. Möglicherweise spielt die transkriptionale Regulation des Phytochelatinsynthase-Gens *LePCS* unter den angegebenen Versuchsbedingungen keine Rolle bei der Schwermetalltoleranz.

4.3 Einfluß der Mykorrhizierung auf die Salztoleranz von Tomatenpflanzen

4.3.1 Einfluß der Mykorrhizierung auf das Wachstum von Tomatenpflanzen unter Salzstress

Die Mykorrhizierung von Pflanzen in den Salzstandorten durch AM-Pilze (Sengupta und Chaudhuri, 1990; Hildebrandt et al., 2001) und die Charakterisierung von AM-Sporen, deren überwiegende Zahl zu *Glomus geosporum* gehören, aus den Böden unterschiedlicher Salzstellen (Hildebrandt et al., 2001; Carvalho et al., 2001; Landwehr et al., 2002) sind Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von AM-Pilzen und besonderes *Glomus geosporum* an der Salztoleranz der Wirtzpflanze.

Um einen möglichen positiven Einfluß des symbiotischen AM-Pilzes auf die Wirtspflanzen unter Salzstress untersuchen zu können, wurden Tomatenpflanzen mit und ohne *Glomus geosporum*-Mischinokulum unter drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (s. Kap. 2.1.3.2) kultiviert. Die mit der höchsten Salzkonzentration (12 g NaCl/l Bodensubstrat) angezogenen Tomatenpflanzen waren innerhalb einer Woche abgestorben und daher konnten aus diesem Ansatz keine Daten ermittelt werden. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ließ sich durch Vergleich der ermittelten Frischgewichte zwischen den mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Versuchspflanzen bei der 8 g NaCl-Konzentration keine Wachstumsstimulierung durch die Mykorrhizierung erkennen.

In der Literatur sind mehrere Ansätze zur Untersuchung des Einflusses von AM-Pilzen auf das Wachstum der Wirtspflanze unter Salzstress beschrieben. Der von Al-Karaki et al. (2001) durchgeführte Versuch mit Tomatenpflanzen und *Glomus mosseae* als Inokulum zeigte einen positiven Effekt der Mykorrhizierung auf das Wachstum der Wirtspflanzen unter ansteigender Salzbelastung (0, 2, 4 g/l NaCl). Vergleichbare Resultate wurden von Ruiz-Lozano und Azcon (1995), Gupta und Krishnamurthy (1996) publiziert. Cantrell und Linderman (2001) zeigten, daß mykorrhizierte Kopfsalatpflanzen, die unter Salzstress kultiviert waren, im Vergleich zu den nicht mykorrhizierten Pflanzen erhöhte Sproßtrockengewichte aufwiesen. Es wäre durchaus denkbar, daß dieser positive Effekt der Mykorrhizierung auf die Pflanze unter Salzstress von verschiedenen Faktoren wie der Wirtspflanze, der verwendeten AM-Pilze und der ausgewählten Versuchsbedingungen (Bodensubstrat, Licht, Temperatur, Salzkonzentration) abhängig sein könnte. Der im Versuch eingesetzte *Glomus geosporum*-Mischinokulum enthält, vermutlich durch eine Kontamination im Gewächshaus, im wesentlichen *Glomus intraradices* Sy167. Wichtig wäre in einem erneuten Versuch ein reines *Glomus geosporum*-Inokulum einzusetzen.

Bei salzemfindlichen Pflanzen tritt eine Beeinträchtigung des Wachstums ab einer Salzkonzentration von etwa 2g/l Bodensubstrat ein (Larcher, 1994). Da die 8 g NaCl-Konzentration keinen Effekt auf das Wachstum der Tomatenpflanzen zeigte, wäre denkbar, daß

der eingesetzte Tomatenkultivar salztolerant sein könnte. Daher sollten in einem weiteren Versuch höhere Salzkonzentrationen eingesetzt werden, die in einem Bereich zwischen 8 und 11g NaCl/l Bodensubstrat liegen, da die höchste eingesetzte NaCl-Konzentration (12g NaCl/l) zum Absterben der Pflanzen geführt hat.

4.3.2 Expression von Aquaporinen *LePIP1*, *LePIP2* und *LeTIP* aus Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza unter Salzstress

Aquaporine sind integrale Membranproteine und gehören zu der MIP (major intrinsic protein)-Protein-Familie (Heymann und Engel 1999). Diese Kanäle erleichtern den Wassertransport durch die Membran (Weig et al., 1997; Schäffner, 1998). Manche Aquaporine sind in der Lage neben Wasser auch andere osmokompatible Stoffe zu transportieren (Maurel und Chrispeels, 2001). Das erste pflanzliche Aquaporinprotein mit breiter Spezifität war NOD26, das neben Wasser auch Glycerin und Formamid transportieren kann (Rivers et al., 1997). Bei Tabak wurden zwei nicht für Wasser spezifische Aquaporine identifiziert. Nt-AQP1 ist an der Plasmamembran lokalisiert und transportiert Wasser, Glycerol und Harnstoff (Biela et al., 1999). Das Tonoplast-Aquaporinprotein Nt-TIPa transportiert neben Wasser und Glycerin hauptsächlich Harnstoff (Gerbeau, 1999).

Die Salzbelastung in der Zelle führt zu einem Ungleichgewicht im Wasserhaushalt der Pflanze. Salinitätsstress ist damit zugleich Dehydratationsstress. Durch ihre Funktion bei der Kontrolle des Wassertransportes können Aquaporine die Wasseraufnahme durch die Wurzel regulieren und somit zu einer möglichen gesteigerten Salztoleranz bei der Pflanze beitragen (Bohnert und Jensen, 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Transkripte der Aquaporingene *LePIP1*, *LePIP2* und *LeTIP* aus Tomate durch Northern-Analysen sowohl in Wurzel- als auch in Blatt-RNA aus Tomate nachgewiesen werden. Die Expression der *LePIP1*, *LePIP2* und *LeTIP* Gene ist bei den Kontrollpflanzen (nicht mykorrhiziert und ohne Salzbelastung) in den Wurzeln höher als in den Blättern. Eine organspezifische differentielle Expression wurde ebenso für drei Aquaporingene *NeMip1*, *NeMip2* und *NeMip3* aus *Nicotiana excelsior* festgestellt (Yamada et al., 1997). Während die Akkumulation der mRNA von *NeMip1* und *NeMip2* überwiegend in den Wurzeln auftrat, war die Transkriptmenge von *NeMip3* in der Blatt-RNA höher als in der Wurzel-RNA.

Unter Salzstress weisen *LePIP1*, *LePIP2* und *LeTIP* bei nicht mykorrhizierten Pflanzen unterschiedliche Expressionsmuster auf. In den Wurzeln führt der Salzstress (8g NaCl/l) zu einer Reduzierung der Transkriptmenge von *LePIP1* und *LeTIP*, während die Expression der *LePIP2* unverändert bleibt. Im Blatt wurde eine Herabsetzung der Transkriptmenge von *LePIP2* unter Salzbelastung festgestellt. Der Einfluß der Salzbelastung auf die Expression von Aquaporingene wurde von einigen Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Pflanzen untersucht. Bei *Arabidopsis* kodiert das *RD28*-Gen für Aquaporin und wird durch Wasserstress induziert (Yamaguchi et al., 1992). Vergleichbare Resultate wurden von Yamada et al. (1997) beschrieben. Transkriptmengen von Aquaporingenen *NeMip1*, *NeMip2* und *NeMip3* wurden mit dem Salzstress in Blättern von *Nicotiana excelsior* hochreguliert. Im Gegensatz dazu wurde in den ersten 30 Stunden nach der Salzbelastung eine Reduzierung der Transkriptmenge für *MipA* und *MipC* aus *Mesembryanthemum crystallinum* beobachtet (Yamada et al., 1995). Diese Redukti-

on der Transkriptmenge der Aquaporingene aus Tomate steht im Einklang mit der von manchen Autoren beschriebenen Reduzierung der Wasseraufnahme unter Salzstress (Hasegawa et al., 2000, Carvajal et al., 2000). Bei Tomate wurde eine Reduktion der Wasseraufnahme mit ansteigender NaCl-Konzentration festgestellt (Romero-Aranda et al., 2001). Azaizeh et al. (1992) konnten zeigen, daß unter Salzstress eine fünffache Reduzierung der Wasseraufnahme in Maiswurzeln auftrat. Diese Änderung in der Wasserpermeabilität könnte durch eine Reduzierung der Expression von Aquaporingenen unter Salzbelastung erklärt werden (Hasegawa et al., 2000).

Die Expression der Aquaporingene mit RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen weist deutliche Unterschiede zwischen Blatt und Wurzel auf. In den Wurzeln zeigen *LePIP1* und *LeTIP* eine Reduzierung der Transkriptmenge mit der Mykorrhizierung. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnten Krajinski et al. (2000) zeigen, daß das Aquaporin *MtAQP1* aus *Medicago truncatula* durch die Kolonisierung mit dem AM-Pilz *Glomus mosseae* induziert wird. Dieser unterschiedliche Einfluß der Mykorrhizierung auf die Expression der pflanzlichen Aquaporingene könnte, neben den unterschiedlichen Versuchsbedingungen, auf den verwendeten AM-Pilz bzw. die Kombination von Pilz und Pflanze zurückgeführt werden.

Die Reduzierung der Transkriptmenge von *LePIP1* und *LeTIP* mit der Mykorrhizierung unter Salzbelastung läßt vermuten, daß unter Salzstress die Wasseraufnahme zum Großteil durch den Pilz gewährleistet werden könnte. Eine gesteigerte Wasseraufnahme durch die Pilz-Hyphen wurde bei *Helianthus annuus* beobachtet. Rosendahl und Rosendahl (1991) haben ebenso eine Zunahme der Wasseraufnahme unter Salzbelastung bei mykorrhizierten Pflanzen festgestellt. Der geringe Hyphendurchmesser ermöglicht den Hyphen das Eindringen in kleine Bodenpartikel und somit sind sie in der Lage, Wasser unter Streß aufzunehmen und weiter zu der Pflanze zu transportieren.

