

Erkennungsmechanismen in der Flechtsymbiose – Präkontaktstudien und molekulare Analyse

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Joachim Meeßen
aus Düsseldorf

Düsseldorf im November 2010

aus dem Institut für Botanik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Gutachterin: Apl. Prof. Dr. Sieglinde Ott (HHU, Düsseldorf, D)
2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. Dieter Willbold (HHU, Düsseldorf, D)

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Interaktionen biologischer Systeme	1
1.2	Definitionen der Symbiose	1
1.3	Formen und Charakteristika der Symbiose	2
1.4	Die Flechtensymbiose	2
1.5	Das Problem der erfolgreichen Relichenisierung	3
1.6	Symbionterkennung in der Flechtensymbiose	5
1.7	Symbionterkennung in anderen Symbiosen	10
1.8	Motivation und Fragestellung	12
2	Material und Methoden	16
2.1	Materialien	16
2.1.1	Die Flechte <i>Fulgensia bracteata</i>	16
2.1.2	Die Photobionten anderer Flechten	17
2.1.3	Die nicht-lichenisierende Alge <i>Myrmecia bisecta</i>	18
2.2	Methoden	18
2.2.1	Präparation der Flechtensymbionten	18
2.2.2	Kultur der Flechtensymbionten	20
2.2.3	Methoden zur Bionteninteraktion während der Präkontaktphase	23
2.2.4	Methoden zur Analyse der Photobiontenexudate	25
2.2.5	Methoden zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene der Bionten	31
3	Ergebnisse	48
3.1	Ergebnisse des Präkontakt-Interaktionsassays	48
3.1.1	Experimente auf Wasser-Agar	49
3.1.2	Experimente auf MYS1-Agar	65
3.1.3	Generelle Wachstumsmuster	81
3.1.4	Durchschnittliche Hyphenlängen	81
3.1.5	Anzahl der Verzweigungen	87
3.1.6	Keimungsraten	88
3.2	Exudate der Photobionten und der Alge <i>Myrmecia bisecta</i>	95
3.2.1	Exudate der Ethylacetat-Extrakte	95
3.2.2	Exudate der Wasser-Extrakte	97
3.2.3	Identifizierte Substanzen	99
3.2.4	Auswirkungen auf den Mycobionten von <i>Fulgensia bracteata</i>	111
3.2.5	Exkurs: Exudate des Mycobionten von <i>Fulgensia bracteata</i>	115
3.3	Differenzielle Genexpression der Bionten	116
3.3.1	Ergebnisse zur mRNA-Isolation aus den Bionten	116
3.3.2	Suppressive Subtraktive Hybridisierung	121
3.3.3	Ergebnisse der Klonierung und der Selektion	124
3.3.4	Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente	127
3.3.5	Identifikation differenziell exprimierter cDNA-Spezies	131
4	Diskussion	144
4.1	Resultate des Präkontakt-Interaktionsassays	144
4.1.1	Zusammenfassung der Ergebnisse der Präkontaktstudien	145
4.1.2	Präkontakt mit dem unspezifischen inkompatiblen Photobionten	146
4.1.3	Präkontakt mit dem spezifischen kompatiblen Photobionten	148

4.1.4	Präkontakt mit der nicht-lichenisierenden Alge.....	149
4.1.5	Spezifität, Selektivität und Kompatibilität im Präkontakt	151
4.1.6	Morphologisch-anatomische Charakteristika des Präkontaktes.....	152
4.1.7	Alternative Wachstumsstrategien des Mycobionten	160
4.1.8	Einfluss der Kulturmedien auf die Reaktion des Mycobionten	164
4.1.9	Modelle zur Interaktion im Präkontakt	165
4.2	Exudationsstudien	172
4.2.1	Zusammenfassung der Ergebnisse der Exudatstudien	173
4.2.2	Chemotropischer Präkontakt <i>versus</i> thigmotropischer Kontakt.....	174
4.2.3	Identifizierte Substanzen	174
4.2.4	Hemmwirkung von Indol-3-carbaldehyd und Rhamnose	180
4.2.5	Weitere Aspekte der Exudationsstudien	181
4.3	Suppressive Subtraktive Hybridisierung	183
4.3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsstudien	183
4.3.2	Generelle Aspekte zur genetischen Konstitution von Flechten	184
4.3.3	Die sechs identifizierten Gene.....	188
5	Zusammenfassung / Summary	197
5.1	Zusammenfassung	197
5.1.1	Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den Präkontaktstudien.....	197
5.1.2	Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den Exudationsstudien	198
5.1.3	Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den Expressionsstudien.....	199
5.2	Summary	201
5.2.1	Results and Conclusions of the Pre-Contact Studies	201
5.2.2	Results and Conclusions of the Exudation Studies	202
5.2.3	Results and Conclusions of the Expression Studies.....	203
6	Abkürzungsverzeichnis	205
7	Abbildungsverzeichnis	208
8	Tabellenverzeichnis.....	211
9	Literaturverzeichnis.....	213
10	Anhang	230
10.1	Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien	230
10.2	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.....	232
10.3	Zusammensetzung der verwendeten Puffer	234
10.4	Dokumentation der Präkontakt-Interaktion.....	236
10.5	Strukturformeln identifizierter Photobionten-Exudate.....	237
10.6	Sequenzen differenziell exprimierter cDNA-Fragmente	238
10.6.1	Prolyl-Peptidyl-Isomerase.....	242
10.6.2	GTP-bindendes EsdC	244
10.6.3	60S Ribosomales Protein L29, Rpl29	246
10.6.4	Protein der Aha1-Domänenfamilie	248
10.6.5	dDTP-bindende 4,6-D-Glucose-Dehydratase	249
10.6.6	ATP-Sulfurylase.....	251
11	Veröffentlichungen.....	252
12	Eidesstattliche Erklärung.....	253
13	Danksagung.....	254

1 Einleitung

1.1 Interaktionen biologischer Systeme

Interaktionen zwischen unterschiedlichen Organismen sind weit verbreitet. Kein Lebewesen ist eine Insel und jedes steht – direkt oder indirekt – in Wechselwirkung mit anderen Organismen (Paracer & Ahmadjian 2000). Interspezifische Interaktionen können heute nicht mehr als Seltenheit angesehen werden. Während früher die Einzelorganismen im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses standen, werden heutzutage gerade solche interspezifischen Interaktionen intensiv erforscht und diskutiert (Zook 1999). Sie sind nicht nur von theoretischem Interesse, sondern erlangen auch zunehmend in der angewandten Biologie eine wesentliche und auch wirtschaftliche Bedeutung. Dabei sei an die Forschungsfelder der Bestäubungsbiologie, der Schädlingsbekämpfung oder auch an die in Forst- und Landwirtschaft wichtigen Mykorrhizapilze und Rhizobien erinnert. Vielmehr bilden interaktive Assoziationen zwischen unterschiedlichen Organismen, die man als Symbiosen bezeichnet, die Voraussetzung und die treibende Kraft für eine Vielzahl an komplexen evolutiven Prozessen. Aus heutiger Sicht fällt es schwer, sich das Leben und seine Evolutionsgeschichte ohne das Auftreten von Symbiosen vorzustellen (Khakhina 1992, Sapp 1994a, 1994b).

1.2 Definitionen der Symbiose

Es war Heinrich Anton de Bary, der zuerst erkannte, dass interspezifische Interaktionen ein eigenständiges biologisches Konzept darstellen. Er prägte den Begriff der Symbiose (altgr. *syn/sym* „zusammen“ und *bios* „Leben“) im Jahre 1879 und definierte sie als das Zusammenleben zweier ungleichnamiger Arten (de Bary 1879). Diese weit gefasste Beschreibung schließt verschiedene Ausprägungen des Zusammenlebens mit ein, wie zum Beispiel den Mutualismus (eine Beziehung zum Nutzen beider Partner), den Parasitismus (eine Beziehung zum Nutzen des einen und zum Schaden des anderen Partners) und den Kommensalismus (eine Beziehung zum Nutzen des einen, aber ohne Auswirkungen auf den anderen Partner). Seit den 1920er Jahren setzte sich allerdings eine enger gefasste Definition durch, die eine Symbiose als die Vereinigung zweier ungleichartiger Organismen auffasst, von der beide Partner profitieren (Kutschera 2006), also eine Begriffsbestimmung, die ausschließlich mutualistische Interaktionen zulässt. Diese Auffassung ändert sich in jüngerer Zeit wieder und fokussiert mittlerweile auch auf andere Kriterien, als das wechselseitige Kosten-Nutzen-Verhältnis des Zusammenlebens. So wird heute oftmals eine Definition akzeptiert, die Zook (2009) wie folgt formulierte: „Symbiose ist das langfristige und enge Zusammenleben zweier oder mehrerer Organismen verschiedener Art, durch das neue Strukturen und neue Stoffwechsellösungen entstehen.“

1.3 Formen und Charakteristika der Symbiose

Die Entstehung von Symbiosen kann, ebenso wie der Übergang vom Ein- zum Vielzeller, als *major evolutionary transition*, also als Evolutionärer Großübergang angesehen werden (Sitte 2001). Dabei schließen sich eigenständige Arten zu komplexen, arbeitsteiligen Systemen mit emergenten Eigenschaften zusammen und bilden den Ausgangspunkt für vollkommen neue Entwicklungslinien. Die von Mereschkowski (1909) zuerst formulierte und später weiterentwickelte Endosymbiontentheorie (Margulis & Bermudes 1985, Martin & Müller 1998) beschreibt solche Großübergänge.

Bei sogenannten primären Endosymbiosen sollen die Mitochondrien aller Eukaryoten und die Plastiden der Chlorobionta, die Rhodoplasten der Rhodobionta und die Cyanellen der Glaucobionta aus phagozytierten α -Proteobakterien bzw. aus Cyanobakterien entstanden sein. Selbst die Entstehung der Eukaryoten wird mittlerweile als eine frühe Symbiose von methanogenen Archaeen und α -Proteobakterien diskutiert (Sitte 2001). Die sekundären Endosymbiosen beschreiben die Aufnahme von kompletten plastidenhaltigen Eukaryoten durch andere Eukaryoten. Dabei ist der innere Eukaryot bei verschiedenen Gruppen der Algen zu einer komplexen Plastide mit mehrschichtiger Membran und Nukleomorph reduziert. Weniger enge intrazelluläre Symbiosen findet man bei Rhizobien mit Leguminosen (zwecks N_2 -Fixierung), sowie bei Cyanobakterien mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Geosiphon* (Gehrig et al. 1996), der eudikotyledonen *Gunnera* (Rai et al. 2000) und mit Kieselalgen. Weiterhin bilden Grünalgen intrazelluläre Symbiosen mit Amöben, *Paramecium* und *Hydra*; mehrere Algengruppen bilden intrazelluläre Symbiosen mit Foraminiferen und Dinophyceen bilden sie mit Riffkorallen (zwecks C-Autotrophie). Extrazelluläre Symbiosen umfassen die Symbiosen von vielen Mykorrhizapilzen mit den Wurzeln der meisten Landpflanzen (Giovanetti 2002, Duplessis et al. 2002, Saarschmidt et al. 2009), von Cyanobakterien mit Moosen (*Anthoceros*), Farnen (*Azolla*) und Cycadeen und auch die Flechtensymbiose (Rai et al. 2000).

Symbiosen sind somit im Laufe der Evolutionsgeschichte vielfach und unabhängig voneinander entstanden. Sie stellen eine wichtige Anpassungsstrategie an die Umwelt dar. Symbiosen ermöglichen den beteiligten Symbionten die Besetzung freier Nischen und die Nutzung neuer Ressourcen. Elementare Stoffwechsellleistungen wie Atmung, Photosynthese und N_2 -Fixierung sind den Eukaryoten nur durch den Erwerb von Mitochondrien und Chloroplasten bzw. durch die Symbiose mit Bakterien, Chloro- und Cyanobionten möglich.

1.4 Die Flechtensymbiose

Wie beschrieben, werden symbiotische Lebensformen von vielen Organismengruppen gebildet, wobei Flechten hierbei eine besondere Stellung einnehmen. Flechten gelten daher als Musterbeispiel und Modellsystem einer Symbiose im klassischen Sinne (Hawksworth 1988, Honegger 1998). Sie sind eine symbiotische Assoziation aus Pilzen und Algen

(Ahmadjian 1993), die nur gemeinsam einen vollkommen neuen und hoch differenzierten Phänotyp mit emergenten physiologischen Eigenschaften bilden (Honegger 1991). Der Pilzpartner wird als Mycobiont bezeichnet. Er gehört bei ca. 99 % aller Flechten zu den Ascomyceten und nur bei wenigen der ca. 16.000 Flechtenarten zu den Basidiomyceten (Henssen & Jahns 1974, Dörfelt 1989). Der Algenpartner wird als Photobiont bezeichnet und kann zu den verschiedenen Verwandtschaftsgruppen der eukaryotischen Chlorophyta (Grünalgen) und der prokaryotischen Cyanobacteria gehören. Annähernd zwei Drittel aller in Flechten gefundenen Photobionten sind Grünalgen und ca. ein Drittel sind Cyanobakterien (Henssen & Jahns 1974). Ungefähr 3-4 % aller Mycobionten können mit beiden Gruppen von Photobionten in Symbiose treten (Honegger 1991). Zu solchen dauerhaft etablierten mehrfachen Symbiosen gehören sowohl die Cephalodien, in denen der Mycobiont innerhalb eines bestehenden Grünalgenthallus zusätzlich mit Cyanobakterien assoziiert ist (Fries 1886, Jordan 1970, James & Henssen 1976), als auch die so genannten Photosymbiodeme, bei denen ein Mycobiont morphologisch verschiedene Flechtenthalli mit unterschiedlichen Photobionten (Grünalgen oder Cyanobakterien) bildet (Renner & Galloway 1982, Ott 1988).