Auf Blattebene zeigen die Expressionsmuster der *LePIP1*-, *LePIP2*- und *LeTIP*-Gene unter Salzbelastung eine Erhöhung der Transkriptmenge mit der Mykorrhizierung. Diese differentielle Expression der Aquaporingene könnte auf die Unterschiede in der Salzbelastung in den oberirdischen Pflanzenteilen zwischen den mykorrhizierten und Kontrollpflanzen zurückgeführt werden. Für diese Annahme gibt es experimentelle Nachweise, die zeigen, daß Kontrollpflanzen unter Salzstress eine höhere Na⁺-Konzentration in den Blättern im Vergleich zu den mykorrhizierten Pflanzen aufweisen (Al-Karaki, 2000; Hatimi, 1999). Ein ähnliches Ergebnis wurde von Cantrell und Linderman (2001) beschrieben. Während mykorrhizierte Wurzeln von *Allium cepa* eine höhere Na⁺-Konzentration im Vergleich zu den nicht mykorrhizierten Wurzeln aufwiesen, wurde im Gegensatz dazu in den oberirdischen Pflanzenteilen eine höhere Na⁺-Konzentration in den Kontrollpflanzen festgestellt. Möglicherweise werden die Na⁺-Ionen von den Pilz-Hyphen durch intrazelluläre Kompartimentierung zurückgehalten, und somit nicht zu den Blättern weiter transportiert.

4.3.3 Expression von Na^+/H^+ -Antiportergenen aus Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza unter Salzstress

Unter Salzbelastung verfügen pflanzliche Zellen über drei Mechanismen zur Vermeidung der Akkumulation von Na^+ -Ionen im Cytosol (Niu et al., 1995; Zhu, 2001): Erstens durch eine verringerte Aufnahme der Na^+ -Ionen durch die Plasmamembran, zweitens durch eine Entlastung des Cytosols durch Entfernung der Na^+ -Ionen aus dem Cytoplasma in die Vakuole durch die in der Tonoplasten befindlichen Na^+/H^+ -Antiporter. Vakuoläre Na^+/H^+ -Antiporter-Gene sind bei einigen Pflanzen kloniert worden (Apse et al., 1999; Fukuda et al., 1999; Gaxiola et al., 1999). Die Überexpression eines vakuolären Na^+/H^+ -Antiporter-Gens *AtNHX1* in *Arabidopsis* führte zu einer Erhöhung der Salztoleranz (Apse et al., 1999). Der dritte Mechanismus zur Vermeidung der Akkumulation von Na^+ -Ionen im Cytosol ist ein aktiver Transport aus der Zelle. Dabei spielen möglicherweise die an der Plasmamembran lokalisierten Na^+/H^+ -Antiporter eine große Rolle (Blumwald et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Transkripte der Na^+/H^+ -Antiporter *LeHNX1* und *LeNHX2* in Wurzel- und Blatt-RNA nachgewiesen werden. Eine differentielle Expression in Wurzeln und Blättern, wie dies von Fukuda et al. (1999) für einen Na^+/H^+ -Antiporter (*OsNHX1*) aus Reis gezeigt wurde, konnte für Transkripte von *LeHNX1* und *LeNHX2* nicht beobachtet werden. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurde ebenso keine Hochgerulierung der Expression von *LeHNX1* und *LeNHX2* unter Salzstress festgestellt, wie dies in verschiedenen Arbeiten beschrieben wurde. Die Transkriptmenge des *OsNHX1*-Gens aus Reis war in Blatt und Wurzel nach der NaCl-Belastung um den Faktor 2,3 und 1,8 höher als in den Kontrollpflanzen (Fukuda et al., 1999). In *Arabidopsis* konnte ebenso eine Erhöhung in der Expression von einem Na^+/H^+ -Antiporter (*AtNHX1*) unter Salzbelastung nachgewiesen werden (Gaxiola et al., 1999). Bei der verstärkten Expression dieser Gene scheint die Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels unter Salzstress eine Rolle zu spielen. Bei *Arabidopsis* wurde eine Genfamilie entdeckt, deren Mutation die Pflanzen besonders Na^+ empfindlich macht (SOS: *salt overly sensitive*). Die Funktion von drei SOS-Proteinen konnte aufgeklärt werden. SOS1 ist ein Na^+/H^+ -Antiporter in der Plasmamembran, SOS2 eine Serin-Threonin-Proteinkinase, die SOS1 aktiviert, und SOS3 ein Calciumbindendes Protein, welches nach Aktivierung seinerseits SOS2 aktiviert (Hasegawa et al., 2000).

Bei der Hybridisierung der Sonden für Na^+/H^+ -Antiporter (*LeNHX1* und *LeNHX2*) mit der RNA aus mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomaten mit und ohne Salzbelastung konnten durch den Vergleich der erhaltenen Signale keine Unterschiede beobachtet werden. So scheint die Mykorrhizierung unter den angegebenen Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf die Expression dieser Gene zu haben.

Die Ergebnisse der Northern-Analysen für die in dieser Arbeit untersuchten Gene *LeHNX1* und *LeNHX2* lassen vermuten, daß die Regulation dieser Gene auf der transkriptionalen Ebene unter den ausgewählten Versuchsbedingungen keine Rolle bei der Salztoleranz bei Tomate spielen. Die Salzbelastung wurde in diesem Versuch durch 8 und 12 g NaCl/l-Konzentrationen gewährleistet. Aufgrund des frühzeitigen Absterbens der Versuchspflanzen, die der höchsten Salzkonzentration (12 g NaCl/l) ausgesetzt waren, konnten aus diesem Ansatz keine Daten gewonnen werden. Eine mögliche Beteiligung der Na^+/H^+ -Antiporter-Gene aus Tomate könnte in einem weiteren Versuch überprüft werden, indem man die Versuchspflanzen Salzkonzentrationen aussetzt, die in

einem Bereich zwischen 8 und 11 g NaCl/l Bodensubstrat liegen. Neben der Salzkonzentration ist möglicherweise der verwendete AM-Pilz ein wichtiger Faktor bei der Übertragung von Salztoleranz auf die Wirtspflanze. Aus diesem Grund könnte, neben dem in diesem Versuch eingesetzten *Glomus geosporum*, vergleichend in einem parallelen Versuch, ein anderer AM-Pilz verwendet werden.

4.4 Ausblick auf weitere Untersuchungen

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, daß molekularbiologische Methoden wie PCR, Southern-Blot, Northern-Blot, *In situ*-Hybridisierung und die quantitative Real-Time PCR bei der Untersuchung der AM-Symbiose unter extremen Bedingungen (Schwermetall- und Salzbelastung) eingesetzt werden können. Der Einfluß der AM-Pilze auf die Schwermetall- und Salztoleranz der Wirtspflanze konnte bisher hauptsächlich nur durch physiologischen und chemischen Verfahren untersucht werden. Der Einsatz der Real-Time PCR bietet neben dem geringeren experimentellen Aufwand gegenüber der Northern-Blot-Methode die Möglichkeit auch ausgehend von relativ geringen RNA-Mengen, die Expression von Genen untersuchen zu können. Dies ist vor allem für die Untersuchung der Expression von pilzlichen Genen von Bedeutung, da AM-Pilze obligat biotroph sind und die Gewinnung von pilzlichem Material limitiert ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals den Einfluß der Mykorrhizierung auf die Expression der Nrampttransporter unter Schwermetallstress. Nrampproteine können eine Vielzahl von Metallionen transportieren (Chen et al., 1999), daher sollen die genaue Substratspezifität und Funktion der Nrampttransporter LeNramp1, LeNramp2 und LeNramp3 aus Tomate in weiteren Versuchen gezeigt werden. Hierzu bietet sich das *Xenopus*-Oocyten-System an, wie es für die Charakterisierung der Nrampttransporter aus der Hefe *SMF1*, *SMF2* und *SMF3* verwendet wurde (Chen, et al., 1999). Dazu müßte jedoch eine vollständig klonierte cDNA dieser Gene erhalten werden. Eine weitere Möglichkeit, die Substratspezifität dieser Metallionentransporter aufzuzeigen ist, die Expression dieser Gene in einem metallionentransporter-defizienten Hefemutanten (Curie et al., 2000) zu untersuchen.

Die Northern-Analysen haben gezeigt, daß das Phytochelatin synthase-Gen bei Tomate konstitutiv exprimiert ist. Die Aktivität des Enzyms unterliegt möglicherweise einer posttranslationalen Regulation. Messungen der Enzymaktivität in den mykorrhizierten und Kontrollpflanzen unter Schwermetallbelastung könnte einen möglichen Einfluß der Mykorrhizierung auf die Aktivität des Enzyms nachweisen.

Der in der vorliegenden Arbeit dargestellte Einfluß der Mykorrhizierung auf die Regulation der Expression der pflanzlichen Aquaporingene unter Salzstress deutet darauf hin, daß AM-Pilze den Wasserhaushalt der Pflanze und somit ihre Salztoleranz beeinflussen könnten. Die Untersuchungen von Biela et al. (1999) haben gezeigt, dass Aquaporine neben Wasser Glycerin und Harnstoff transportieren können. Daher sollte die genaue Funktion der *LePIP1*, *LePIP2* und *LeTIP* mittels des *Xenopus*-Oocyten-Systems überprüft werden.

Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Rolle von Na^+/H^+ -Antiportergenen bei Salztoleranz und deren Induktion unter Salzstress (Apse et al., 1999) wiesen *LeNHX1* und *LeNHX2* aus Tomate keine Unterschiede in der Expression auf, weder

unter Salzstress noch unter der Mykorrhizierung. Hier könnten in einem weiteren Versuch auf der einen Seite weitere Salzkonzentrationen in dem Bereich zwischen 8 und 11 g NaCl/l Bodensubstrat eingesetzt werden. Auf der anderen Seite könnte als Inokulum parallel zu *Glomus geosporum* ein weiterer AM-Pilz wie *Glomus mosseae* verwendet werden, dessen positiver Einfluß auf das Wachstum der Tomatenpflanzen unter Salzstress gezeigt wurde (Al-Karaki, 2000). Möglicherweise ist sowohl die gewählte AM-Spezies als auch die Kombination Pilz-Pflanze entscheidende Faktoren für eine erfolgreiche Übertragung der Salztoleranz auf die Wirtspflanze.

Um ein Bild über den Einfluß der AM-Pilze auf die Schwermetall- und Salztoleranz der Wirtspflanze vervollständigen zu können, sollten die pilzlichen Gene erfaßt werden, die an der Schwermetall- und Salztoleranz beteiligt sein könnten. Die Erfassung pilzlicher Gene führt bislang durch PCR-basierende Ansätze unter Verwendung von degenerierten Primern zu keinen erfolgreichen Ergebnissen. Aufgrund ihrer obligat biotrophen Lebensweise ist es schwer, genügend pilzliches Material zur Isolierung von DNA und RNA zu erhalten. Hier bietet sich das Kultur-System mit Ri T-DNA transformierten Karottenwurzeln an (Mugnier und Mosse, 1987; Bécard und Fortin, 1988). Bei der Verwendung von gekammerten Agarplatten wachsen die Pilzhyphen in eine wurzelfreie Kammer hinein. Die wurzelfreie Kammer kann mit definierten Mengen unterschiedlicher Schwermetalle bzw. unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen versetzt werden, was zur Induktion von Genen, die an der Schwermetall- bzw Salztoleranz beteiligt sind, führen könnte. Eine Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken, ausgehend von Pilzmaterial mit und ohne Schwermetalle aus diesem Karottenwurzelsystem, könnte möglicherweise zur Identifizierung von pilzlichen Genen führen.

5. Zusammenfassung

1. Durch Vergleiche der publizierten Sequenzen von Genen, die bei der Schwermetall- bzw. Salztoleranz höherer Pflanzen beteiligt sind, konnten aus den konservierten Bereichen degenerierte Primer entwickelt werden. Die verwendeten Primer ermöglichten mittels PCR, die Amplifikation von Segmenten für Phytochelatin synthase-, Metallothionein-, Nrampttransporter-, Aquaporin- und Na^+/H^+ -Antiporter-gene aus Tomate.
2. Die amplifizierte PCR-Segmente wurden kloniert und sequenziert. Die Verwendung von RACE-Primern erlaubte die Amplifizierung und Sequenzierung von 3'-nicht translatierten Endbereichen von den erhaltenen Gensegmenten. Sowohl bei den Nrampttransportern *LeNramp1*, *LeNramp3*, als auch bei den Aquaporinen *LePIP1* und *LePIP2* handelt sich um bisher unbekannte Gene aus Tomate.
3. Bei der Anzucht von Tomatenpflanzen in Breinigerberg- und Mechernicherde, mit und ohne *Glomus intraradices* BrI, zeigen die erhaltenen Ergebnisse eine deutliche Stimulierung des Wachstums von mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Schwermetallbelastung im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Vergleichbare Ergebnisse konnten ebenso unter Cadmium-Belastung erhalten werden.
4. Durch Southern-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, daß im Genom von Tomate mindestens drei unterschiedliche zu Nrampttransportern homologe Gene vorhanden sind.
5. Kreuzhybridisierungsversuche haben gezeigt, daß die Homologien zwischen den verschiedenen Sonden so gering sind, daß man die Expression einzelner Nrampttransportergene und Metallothioneingene untersuchen kann.
6. Durch Northern-Analyse wurde gezeigt, dass das Gen der Phytochelatin synthase konstitutiv exprimiert ist und dessen Expression nicht durch die Mykorrhizierung beeinflusst wird.
7. Die Expression des Nrampttransporters *LeNramp1* ist auf die Wurzel beschränkt, während Transkripte von *LeNramp2* und *LeNramp3* sowohl in der Wurzel als auch im Blatt nachgewiesen wurden. Durch Northern-Analysen und durch Real Time PCR-Quantifizierung wurde gezeigt, daß die Transkriptmenge von *LeNramp1* und *LeNramp2* mit der Mykorrhizierung und unter Schwermetallstress reduziert wird, wohingegen bei *LeNramp3* keine Effekte der Mykorrhizierung zu beobachten sind.
8. Northern-Analysen lassen für die Metallothioneingene *Lemt1*, *Lemt3* und *Lemt4* keine deutlichen Unterschiede in der Expression zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen unter Schwermetallbelastung feststellen. Im Gegensatz dazu konnte durch Northern-Analysen und durch Real-Time PCR-Quantifizierung gezeigt werden, daß die Transkriptmenge von *Lemt2* mit der Mykorrhizierung in der Schwermetallerde aus Breinigerberg um den Faktor 12 reduziert wird. Diese deutliche Herabsetzung der Expression des *Lemt2*-Gens wurde

ebenso unter Cd-Belastung beobachtet.

9. Zur Lokalisierung der Transkripte von *LeNramp1* und *Lemt2* in den mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenwurzeln unter Schwermetallstress wurden Dig-markierte RNA-Sonden beider Gene eingesetzt. Die Expression von *LeNramp1* konnte in den nicht mykorrhizierten Wurzeln in unmittelbarer Umgebung des Zentralzylinders nachgewiesen werden. In den mykorrhizierten Wurzeln waren keine Signale nachweisbar. *Lemt2* wird stark in den nicht mykorrhizierten jungen Wurzelbereichen in den Rindenparenchym- der Rhizodermiszellen exprimiert. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *Lemt2* in den mykorrhizierten Wurzeln auf einige Rindenparenchymzellen beschränkt. In unmittelbarer Nähe der pilzlichen Arbuskeln traten keine Signale auf.
10. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen läßt sich durch Vergleich der ermittelten Frischgewichte zwischen den mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Versuchspflanzen unter Salzstress keine Wachstumsstimulierung durch die Mykorrhizierung erkennen.
11. Die untersuchten Aquaporingene *LePIP1*, *LePIP2* und *LeTIP* sind bei den Kontrollpflanzen in den Wurzeln stärker exprimiert als in den Blättern. In den Wurzeln wird die Transkriptmenge von *LePIP1* und *LeTIP* mit der Mykorrhizierung unter Salzbelastung (8g NaCl/l) herunterreguliert, während *LePIP2* durch die Mykorrhizierung unter den gewählten Bedingungen nicht beeinflusst wird. In den Blättern mykorrhizierter Pflanzen sind für die drei Gene eine deutliche Erhöhung der Transkriptmengen unter Salzstress zu beobachten.
12. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen wurde keine Induzierung der Na⁺/H⁺-Antiporter *LeHNX1* und *LeNHX2* unter Salzstress festgestellt. Durch Northern-Analysen konnten keine Unterschiede in der Expression beider Gene zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Tomatenpflanzen unter Salzbelastung beobachtet werden.

6. Literaturverzeichnis

Al-Karaki G.N., Al-Raddad A. (1997) – effects of arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress on growth and nutrient uptake of two wheat genotypes differing in drought resistance – *Mycorrhiza* 7, 83-88

Al-Karaki G.N., Clark R.B. (1998) – growth, mineral acquisition, and water use by mycorrhizal wheat grown under water stress – *J. Plant Nutr.* 21, 263-276

Al-Karaki G.N. (2000) – Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress – *Mycorrhiza* 10, 51-54

Al-Karaki G.N., Hammad R., Rusan M. (2001) – Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress – *Mycorrhiza* 11, 43-47

Alonso J.M., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S., Ecker J.R. (1999) – EIN2, a bifunctional transducer of Ethylene and stress Responses in *Arabidopsis* - *Science* 284, 2148-2152

Alten, von, H., Beeck C., Schönbeck F. (1990) – Aspects of infectivity and efficiency of VA-mycorrhiza inoculum on expanded clay, Abstracts: 8th NACOM (North American Conference On Mycorrhizae) – innovation and hierarchical integration – Jackson, Wyoming, September 1990

Ambler J.R., Young J.L. (1997) – Techniques for determining root length infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae – *Soil Sci. Soc. Am.J.* 41, 551-556

Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E. (1999) – Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis* – *Science* 285, 1256-1258

Azaizeh H., Gunse B., Steudle E. (1992) – Effects of NaCl and CaCl₂ on water transport across root cells of maize (*Zea mays* L.) seedlings – *Plant Physiol.* 99, 886-894

Bago B., Chamberland H., Goulet A., Vierheilig H., Lafontaine J.G., Piché Y. (1996) – Effekt of Nikkomycin Z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular mycorrhizal fungi – *Protoplasma* 192, 80-92

Bago B., Zipfel W., Williams R.C., Chamberland H., Lafontaine J.G., Webb W.W., Piché Y (1998a) – In vivo studies on the nuclear behavior of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* grown under axenic conditions – *Protoplasma* 203, 1-15

Bago B., Azcon-Aguilar C., Piché Y (1998b) – Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions – *Mycologia* 90, 52-62

Bago B., Azcon-Aguilar C., Goulet A., Piché Y. (1998c) – Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi – *New Phytol.* 139, 375-388

Bécard G., Fortin J.A. (1988) – Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots – *New Phytol.* 108, 211-218

Bécard G., Piché Y. (1989a) – fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis – *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2320-2325

Bécard G., Piché Y. (1989b) – New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* – *New Phytol.* 112, 77-83

Bécard G., Piché Y. (1990) – Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and non host Ri T-DNA transformed roots – *Can. J. Bot.* 68, 1260-1264

Bécard G., Doner L.W., Rolin D.B., Douds D.D., Pfeffer P.E. (1991) – Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by in vivo ¹³C NMR and HPLC analyses – *New Phytol.* 118, 547-552

Bécard G., Douds D.D., Pfeffer P.E. (1992) – Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols – *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 821-825

Bécard G., Taylor L.P., Douds D.D., Pfeffer P.E., Doner L.W. (1995) – Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses – *Mol. Plant Microbe Interact.* 8, 252-258

Belouchi A., Kwan T., Gros P. (1997) – Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions – *Plant Mol. Biol.* 33, 1085-1092

Berthelin J., Munier-Lamy C., Leyval C. (1995) – Effect of microorganisms on mobility of heavy metals in soils – In: Huang P.M., Berthelin J., Bollag J.M., McGill W.B., Page A.L. (eds.) – *Metals, other inorganics, and microbial activities (Environmental impacts of soil component interactions, vol 2)* – Lewis, Boca Raton, Fla, 3-17

Biela A., Grote K., Otto B., Hoth S., Hedrich R., Kaldenhoff R. (1999) – The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol – *Plant J.* 18, 565-570

Birnboim H.C., Doly J. (1979) – A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA – *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523

Blumwald E., Aharon G.S., Apse M.P. (2000) – Sodium transport in plant cells – *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 140-151

Bohnert H.J., Jensen R.G. (1996) – Metabolic engineering for increased salt tolerance – the next step – *Aust. J. Plant Physiol.* 23, 661-667

Bonfante-Fasolo P., Faccio A., Perotto S., Schubert A. (1990) – Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* – *Mycol. Res.* 94, 157-165

Bonfante P., Perotto S. (1995) – Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi infecting host plants – *New Phytol.* 130, 3-21

Bonfante P. (1996) – Transcriptional activation of a maize-tubulin gene in mycorrhizal maize and transgenic tobacco plants – *Plant J.* 9, 737-743

Brown N.L., Lloyd J.R., Jakeman K., Hobman J.L., Bontidean I., Mattiasson B., Csöregi E. (1998) – heavy metal resistance genes and proteins in bacteria and their application – *Biochem. Soc. Trans.* 26 (4), 662-665

Buee M., Rossignol M., Jauneau A., Ranjeva R., Bécard G. (2000) – The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates - *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 693-698