Es wird geschätzt, dass ungefähr 8 % aller terrestrischen Ökosysteme von Flechtenvegetation dominiert werden (Larson 1987). In diesen Ökosystemen stoßen die Gefäßpflanzen an ihre physiologischen Grenzen und verlieren an Konkurrenzkraft. Die poikilohydrn, das heißt wechselfeuchten Flechten besitzen hingegen einen Wettbewerbsvorteil durch ihre Fähigkeit, extreme Kälte, Hitze und Trockenheit in einem Anabiose genannten Ruhezustand zu überdauern (Honegger 1991).

1.5 Das Problem der erfolgreichen Relichenisierung

Die Flechtensymbiose ist für den Mycobionten obligat; er ist für seine Ernährung und Fruchtkörperbildung vom photoautotrophen Photobionten abhängig und kann seinen Lebenszyklus ohne ihn nicht vollenden. Die Doppelnatur des Symbioseorganismus erfordert komplexe Fortpflanzungsstrategien. Man unterscheidet die vegetative (asexuelle) Fortpflanzung, bei der beide Bionten gemeinsam verbreitet werden, und die sexuelle Fortpflanzung, bei der nur der Mycobiont generativ vermehrt und verbreitet wird. Vegetativ werden beide Bionten durch Thallusbruchstücke oder speziell gebildete Diasporen verbreitet. Dazu zählt man Schizidien, Isidien und Soredien. Schizidien sind Fragmente der obersten Thallusschicht, Isidien sind formenreiche, kompakte und berindete Auswüchse des Thallus und Soredien sind Diasporen, die in speziellen vegetativen Fortpflanzungsorganen, den Soralen, gebildet werden (Brodo et al. 2001). Soredien bestehen aus Gruppen von Photobionten, die von einem losen, unberindeten Hyphengeflecht des Mycobionten umspinnen sind. Aufgrund der hohen Plastizität des Mycels und des geringen Differenzierungsgrades der Zellen (Jahns & Ott 1994) können alle Diasporen am neuen Standort zu vollständigen Thalli auswachsen.

In isolierter Kultur vermehren sich die Photobionten sexuell mittels Zoosporen (Ahmadjian 1993). Innerhalb der Symbiose vermehren sie sich allerdings nur asexuell über Aplanosporen, deren Bildung durch den Mycobionten kontrolliert wird (Friedl 1989, Ahmadjian 1992).

Einige Verwandtschaftsgruppen der lichenisierten Ascomyceten haben die Fähigkeit zur sexuellen Reproduktion verloren. Die Mehrheit der Flechtenpilze vermehrt sich hingegen sexuell (Honegger 1992). Die von diesen Arten gebildeten Fruchtkörper, die Sexualorgane des Pilzes, vermehren in der Regel nur den Mycobionten und nur in seltenen Fällen werden Hymenialalgen zusammen mit den Ascosporen ausgestreut (Stahl 1877, Pyatt 1973 nach Bailey 1976). Durch die alleinige Verbreitung des Mycobionten ergibt sich für diesen die Problematik, nach der Keimung der Spore den passenden und obligat notwendigen Photobionten zu finden. Nur die erfolgreiche Relichenisierung sichert das dauerhafte Überleben des Flechtenpilzes und erlaubt es ihm, sich selbst zu vermehren. Dabei geht der Mycobiont nicht mit jeder verfügbaren Alge eine Symbiose ein, sondern akzeptiert nur eine mehr oder minder eng begrenzte Gruppe von Photobionten, oftmals auch nur eine einzige Art (Galun et al. 1984, Bubrick et al. 1985).

Für Mycobionten, die mit Algen der Gattung *Trebouxia* in Symbiose leben – mehr als 50 % aller untersuchten Flechtenarten – wird das Problem einer erfolgreichen Relichenisierung dadurch verstärkt, dass *Trebouxia* nicht oder nur selten freilebend vorkommt (Henssen & Jahns 1974, Honegger 1992). Als mögliche Quelle für freilebende *Trebouxia*-Algen könnten aber degenerierte Thalli dienen. Andere Photobionten (*Nostoc*, *Trentepohlia*) können hingegen deutlich häufiger freilebend beobachtet werden (Ahmadjian 1993). Die nach jedem generativen Vermehrungszyklus notwendige *de-novo* Synthese der Flechtensymbiose setzt weit entwickelte Erkennungsmechanismen voraus. Sie ermöglichen es dem Mycobionten, den für ihn obligaten Photobionten zu finden, zu erkennen, an sich zu binden und mit ihm einen erfolgreichen Relichenisierungsprozess einzuleiten. An dessen Ende steht der ausdifferenzierte Flechtenthallus (Galun 1988, Honegger 1992). Dieser Erkennungsprozess muss auch innerhalb bestehender Thalli andauern, da dort durch Teilung neu entstandene Algenzellen vom Mycobionten als solche erkannt und inkorporiert werden müssen (Reisser 1992, Ahmadjian 1993).

In Anbetracht dieser problematischen Umstände muss die sexuelle Vermehrung bedeutende Vorteile bieten, die den Mehraufwand zur Partnersuche aufwiegen. Diese Vorteile basieren wahrscheinlich auf der genetischen Rekombination der parental Merkmale und den damit einhergehenden Möglichkeiten zur Etablierung von Anpassungsstrategien an sich wandelnde Umweltbedingungen. So dominieren an Extremstandorten eindeutig solche Arten, die sich sexuell fortpflanzen (Fahselt et al. 1989). Des Weiteren scheinen Ascosporen gegenüber vegetativen Diasporen leichter und weiter verbreitet zu werden, widerstandsfähiger zu sein und extreme Umweltbedingungen durch Ruhepausen überdauern zu können, bevor sie auskeimen (Lawrey 1984a).

1.6 Symbionterkennung in der Flechtensymbiose

Flechten können als eine der, oder sogar die erfolgreichste Symbiose angesehen werden, die terrestrische Algen einzugehen vermögen (Nash 1996, Honegger 1992). Obwohl Flechten polyphyletischen Ursprungs sind, also im Laufe der Evolutionsgeschichte mehrfach unabhängig voneinander entstanden sind (Smith & Douglas 1987, Jahns 1988, Liu & Hall 2004, Hill 2009), wird angenommen, dass die meisten Abstammungslinien sehr alt sind und teilweise bis ins Kambrium zurückreichen (Hill 2009). Daher konnten sich die Bionten in einem anhaltenden koevolutiven Prozess aneinander adaptieren (Ahmadjian 1987, Hawksworth 1988, Ahmadjian 1992, Hill 2009). Es kann also davon ausgegangen werden, dass diese hoch organisierten Flechtensymbiosen besonders komplexe Formen der Interaktion entwickelt haben. Für diese Entwicklung und eine erfolgreiche Interaktion sind Erkennungsmechanismen zwischen den beteiligten Organismen von essenzieller Bedeutung. Für das weitere Verständnis des Erkennungsprozesses zwischen den beiden Bionten sind die Konzepte von Spezifität, Selektivität und Kompatibilität entscheidend. Sie sollen daher einführend erläutert werden:

- Spezifität beschreibt den Umstand, dass einige Mycobionten auf eine eng begrenzte Gruppe, eine einzelne Art oder gar eine Unterart von Photobionten angewiesen sind, während andere mit einer weiter gefassten Gruppe von Photobionten in Symbiose leben können (Henssen & Jahns 1974, Schaper & Ott 2003). Hohe Spezifität drückt sich somit in einer „absoluten Exklusivität“ der symbiotischen Interaktion aus (Galun 1988), während niedrige Spezifität die Akzeptanz einer breiter gefassten Verwandtschaftsgruppe von Photobionten bedeutet. Spezifität beschreibt damit die mögliche taxonomische Bandbreite akzeptabler Partner (Rambold et al. 1998).
- Selektivität hingegen beschreibt den Umstand, dass sich ein Mycobiont vorzugsweise mit einem Partner assoziiert, auch wenn ihm eine Auswahl an potenziellen Photobionten angeboten wird (Galun 1988) oder unter natürlichen Bedingungen zur Verfügung steht (Yahr et al. 2004). Selektivität kann somit auch als die Häufigkeit der Assoziation zwischen kompatiblen Partnern angesehen werden (Rambold et al. 1998).
- Kompatibilität ist die Grundvoraussetzung für einen erfolgreichen Erkennungsprozess und gibt den Umstand des „Zueinanderpassens“ an (Schaper & Ott 2003). Zusätzlich zu Spezifität und Selektivität beschreibt Kompatibilität die den Symbionten innewohnende Fähigkeit zur erfolgreichen gemeinsamen Lichenisierung.

Im Gegensatz zu anderen Formen der Symbiose sind die der Flechtensymbiose zu Grunde liegenden Erkennungsmechanismen zur Lichenisierung und deren Steuerung bisher wenig verstanden (Honegger 1996, Beck et al. 1998), obwohl viele Forscher an ihrer Aufklärung gearbeitet haben. Die verschiedenen Forschungsansätze werden im Folgenden dargestellt.

So gibt es eine Anzahl von Studien, die detailliert die *in natura* vorkommenden Assoziationen von Mycobionten mit Photobionten mittels molekularbiologisch-phylogenetischer Methoden untersucht haben und daraus wertvolle Erkenntnisse über den Grad von Spezifität und Selektivität in verschiedenen Verwandtschaftsgruppen der Flechten oder in unterschiedlichen Habitaten ableiten konnten (Beck et al. 1998, Beck 1999, De Priest et al. 2000, Helms et al. 2001, Beck et al. 2002, Brinkmann 2002, Romeike et al. 2002, Yahr et al. 2004, Engelen et al. 2009). Viele Mycobionten von Makroflechten, also von heteromer aufgebauten Flechten mit komplexen Thalli, zeigen dabei eine hohe (Schaper & Ott 2003, Yahr et al. 2004) bis moderate (Galun & Bubrick 1984, Bubrick et al. 1985, Honegger 1992) Spezifität und eine hohe Selektivität. Darüber hinaus zeigt sich, dass eine geringe Selektivität die Lichenisierung an einem Standort mit geringer Photobiontendichte und hoher Photobiontendiversität deutlich erleichtern kann (Romeike et al. 2002). Hohe Photobiontendichten bei geringer Photobiontendiversität begünstigten hingegen die Ausbildung hoher Selektivität. Abiotische Faktoren, die die Photobiontenpopulation beeinflussen, könnten somit auf die Selektivität wirken (Schaper & Ott 2003).

Anatomische und ultrastrukturelle Untersuchungen hingegen beleuchten hauptsächlich die Ausbildung von Kontaktstellen zwischen Mycobionten und Photobionten (Honegger 1985, 1986a, 1986b und 1991). Diese Kontaktstellen werden *mycobiont-photobiont-interface* genannt und können je nach den beteiligten Bionten sehr unterschiedlich gestaltet sein (Honegger 1991). Abgeleitet von diesen Ergebnissen wird ein vielstufiger Erkennungsprozess postuliert (Honegger 1992), beginnend mit einem unspezifischen Kontakt (1), der Ausbildung von Anhaftungsstrukturen (2) und der Bildung eines Präthallus (3). Dieser Prozess kann mit inkompatiblen nicht-spezifischen Photobionten und anderen Algen jederzeit abbrechen und führt nur mit kompatiblen Photobionten zu einem voll entwickelten Thallus. Der dafür notwendige Stimulus ist bisher unbekannt.

Darüber hinaus wurden aus einer Anzahl von Flechtenarten Phytohämagglutinine (Lektine) isoliert (Berheimer & Farkas 1953, Howe & Barrett 1970, Kardish et al. 1991, Andrews et al. 1992, Lehr et al. 1995). Hämagglutinine aus *Peltigera canina* und *P. polydactyla* besitzen die Fähigkeit, an den passenden Photobionten (*Nostoc*) zu binden (Lockhart et al. 1978). Auch der Mycobiont von *P. aphthosa* bildet in seinen Cephalodien ein PAA1 genanntes Lektin, das die spezifische Erkennung des Cyanobionten *Nostoc* vermittelt (Lehr et al. 2000). Die genaue Art und Funktionsweise dieser Lektine ist bisher nur unzureichend erforscht und es ist unklar, in wie weit sich die bisher gefundenen Lektine in den verschiedenen Flechtensymbiosen ähneln oder unterscheiden.

In anderen Arbeiten wurde der direkte Kontakt der Bionten biochemisch untersucht und in *Xanthoria parietina* und dessen isolierten Mycobionten ein spezielles, 12,5 kDa schweres *Algal-Binding-Protein* (ABP) entdeckt und isoliert (Bubrick & Galun 1980, Bubrick et al. 1980, Galun & Bubrick 1984, Bubrick et al. 1985 und Galun 1988). ABP bindet an Algenzellen von Flechten der gleichen Familie wie *X. parietina*, den *Teloschistaceae*, nicht

aber an die Algen artfremder Flechten. Das ABP könnte auch an den ersten Schritten der Reassoziaton der Symbionten beteiligt sein (Galun et al. 1984). Diese Ergebnisse führten zur Entwicklung eines Schemas zur Erkennungsreaktion. Galun (1988) bezieht dabei ausdrücklich eine Interaktion der Bionten noch vor einem physischen Kontakt in ein mehrstufiges Schema zur Lichenisierung mit ein. Demnach folgt auf eine Präkontaktphase (1) eine Kontaktphase (2), die Umhüllung der Algenzellen durch Hyphen des Mycobionten (3), die Bildung einer gemeinsamen Gallertmatrix (4) und eine Phase morphologischer, physiologischer und biochemischer Anpassungen mit dem Aufbau gemeinsamer Regulationsmechanismen (5).

Das aus *X. parietina* isolierte ABP wurde als glykosylierte Arginase identifiziert (Molina et al. 1993). Fluorescinmarkiertes ABP bindet an isolierte Photobionten von *X. parietina*, besonders dann, wenn diese in harnstoffhaltigem Medium kultiviert wurden. Harnstoff induziert in den isolierten Photobionten die Expression von glykosylierter Urease, die an ABP bindet und auch in Thalli von *X. parietina* nachgewiesen werden konnte. Beide Enzyme sind monomere Glykoproteine mit hohen Anteilen an Polygalactose (Pérez-Urria & Vicente 1989) und verlieren ihre enzymatische Aktivität, wenn sie aneinander binden. Wird die Urease nicht vom Photobionten gebildet, soll die vom Mycobionten sekretierte Arginase in die Algenzelle eindringen und den Putrescinlevel erhöhen, was letztendlich zum Zelltod führt (Vicente & Legaz 1988, Molina & Vicente 1995, 2000, Molina et al. 1998b). Die Biontenerkennung bei *X. parietina* repräsentiert einen lektinartigen Mechanismus der die Spezifität der Assoziation zwischen den Bionten sicherstellt (Legaz et al. 2004).

Die bisher angeführten Studien untersuchen größtenteils die Gegebenheiten, die *nach* einer erfolgreichen Biontenerkennung herrschen. So analysieren die wenigen molekularbiologisch-phylogenetischen Studien den Ist-Zustand in etablierten Flechtenthalli und auch die Lektine wurden in etablierten Thalli nach erfolgreicher Lichenisierung und Thallogenese untersucht. Studien, die sich mit den initialen Prozessen des Biontenkontaktes befassen sind rar.

Beobachtungen aus Experimenten mit dem Mycobionten von *Cladonia cristatella* sprechen dafür, dass die Initialreaktion der Biontenerkennung thigmotropisch vom Mycobionten ausgeht (Ahmadjian & Jacobs 1983). Die Existenz eines chemotropischen Reizes wird abgelehnt. Eine mögliche weitergehende Reaktion, die den Lichenisierungsprozess auslöst, wird als sekundäres Ereignis eingestuft. Es soll ein zwischen Photobiont und Mycobiont übertragenes Signal geben, bei dem dem thigmotropischen Reiz eine Schlüsselrolle zukommt, er aber nicht der alleinige spezifische Faktor der Erkennung sein soll (Ahmadjian et al. 1978, Ahmadjian & Jacobs 1983). Diese Ergebnisse bestätigen sich in anderen Arbeiten mit *Xanthoria parietina* (Bubrick et al. 1985) und *Cladonia grayii* (Jonesson & Lutzoni 2008) allerdings nicht und werden daher kontrovers diskutiert. In Resynthese-Experimenten werden dem Mycobionten von *Cladonia cristatella* unterschiedliche Algen als potenzielle Photobionten angeboten. Diese Experimente zeigen, dass der Mycobiont selektiv mit dem eigenen

Photobionten (*Trebouxia erici*) und nahe verwandten Arten Thallusvorstufen ausbilden kann, an den meisten anderen Trebouxien und Algen fremder Gattungen jedoch parasitiert und diese abtötet (Ahmadjian et al. 1980, Ahmadjian & Jacobs 1983). Spätere Untersuchungen mit *Cladonia grayii* stützen die Annahme, dass die morphologischen Reaktionen des Mycobionten auf seinen eigenen Photobionten spezifisch sind (Jonesson & Lutzoni 2008).

Als mögliche Transformationssignale, also jene vom Photobionten ausgesandten Signale, die den Mycobionten dazu veranlassen einen Flechtenthallus aufzubauen (Jahns 1988) werden unterschiedliche Stimuli diskutiert. Dazu gehören laut Ahmadjian (1992) unter anderem der Zuckeralkohol Ribitol, aber auch die in Flechten gebildeten Phytohormone Indolessigsäure, Kinetin (Remmer et al. 1986) und Ethylen (Luria & Garty 1991, Ott & Zwoch 1992). Ribitol ist das Hauptphotosyntheseprodukt von *Trebouxia*-Photobionten und dient der Versorgung des Mycobionten mit Kohlenhydraten (Richardson et al. 1967, Richardson et al. 1968). Die beobachtete Sekretion von Kohlenhydraten ist allerdings nur in der Symbiose ausgeprägt. Nach der Isolierung der Bionten stoppt sie innerhalb kurzer Zeit (Richardson & Smith 1966, Drew & Smith 1967a, Drew & Smith 1967b). Es bleibt anzumerken, dass auch die Existenz und Art dieser Signale kontrovers diskutiert werden und ein etwaiges Transformationssignal nicht zwangsläufig mit dem Signal der initialen Biontenerkennung identisch sein muss.

Initiale Erkennungsreaktionen waren in der Vergangenheit mehrfach Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeitsgruppe. Die so erzielten und im Folgenden beschriebenen Ergebnisse bilden die Grundlage der hier vorliegenden Dissertation. So wurde das frühe Wachstumsverhalten und die Lichenisierung von Sporen von *Xanthoria parietina* in Freilandkulturen untersucht (Ott 1987b). Die Keimung von *X. parietina* erfolgt meist aus Sporenclustern. Die Hyphen wachsen in alle Richtungen aus, haften sich durch Gallertbildung an das Substrat und bilden lockere Mycelien. Gelangen die Hyphen des Mycobionten in Kontakt mit verschiedenen Algenarten, lassen sich differenzierte Reaktionen beobachten: Bei Kontakt mit frei lebenden Algen vom *Pleurococcus*-Typ beginnt der Mycobiont Gallerte abzuscheiden und inkorporiert die Algen in ein loses, später areoliertes Netzwerk aus Hyphen, Algen und Gallerte. Beide Organismen gehen dabei keine echte Symbiose ein, eine weitere Differenzierung des Pilz-Alge-Konglomerats findet nicht statt. Dennoch ist es dem Mycobionten in diesem Stadium möglich, das Substrat großflächig zu kolonisieren und damit die Wahrscheinlichkeit auf Kontakt mit dem spezifischen *Trebouxia*-Photobionten zu erhöhen. Beim Kontakt des Mycobionten mit *Trebouxia* können andere Reaktionen beobachtet werden: Beide Bionten gehen eine echte Symbiose ein, deren erstes Anzeichen eine starke, und für die gesamte weitere Entwicklung charakteristische Gallertbildung ist. Die Gallerte formt eine geschlossene Oberfläche. Durch Wachstum wölbt sich das Gewebe halbkugelförmig hervor und bildet schuppenförmige Thallusprimordien.

Diese beiden unterschiedlichen Entwicklungsprozesse zeigen erstmals eine abgestufte Lichenisierung, basierend auf unzureichender bzw. erfolgreicher Erkennung zwischen Pilz

und Alge. Die Bedeutung der Gallertbildung und einer gemeinsamen Gallertmatrix im Rahmen der Bionterkennung wird darüber hinaus auch in anderen Arbeiten erkannt (Ahmadjian et al. 1978, Ahmadjian & Jacobs 1981) und scheint nicht auf die Flechtensymbiose beschränkt zu sein (Nicholson & Epstein 1991).

Auch der Mycobiont der Flechte *Fulgensia bracteata* ist nicht ausschließlich auf freilebende Photobionten angewiesen. Auskeimende Sporen dieser Flechte besitzen die Fähigkeit, parasitisch in die Algenschicht der Flechte *Toninia sedifolia* einzuwachsen und dort gezielt den Photobionten in einem *algal stealing* genannten Prozess zu übernehmen (Ott et al. 1995). Molekularbiologische Untersuchungen der intertranskriptiven rDNA-Regionen ITS1 und ITS2 der Photobionten von *F. bracteata* und *T. sedifolia* zeigen, dass die Photobionten beider Flechtenarten identisch sind (Schaper 2003, Schaper & Ott 2003). Die Resynthese-Experimente mit dem Mycobionten von *F. bracteata* und den unterschiedlichen Photobionten aus sechs assoziiert vorkommenden Flechtenarten zeigen klare Unterschiede im Erkennungs- und Lichenisierungsprozess und liefern Anhaltspunkte für die hohe Selektivität von *F. bracteata* und die unterschiedliche Kompatibilität der untersuchten Photobionten. Die Identität der einzelnen Photobionten ist in Abb. 1.2 aufgeführt.

Die Interaktionen zwischen dem Mycobiont von *F. bracteata* und den Photobionten von *F. bracteata* und *T. sedifolia* sind identisch. Nach sechs Wochen in Kultur ist der Kontakt zwischen den Bionten etabliert, verzweigte Hyphen umwachsen einzelne Algenzellen, umschließen sie mit Gallerte und bilden haustorienähnliche Strukturen. Nach neun Wochen sind beide Bionten in eine gemeinsame Gallertmatrix eingebettet. Innerhalb von sechs Monaten werden kompakte, gewebeähnliche Konglomerate mit inkorporierten Algenpaketen gebildet, die von einer homogenen Gallertschicht abgeschlossen werden. Es herrscht ein intensiver Kontakt zwischen beiden Bionten.

Die Interaktionen zwischen dem Mycobionten von *F. bracteata* und den anderen vier untersuchten Photobionten (aus den vergesellschaftet lebenden Flechten *F. fulgens*, *Squamarina cartilaginea*, *Lecidea lurida* und *Psora decipiens*) verlaufen grundsätzlich wie oben beschrieben, sind allerdings mehr oder minder stark verzögert und resultieren in weniger intensivem Kontakt zwischen Mycobiont und Photobiont. Allerdings lassen sich bei diesen Interaktionsmustern mehrere Unterschiede erkennen. Die Intensität der Interaktion nimmt graduell ab und lässt bei den Photobionten von *L. lurida* und *P. decipiens* bereits einen parasitischen Charakter erkennen. Daneben steigt die Teilungsrates der Algenzellen antiproportional zur Kontaktintensität an. Dies wird als mangelnde Fähigkeit des Mycobionten interpretiert, den Zellteilungszyklus von nicht kompatiblen Photobionten zu kontrollieren, während es bei kompatiblen Photobionten gelingt (Schaper & Ott 2003).

Die oben aufgeführten Untersuchungen (Ott 1987b, Galun 1988, Ahmadjian 1992, Honegger 1992, Ott et al. 1995) und die Beobachtung initialer Lichenisierungsprozesse im Modellsystem *Fulgensia bracteata* (Schaper & Ott 2003) weisen auf differenziert abgestufte

Mechanismen von Spezifität, Selektivität und Kompatibilität zwischen den potenziellen Bionten der Flechtensymbiose hin. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann eine Erkennungskaskade der initialen Lichenisierungsschritte abgeleitet werden, wie sie in Abb. 1.1 dargestellt ist.

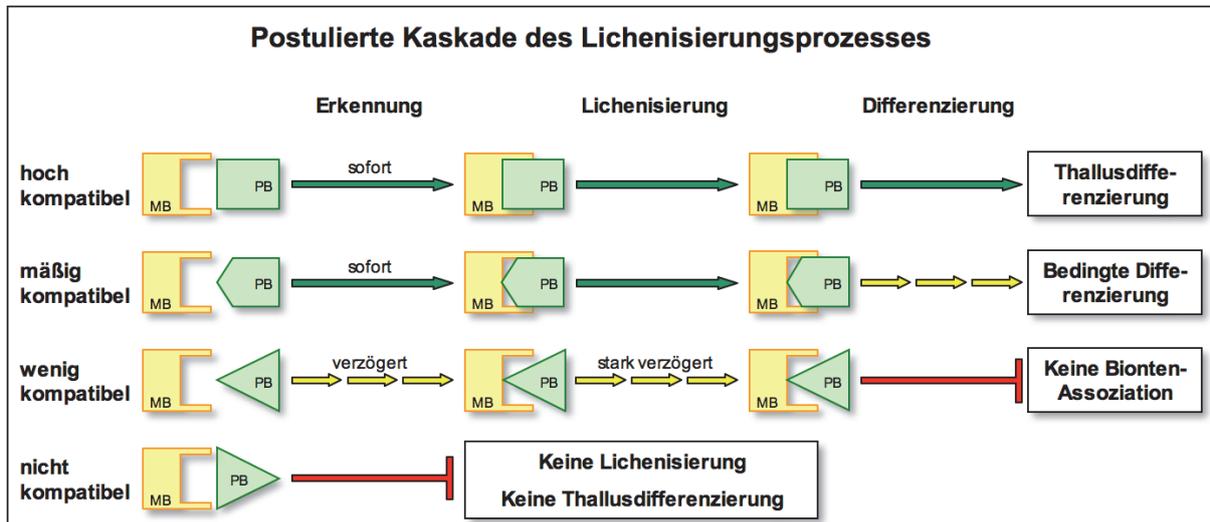


Abb. 1.1: Postulierte Kaskade des Lichenisierungsprozesses (modifiziert nach Schaper & Ott 2003)

1.7 Symbionterkennung in anderen Symbiosen

Wie vorangehend dargestellt wird, sind die Regulationsmechanismen der initialen Bionterkennung zwischen den Flechtensymbionten bisher nur ansatzweise untersucht. Daher sollen für ein besseres Verständnis die bereits bekannten Erkennungsmechanismen anderer, eingehender erforschter Symbiosen vorgestellt werden.

Symbiosen von Prokaryoten (Cyanobakterien und Eubakterien) mit grünen Pflanzen (Hornmoosen, *Azolla*, Cycadeen, *Gunnera* und Leguminosen) sind weithin bekannt. Die C-autotrophen Pflanzen nutzen dabei die Fähigkeit der stickstoffautotrophen Prokaryoten, Luftstickstoff zu binden und somit für die Pflanze nutzbar zu machen (Rai et al. 2000). Die Erkennungsmechanismen, die der *Rhizobium*-Fabaceen-Symbiose zu Grunde liegen sind gut verstanden (Long 2001, Jones et al. 2007). Die Wurzeln der Wirtspflanze scheiden Flavonoide aus, die kompatible Rhizobien chemotaktisch anlocken und an Lektine der Wurzelhaarspitzen binden. Die Flavonoide aktivieren zusätzlich die *nod*-Gene auf dem, für die Symbiose essenziellen, Sym-Plasmid von *Rhizobium*. Die von diesen Genen gebildeten Nod-Faktoren induzieren wiederum die Teilung von Wurzelrindenparenchymzellen und die Phagocytose der Bakterien in diese Zellen. Es entstehen die charakteristischen Knöllchen.