Burleigh S.H., Bechmann I.E. (2002) – Plant nutrient transporter regulation in arbuscular mycorrhizas – *Plant and soil* 244, 247-251

Cantrell I.C., Linderman R.G. (2001) - Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity – *Plant and soil* 233, 269-281

Carling D.E., Brown M.F. (1982) – Anatomy and physiology of vesicular-arbuscular and non-mycorrhizal roots – *Phytopath.* 72, 1108-1114

Carvajal M., Cedra A., Martinez V. (2000) – Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity? – *New Phytol.* 145, 439-447

Carvalho L.M., Caçador I., Martins-Loução M.A. (2001) – Temporal and spacial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of Tagus estuary (Portugal) – *Mycorrhiza* 11, 303-309

Cellier M., Prive G., Belouchi A., Kwan T., Rodrigues V., Chia W., Gros P. (1995) – Nrap defines a family of membrane proteins – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10089-10093

- Cellier M., Belouchi A., Gros P. (1996)** – Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of *Nramp* – Trends Genet 12, 201-204
- Chen J., Zhou J., Goldsbrough P.B. (1997)** – Characterization of phytochelatin synthase from tomato – Physiol. Plant. 101, 165-172
- Chen X.Z., Peng J.B., Cohen A., Nelson H., Nelson N., Hediger, M.A. (1999)** – Yeast SMF1 mediates H⁺-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents – J. Biol. Chem. 174, 35089-35094
- Clement S., Kim E.J., Neumann D., Schröder J.I. (1999)** – Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast – EMBO J. 18, 3325-3333
- Cobbett C.S., May M.J., Howden R., Rolls B. (1998)** – The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1* of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase – Plant J. 16, 73-78
- Cobbett C.S. (2000)** – Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification – Curr. Opin. Plant Biol. 3, 211-216
- Cohen A., Nelson H., Nelson N. (2000)** – The family of SMF metal ion transporters in yeast cells – J. Biol. Chem. 275, 33388-33394
- Corbisier P., van der Lelie D., Borremans B., Provoost A., de Lorenzo V., Brown N., Lloyd J., Hobman J., Csöregi E., Johansson G., Mattiasson B. (1999)** – Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples – Anal. Chim. Acta 387, 235-244
- Chung C.T., Miller R.H. (1993)** – Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells – Methods Enzymol. 218, 43
- Curie C., Aroso J.M., Jean M.L., Ecker J.R., Briat J.F. (2000)** – Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport – Biochem. J. 347, 749-755
- Dameron C.T., Harrison M.D. (1998)** – Mechanisms for protection against copper toxicity – Am. J. Clin. Nutr. 67, 1091-1097
- Das P., Samantaray S., Rout G.R. (1997)** – Studies on cadmium toxicity in plants: a review – Environ. Pollut. 98, 29-36
- De Framond A.J. (1991)** – A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*); cloning and characterization – FEBS Letters 290, 103-106
- Dehne H.W. (1982)** – Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens – Phytopath. 72, 1115-1119

- Dehne H.W., Backhaus G.F. (1986)** – The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in plant production. I. Inoculum production – J. of Plant Diseases and Protection 93, 415-424
- Delauney A.J., Verma D.P.S. (1993)** – Proline biosynthesis and osmoregulation in Plants – Plant J. 4, 215-223
- De Miranda J.R., Thomas M.A., Thurman D.A., Tomsett A.B. (1990)** – Metallothionein-like gene from the flowering plant *Mimulus guttatus* – FEBS Letters 260, 277-280
- Diaz G., Azconaguilar C., Honrubia M. (1996)** – Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides* – Plant Soil 180, 241-249
- Dietz K.J., Baier M., Krämer U. (1999)** – Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants – In: Prasad M.N.V., Hagemeyer J., eds.- Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems – Berlin, Springer-Verlag, 73-97
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1990)** – Isolation of Plant DNA from fresh tissue – Focus 12, 13-15
- Douds D.D., Pfeffer P.E., Shachar-Hill Y. (2000)** – Application of in vitro methods to study carbon uptake and transport by AM fungi – Plant and soil 226, 255-261
- Eggermont K., Goderis I.J., Broekaert W.F. (1996)** – High-throughput RNA extraction from plant samples based on homogenisation by reciprocal shaking in the presence of a mixture of sand and glass beads . Plant Molecular Biology Reporter 14(3), 273-279
- Eide D., Broderius M., Fett J., Guerinot M.L. (1996)** – A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93, 5624-5628
- El-Kherbawy M., Angle J.S., Heggo A., Chaney R.L. (1989)** – Soil pH, rhizobia and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.) – Biol. Fertil. Soils 8, 61-65
- Ernst W.H.O. (1996)** – Schwermetalle – In: Brunold C., Rüesegger A., Brändle R. (eds.) – Stress bei Pflanzen – UTB Verlag Bern, Stuttgart, Wien, 191-220
- Esch H., Hundeshagen B., Schneider-Poetsch H.J., Bothe H. (1994)** – Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis* – Plant Science 99, 9-16

- Evans I.M., Gatehouse L.N., Gatehouse J.A., Robinson N.J., Croy R.R. (1990)** – A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes – FEBS Letters 262, 29-32
- Fedorcsak I., Ehrenberg L. (1996)** – Effects of diethyl pyrocarboboate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases – Acta Chem. Scand. 20, 107ff
- Fleming M.D., Romano M.A., Su M.A., Garrick L.M., Garrick M.D., Andrews N.C. (1998)** – *Nramp2* is mutated in the anemic Belgrade (*b*) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95, 1148-1153
- Foley R.C., Singh K.B. (1994)** – Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene: expression in foliar trichomes – Plant Mol. Biol. 26, 435-444
- Forbes J.R., Gros P. (2001)** – Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions – Trends Microbiol. 9, 397-403
- Frank B.A. (1885)** – Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterschiedliche Pilze – Ber. Dtsch. Bot. Ges., 3, 128-145
- Fries L.L., Pacovsky R.S., Safir G.R., Siqueira J.O. (1997)** – Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization affected by exogenously applied phenolic compounds – J. Chem. Ecol. 23, 1755-1767
- Frohman, M.A. (1990)** – RACE: Rapid amplification of cDNA ends – In: Innes, M.A.; Gelfand, D.H., Sninsky J.J., White T.J. eds.: PCR-Protocols: a guide to Methods and Applications – Academic Press, New York
- Frohman M.A., Dush, M.K., Martin G.R. (1988)** – Rapid production of full-length cDNA's from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002
- Fukuda A., Nakamura A., Tanara Y. (1999)** – Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa* – Biochim. Biophys. Acta 1446, 149-155
- Gaspar L., Pollero R.J., Cabello M. (1994)** – Triacylglycerol consumption during spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi – J. AM. Oil. Chem. Soc. 71, 449–452
- Gaspar L., Pollero R.J., Cabello M. (1997)** – Partial purification and characterization of a Lipolytic enzyme from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* – Mycologia 89, 610-614
- Gaxiola R.A., Rao R., Sherman A., Grisafi P., Alper S.L., Fink G.R. (1999)** – The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 96, 1480-1485

Gekeler W., Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1988) – Algae sequester heavy metals via synthesis a phytochelatin complexes – Arch. Microbiol. 150, 197-202

Gerbeau P., Guclu J., Ripoche P., Maurel C. (1999) – Aquaporin Nt-TIP α can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes – Plant J. 18, 577-587

Gerdemann J.W. (1964) – The effect of mycorrhiza on the growth of maize – Mycologia 56, 342-349

Gianinazzi-Pearson V., Branzanti B., Gianinazzi S. (1989) – In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids – Symbiosis 7, 243-255

Gianinazzi-Pearson V. (1996) – Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis – Plant Cell 8, 1871-1883

Gildon A., Tinker P.B. (1983) – Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. 1. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas – New Phytol. 95, 247-261

Giovanetti M., Sbrana C., Avio L., Citernesi A.S., Logi C. (1993) - Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages – New Phytol. 125, 587-593

Giovanetti M., Sbrana C. (1998) – Meeting a non-host: The behaviour of AM fungi – Mycorrhiza 8, 123-130

Giritch A., Ganal M., Stephan U.W., Bäumlein H. (1998) – Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato – Plant Mol. Biol. 37, 701-714

Glenn M.G., Chew F.S., Williams P.H. (1988) – Influence of glucosinolate content of *Brassica* (Cruciferae) roots on growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi – New Phytol. 110, 217-225

Gonzalez-Chavez C., Harris P.J., Dodd J., Meharg A.A. (2002) – Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenate resistance on *Holcus lanatus* – New Phytol. 155, 163-171

Govoni G., Gros P. (1998) – Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections – Inflamm. Res. 47, 277-284

Greenway H., Munns R. (1980) – Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes – Annu. Rev. Plant Physiol. 31, 149-190

Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1985) – Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants – *Science* 230 674-676

Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1987) – Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84, 439-443

Grill E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1989) – Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase) - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86, 6838-6842

Grotz N., Fox T., Connolly E., Park W., Guerinot M.L., Eide D. (1998) – Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95 (12), 7220-7224

Grunewaldt-Stöcker G. (1989) – Microscopic characterization of VAM-fungal structures on expanded clay for inoculum production – *Agric. Ecosystems Environm.* 29, 179-182

Gryndler M., Hrselova H., Chvatalova I. (1997) – An improved procedure for root surface disinfection suitable for observations of proliferation of intraradical hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fistulosum* – *Folia Microbiologica* 42 (5), 489-494

Guerinot M.L. (2000) – The ZIP family of metal transporters – *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 190-198

Guerrero F.D., Jones J.T., Mullet J.E. (1990) – Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes – *Plant Mol. Biol.* 15, 11-26

Gupta R., Krishnamurthy K.V. (1996) – Response of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Arachis hypogea* to NaCl and acid stress – *Mycorrhiza* 6, 145-149

Gunshin H., Mackenzie B., Berger U.V., Gunshin Y., Romero M.F., Boron W.F., Nussberger S., Gollan J.L., Hediger M.A. (1997) – Cloning and characterization of mammalian proton-coupled metal-ion transporter – *Nature* 388, 482-488

Ha S.B., Smith A.P., Howden R., Dietrich W.M., Bugg S., O'Connell M.J., Goldsbrough P.B., Cobbett C.S. (1999) – Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast, *Schizosaccharomyces pombe* – *Plant Cell* 11, 1153-1164

Harley J.L., Smith S.E (1983) – *Mycorrhizal Symbiosis* – Academic Press, London

Harley J.L. (1984) – The mycorrhizal associations – Linskens H.F., Helslop-Harrison J., eds. Cellular interactions. Berlin, Springer Verlag, 148-186