Die Erkennungsmechanismen der Cyanobakterien-Pflanzen-Symbiosen sind weit weniger gut verstanden. Während *Azolla*-Arten ihren spezifischen Cyanobionten *Anabaena azollae* über jeden Generationswechsel weitergeben, ist – in Analogie zu den Flechten – für Hornmoose, Cycadeen und *Gunnera* die *de-novo* Synthese der Symbiose mit ihrem Cyanobionten

Nostoc nach jedem Generationswechsel notwendig. Hornmoose und *Gunnera* induzieren dazu durch die Sekretion von HIF (*hormogonia inducing factor*) die Umwandlung von *Nostoc* in bewegliche Hormogonien, die dann über chemotaktische Substanzen extrazellulär in mikroaerobische Höhlungen (Hornmoose) oder intrazellulär in mikroaerobische Gewebe (*Gunnera*) geleitet und integriert werden. Bei den *Nostoc*-Cyanobionten von *Azolla* und *Gunnera* können keine kompletten *nod*-Gencluster wie bei *Rhizobium* gefunden werden. Dennoch zeigen mehrere plasmidäre Gene Homologien mit *nod*-Genen (Rai et al. 2000).

Auch die Mykorrhizasymbiosen zwischen Pilzen und höheren Pflanzen werden intensiv erforscht. Die wesentlichen Interaktionen zur Bildung der Ektomykorrhizasymbiose sind bekannt (Duplessis et al. 2002): In der Präinfektionsphase scheiden die Wurzeln der Wirtspflanze Flavonoide und Cytokinine in den Boden aus, welche Veränderungen in der Morphologie des Pilzmycels induzieren, wie zum Beispiel eine erhöhte Verzweigungsrate der Hyphen. Im Gegenzug setzen die Hyphen Substanzen frei, die ihrerseits die Wurzelmorphologie verändern. In der Kolonisationsphase lagern sich Pilzhyphen an die Wurzeln an und erfahren starke morphologische Änderungen. Die Hyphenspitzen schwellen an und formen fingerartige Strukturen. In der Morphogenese phase aggregieren die Hyphen, bilden ein die Wurzel umschließendes Pseudoparenchym, wachsen in Rhizodermis und Wurzelrinde ein und formen dort das Hartig'sche Netz. Diese Prozesse gehen mit Genexpressionsänderungen in Pilz und Pflanze einher, die mit molekularbiologischen Methoden wie Subtraktiver Hybridisierung und *differential display* untersucht wurden.

Die initialen Prozesse zur Bildung der vesikulär-arbuskulären Mykorrhiza zwischen den obligat biotrophen Glomeromyceten und einer Vielzahl von Farnen, Gymno- und Angiospermen verlaufen hingegen anders als bei Ektomykorrhizasymbiosen: Die Spore keimt in der Nähe der Wurzel und bildet bei Kontakt ein Appressorium aus. Danach durchwächst die Hyphe die Zellen der Epidermis und der äußeren Rinde entlang eines durch die Wurzelzellen präformierten Pfades und bildet schließlich im inneren Cortex ein von einer pflanzlichen und einer pilzlichen Membran umschlossenes Arbuskel. Dieses ermöglicht als *host-symbiont-interface* den Stoffaustausch zwischen den Symbionten. In dieser Symbiose kontrolliert die Pflanze den Besiedlungsprozess durch den Pilz maßgeblich und es werden Signalwege der Bionterkennung postuliert, die sich mit denen der *Rhizobium*-Fabaceen-Symbiose zumindest teilweise überschneiden (Saarschmidt et al. 2009).

Darüber hinaus sind weitere Erkennung vermittelnde Mechanismen bekannt, wie die *mating-type* Hormone der Ascomyceten (Bistis 1983) sowie N-acyl-Homoserinlaktone und Peptide aus Bakterien, die als Signalstoffe eines *quorum sensing* genannten intra- und interspezifischen Kommunikationssystems fungieren (Paracer & Ahamdjian 2000, Lyon & Novick 2004, Juhas et al. 2005).

1.8 Motivation und Fragestellung

Die initialen Interaktionen zwischen den Myco- und Photobionten der Flechtensymbiose sind bisher weder hinreichend untersucht worden, noch ausreichend verstanden (Honegger 1996, Beck et al. 1998). Bis heute existiert keine konsistente Theorie, die die vorliegenden Ergebnisse aufgreift, integriert und die Erkennung der Symbionten hinreichend zu beschreiben vermag. In der vorliegenden Arbeit sollen die initialen Erkennungsreaktionen und die zugrunde liegenden Erkennungsmechanismen genauer untersucht werden. Wie bereits beschrieben (Kapitel 1.6), sind die Funktionsweisen der meisten bekannten Lektine (außer ABP) nur im bereits etablierten Thallus untersucht worden. Die Untersuchung der *mycobiont-photobiont-interfaces*, aber auch die molekularbiologisch-phylogenetischen Studien zur Spezifität und Selektivität setzen *per se* einen bereits erfolgten Biontenkontakt voraus. Mit der Arbeit von Schaper & Ott (2003) hat sich die Untersuchung der Biontenerkennung deutlich an den Zeitpunkt des initialen Biontenkontaktes angenähert. Die Biontenerkennung und der unterschiedliche Grad von Spezifität und Selektivität konnten dabei kurz nach dem erfolgten Biontenkontakt unter kontrollierten experimentellen Bedingungen untersucht und detailliert beschrieben werden. Es zeigte sich, dass Spezifität und Selektivität schon sehr früh determiniert werden. Um den Zeitpunkt genauer zu ermitteln, an denen die Mechanismen der Biontenerkennung einsetzen, soll in dieser Arbeit auch die von Galun (1988) postulierte vorangehende Präkontaktphase mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Die initiale Biontenerkennung, ebenso wie Spezifität und Selektivität, könnten also bereits vor dem direkten, physischen Kontakt der potenziellen Partner eingeleitet werden. Dies impliziert eine Anzahl von Fragen, deren Beantwortung Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein soll:

- Existiert die von Galun (1988) postulierte und für andere symbiotische Interaktionen bereits nachgewiesene Präkontaktphase ebenso in der Flechtensymbiose?
- Gibt es morphologische Veränderungen des Mycobionten, die die Präkontaktphase begleiten und wie lassen sich diese möglichen Veränderungen charakterisieren?
- Sind solche morphologischen Veränderungen abhängig von der Identität des potenziellen Photobionten und könnten sie Aufschluss über Spezifität und Selektivität im initialen Kontaktstadium geben?

Diese Fragestellungen – wie auch alle folgenden – sollen in Untersuchungen mit der Flechte *Fulgensia bracteata* aus der Familie der Teloschistaceae beantwortet werden. Die Symbionten dieser Flechte haben sich in vorangegangenen und bereits beschriebenen Arbeiten (Schaper 2003, Schaper & Ott 2003) als überaus geeignet zur Untersuchung des Biontenkontaktes in Flechtensymbiosen erwiesen und können somit als verlässliches Modellsystem angesehen werden. Um diese Fragestellungen zu beantworten, soll ein eigens entwickelter Präkontakt-Interaktionsassay verwendet werden. Dies ist ein experimenteller Aufbau, bei dem

der Mycobiont von *F. bracteata* ohne physischen Kontakt dem Einfluss des eigenen, spezifischen Photobionten (*Trebouxia sp.*) ausgesetzt wird. Um Aussagen über den Einfluss von Spezifität und Selektivität des Mycobionten tätigen zu können, wird er ebenfalls dem Einfluss des nicht-kompatiblen Photobionten von *Lecidea luria* (*Asterochloris sp.*, vgl. Schaper & Ott 2003) und der nicht-lichenisierenden (Beck, persönliche Mitteilung), kokkalen Grünalge *Myrmecia bisecta* ausgesetzt. Die Versuche dieser *assays* finden unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen und im Vergleich zu einer Kontrolle statt. Um den Einfluss von unterschiedlichen ernährungsphysiologischen Zuständen des Mycobionten auf die Ergebnisse berücksichtigen zu können, werden alle Experimente sowohl auf nährstoffarmen Wasser-Agar als auch auf nährstoffreichem *malt-yeast-extract*-Agar mit 1 % Sucrose (syn.: Saccharose) durchgeführt. Die Auswertung erfolgt am Rasterelektronenmikroskop.

Darüber hinaus ergeben sich weitergehende Fragestellungen nach der Art der so untersuchten Einflüsse auf den Mycobionten von *Fulgensia bracteata*:

- Ist der Einfluss der potenziellen Photobionten auf den Mycobionten von *Fulgensia bracteata* chemischer Natur?
- Welche chemischen Substanzen werden von den Bionten ausgeschieden, die als Erkennungssignal dienen könnten und somit den initialen Biontenkontakt zwischen Photobiont und Mycobiont vermitteln könnten?
- Scheiden verschiedene potenzielle Photobionten unterschiedliche Substanzen aus, die als mögliche Signalstoffe dienen könnten?
- Rufen solche Substanzen unterschiedliche Reaktionen des Mycobionten hervor und lässt sich ein etwaiger Einfluss der identifizierten Substanzen auf die Entwicklung und Morphologie des Mycobionten in *in vitro* Experimenten nachweisen?

Signalsubstanzen, die eine spezifische Biontenerkennung vermitteln und im Symbiosepartner weitreichende, die Symbiose ermöglichende Veränderung auslösen, sind aus anderen Symbiosen bereits bekannt (Kapitel 1.7). Bei Flechten hingegen sind sie noch nicht erforscht. Dennoch ist anzunehmen, dass eine mögliche Präkontaktphase zwischen dem Mycobionten und einem potenziellen Photobionten über den – zumindest unidirektionalen – Austausch von Signalstoffen eingeleitet wird. In der Tat geht auch Jahns (1988) davon aus, dass der morphogenetische Einfluss der Alge die dem Pilz innewohnende Fähigkeit steuert, kompakte Gewebe zu entwickeln und so undifferenzierte Pilz-Alge-Konglomerate durch einen hoch organisierten Flechtenthallus zu ersetzen. Andere Autoren hingegen (Ott 1987b, Ahmadjian 1991 und Beck et al. 1998) sehen den Photobionten ebenso als initialen Stimulus für eine abschließende Lichenisierung an. Daher sollen in dieser Arbeit auch hauptsächlich die Photobionten auf ausgeschiedene Substanzen hin untersucht werden. Dafür werden der

eigene, spezifische Photobiont von *Fulgensia bracteata* (*Trebouxia sp.*), der nach ITS-Sequenzanalyse (Schaper & Ott 2003) identische Photobiont von *Toninia sedifolia*, die wenig bzw. nicht spezifischen Photobionten von *Fulgensia fulgens*, *Lecidea lurida* und *Xanthoria elegans*, wie auch die nicht-lichenisierende, freilebende kokkale Grünalge *Myrmecia bisecta* in flüssigem Medium kultiviert. Das Kulturmedium wird anschließend auf etwaige Exudate hin analysiert. Die Identifizierung der Substanzen erfolgt in Abhängigkeit von der zu identifizierenden Substanz mit verschiedenen chromatographischen Methoden. Die Versuche finden unter standardisierten Bedingungen und im Vergleich zu einer Kontrolle statt. Um den Einfluss von unterschiedlichen ernährungsphysiologischen Zuständen des Photobionten auf die Ergebnisse berücksichtigen zu können, werden alle Experimente in zuckerfreiem TOM, und in zuckerhaltigem TOM-Medium (1 % Glucose) durchgeführt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit soll ein anderer Aspekt der initialen Biontenerkennung bearbeitet werden. Es ist anzunehmen, dass die Entstehung der Flechtensymbiose zwischenartliche genetische Interaktionen mit einbezieht (Dyer 1989), wie auch eine wechselseitige Genregulation (Ahmadjian et al. 1990). Ebenso wird angenommen, dass die Kompatibilität von Symbionten genetisch determiniert ist (Carlile et al. 2001). Abgesehen von diesen allgemeinen Überlegungen fehlt es an Wissen über die Vorgänge auf genetischer Ebene während des initialen Biontenkontaktes und der Biontenerkennung. Im Vergleich dazu ist das Wissen über erkenntungsspezifische Gene bei anderen Symbiosen wesentlich genauer, wie zum Beispiel der *Rhizobium*-Fabaceen-Symbiose (Long 2001), der Ektomykorrhiza (Duplessis et al. 2002) und der vesikulär-arbuskulären Mykorrhiza (Saarschmidt et al. 2009). Für ein tieferes Verständnis der Biontenerkennung und der ihr zu Grunde liegenden Mechanismen ist es unerlässlich, die daran beteiligten Gene zu identifizieren.

- Verändert sich die Genexpression bzw. die Genregulation während des initialen Biontenkontaktes und der Biontenerkennung?
- Welche Gene werden im Zuge der Erkennung der Symbionten und des initialen Biontenkontaktes hochreguliert bzw. herunterreguliert?
- Welche Bedeutung könnten diese Gene für die Mechanismen der Biontenerkennung besitzen?

Diese Fragen sollen mittels Suppressiver Subtraktiver Hybridisierung (SSH) aufgeklärt werden. Dabei handelt es sich um eine Identifizierungsmethode für Gene, die aufgrund eines experimentellen Stimulus oder eines physiologischen Unterschiedes differenziell exprimiert sind (Diatchenko et al. 1996, Li et al. 2002). Die SSH eignet sich zur Untersuchung von Organismen und zur Identifizierung von Genen, die bisher nicht molekularbiologisch charakterisiert sind, was auf *Fulgensia bracteata*, wie auf alle Flechten, zutrifft.

Im Falle dieser Arbeit ist der Stimulus das Zusammentreffen beider Bionten. In einem Ansatz (*tester*) werden beide Bionten in Kontakt gebracht und die kontaktspezifischen Gene exprimiert und alle Transkripte, auch die kontaktspezifisch hochregulierten, isoliert. In einem zweiten Ansatz (*driver*) werden die Bionten isoliert kultiviert und deren Transkripte getrennt isoliert. Der *driver* enthält keine kontaktspezifischen mRNAs. In der Folge nutzt die SSH eine suppressive PCR-Methodik. Dies erzeugt cDNA-Populationen in denen nur Transkripte vertreten sind, deren Expression vom untersuchten Stimulus angehoben wird. Das Vertauschen der *tester*- und *driver*-Ansätze ermöglicht es, durch den Stimulus herunterregulierte Gene zu identifizieren. Eine gemeinsame Kulturdauer der Bionten von vier Wochen wurde gewählt, da sie genug Zeit für eine Veränderung der Genexpression bieten sollte, aber noch keine morphologische Reaktion des Mycobionten von *F. bracteata* auf den spezifischen Photobionten zeigt (Schaper & Ott 2003).

Die folgende Tabelle (Tabelle 1.1) stellt dar, welche Organismen in dieser Arbeit mit den bereits vorgestellten Methoden untersucht wurden. Die Auswahl der Organismen erfolgte dabei im Kontext vorangegangener Arbeiten (Schaper & Ott 2003).

Identität des Photobionten bzw. der Alge	Interaktionsintensität mit dem MB von <i>F. bracteata</i> (Schaper & Ott 2003)	Untersuchungen der vorliegenden Arbeit		
		Photobionten- bzw. Algen- Exudate	Präkontakt- Interaktion mit <i>F. bracteata</i> -MB	Differentiell exprim. Gene bei Kontakt mit <i>F. bracteata</i> -MB
<i>Trebouxia</i> sp., Clade I, subgr. 1* aus <i>F. bracteata</i>	++++ intensiv, spezifisch	ja	ja	ja
<i>Trebouxia</i> sp., Clade I, subgr. 1* aus <i>T. sedifolia</i>	++++ intensiv, spezifisch	ja	-	-
<i>Trebouxia</i> sp., Clade I, subgr. 2* aus <i>F. fulgens</i>	+++ schwächer, verzögert	ja	-	-
<i>Asterochloris</i> sp., Var. 4* aus <i>S. cartilaginea</i>	+ schwach, verzögert	-	-	-
<i>Asterochloris</i> sp., Var. 4* aus <i>P. deceptans</i>	+ schwach, verzögert	-	-	-
<i>Asterochloris</i> sp., Var. 3* aus <i>L. lurida</i>	+ parasitisch, verzögert	ja	ja	-
<i>Trebouxia</i> sp.** aus <i>X. parietina</i>	-	ja	-	-
<i>Myrmecia bisecta</i> nicht lichenisiert	-	ja	ja	-

Tab 1.1: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit angewendeten Methoden und der dazu verwendeten Organismen (* Identifizierung durch Schaper & Ott (2003), ** nach De Vera et al. (2003), MB = Mycobiont).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Die Flechte *Fulgensia bracteata*

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich die beiden Bionten der Flechte *Fulgensia bracteata* (Hoffm.) Räsänen var. *bracteata* untersucht. Die Arten der Gattung *Fulgensia* (Mass. et De Not.) werden taxonomisch zur Familie der Teloschistaceae und zur Ordnung der Lecanorales aus dem Stamm der Ascomycota gestellt. Bei *Fulgensia bracteata* (Abb. 2.1) handelt es sich um eine krustig-schuppige, an den Rändern nur leicht gelappte Flechtenart, die vornehmlich auf kalkhaltigen Felsen und flachgründigen Böden in sommerwarmen und trockenen Lokalklimaten wächst. Sie besiedelt neben dem eigentlichen Substrat auch assoziiert vorkommende Moose und Flechten indem sie diese überwächst bzw. an ihnen parasitiert. Mit mehreren anderen Flechtenarten bildet *F. bracteata* dabei einen relativ stabilen und charakteristischen Vegetationstypus, der unter dem Namen „Bunte Erdflechtengesellschaft“ bekannt ist. Die gelblich-orange bis leuchtend gelbe Thallusfärbung und das kräftige Rot der Apothecien von *F. bracteata* tragen ebenso zu dieser Namensgebung bei, wie die ähnlich gefärbte Flechte *Fulgensia fulgens*, die Brauntöne von *Lecidea lurida* (Ach.), das Braunrot von *Psora decipiens* (Hedwig) Hoffm., sowie das Blaugrau von *Toninia sedifolia* (Scop.) Timdahl. Die gelbe Färbung von *F. bracteata* geht dabei auf hohe Konzentrationen des sekundären Flechteninhaltsstoffes Parietin zurück, das auf und in der Rinde abgelagert wird (Ott et al. 1995). Die Apothecien von *F. bracteata* stehen zerstreut bis dicht gedrängt mit einem mehr oder weniger breiten Rand und einem Durchmesser von bis zu 2 mm auf dem Thallus. Sie streuen pro Ascus acht einzellige, hyaline und meist breit elliptische Ascosporen mit Abmessungen von 9-13 x 4-7 µm aus (Poelt 1969).

Die Verwendung von *F. bracteata* ergibt sich aus den vorangegangenen, in der Einleitung bereits ausführlich dargestellten Forschungsergebnissen. Die hohe Sporulationsrate präparierter Apothecien und die rasch darauf folgende Keimung der Sporen auf gängigen Kulturmedien (Schaper 2003) ermöglichen es, initiale Interaktionsstudien mit axenischen, generativen Mycobiontenkulturen durchzuführen. Der Photobiont von *F. bracteata* wurde mit Hilfe von molekularbiologischen Analysen der ITS 1 und ITS 2 rDNA Regionen identifiziert (Romeike et al. 2002). Es handelt sich dabei um die einzellige kokkale Grünalge *Trebouxia sp.*, Clade I, Untergruppe 1 (Bestimmung durch Schaper & Ott 2003, Einteilung gemäß Helms et al. 2001) aus der Familie der Trebouiaceae und der Ordnung der Microthamniales. Auch der Photobiont ließ sich, wie im Folgenden beschrieben, isolieren und axenisch kultivieren. Das Ausgangsmaterial der Untersuchungen wurde, ebenso wie das aller anderen Flechtenproben der „Bunten Erdflechtengesellschaft,“ in den Jahren 2004 und 2006 auf der

Kiesalvar bei Ardre (57°23'N, 18°42'E auf Gotland, Schweden) gesammelt, luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.



Abb. 2.1: Habitus von *Fulgensia bracteata* auf Moos (Photo von D. Borchard, 2004)

2.1.2 Die Photobionten anderer Flechten

Für die folgenden Untersuchungen wurden neben dem Photobionten von *Fulgensia bracteata* auch Photobionten anderer, zumeist assoziierter Flechtenarten der „Bunten Erdflechtengesellschaft“ verwendet. Sie dienen dazu, die Ergebnisse zur initialen Bionteninteraktion zwischen dem Mycobionten und dem eigenen, hoch kompatiblen Photobionten von *F. bracteata* mit der initialen Interaktion gegenüber weniger bzw. nicht kompatiblen Photobionten (vgl. Schaper & Ott 2003) vergleichen zu können. Gleiches galt für die Analyse der Photobiontenexudate. Auch hier erschien es sinnvoll, nicht nur die Exudate des hoch kompatiblen Photobionten zu untersuchen. Die verwendeten Photobionten werden im Folgenden beschrieben und eine vergleichende Ansicht der durchgeführten Untersuchungen findet sich in Tabelle 1.1. Für die Untersuchung der initialen Bionteninteraktion wurde der nicht-kompatible Photobiont *Asterochloris* sp. Var. 3 aus *Lecidea lurida* Ach. (Synonym: *Psora lurida* (Ach.) DC) verwendet. Für die Untersuchung der Photobiontenexudate wurden neben dem Photobionten von *L. lurida* auch die Photobionten *Trebouxia* sp., Clade I, Untergruppe 2 aus *Fulgensia fulgens* (Sw.) Elenkin., und die mit dem spezifischen *F.*

bracteata-Photobionten identische *Trebouxia* sp., Clade I, Untergruppe 1 aus *Toninia sedifolia* (Synonym: *T. caeruleonigricans* (Lightt.) Th.Fr.) verwendet. Darüber hinaus wurde der Photobiont *Trebouxia* sp. Clade I, Untergruppe 2 (Schaper & Ott 2003, De Vera et al. 2003) verwendet, der aus der rindenbewohnenden Flechte *Xanthoria parietina* und damit aus einem gänzlich anderen Habitat stammt.

2.1.3 Die nicht-lichenisierende Alge *Myrmecia bisecta*

Zum weiteren Vergleich der Ergebnisse aus der initialen Bionteninteraktion und der Analyse der Photobiontenexudate wurde auch die nicht-lichenisierende (Beck, pers. Mitteilung), freilebende, kokkale Grünalge *Myrmecia bisecta* Reisingl. (Ettl & Gärtner 1995, SAG 2043, Brixen, Südtirol, Italien) verwendet. In der Gattung *Myrmecia* findet man sowohl lichenisiert vorkommende Arten, wie *M. biatorellae*, als auch nicht-lichenisierende Arten wie *M. astigmatica* und die Boden besiedelnde *M. israeliensis* (Friedl & Bhattacharya 2002). Wie auch die Gattungen *Trebouxia* und *Asterochloris* gehört *Myrmecia* zur Familie der Trebouiaceae und der Ordnung der Microthamniales aus der Klasse der Trebouiophyceae (Friedl 1995, Romeike et al. 2002, Nelsen & Gargas 2006).

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der Flechtensymbionten

2.2.1.1 Präparation des Mycobionten

Die Präparation des Mycobionten erfolgte im Rahmen dieser Arbeit auf zwei Arten. Zum einen wurden die Mycobionten axenisch aus generativ gebildeten Ascosporen isoliert, zum anderen aus dem vegetativen Pilzmycel direkt aus dem Flechtenthallus. Beide Methoden werden im Folgenden beschrieben. Die erste Methode, abgewandelt nach Yoshimura et al. (2002), bediente sich der Sporulation, also des natürlichen Verbreitungsmechanismus der Ascomyceten. Dabei werden die in den Asci der Apothecien gebildeten Ascosporen beim Austrocknen ausgeschleudert und verbreitet. Zur Isolierung wurden die Thalli der Flechte nach dem Auftauen mit einem Pinsel grob gereinigt und jüngere, unbeschädigte Apothecien wurden mit einem Skalpell sorgfältig und sauber abpräpariert. Die Apothecien wurden dann unter fließendem Wasser für ca. 60 min gewaschen und so von weiteren Verunreinigungen befreit. Die abgetropften, aber noch feuchten Apothecien wurden sofort mit kleinen Mengen Terostat (Henkel AG, Düsseldorf, D) und in Gruppen von 5-7 Apothecien mit einer sterilen Pinzette auf der Innenseite der Petrischalendeckel fixiert. Mit dem Austrocknen der Apothecien begannen die Asci auf das darunterliegende Medium auszustreuen (Abb. 2.2). Dieser Vorgang wurde nach drei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) durch das

Auswechseln der Petrischalendeckel beendet und die so isolierten und auskeimenden Ascosporen des Mycobionten unter sterilen Bedingungen weiter kultiviert.

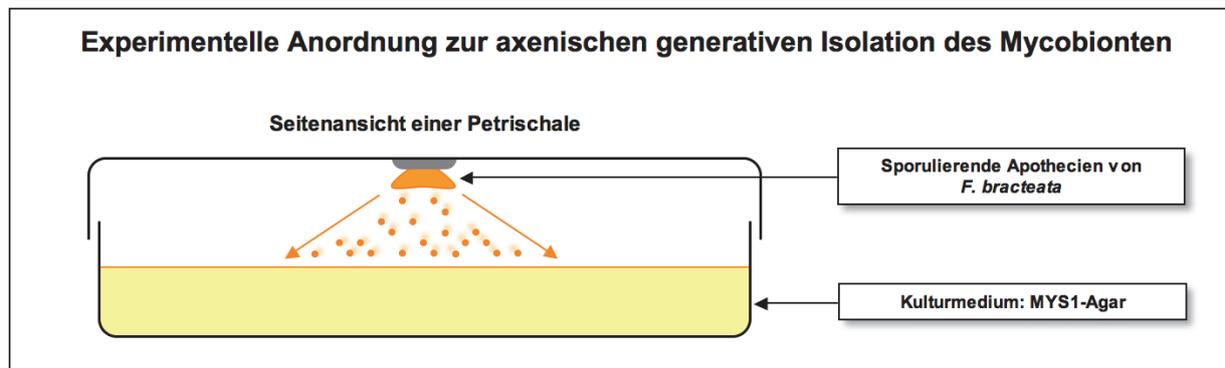


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung zur axenischen generativen Isolation des Mycobionten

Die zweite Methode wurde für die Anzucht größerer Mengen an axenisch kultiviertem Mycobionten verwendet. Dabei wurden, wie oben beschrieben, die Apothecien vom Thallus abpräpariert und gewaschen. Anschließend wurden die Apothecien unter der Sterilbank (Mühlenkamp Reinraumtechnik, Billerbeck, D) unter einem Binokular (WILD-Heerbrugg M3, Völkermarkt, A, mit Schwanenhalslampe KL 1500 electronic, Schott AG, St. Gallen, CH) mit einem sterilen Skalpell derart zerteilt, dass das mittig gelegene, kompakte und meist algenfreie Pilzmycel von dem mit Algen durchzogenen lecanorinen Apothecienrändern befreit und von der Subhymenialschicht abgetrennt wurde (Abb. 2.3). Die so isolierten Stücke des Mycobionten wurden auf Agar überführt und axenisch weiterkultiviert.