Harrison M.J., Dixon R.A. (1993) – Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula* – Mol. Plant Microbe Interact 6, 643-654

Harrison M.J., Dixon R.A. (1994) – Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* – Plant J. 6, 9-20

Harrison M.J., Buuren V. (1995) – A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* – Nature 378, 626-629

Harrison M.J. (1999) – Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 361-389

Hartig (1851) – Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Kulturpflanzen Deutschlands - Berlin

Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J. (2000) – Plant cellular and molecular responses to high salinity – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51, 463-499

Hatimi A. (1999) – Effect of salinity on the association between root symbionts and *Acacia cyanophylla* Lind.: growth and nutrition – Plant and soil 216, 93-101

Hayman D.S. (1982) – Influence of soil and fertility and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi – Phytopath. 72, 1119-1124

Hernandez L.E., Cooke D.T. (1997) – Modifications of the root plasma membran lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum* – J. Exp. Bot. 48, 1375-1381

Hertz J. (1991) – Bioindicators for monitoring heavy metals in the environment – In: Metals and their compounds in the environment. Merain E. (ed.) VCH, Weinheim, pp 221-233

Heymann J., Engel A. (1999) – Aquaporins: phylogeny, structure and physiology of water channels – News Physiol. Sci. 14, 187-193

Hildebrandt U., Kaldorf M., Bothe H. (1999) – The zinc and its colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi – J. Plant Physiol. 154, 709-717

Hildebrandt U., Janetta K., Ouziad F., Renne B., Nawrath K., Bothe H. (2001) – Arbuscular mycorrhizal colonization of halophytes in central European salt marshes – Mycorrhiza 10, 175-183

- Höfte H., Faye L., Dickinson C., Herman E.M., Chrispeels M.J. (1991)** – The protein-body proteins phytohemagglutinin and tonoplast intrinsic protein are targeted to vacuoles in leaves of transgenic tobacco – *Planta* 184, 431-437
- Holleman A.F., Wiberg E. (1960)** – Lehrbuch der anorganischen Chemie – W.de Gruyler & co, Berlin
- Howden R., Goldsbrough P.B., Andersen C.R., Cobbett C.S., (1995)** – Cadmium-sensitive, *cad1*, mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient – *Plant Physiol.* 107, 1059-1067
- Hsieh H.M., Liu W.K., Huang P.C. (1995)** – A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice – *Plant Mol. Biol.* 28, 381-389
- Hurkman W.J., Tanaka C.K. (1987)** – The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots – *Plant Physiol.* 83, 517-524
- Iraki N.M., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Carpita N.C. (1989)** – Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of the growth-limited plant cells adapted to osmotic stress – *Plant Physiol.* 91, 39-47
- Johansson I., Karlsson M., Shukla V.K., Chrispeels M.J., Larsson C., Kjellbom P. (1998)** – Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation – *Plant Cell* 10, 451-459
- Juniper S., Abbott L. (1993)** – Vesicular-arbuscular mycorrhizas and soil salinity – *Mycorrhiza* 4, 45-57
- Juste C. (1988)** – Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol – *Sci. Sol.* 26, 103-112
- Kaldorf M., Kuhn A.J., Schröder W.H., Hildebrandt U., Bothe H. (1999)** – Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus – *J. Plant Physiol.* 154, 709-717
- Kammerloher W., Fischer U., Piechottka G.P., Schäffner A.R. (1994)** – Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system – *Plant J.* 6, 187-199
- Kawashima I., Inokuchi Y., Chino M., Kimura M., Shimizu N. (1991)** – Isolation of a gene for a metallothionein-like protein from soybean – *Plant Cell Physiol.* 32 (6), 913-916
- Kehres D.G., Zaharik M.L., Finlay B.B., Maguire M.E. (2000)** – The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen – *Mol Microbiol.* 35, 1085-1100

- Khaliel A.S. (1993)** - Influence of three *Glomus* species on the growth and ion uptake on tomato seedlings – *Crypt. Bot.* 4, 14-18
- Killham K., Firestone M.K. (1983)** – Vesicular-arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions – *Plant Soil* 72, 39-48
- Klapheck S., Schlunz S., Bergmann L. (1995)** – Synthesis of phytochelatins and Homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L. – *Plant Physiol.* 107, 515-521
- Kneer R., Kutchan T.M., Hochberger A., Zenk M.H. (1992)** – *Saccharomyces cerevisiae* and *neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin – *Arch. Microbiol.* 157, 305-310
- Koide R.T., Schreiner R.P. (1992)** – Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 557-581
- Kothari S.K., Marschner H., George E. (1990)** – Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize – *New Phytol.* 116, 303-311
- Kothari S.K., Marschner H., Römheld V. (1991)** – Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil – *Plant and Soil* 131, 177-185
- 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 mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula* – *Planta* 211, 85-90
- Krupa Z., Öquist G., Huner N.P.A. (1993)** – The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris*: a fluorescence analysis – *Physiol. Plant.* 88, 626-630
- Landwehr M., Hildebrandt U., Wilde P., Nawrath K., Toth T., Biro B., Bothe H. (2002)** – The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils – *Mycorrhiza* 12, 199-212
- Lane B., Kajioka R., Harwood J.L., Kennedy T. (1987)** – The wheat-germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein – *Biochem. Cell Bio.* 675, 1001-1005
- Lanfranco L., Bolchi A., Ros E.C., Ottonello S., Bonfante P. (2002)** – Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus – *Plant Physiol.* 130, 58-67
- Lapedes D.N. (1974)** – Dictionary of scientific and technical terms – Mc Graw Hill, New York

Larcher W. (1994) – Ökophysiologie der Pflanzen: Leben, Leistung und Stressbewältigung der Pflanzen in ihrer Umwelt – Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Leyval C., Turnau K., Haselwandter K. (1997) – Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonisation and function: physiological, ecological and applied aspects – *Mycorrhiza* 7, 139-153

Locy R.D., Chang C.C., Nielsen B.L., Singh N.K. (1996) – Photosynthesis in salt-adapted heterotrophic tobacco cells and regenerated plants – *Plant Physiol.* 110, 321-328

Liu H., Trieu A.T., Blaylock L.A., Harrison M.J. (1998) – Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi – *Plant-Microbe Interact.* 11, 14-22

Liu X.F., Supek F., Nelson N., Culotta V.C. (1997) – Negative control of heavy metal uptake by the *saccharomyces cerevisiae* *BSD2* gene – *J. Biol. Chem.* 272, 11763-11769

Liu X.F., Culotta V.C. (1999) – Post-translational control of Nramp metal transport in yeast: role of metal ions and *BSD2* gene – *J. Biol. Chem.* 274, 4863-4868

Luk E., Culotta V.C. (2001) – Manganese superoxide dismutase in *S. cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nramp metal transporter, Smf2p – *J. Biol. Chem.* 276, 47556-47562

Maitani T., Kubota H., Sato K., Yamada T. (1996) – The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in roots cultures of *Rubia tinctorum* – *Plant Physiol.* 110, 1145-1150

Mancuso S., Rinaldelli E. (1996) – Response of young mycorrhizal and non-mycorrhizal plants of live tree (*Olea europea*) to saline conditions. II. Dynamics of electrical impedance parameters of shoots and leaves - *Adv. Hort. Sci.* 10, 135-145

Marschner H.L. (1995) – Mineral nutrition of higher plants – Academic Press, London

Marsh J.F., Schultze M. (2001) – Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants – *New Phytol.* 150, 525-532

Maurel C., Reizer J., Schröder J.I., Chrispeels M.J. (1993) – The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes – *EMBO J.* 12, 2241-2247

Maurel C., Kado R.T., GuernJ., Chrispeels M.J. (1995) – Phosphorylation regulates the water-channels activities of the seed-specific aquaporin α -TIP – *EMBO J.* 14, 3028-3035

Maurel C., Chrispeels M.J., Lurin C., Tacnet F., Geelen D., Ripoche P., Guern J. (1997) – Function and regulation of seed aquaporins – *J. Exp. Bot.* 48, 421-430

Maurel C., Chrispeels M.J. (2001) – Aquaporins. A molecular entry into plant water relation – *Plant Physiol.* 125, 135-138

Menge J.A. (1983) – Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture – *Can. J. Bot.* 61, 1015-1024

Menge J.A. (1986) – Inoculum production - In: VA mycorrhiza, C.L. Powell, D.J. Bagyaraj eds., CRC Press, Boca Raton, USA, 187-203

Miller A.J., Zhou J.J. (2000) – *Xenopus oocytes* as an expression system for plant transporters – *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 343-358

Morton J.B., Redecker D. (2001) – Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archaeospora und Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters – *Mycologia* 93, 181-195

Mosse B., Hepper C. (1975) – Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root cultures – *Physiol. Plant Pathol.* 5, 215-223

Mugnier J., Mosse B. (1987) – Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically – *Phytopathology* 77, 1045-1050

Murphy A., Taiz L. (1995) – Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes – *Plant Physiol.* 109, 945-954

Nagy F., Kay S., Chua N.H. (1988) – Analysis of gene expression in transgenic plants, pp. B4:1-29 in *Plant Molecular Biology Manual* (S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, Hrsg.) Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands

Nakazawa R., Ikawa M., Yasuda K., Takenaga H., (2000) – Synergistic inhibition of the growth of suspension cultured tobacco cells by simultaneous treatment with cadmium and arsenic in relation to phytochelatin synthesis – *Soil Sci. Plant Nutr.* 46, 271-275

Nelson N. (1999) – Metal ion transporters and homeostasis - *EMBO J.* 18, 4361-4371

Neuer G., Kronenbeg A., Bothe H. (1985) – Denitrification and nitrogen fixation by *Azospirillum*. III. Properties of a *Weat-Azospirillum* association – *Arch. Microbiol.* 141, 364-370

Niu X., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Pardo J.M. (1995) – Ion homeostasis in NaCl stress environments – *Plant Physiol.* 109, 735-742

Orlowski J., Grinstein S. (1997) – Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells - J. Biol. Chem. 272, 22373-22376

Ortiz D.F., Kreppel L., Speiser D.M., Scheel G., McDonald G., Ow D.W. (1992) – heavy-metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter – EMBO J. 11, 3491-3499

Ortiz D.F., Ruscitti T., McCue K.F., Ow D.W. (1995) – Transport of metal-binding peptides by HTM1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein – J. Biol. Chem. 270, 4721-4728

Peat H. J., Fitter A.H. (1993) – The distribution of arbuscular mycorrhizas in the British flora – New Phytol. 125, 845-854

Pfeiffer C.M., Bloss H.E. (1988) – Growth and nutrition of guayule (*Parthenium argentatum*) in saline soil as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhizal and phosphorus fertilization – New Phytol. 108, 315-321