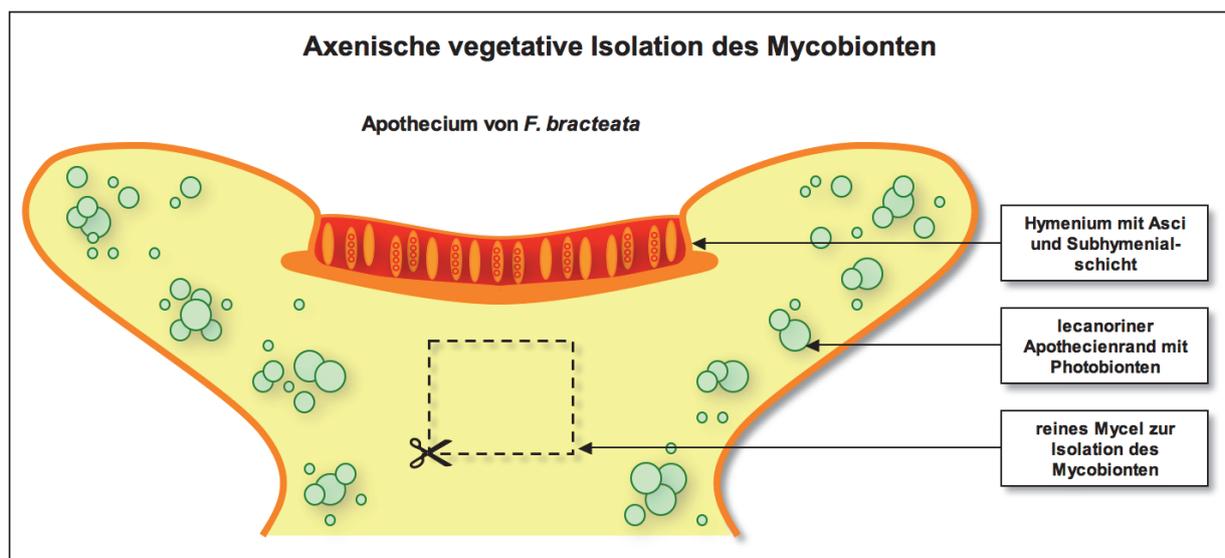


Abb. 2.3: Schematische Darstellung zur axenischen vegetativen Isolation des Mycobionten

2.2.1.2 Präparation der Photobionten

Die Photobionten wurden aus den Thalli der entsprechenden Flechten isoliert. Dazu wurden die Thalli der Flechte nach dem Auftauen mit einem Pinsel grob gereinigt und einzelne, augenscheinlich vitale Bereiche unter fließendem Wasser für ca. 60 min gewaschen, um sie so von weiteren Verunreinigungen zu befreien. Die abgetropften, aber noch feuchten Thallusstücke wurden dann unter der Sterilbank (Mühlenkamp Reinraumtechnik, Billerbeck, D) unter einem Binokular (WILD-Heerbrugg M3, Völkermarkt, A, mit Schwanenhalslampe KL 1500 electronic, Schott AG St. Gallen, CH) mit einem sterilisierten Skalpell zerteilt und einzelne, möglichst pilzfreie Algengruppen der Algenschicht abgenommen. Die Algengruppen wurden anschließend zwischen zwei sterilen Objektträgern vorsichtig zerrieben. Tropfen der so gewonnenen grünen Suspension wurden auf TOM-Agar ausgebracht und nach einigen Wochen konnten einzelne Photobiontenkolonien entnommen und weiter kultiviert werden (nach Ahmadjian 1993).

2.2.2 Kultur der Flechtensymbionten

2.2.2.1 Kulturmedien

Für die vorliegende Arbeit wurden zwölf verschiedene Kulturmedien – flüssige Medien sowie feste Agar-Sorten – verwendet. Ihr jeweiliger Verwendungszweck wird nachfolgend aufgeführt, während sich die entsprechende Zusammensetzung im Anhang befindet.

TOM-Medium ohne Glucose: Für dieses abgewandelte *Trebouxia organic medium* (TOM) wurde, als einzige Abweichung vom nachfolgend aufgeführten Grundrezept, auf die Zugabe von 1% Glucose verzichtet (Tab. A.1). Dieses Medium wurde für die Analyse der Photobiontenexudate (Kapitel 2.2.4.1) verwendet, um den Einfluss eines veränderten ernährungsphysiologischen Zustandes auf die Photobiontenexudation untersuchen zu können. Für die Dünnschichtchromatographie (TLC, Kapitel 2.2.4.5) wurde ausschließlich TOM-Medium ohne Glucose verwendet.

TOM-Medium: Das *Trebouxia organic medium* nach Ahmadjian (1967) eignet sich zur Kultur von Photobionten der Gattung *Trebouxia* und verwandter Algengattungen, wie *Asterochloris* und *Myrmecia* (Tab. A.2). Es wurde für die dauerhafte Kultur der Photobionten, für die Analyse der Photobiontenexudate (Kapitel 2.2.4.1) und zur Kultur des Photobionten von *F. bracteata* zur Untersuchung auf differenziell exprimierte Gene des Biontenkontaktes (Kapitel 2.2.5.1) verwendet.

TOM-Agar: Dieses Festmedium wurde durch die Zugabe von 20 g Agar pro Liter TOM-Medium hergestellt (Tab. A.3). TOM-Agar diente zur Isolation und Vorkultur der

Photobionten (Kapitel 2.2.1.2), sowie als Vergleichsprobe zur Untersuchung der initialen Bionteninteraktion (Kapitel 2.2.3).

Wasser-Agar: Wasser-Agar ist ein Minimalmedium mit nur geringen Mengen an Nährstoffen (Tab. A.4). Es diente zur Untersuchung des initialen Biontenkontaktes (Kapitel 2.2.3) unter Bedingungen des Nährstoffmangels.

MY-Agar mit 1% Sucrose: Dieses abgewandelte *malt-yeast-extract*-Medium wurde durch die Zugabe von 10 g Sucrose (syn. Saccharose) und 20 g Agar pro Liter MY-Medium hergestellt (Tab. A.5). Es diente zur dauerhaften und vermehrenden Kultur des Mycobionten von *F. bracteata*, zur Untersuchung des initialen Biontenkontaktes (Kapitel 2.2.5.1) und zur Untersuchung auf differenziell exprimierte Gene des Biontenkontaktes auf Festmedium (Kapitel 2.2.5.1).

MY-Medium: Das *malt-yeast-extract*-Medium (MY) ist ein gängiges Medium zur Flüssigkultur von Pilzen und eignet sich auch zur Flüssigkultur von Mycobionten (Tab. A.6, nach Ahmadjian 1993). Es wurde für die Flüssigkultur des Mycobionten von *F. bracteata* zur Untersuchung auf etwaige Mycobiontenexudate verwendet.

MY-Medium mit 1% Sucrose : Dieses abgewandelte *malt-yeast-extract*-Medium (MYS1) wurde durch die Zugabe von 10 g Sucrose (syn. Saccharose) pro Liter MY-Medium hergestellt (Tab. A.7). Es diente zur Flüssigkultur des isolierten Mycobionten von *F. bracteata* und zur Untersuchung auf differenziell exprimierte Gene des Biontenkontaktes in Flüssigmedium (Kapitel 2.2.5.1).

LB-Medium mit Ampicillin: Dieses Luria-Broth-Medium diente der selektiven Kultur von transformierten *Escherichia coli* Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, dass neben einem inserierten Gen auch das Gen für eine Ampicillinresistenz trug (Tab. A.8). Es wurde bei der Anzucht von einzelnen Bakterienklonen zur Untersuchung auf differenziell exprimierte Gene des Biontenkontaktes (Kapitel 2.2.5.11) verwendet.

LB-Agar mit Ampicillin: Dieser Agar diente einem ähnlichen Zweck wie das LB-Medium mit Ampicillin (Tab. A.9). Es wurde bei der Untersuchung auf differenziell exprimierte Gene des Biontenkontaktes (Kapitel 2.2.5.8) verwendet.

LB-Agar mit Ampicillin, IPTG, X-Gal: Dieses LB-Medium diente der ausschließlichen Kultur von transformierten *Escherichia coli* Bakterien und zur Blau-Weiß-Selektion von jenen Bakterien, die ein Plasmid mit Insert aufgenommen haben (Tab. A.10). Es wurde bei der Untersuchung auf differenziell exprimierte Gene des Biontenkontaktes (Kapitel 2.2.5.8) verwendet.

SOC-Medium: Hierbei handelt es sich um ein komplexes Nährmedium (Tab. A.11), das im Rahmen der Untersuchung auf differenziell exprimierte Gene des Biontenkontaktes (Kapitel 2.2.5.8) nach der Transformation kompetenter Bakterienzellen verwendet wurde.

dYT/HMNF-Einfrierpuffer: Dieser glycerinhaltige Puffer wurde zur Übernachtskultur (ÜNK) von transformierten Bakterienklonen und direkt anschließenden Einfrieren bei -80 °C verwendet (Tab. A.12). Es diente somit zur dauerhaften Aufbewahrung der bei der Untersuchung auf differenziell exprimierte Gene des Biontenkontaktes erhaltenen Klone (Kapitel 2.2.5.8).

2.2.2.2 Kulturbedingungen

Flüssigkulturen von Mycobionten und Photobionten: Die Flüssigkulturen aller Bionten wurden in einer Klimakammer bei 10 °C, einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 14 zu 10 Stunden bei einer Beleuchtungsstärke (PPFD) von 15-25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und unter Schütteln bei 95 rpm in je 80 ml des entsprechenden Mediums kultiviert. Neben den Dauerkulturen für die Photobionten wurden auch die Photobionten/Algen und der Mycobiont für die Analyse der Biontenexudate unter diesen Bedingungen angezogen. Ebenso wurden die Photobionten, die Mycobionten und die gemeinsam kultivierten Bionten zur Untersuchung auf differenziell exprimierte Gene des Biontenkontaktes in Flüssigmedium (Kapitel 2.2.5.1) unter diesen Bedingungen kultiviert. Die jeweilige Kulturdauer wird in der Beschreibung des entsprechenden Experiments aufgeführt.

Festkulturen von Mycobionten und Photobionten: Die Festkulturen auf Agar wurden in einem Klimaschrank (RUMED 1200, Rubarth Apparate GmbH, Laatzen, D) bei 18 °C, einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 zu 12 Stunden und einer Beleuchtungsstärke (PPFD) von 15-25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ angezogen. Diese Anzuchsbedingungen wurden für die Untersuchung des initialen Biontenkontaktes im Präkontakt-Interaktionsassay und für die Anzucht und Vermehrung des Mycobionten auf Festmedium verwendet. Ebenso wurde es für die Mycobionten-Kultur und die gemeinsam kultivierten Bionten zur Untersuchung auf differenziell exprimierte Gene des Biontenkontaktes auf Festmedium verwendet (Kapitel 2.2.5.1). Die jeweilige Kulturdauer wird in der Beschreibung des entsprechenden Experiments aufgeführt. Lediglich für die alleinige Anzucht von Photobionten auf Festmedium, meist direkt nach der Isolation aus dem Flechtenthallus, wurde ein baugleicher Klimaschrank mit 12 °C, aber unter ansonsten identischen Kulturbedingungen verwendet.

Kultur der Bakterien: Bakterienkulturen von *Escherichia coli*, sowohl in Fest- wie auch Flüssigkultur, wurden stets bei 37°C in Dunkelheit kultiviert, die Flüssigkulturen zusätzlich unter stetigem Schütteln bei 150 rpm. Die Anzucht der Bakterien dauerte zumeist nur eine

Nacht. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Bakterien auf LB-Agar-Platten aber für einen Zeitraum von bis zu 2 Monaten bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt werden.

2.2.3 Methoden zur Bionteninteraktion während der Präkontaktphase

Der spezifische Photobiont von *Fulgensia bracteata*, der unspezifische inkompatible Photobiont von *Lecidea lurida* und die nicht-lichenisierende Alge *Myrmecea bisecta* wurden auf ihren Präkontakt-Einfluss auf den isolierten und generativ verbreiteten Mycobionten von *F. bracteata* in einem eigens entwickelten Präkontakt-Interaktionsassay hin untersucht.

Die zwei Photobionten und die Alge wurden für vier Wochen in einer Vorabkultur angezogen (vgl. 2.2.2.2). Anschließend wurden je 2 ml einer dicht bewachsenen Algen-suspension auf Petrischalen (60 mm Durchmesser) mit nährstoffarmem Wasser-Agar und auf nährstoffreichem, das Mycobiontenwachstum gut unterstützendem MYS1-Agar ausplattiert und homogen ausgestrichen. Die Algen wurden danach für weitere fünf Tage als Festkultur kultiviert (vgl. 2.2.2.2) und anschließend mit einem Durapore Membranfilter aus Polyvinyliden-Difluorid (Millipore Inc., Billerica, USA) mit einer Dicke von 0,125 mm und einem durchschnittlichen Porendurchmesser von 0,22 µm abgedeckt. Als Kontrolle wurden Petrischalen mit beiden Medien, aber ohne Algenzellen mit dem Membranfilter belegt. Um den Einfluss des beim Ausplattieren der Algen unvermeidlich mit übertragenen TOM-Mediums auf den Mycobionten auszuschließen, wurden ebenfalls Petrischalen mit TOM-Agar mit Membranfiltern belegt und wie die Kontrolle behandelt. Je drei Replicates wurden für jeden unterschiedlichen Ansatz angefertigt. Mit Hilfe der bereits beschriebenen Methode nach Yoshimura et al. (2002, vgl. 2.2.1.1) wurden abpräparierte Apothecien von *F. bracteata* in Gruppen zu je 5-7 Stück an der Innenseite des Petrischalendeckels fixiert. Diese sporulierten für drei Tage unter Festkulturbedingungen. Die ausgestreuten Ascosporen fielen auf den Membranfilter und keimten so in direkter Nähe der Photobionten, wobei der Membranfilter einen direkten Kontakt beider Bionten und ein Durchwachsen der Hyphen des Mycobionten aufgrund seiner Porengröße verhinderte. Abb. 2.4 zeigt den Versuchsaufbau.

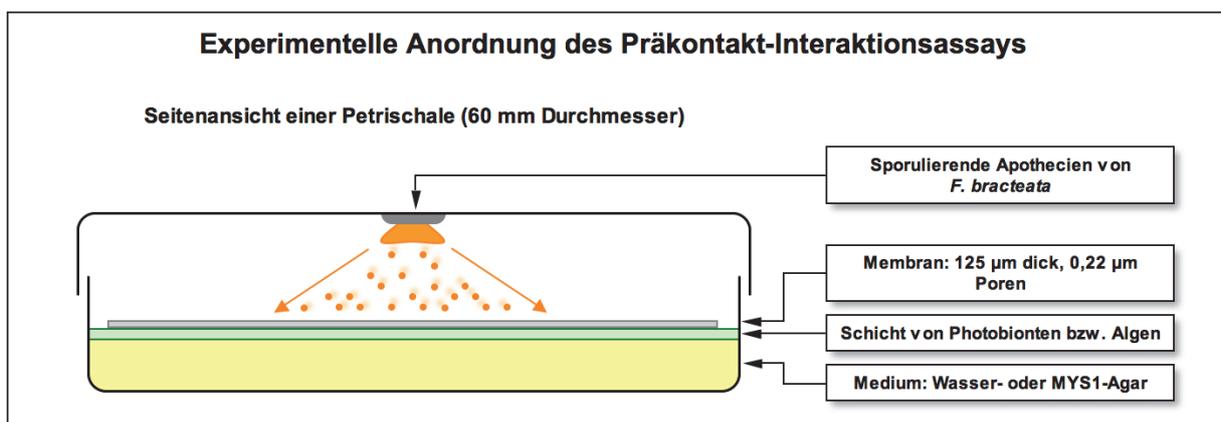


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung des Präkontakt-Interaktionsassays

Nach 10, 20 und 30 Tagen wurden ca. 5 x 10 mm große Stücke des Membranfilters unterhalb der Sporulations-*spots* steril entnommen, auf rasterelektronenmikroskopischen Probenhaltern befestigt, für 8 h luftgetrocknet und für 180 s bei 35 mA mit Gold beschichtet (Agar Sputter Coater, Agar Scientific Ltd., Stansted, GB). Anschließend wurden die Mycelien des Mycobionten unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM, LEO 1430 VP, Carl Zeiss SMT AG, Wetzlar, D) hinsichtlich ihrer Wachstumsmuster und ihrer Morphogenese detailliert untersucht. Zusätzlich wurden verschiedene Parameter aufgenommen und dokumentiert; wie die Menge an produzierter Gallerte, die Bildung von Lufthyphen, die Beschaffenheit der Hyphenspitzen, die Verzweigungshäufigkeit und die Keimungsrate. Mit Hilfe von Funktionen der REM-Software konnte ebenfalls die Hyphenlänge pro Spore erfasst werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden bei dieser Auswertung lediglich jene Mycelien berücksichtigt, die nicht zu dicht beieinander lagen und/oder zu stark miteinander verflochten waren.

Die Daten zur Keimungsrate, zur Verzweigungshäufigkeit pro Spore und zur Hyphenlänge pro Spore wurden mit grundlegenden statistischen Methoden analysiert. Dazu wurden die Ergebnisse der Hyphenlängenmessung zur besseren Vergleichbarkeit in 12 Klassen eingeteilt. Die Klassen 1-10 repräsentierten Intervalle der Hyphenlänge von je 50 μm (1-50 μm bis 451-500 μm), während die Klassen 11 und 12 Hyphenlängen von 501-1000 μm und >1000 μm darstellten (vgl. Kapitel 3.1.1 und Kapitel 3.1.2). In der Beschreibenden Statistik wurde der Arithmetische Mittelwert für die Betrachtung der durchschnittlichen Hyphenlängen, Verzweigungszahlen und Keimungsraten verwendet. Ein gewichteter Mittelwert nach der Formel $x_{\text{gew}} = (h_1+h_2+h_3)*(n_1+n_2+n_3)^{-1}$ wurde für die Betrachtung der relativen Klassenhäufigkeiten verwendet, da er die unterschiedlichen Anzahlen ausgestreuter Ascosporen auf jedem einzelnen Replicate berücksichtigt (Diepenbrock, mündl. Mitteilung). Die Streuung der Mess- und Mittelwerte wurde stets als Standardabweichung angegeben, da sie genauere Aussagen über die Streuung tatsächlich erhobener Stichproben-Messwerte und die biologische Variabilität erlaubt als der Standardfehler (Kuschak, 2006). Der Standardfehler bildet als statistisches Maß eher die Messgenauigkeit ab. Methoden der Schließenden Statistik wurden für einen Vergleich der durchschnittlichen Hyphenlängen verwendet, da das Hyphenwachstum ein grundlegendes messbares Kriterium für den Einfluss potenzieller Photobionten auf das Wachstumsmuster des Mycobionten zu sein scheint. Für die Auswertungen der Schließenden Statistik wurde der t-Test (nach Rasch et al. 2006) verwendet. Der t-Test testet, ob die aufgestellte Nullhypothese H_0 zutrifft. Im hier verwendeten Fall besagt H_0 , dass sich die gefundenen empirischen Mittelwerte mit einer gegebenen Wahrscheinlichkeit von $p = 0,95$ nicht unterscheiden. Die Berechnung erfolgt mit der Formel

$$t_{df} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\hat{\sigma}_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}}$$

$$\text{mit } \hat{\sigma}_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}} \quad \text{und} \quad df = n_1 + n_2 - 2$$

- wobei t_{df} = t-Wert
 \bar{x}_1 = Mittelwert der Stichproben aus Population 1
 \bar{x}_2 = Mittelwert der Stichproben aus Population 2
 $\sigma_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}$ = geschätzter Standardfehler der Mittelwertsdifferenz
 σ_1^2 = geschätzte Varianz der Population 1
 σ_2^2 = geschätzte Varianz der Population 2
 n_1 = Anzahl der Beobachtungen aus Population 1
 n_2 = Anzahl der Beobachtungen aus Population 1
 df = $n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgrade

Die Parameter für die durchgeführten t-Tests von H_0 lauten: $p = 0,95$; $n = 3$; $f = 4$ und ergeben einen t-Wert für H_0 von 2,776. Werte im Bereich zwischen -2,776 und 2,776 bestätigen H_0 , Werte außerhalb dieses Bereichs lehnen sie ab. Das besagt im Umkehrschluss, dass sich solche empirisch gefundenen Mittelwerte signifikant voneinander unterscheiden. Die vergleichende Auswertung der so erhaltenen Daten, aber auch der generellen Wachstumsmuster und der morphologischen Charakteristika, wie Gallertbildung und Beschaffenheit der Hyphenspitzen, diente dazu, den unterschiedlichen Präkontakt-Einfluss der beiden Photobionten und der Alge auf den Mycobionten von *F. bracteata* zu ermitteln.

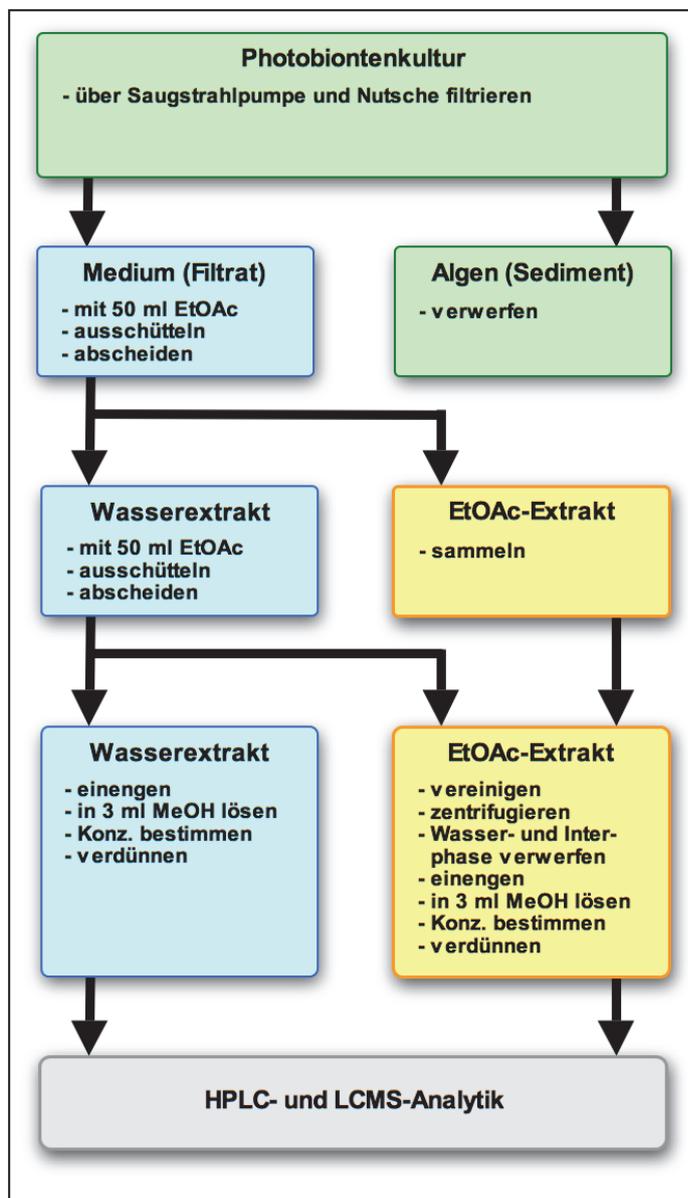
2.2.4 Methoden zur Analyse der Photobiontenexudate

2.2.4.1 Vorbereitung der Wasser- und Ethylacetatextrakte für HPLC und LCMS

Die Photobionten von *Fulgensia bracteata* und *Toninia sedifolia* (in beiden Fällen *Trebouxia* sp., Clade I, Untergruppe 1), von *F. fulgens* (*Trebouxia* sp., Clade I, Untergruppe 2), *Lecidea lurida* (*Asterochloris* sp.) und *X. parietina* (*Trebouxia* sp.), sowie die Alge *Myrmecia bisecta* wurden unter den in Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen Bedingungen angezogen. Die Flüssigkultur wurde in TOM ohne Glucose (TOM-) und in TOM mit Glucose (TOM+) für jeden der untersuchten Photobionten bzw. für die Alge durchgeführt. Die Kulturdauer betrug 8 Wochen und für jeden Ansatz wurden drei Replicates angefertigt.

Nach der zweimonatigen Kulturdauer wurden die Algenzellen mit Hilfe von Wasserstrahlpumpe, Büchnertrichter und Millipore-Filtern (Millipore Inc., Billerica, USA) vollständig vom Kulturmedium abfiltriert und verworfen. Das verbleibende Kulturmedium (ca. 70 ml) hingegen wurde mit lipophilem Ethylacetat (50 ml, HPLC-Qualität) versetzt, dreimal ausgeschüttelt und im Scheidetrichter abgetrennt. Das Kulturmedium, ein wässriger

Extrakt, wurde erneut mit frischem Ethylacetat (50 ml) ausgeschüttelt. Beide Ethylacetatphasen wurden vereinigt, für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert und etwaige Reste der Wasserphase, ebenso wie die oftmals stark ausgeprägte Interphase, abgenommen. Sowohl



die Ethylacetatphase als auch die Wasserphase wurden im Rotationsverdampfer bei 40 °C und Niederdruckbedingungen soweit eingengt, dass der zähflüssige Rückstand in 3 ml reinem Methanol (HPLC-Qualität) aufgenommen werden konnte. Eine schematische Darstellung zur Herstellung der Extrakte findet sich in Abb. 2.5. Um ein Überladen der HPLC- und LCMS-Säulen in den nachfolgenden Analysen zu vermeiden und den Gehalt an UV-absorbierenden Substanzen abschätzen zu können, wurden je 5 µl Probe auf TLC-Platten aufgetragen und im UV-Kabinett unter monochromatischem UV-Licht von 254 nm ausgewertet. Wenn nötig wurden die Extrakte mit reinem Methanol (HPLC-Qualität) verdünnt. Bis zur weiteren Untersuchung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren und aufbewahrt.

Abb. 2.5: Schematische Darstellung zur Probenaufbereitung für HPLC- und LCMS-Analyse (Konz. = Konzentration)

2.2.4.2 Analyse der Proben mittels HPLC

Die HPLC, auch als Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bekannt, ist eine analytische Methodik, mit der sich unterschiedlichste, vor allem auch nicht-flüchtige Substanzen trennen und identifizieren lassen. Bei diesem chromatographischen Trennverfahren wird die zu untersuchende Substanz mit Hilfe einer mobilen Phase, auch Laufmittel genannt, durch die stationäre Phase in einer Trennsäule gepumpt. Die Wechselwirkungen der unterschiedlichen

Substanzen mit der stationären Phase, aber auch mit der sich meist über die Laufzeit ändernden mobilen Phase, bewirken dabei die Auftrennung der Proben.