Pond E.C., Menge J.A., Jarrell W.M. (1984) – Improved growth of tomato in salinized soil by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi collected from saline soils – Mycologia 76, 74-84

Portnoy M.E., Liu X.F., Culotta V.C. (2000) – *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of the metal transporters – Mol. Cell. Biol. 20, 7893-7902

Portnoy M.E., Jensen L.T., Culotta V.C. (2002) – The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast – Biochem. J. 362, 119-124

Poss J.A., Pond E., Menge J. A., Jarrell W.M. (1985) – Effect of salinity on mycorrhizal onion and tomato in soil with and without additional phosphate – Plant and soil 88, 307-319

Reader U., Broda P. (1985) – Rapid preparation of DNA from filamentous fungi – Lett. Appl. Microbiol. 1, 17-20

Rausser W.E (1990) – Phytochelatins – Annu. Rev. Biochem. 59, 61-86

Rausser W.E. (1995) – Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis, and function – Plant Physiol. 1141-1149

Rausser W.E. (1999) – Structure and function of metal chelators produced by plants – Cell Biochem. Biophys. 31, 19-48

Redecker D., Kodner R., Graham L.E. (2000) – Glomalean fungi from the Ordovician – Science 289, 1920-1921

Redecker D. (2002) – Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi – *Plant and soil* 244, 67-73

Reynolds T.L., Crawford R.L. (1996) – Changes in abundance of an abscisic acid-responsive, early cysteine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*) – *Plant Mol. Biol.* 32, 823-829

Rinaldelli E., Mancuso S. (1996) – Response of young mycorrhizal and non-mycorrhizal plants of live tree (*Olea europaea*) to saline conditions. I. Short-term electrophysiological and long-term vegetative salt effects – *Adv. Hort. Sci.* 10, 126-134

Rivers R.L., Dean R.M., Chandy G., Hall J.E., Roberts D.M., Zeidel M.L. (1997) – Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes – *J. Biol. Chem.* 272, 16256-16261

Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C., Jackson P.J. (1993) – Plants metallothioneins – *Biochem. J.* 295, 1-10

Romero-Aranda R., Soria T., Cuartero J. (2001) – Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions – *Plant Science* 160, 265-272

Rosendahl C.N., Rodendahl S. (1991) – Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp) on the response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salt stress – *Environ. Exp. Bot.* 31, 313-318

Rosewarne G.M., Barker S.J., Smith S.E., Smith F.A., Schachtman D.P. (1999) – *Lycopersicon esculentum* phosphate transporter (LePT1) involved in Phosphorus uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus – *New Phytol.* 144, 507-516

Ruiz-Lozano J.M., Azcon R. (1995) – Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status – *Physiol. Plant.* 95, 472-478

Ruiz-Lozano J.M., Azcon R., Gomez M. (1996) – Alleviation of salt stress by arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants – *Physiol. Plant.* 98, 767-772

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985) – Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia – *Science* 230, 1350-1354

Saito M. (2000) – Symbiotic exchange of nutrients in arbuscular mycorrhizas: transport and transfer of phosphorus – In: Y Kapulnik, DD Douds, eds, *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, PP 85-106

Salt D.E., Rauser W.E. (1995) – MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots- *Plant Physiol.* 107, 1293-1301

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) – Molecular cloning: A laboratory manual (2nd edition) – Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1997) – DNA sequencing with chain-terminating inhibitors – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467

Schat H., Liugany M., Bernard R. (2000) – Metall-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metal of heavy metals in hyperaccumulating and nonhyperaccumulating metallophytes – In: Terry N., Banuelos G., eds. – *Phytoremediation of contaminated soil and water* – C.R.C Press L.L.C, 171-188

Schat H., Liugany M., Vooijs R., Hartley-Whitaker J., Bleeker P.M. (2002) – The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes – *J. Exp. Bot.* 53, 2381-2392

Schäffner A.R. (1998) – Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? – *Planta* 204, 131-139

Schmitz O., Danneberg G., Hundeshagen B., Klingner A., Bothe H. (1991) – Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhiza by biochemical parameters – *J. Plant Physiol.* 139, 106-114

Schmöger M.E.V., Oven M., Grill E. (2000) – Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants – *Plant Physiol.* 122, 793-801

Schüepp H., Dehn B., Sticher H. (1987) – Interaktion zwischen VA-Mykorrhizen und Schwermetallbelastungen – *Angew. Bot.* 61, 85-95

Seemann J., Critchley C. (1985) – Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behavior and photosynthetic capacity of salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* – *Planta* 164, 151-162

Shachar-Hill Y., Pfeffer P.E., Douds D.D., Osman S.F., Doner L.W., Ratcliffe R.G. (1995) – Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek – *Plant Physiol.* 108, 7-15

Shetty K.G., Banks M.K., Hetrick B.A., Schwab A.P. (1994) – Biological characterization of a southeast kansas mining site – *water Air Soil Pollut* 78, 169-177

Sengupta A., Chaudhuri S. (1990) – Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) in pioneer salt marsh plants of the Ganges River delta in west Bangal (India) – *Plant and Soil* 122, 111-113

- Siedlecka A., Krupa Z. (1996)** – Interaction, between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris* - Plant Physiol. Bio. 34, 833-841
- Siedlecka A., Krupa Z., Samuelsson G., Öquist G., Gardeström P. (1997)** – Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* plants under Cd/Fe interaction – Plant Physiol. Bio. 35, 951-957
- Simon L., Bousquet J., Lévesque R.C., Lalonde M. (1993)** – Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants – Nature 363, 67-69
- Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V. (1988)** – Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants – Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 221-244
- Snowden K.C., Gardner R.C. (1993)** - Five genes induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots – Plant Physiol. 103, 855-861
- Solaiman M.D., Saito M. (1997)** – Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry – New Phytol. 136, 533-538
- Southern E.M. (1975)** – Detection of specific sequences among DANN fragments separated by gel electrophoresis – J. Mol. Biol. 98, 503-517
- Spanu P., Bonfante Fasolo P. (1988)** – cell wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum* – New Phytol. 109, 119-124
- Spanu P., Boller T., Ludwig A., Wiemken A., Faccion A. (1989)** – Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization – Planta 177, 447-455
- Stommel M., Mann P., Franken P. (2001)** – EST-library construction using spore RNA of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* – Mycorrhiza 10, 281-285
- Supek F., Supekova L., Nelson H., Nelson N. (1996)** – A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93, 5105-5110
- Tawarayama K., Watanabe S., Yoshida E., Wagatsuma T. (1996)** – Effect of onion (*Allium cepa*) root exudates on the hyphal growth of *Gigaspora margarita* – Mycorrhiza 6, 57-59
- Tinker P.B., Jones M.D., Durall D.M. (1992)** – A function comparison of ecto- and endomycorrhizas – In: Mycorrhizae in the next Decade. Practical applications and research priorities (Sylvia D.M., Hung L.L., Graham J.H., eds.), University of Florida Publication, Gainesville, pp. 175-177

- Thomine S., Wang R., Ward M.J., Crawford N.M., Schröder J.I. (2000)** – Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 97, 4991-4996
- Tsai S.M., Phillips D.A. (1991)** – Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro – Appl. Environ. Microbiol. 57, 1485-1488
- Turnau K., Kottke I., Oberwinkler F. (1993)** – Localization of toxic elements in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* collected from dust treated experimental plots – New Phytol. 123, 313-324
- Van der Lelie D., Corbisier P., Baeyens W., Wuertz S., Diels L., Margeay M. (1994)** – The use of biosensors for environmental monitoring – Res. Microbiol. 145, 67-74
- Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y.P., Rea P.A. (1999)** – AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 96, 7110-7115
- Vierheilig H., Piché Y. (1995)** – facteurs biochimiques potentiellement impliqués dans les interactions entre les champignons endomycorrhiziens et leurs plantes non-hotes. Pages 109-123 in: La symbiose mycorrhizienne. Etat des connaissances. Orbis Publishing, Frelighsburgh, canada
- Vidal S.M., Malo D., Vogan K., Skamene E., Gros P. (1993)** – Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg – Cell 73, 469-485
- Vögeli-Lange R., Wagner G.J. (1990)** – Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: implication of a transport function for cadmium-binding peptides – Plant Physiol. 92, 1086-1093
- Volpin H., Phillips D.A., Okon Y., Kapulnik Y. (1995)** – Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots – Plant Physiol. 108, 1449-1454
- Wallnöffer P.R., Engellhardt G. (1995)** – Schadstoffe aus dem Boden – In: Kock B., Elstner E.F. (eds.) – Schadeinwirkungen auf Pflanzen – Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 118-140
- Weig A., Deswarte C., Chrispeels M.J. (1997)** – The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group – Plant Physiol. 114, 1347-1357
- Weissenhorn I., Leyval C., Belgy G., Berthelin J. (1995)** – Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil – Mycorrhiza 5, 245-251

- Weissenhorn I., Leyval C. (1995)** – Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture – *Plant Soil* 175, 233-238
- Werner D. (1987)** – Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen – Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York
- West A.H., Clark D.J., Martin J., Neupert W., Hart F.U., Horwich A.L. (1992)** – Two related genes encoding extremely hydrophobic proteins suppress a lethal mutation in the yeast mitochondrial processing enhancing protein – *J. Biol. Chem.* 267, 24625-24633
- Williams L.E., Pittman J.K., Hall J.L. (2000)** – Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants – *Biochimica Biophysica Acta* 1465, 104-126
- Wright S.F., Franke-Snyder M., Morten J.B., Upadhyaya A. (1996)** – Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonisation of roots – *Plant and Soil* 181, 193-203
- Wright S.F., Upadhyaya A. (1996)** – Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi – *Soil Sci.* 161, 575-586
- Xia T., Apse M.P., Aharon G.S., Blumwald E. (2002)** – Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Beta vulgaris* – *Physiol. Plant.* 116, 206- 212
- Yamada S., Katsuhara M., Kelly W.B., Michalowski, C.B., Bohnert H.J. (1995)** – A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant – *Plant Cell* 7, 1129-1142
- Yamada S., Komori T., Myers P.N., Kuwata S., Kubo T., Imaseki H. (1997)** – Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior* – *Plant Cell Physiol.* 38 (11), 1226-1231
- Yamaguchi-Shinozaki K., Koizumi M., Urano S., Shinozaki K. (1992)** – Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein – *Plant Cell Physiol.* 3, 217-224
- Yancey P., Lark M., Hand S., Bowlus R., Somero G. (1982)** – Living with water stress: Evolution of osmolyte systems – *Science* 217, 1214-1222
- Zenk M.H. (1996)** – Heavy metal detoxification in higher plants: a review – *Gene* 179, 21-30

Zhang H.X., Hodson J., Williams J.P., Blumwald E. (2001) – Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98, 12832-12836

Zhou J., Goldsbrough P.B. (1994) – Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis* – Plant Cell 6, 875-884

Zhou J., Goldsbrough P.B. (1995) – Structure, organisation and expression of the metallothioneingene family in *Arabidopsis* – Mol. Gen. Genet. 248, 318-328

Zhu J.K. (2001) – Plant salt tolerance – Trends Plant Sci. 6, 66-71

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAS	branched absorbing structure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphatase
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
cDNA	complementäre DNA
CI	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro {1,2dioxetan3,2' (5' chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan} -4-yl)phenylphosphat
Cys	Cystein
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
FMN ⁺	Flavinmononukleotid, oxidiert
FMNH ₂	Flavinmononukleotid, reduziert
G	Guanosin
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
Kap.	Kapitel
Kb	Kilo-Basenpaare
KDa	Kilo-Dalton
l	Liter

LB	Luria-Bertani (Kulturmedium nach Luria und Bertani, modifiziert)
M	Molar
Min	Minuten
mRNA	Messenger (Boten)-RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerasekettenreaktion
RACE	Schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase- Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
SSC	Natriumcitrat-Puffer
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
Tris	Tris (Hydroxymethyl)aminomethan
ü.N	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
Vol :	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -galaktopyranosid

7.2 DNA-Sequenzen

LePCS

ATGGGAGCTCAAACAACAGAGCAAGGAGATTGTTCAAATTTAAAGGAAACATTCCCCATTGCTGCAAGG
GGGATCCAACCGTCGTCGATTTACTGCCCCGAACTCCTTACAATCAGCAGATTGCAAATGCTGTAAGGG
AGGAGTGATCAACTCATGGGGACAAGATCCTGAAACTGCCGTTAGCTCATTCCAAGTCAGTGTTGGTGCA
GCTGGGACAACAAATAAAACAGTTAGAGTTCCTAAGAATTTACCCTTAAGGCACCAGGGCCTGGTTATA
CTTGTGGACCCGCTAAAGTTGTTAAACCCACCAAGTTCTCTAGTGGTGATGGGAGACGAATAACACAAGC
CATGATGACTTGGAAATGTCACATGCACACACTCACAGTTCCTAGCTCAAAAAGACTCCTACATGCTGTGTC
TCCCTTTTCATCCTTCTACAATGACACCATTGTACCGTGTCCAACATGCACCTTGTGGCTGCCAGAAGAATG
GTACCCAGCATGGAAATGTGTAGATCAAGACGAACCACACTTAGCTTCAGTTGTTTCAGGCCTTGGAAA
AAACAATTATGCTCCTTTGGTTCAGTGCCTAGTGCATATGTGCCCTATTAGAATTCAGTGGCATGTGAAA
CTCAACTACAAGGAGTATTGGAGGGTGAAGGTCATACTAACTTCAATTACAATATGAATTATACGC
AATGGAACCTTAGTTGTCCAGCATCCAATTTGACAACCTCACTCAGCTATTCAGCTTTTCATTACAAGTC
ATTAACCTCTTATGGAGCAATAAATGACACTGCTATGCTCTGGGGTATGAAATTCACAACGATCTGCTC
ATGCAAGCTGGTCCATTAGGAAATGTCCAGTCTGAGCTTCTATTCCGCAAGGATATGTGCGACG

LeNramp1

GACATCCCGAAGTGATCGGGACAGCATTGCTCTTAATATATTGTTCCATATTCCCTGTTTGGGCTGGAG
TTCTTTGCCTGGTGTAGTACTCTTCTATTTCATTGGCCTGCAGAGATATGGGGTTAGGAAGTTAGAATT
GTTAATAGCAATTCATAGTATTTGTAATGGCAGCTTGTTCCTTTGGGGAAATGAGTTATGTAACCTCCT
GCTAATGAATATTCAAAGGAATGTTTCATTCCCTAAGCTCAACGGTGACGGAGCCACCGCTGATGCTATCG
CCTTGTGGGCGCCCTTGTATGCCACACAATCTCTTCCCTTCACTCTGCCCTTGTACTATCTAGGAAGAT
ACCTAACTCGGTTTCGTGGCGTTAATGATGCATGTAAATCTTCTTGTAGAGAGCGGTTTCGCGTTGTTT
GTGTCCTTCCCTAATCAATGTGGCAGTTGTGTCTGTGTCTGGTACTGTTTGTGGAGCTGACAATCTTTCAG
ATCAGAATAAAGAAAGTTGTGGTGACATTACATTGATACTCTGCTTCTTTTCTTCTCAAGAATGTACTTG
GAAAATCAAGTTCCTACTGTTTATGCCCATTTGGCATTATTAGCCTCAGGACAAAGCTCTACCATTACTGGT
ACTTATGCTGGCCAATTTATCATGCAAGGATTTTGGATTATACTTAAATGAAGACGTGGTTAAGGAACCTGT
TTACTAGACTTATTGCTATTACTCCAAGCCTTGTGTTTCAATTATTGGAGGATCGTCAGGAGCGGGAAG
ACTAATCATCATTGCTTCTATGATACTTTCTTTGAACTTCCATTTGCCTCATTCCACTACTCAAATTC
AGCAGGAGCTCCACTAAAGTTGGGACCACACAAGAATCAATTTATATTATCGGATCTCGTGGATTCTTG
GACTAGGCATCATTGGGATCAACATCTACTACCTTAGCACAGCTTTTCGTGGGTTGGCTGATAAGCAACAA
TTTGCCTAAAGTTGGAAATGTATTGATTGGGATCGTAGTATTTCCATTGATGGCTATATATATTCTAGCT
GTGATATACCTTATGTTTCGAAAAGATAAAGTTGTGACCTACATTGATCCAATCAAGGATGATCATATGG
AAAATGGAATAAACAGTATGGAATTAGTAGATCGTGTGCCTTATAGAGAGGATCTTGCTGATATTCCATT
GCCACAAAAGGTTTTTTTTTCAATTTGTTGTAATACACTTCAATTTTCACTCTTAATTTTTATGTCTAGTCT
AATAATGAACTATAAAGTGGTTTTGTGTCAAAAAAAAAA

LeNramp2

GGGTCATGACCGAATTGGCTCTAATTGGGGCTGATATTCAAGAGGTTATTGGAAGTGCTATTGCTATAAAA
GATTTTGAGTCGAGGGTTCTTGCCTCTATGGTCTGGTGTGTCATCACTGCTCTTGATTGCTTTGTATTC
TTATTTCTTGAGAATATGGAGTGAGGAAGCTGGAAGCACTCTTGTCTGCTTATTGTCAGTTATGGCCG
TCTCATTTCATGATGGATGTTTGGAGTAGTACGAAACCAATGGAGTGGTATCTTCTTGTGGTGTGGTGGT
CCAAAACCTTAGGCTCCAAAACAATAAAGACAGGCAGTGGGAATTGTCAGGGTGTGATATCATGCCTCAC
AATGTGTTACTACATTCCGGCGCTAGATGCAGGTCCAGAGACATATGACAACCTCGAACAGATTTGGCAGAG
TTCCGAGAAGCACTTAATTAATACTCCATAGAGTCGACAATTGCCTTGGCAATTTTCATTTCATGATCAATTT
GTTTGTACAACAGTGTTCCGAAAGTCATTTTATGGTAGTGAATAGCCAATAGCATTGGCCTAGAAAAT
GCTGGTCAATATCTTCAGGATAAGTATGGTGGGGGATCGTTCCTCCATCCTTTATATCTGGGCTATTGGAT
TGTTGGCTGCTGGACAGAGTAGTACTATAACTGGTACTTATGCTGGACAATTTATTATGGGAGGTTTTCT
GCACATGAGGTTGAAAAATGGCAGAGAGCGTTAATAACAAGAAGTTGTGCTATCGTCCCAACTCTGATA
GTTGCTCTTGTCTTTGACACCTCTGAGAAATCATTAGATGTTCTGAACGAGTGGCTCAACGTTCTTCAGT
GTGTCCAAATCCCTTTTGCCTGATCCCCCTTCTTGTCTTGTATCCAGAGAAGAAATCATGGGTGTTTT
CAAGATTGGCTCTACTATGAAGGTGATATCATGGCTAGTAGTGTGCTGGTTATGCTGATTAATGGCTAT
CTTTTGTAGTACTCTTTATCTTCTGCTGTCAAGTGGGATGTTGTTTACATCTGTTGTAGTTGCTTTTACA
GGTGATACATTGCCTTCATTGTATACCTCATTTACGGGGAATTACCTTCCCAATTTGGTTTTGTAAAAA
AAAAA

LeNramp3

GGGGTTTTACCCTCTGGGCTGGTGTCTTATTACTGCTTCTGATTGCTTTCTTCTTTTGGTTCTTGAGA
ACTATGGTATAAGGAAGTTGGAAGCTGTGTTTGGCTGTTCTTATTTTCGACTATGGCACTGTCTTTGCTTG
GATGTTTGGAGATGCCAAACCAAATGGGAAGGAGCTTTTAGCAGGTCTCTTGATTCCAAAACCTCAGTTCA
AGGACAGTTCGGCAGGCTGTTGGAGTAGTTGGTTGTGTAATAATGCCTCACAATGTCTTCTTGCAATCAG
CTTTGGTGAATCCAGAGAGATCGATTTGAAGAAAAAAGGGCAGGTTCCAGGAGGCACTGAATTACTACTC
CATAGAATCTTCTTTGCCCTTCTTATCTCTTTTATGATCAATTTGTTTGTACAACTGTCTTTGCCAAG
GGATTTTATGGCAGTGAGCAAGCTGGTAGTTTAGGCCTTGTAAATGCAGGGCAGTTTCTTCAAGACAAGT
ATGGTGGGGGACTGTTCCCAATCTCTATATTTGGGGCATTGGGTTACTGGCAGCTGGGCAGAGTAGTAC
GATAACTGGTACTTATGCTGGACAGTTTATTATGGGAGGTTTTCTAGATCTACGTTTGAAGAAAATGGCTT
AGGGCACTGATTACTCGAAGTTGTGCCATTGTGCCAACAAATCATTGTGCTCTGATTTTTAATAGATCTG
AATCATCACTCGACGCTTTGAATGAGTGGCTTAACGTGCTTCAGTCTATACAGATCCCTTTTGGCCTTAT
TCCCCTTCTGACATTGGTGTCCAAGGAGGATATAATGGGTACTTTCCAATGTTGCCAATTGGTTCAACCT
ACTCCGCACAAAAGGATATAGCTATGCTGGTCAATGAGACATCTAAGCAATACATTCAATCAAATCCAGA
CGTCGTAAGTATAGTAAATCACTACATTGCAGAGAGGCCATGGCCATGGGGAAGTTGATTACTGAAGCA
TTCTTTTTCATCTGAAGAGGTTCCAATTTCTTTATGTCTTAACCTGTATAATAGCTTTTGAGAAACTGCCA
GCGTTTGTCTTTTAGCTGTAGGTTCCCCAAAAGAAAATAATGGAACAAACTATCCCGGATATTGACAACAGT
TATATATAGAGGATGAAGAAAGTATATAGTCCGCCGGATGAAGATACTTGTTCATTGCAGGCGTAAACAA
TCCACAAAAAATGTTGTATTTATCGAATAGAGACGCAGAACTTTAAAGTGATTAATTTTTTTGCAAGAA
AAAAAAAAAAAAAAAA

LePIP1

GGCAAGAAAAGTATCACTAATCAGAGCAGTATTGTACATGGTAGCACAATGTTTGGGTGCCATTTGTGGA
GTTGGTTTTGTCAAGGCATTCATGACGCACCCATACAACGCCTAGGTGGTGGTGCTAATTTTTGTGCAAT
CTGGGTACAATAATGGCACTGCTTTGGGTGCTGAAATTATTGGTACTTTTGTCTTGTTTACACTGTTTT
CTCTGCTACTGACCCTAAGAGAAGCGCCCGCATTCCCATATCCCCGTGTTGGCTCCATTACCAATTGGG
TTTTGCTGTATTCATGGTTTCAATTTGGCTACAATTCCTATTACTGGAAGTGGTATCAACCCCGCTAGGAGCT
TTGGAGCTGCTGTTATTGCTGATAATAAAAATGTCTGGGATGACCAGTGGATCTTTTTGGGTTGGACCATT
TGTGGGAGCATTTGTTAGCAGCAGCATATCACCATAACATTTTGGAGAGCTGCAGCTATTAAGGCCTTGGGT
TCTTTCCGCAGCAACGCCACCAATTAATCAATAACTAAAGCATTCAATTGATCTTTTTGTTTATTTATT
TAATTCATATGTGTTTGAAGAGAAAATGTATGCAACTCTTTCATTATGTTGTATGTAATGCTAGTTTTA
TCTTAGCCTTGGATCTGTACTGTATTTATTTGTATCATCCTTATTAGTATTGGTCATATTTTTTCATTTCA
ATCTTAAAAAAAAAAAAAAAA

LePIP2

TGGTGGTGCTAATGTTGTTAATCCTGGTTACACCAAAGGTGATGGACTTGGTGCTGAGATTATTGGTACT
TTCGTCCTTGTTTACACTGTTTTCTCTGCCACTGATGCCAAAAGAAGTGCTAGAGACTCACATGTTCCCTA
TTTTGGCACCTCTTCCAATTGGATTTCGCGGTGTTCTTGGTTCAATTTGGCTACCATTCCAATCACCGGAAC
TGGTATCAACCCCGCAAGGAGTCTTGGAGCTGCTATCATCTTAAACAAAGACGAGGCATGGGATGACCAC
TGGATTTTCTGGGTTGGACCATTCAATTGGAGCAGCTCTTGTGTCAGTTTACCATCAGATAATCATCAGAG
CTATTCCATTCAAGAGCAGCAGGTTTGAAGAGTTGAAGAGACCTTTTATCTTTTTCATTTTTCCCATGTCT
GGTGTGTTGTTTTTGTGTTATTTTCTACTTTTTCTCAGATGTTGATTATGTGTGTAATTTGATCAGG
TTAATGTTTGTATCTAAAAAAAAAAAAAAAA

LeTIP

GGGTGCTCAATTAATCTGGCTCCACTGTTGCTTGCCTCCTCCTTAAATATGTCCTAATGGTTTGGCTGT
TCCAACCTCATGGAGTTGCTGCTGGGATGAGTGGAGCTGAGGGAGTAGTTATGGAGATAGTCATCACCTTT
GCACTTGTCTACACTGTTTATGCCACAGCAGCAGATCCCAAAAAGGGCTCACTTGGAAACCATTGCACCCA
TTGCAATTGGTTTTTATTGTTGGTGCCAACATTTTGGCAGCTGGCCATTTCAGTGGTGGATCTATGAACCC
AGCAGCATCAATTTGGGCCAGCTGTGCTTGGTGGAGACTTTTTCTCAGAAGTGGATTTACTGGGTGCGACCA
CTCATTGGTGGAGGATTGGCTGGGTTTTATTTATGGAGATGTCTTTATTGGATGCCACACACCCTTCCAA
CCTCAGAAGACTATGCTTAGAACAAAGAAGAAAGAACAAGTCTTCAACAGTGTTTTTCTTTTCAAGTGTGTT
TCAAAAATGCAATGTTGATTTAATTTAAGCTTTGTATATTCTGTTACGCAAGAAGTTTGTTTCCAATGA
AATATCATGTTTGGTTTCAATTTTGACAAAAAAAAAAAAAAAA

LeNHX1

TCCTGGAAAATCTGTTGGGGTAAGCGCTGCACTGCTTGGTCTGGTTCTGGTTGGAAGGGCATGTTTTGTG
TTCCCGTTGTCTCTTTTTTCCAATTGCTTGAAGCGATCTGAGCATGACAAGTTTGGTCTTAAACAACAGG
TTACGATATGGTGGGCTGGTTTAATGCGGGGATCTGTTTCCATGGCATTGGCTTATAACCAGTTTACGAG
ATTTGGCCACACCCAACAGCCAGGAAATGCAGTTATGATCACCAGCACAATTACAATAGTCCTCTTCAGT
ACAGTGGTGTGTTGGGCTGATAACCAAGCCTCTTGTAAGGTTCTTGTTGCCTTCATCACAAGGTTTCAACA
ACCTGATCTCTTCTGAACAATCGTTTGCACGCCCACTTCTCACTAACGAGCAAGAACTCGAACTTGAGAT
GGGAAATGTTGATCCTGTACGACCATCTGGTTTGAGTATTCTACTGAAGGAACCTTCTTACACTATACAT
AACCATTGGAGAAGGTTTGATGATGCTTTTATGCGACCCCTGTTCCGGAGGCAGGGGATTCGTGCCCGATG
CACCTGAGTTGTCAAAGGGAGGATGTGATCAATATTGACAAGTGTAACGCAGCAGAGTTTCTTGAATTT
GCTGTTAGACTTCAGTGTAAGTTCTTTAACTATGATAAAGGCGGAGCTAAAGGGGATTCA

LeNHX2

ATTTATCTTCTTCTCAATTCTGTTTCATTGTGATTGCGAGGGCTGCTAATGTGTTTGGTTGTGCATATTTG
GTCAATCTTGTACGACCTCCACACCAAAAAGATACCAGCAAAACATCAAAAAGCACTCTGGTACAGTGGAC
TTCGAGGCGCTATGGCTTTTGCCCTTGCTTTGCAGTCAGTCCATGATCTTCCTGAAGGACATGGTCAGAC
AATATTCACTGCTACCACTGCCATTGTTGTATTAACGGTTTTGATTATTGGAGGATCGACAGGAACCATG
CTAGAAGCTTTGGAAGTTGTGGGTGATGGTCAATCTGGCTCCATGGATGAAACCTTTGAGGGGAACAATG
GATATATAGCTCCTTCTTATAGTGATGAATCTTATGATGGTGAACCGTCATCAGGGAACAGGTTTCCAGGAT
GAACTTAAGGAATTCACAAGAGTACTACTTTCGTTCTCAGCATTGGACAAAACTACCTCACTCCATTC
TTTACTACTCAAGGTGGAGACGAAGATGAAGATGAGCCAATTATGCACAGCTCCAGAAGAGCTGGTTATG
ACGGCCACTGACTTTCAATAGCACAATCAAAATTTCAAGATGGCAAGATAAGTACGAACCACATTTTGC
TGCAAAGATAAACTTAACTTCAAGTTTACTCAACGGATAATGAGaGGCTTGTTGATTGTAAG

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Bothe angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Bothe danke ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Bearbeitung insbesondere durch viele hilfreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Hj.A.W. Schneider-Poetsch danke ich für die Übernahme des Coreferats.

Bei Frau Kerstin Langen und Frau Stefanie Backhausen möchte ich mich für die technische Assistenz bedanken.

Die *In situ* Hybridisierungsexperimente wurden am Max Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln-Vogelsang durchgeführt. Hiermit möchte ich Prof. Dr. Hahlbrock und Dr. E. Schmelzer, in dessen Labors ich die Versuche durchführen durfte. Mein Dank gilt insbesondere Herrn Dr. E. Schmelzer für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge sowie Herrn R. Franzen und Herrn U. Martin für die technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche.

Außerdem möchte ich mich vor allem bei Herrn Dr. U. Hildebrandt, Frau Dr. G. Boison und Herrn Dr. A. Mergel sowie bei Frau P. Wilde, Herrn C. Rösch und allen übrigen Mitarbeitern des Botanischen Institutes und des Max Planck-Institutes bedanken, die durch Ratschläge und Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich ganz herzlich meiner Frau Kirsten danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Köln, den 10.03.2003

Ich versichere, daß die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß die Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. H. Bothe betreut worden.

Köln, den 10.03.2003

F. Ouzias

Lebenslauf

Name	Fouad Ouziad
Wohnort	Hirschbergstr 28 50939, Köln
Geburtsdatum	31.08.1967
Geburtsort	Marrakech, Marokko
Staatangehörigkeit	marokkanisch
Familienstand	verheiratet
Schulbildung	
Sept. 1974-Juli 1979	Grundschule/Marrakech
Sept. 1979-Juli 1986	Gymnasium/Marrakech
18.6.1986	Abitur
Studium	
Sept. 1986	Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Cady Ayyad, Marrakech
17.6.1991	Licence es-sciences
1991-1993	Deutschkurs
Okt. 1993	Beginn des Studiums der Biologie an der Universität zu Köln
15.01.1999	Diplom-Hauptprüfung in der Biologie Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung der arbuskulären Mykorrhiza Pilz-Flora an ausgewählten Standorten mit molekularbiologischen Methoden
Seit 1.3.1999	Promotion am Botanischen Institut der Universität zu Köln unter der Leitung von Prof. Dr. H. Bothe

Köln, den 10.03.2003