Die Ethylacetat- und Wassereextrakte wurden mit *reversed phase* HPLC untersucht. Hierbei werden die Partikel der stationären Phase mit unpolaren Alkanen substituiert. Somit interagieren unpolare Probenmoleküle stärker mit der stationären Phase und werden stärker retardiert. Als Säule diente eine Eurosher 100 C18-Trennsäule (Knauer ASI, Berlin, D). Von jeder Probe wurden 20 µl mit einem ASI 100 Autosampler (Dionex Corp. Sunnyvale, USA) in die HPLC eingespeist und mit einem binären Gradientenlaufmittel aus Methanol (HPLC-Qualität) und NanoPur[®]-Wasser (pH 2 mit *ortho*-Phosphorsäure) aufgetrennt. Die Laufzeit betrug 60 min, bei einer Durchflussrate von 1 ml/min. Die Chromatogramme der Proben wurden auf vier Kanälen mit einem UVD 340 S Photodiodenarraydetektor (Dionex Corp. Sunnyvale, USA) bei vier Wellenlängen von 235, 254, 280 und 340 nm aufgezeichnet. Für jedes Signal mit einem parametrischen Wert von ≥ 1 [Signal]*min wurde ein komplettes UV/VIS-Absorptionsspektrum von 200-595 nm aufgenommen. Die Betrachtung und anschließende Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der Chromeleon V6.30 Software (Dionex Corp. Sunnyvale, USA) und die Identifizierung der Signale mittels einer internen UV/VIS-Spektrenbibliothek. Für die weitere Auswertung der Ergebnisse wurden nur solche Signale berücksichtigt, die für alle drei Replicates eine Übereinstimmung zwischen Spektrum und Referenz von ≥ 990 (was 99,0 % entspricht) zeigten.

2.2.4.3 Analyse der Proben mittels LCMS

Die LCMS, auch LC/MS oder HPLC-MS genannt, ist eine Kopplung von zwei Methoden: zum einen der bereits beschriebenen HPLC als flüssigchromatographischem Trennverfahren und zum anderen der Massenspektrometrie. Die Massenspektrometrie (MS) dient dabei der Messung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses m/z der Ionen von zu untersuchenden Substanzen. Dazu werden die zu untersuchenden Substanzen bzw. Substanzgemische in die Gasphase überführt und ionisiert. Die Ionen werden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt, nach ihrem m/z -Verhältnis aufgetrennt und detektiert. Dies wiederum ermöglicht die Identifizierung der gesuchten Substanzen anhand ihres Molekulargewichtes.

Die HPLC-Komponente (HP1100 HPLC Apparat, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) funktionierte im Prinzip genau so, wie bereits in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben. Das binäre Gradienten-Laufmittel bestand aus Methanol (HPLC-Qualität) mit angesäuertem NanoPur[®] Wasser (0,1 % Ameisensäure) bei einer Durchflussrate von 0,4 ml/min. Als stationäre Phase dienten Eurosher 100 C18-A-Trennsäulen (Knauer ASI, Berlin, D). Der bei 280 nm arbeitende UV- Photodiodenarraydetektor nahm ein komplettes Chromatogramm des Trennlaufs auf und zu jedem signifikanten Signal ein Absorptionsspektrum von 210-400 nm. Damit war eine Zuordnung von Absorptionsspektren und Massenspektrogrammen ebenso möglich, wie ein Vergleich mit den Ergebnissen der vorangegangenen HPLC-Analyse. Die

Übergabe der Probe von der HPLC-Komponente an die MS erfolgte mit einem G 1313 A ALS 1100 Injektor (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA).

Das MS (Finnigan LCQ^{Deca} MS, Thermo Finnigan Ltd., Cambridge, GB) besteht im Wesentlichen aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. In der Ionenquelle werden die von der HPLC übernommenen Substanzen ionisiert. Im Fall dieser Untersuchung geschah dies mittels der *electrospray injection* (ESI, Thermo Finnigan Ltd., Cambridge, GB), einer sanften, also weitgehend zerstörungsfreien Ionisierungsmethode, die sich besonders für biologische Moleküle (Arzneistoffe, Pestizide, Peptide, Proteine, Oligonukleotide) eignet, generell aber auch für große, geladene und polare Moleküle. Bei diesem Verfahren entstehen meist Pseudomolekül-Ionen durch die Aufnahme oder Abgabe eines Protons $[M+H]^+$ bzw. $[M-H]^-$ oder Addukt-Ionen wie $[M+Na]^+$ oder $[M-H+HCOOH]^-$.

Als Analysator diene eine Ionenfalle, die Ionen in einem Quadrupolfeld einfängt und selektiv nach ihrer Ladung und ihrem m/z -Verhältnis an den Detektor weiterleitet. Der Detektor (G 1315 B DAD 1100, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) nahm die Massenspektrogramme getrennt für positiv und negativ geladenen Ionen nach dem Prinzip eines Sekundärelektronenvervielfachers (SEV) auf. Die Kontrolle der erhaltenen Massenspektrogramme und die nachfolgende Analyse erfolgten mit Hilfe der Xcalibur© V1.30 Software (Dionex Corp. Sunnyvale, USA).

2.2.4.4 Analyse einer Probe mittels EIMS

Sowohl in der HPLC, als auch in der LCMS zeigte sich das Signal einer Substanz mit außergewöhnlichem Absorptionsspektrum, das sich allerdings mit keiner der beiden Methoden bestimmen ließ. Für die Identifikation dieser Substanz wurde die EIMS, die Elektronenimpakt-MS, verwendet. Bei dieser massenspektrometrischen Methode wurden die Probenmoleküle durch Elektronenstöße ionisiert und dadurch in der Regel auch fragmentiert. Die Fragmente wurden mit der MS anschließend wie oben beschrieben aufgetrennt. Die Verteilungsmuster sowie die m/z -Verhältnisse der Fragmente erlauben eine Identifizierung der zu analysierenden Probe.

Zur Untersuchung mit der EIMS wurde die Substanz mittels semi-quantitativer HPLC (L-7100 Pumpe und L-7400 UV-Detektor, beide von Merck/Hitachi, Darmstadt, D) aus 1,0 ml Ausgangsextrakt mit einer Eurosher 100-10 C18-Trennsäulen (Knauer ASI, Berlin, D) in einem Gradienten-Laufmittel aus Methanol (HPLC-Qualität) und NanoPur[®]-Wasser (pH 2 mit *ortho*-Phosphorsäure) aufgetrennt (Durchflussrate von 1,0 ml/min, Laufzeit bis zur Fraktionierung des gesuchten Signals). Die entsprechende Fraktion wurde eingengt, resuspendiert (Methanol, HPLC-Qualität) und mit der EIMS (*uncoupled trace* DSQ MS, Thermo Finnigan Ltd., Cambridge, GB) bei einer Ionenquellentemperatur von 220 °C und einer Elektronenenergie von 70 eV analysiert. Da Masse und Häufigkeit der Fragmente einer jeden Substanz unter definierter Beschleunigungsspannung eindeutig sind, konnte die gesuchte Substanz durch den integrierten Datenbankabgleich identifiziert werden.

2.2.4.5 Analyse der Proben auf Kohlenhydrate mittels TLC

In diesem Arbeitsschritt wurden Photobionten von *Fulgensia bracteata*, *Toninia sedifolia*, *Fulgensia fulgens*, *Lecidea lurida* und *Xanthoria parietina*, sowie die Alge *Myrmecia bisecta* auf exudierte Kohlenhydrate, genauer auf Zucker und Zuckeralkohole hin untersucht. Als Methode diente dazu die Dünnschichtchromatographie (TLC), da sich die bereits beschriebenen Methoden der HPLC und LCMS nicht für die Analytik von Kohlenhydraten eigneten. Die verwendeten Verfahren orientierten sich, trotz einiger Abweichungen, an den Methoden von Hansen (1975) zur Identifizierung von Zuckern und von Papin & Udiman (1975) zur Identifizierung von Zuckeralkoholen. Für die Untersuchung auf Kohlenhydrate wurden die Photobionten nur in TOM ohne Glucose in Flüssigkultur angezogen, da der mit 1 % recht hohe Glucosegehalt im normalen TOM-Medium die Ergebnisse beeinträchtigt hätte. Für jeden Photobionten bzw. die Alge wurden drei Replicates angesetzt und bearbeitet.

Zur Vorbereitung der Kulturmedien wurden Proteine und Lipide extrahiert um ihrem störenden Einfluss auf die TLC auszuschließen. Dazu wurden pro Probe 500 µl kaltes Medium mit 500 µl eiskaltem Aceton (p.a.) versetzt und 5 min bei -20 °C inkubiert. Die Proteine wurden für 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge (5415C, Eppendorf AG, Hamburg, D) ausgefällt. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand wurde für die Lipidextraktion in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in der Vakuum-Konzentrations-Zentrifuge (Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, D) getrocknet, dreimal mit n-Butanol (p.a.) gewaschen, bei RT getrocknet und in 50 µl Aqua bidest. resuspendiert. Aliquots von 10 µl wurden zusätzlich für 2 h bei 120 °C mit Trifluoressigsäure (TFA, p. a.) hydrolysiert, in der Vakuum-Konzentrations-Zentrifuge getrocknet und wieder in 10 µl Aqua bidest. resuspendiert. Diese saure Hydrolyse diente dazu, eventuell exudierte Oligo- oder Polysaccharide detektieren zu können, da die Methode von Hansen (1975) nur Mono-, Di- und Trisaccharide identifizieren kann. Für beide Methoden zur Zucker- und Zuckeralkoholanalytik wurden Silica 60 Dünnschichtplatten aus Glas verwendet (10 x 20 cm, 0,25 mm Silicabeschichtung, Merck AG, Darmstadt, D). Für beide Methoden wurden Probenmengen von 1, 2 und 3 µl aufgetragen. Die R_f -Werte und die Färbung der *spots* der Vergleichsproben, ebenso wie die entsprechenden Literaturangaben, wurden zur Identifizierung exudierter Kohlenhydrate verwendet.

Das Lösungsmittelsystem für die Zucker-Analytik war Isopropanol-Aceton-0,1 M Milchsäure (4:4:2). Nach dem TLC-Lauf wurden die Platten durch Besprühen mit Diphenylamin-Anilin-Aceton-80 % Phosphorsäure (4 g : 4 ml : 200 ml : 30 ml) entwickelt und für 30 min bei 105 °C inkubiert. Die Zucker erschienen dadurch als farbige *spots* auf weißem Grund.

Das Lösungsmittelsystem für die Zuckeralkohol-Analytik war Isopropanol-Aceton-Wasser (4:5:1). Die Entwicklung der trockenen Platten erfolgte durch zweimaliges Besprühen, zuerst mit Natrium-*meta*-periodat (0,1 % in Wasser) und nach 5 min Inkubation mit N,N,N',N'-

tetramethyl-4,4'-methylendiamin – Essigsäure – Aceton (2 g : 20 ml : 80 ml). Nach kurzem Erhitzen auf 50 °C zeigten sich die Zuckeralkohole als weiße *spots* auf blauem Grund.

Zur Konzentrationsabschätzung wurden Konzentrationsreihen von 10; 1; 0,1; 0,01 und 0,001 µg/µl Glucose bzw. Ribitol verwendet, wobei die Nachweisgrenze für beide Substanzgruppen bei ca. 0,1 µg aufgetragenem Kohlenhydrat lag. Zur Identifizierung etwaiger Kohlenhydrate wurden 0,2 %ige Vergleichsstandards von zehn Monosacchariden (Ribose, Xylose, Arabinose, Sorbose, Mannose, Glucose, Galactose, Fructose, Rhamnose, Fucose), drei Disacchariden (Sucrose, Maltose, Lactose) und drei Zuckeralkoholen (Ribitol, Sorbitol, Mannitol) verwendet.

2.2.4.6 Effekte der Photobiontenexudate auf den *F. bracteata*-Mycobionten

Die mit den bereits beschriebenen Methoden (Kapitel 2.2.4.1 bis 2.2.4.5) identifizierten Substanzen wurden auf ihren Einfluss auf die Keimung und die frühe Entwicklung des Mycobionten von *F. bracteata* hin untersucht. Dafür wurden die isolierten und auskeimenden Ascosporen dem Einfluss dieser Substanzen in einem Experiment ausgesetzt, dessen Versuchsaufbau dem zur axenischen Isolation des Mycobionten ähnelt (Kapitel 2.2.1.1, Abb. 2.2). Allerdings wurden dem Kulturmedium MYS1-Agar die vier identifizierten Substanzen, Indol-3-carbaldehyd, L-Rhamnose, Cyclo-(L-tryptophanyl-L-tryptophanyl) und Cyclo-(L-leucyl-L-tyrosyl) in Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-6} M zugesetzt und der Agar mit Durapore-Membranfiltern (Polyvinylidene-Difluorid Porendurchmesser 0,22 µm, Millipore Inc., Billerica, USA) abgedeckt. Cyclo-(L-leucyl-L-tyrosyl) wurde nach der Methode von Kopple & Ghazarian (1968) selbst aus L-Leucyl-L-tyrosyl synthetisiert. Bei dieser Synthese wurde Phenol verwendet und ein nur unvollständiges Abdampfen des Phenols konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher wurden auch Versuche mit 10^{-4} und 10^{-6} M Phenol angesetzt. Da sich die Ergebnisse unter Einfluss von Phenol allerdings nicht von denen der Kontrollproben (MYS1-Agar ohne Zusatz) unterschieden, wird im Folgenden nicht mehr auf diese Proben eingegangen. Für jeden Ansatz wurden sechs Replicates untersucht. Die auf diese Weise präparierten Festkulturen wurden anschließend, wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, kultiviert. Nach 10 und 30 Tagen wurden ca. 5 x 10 mm große Stücke des Membranfilters unterhalb der Sporulations-*spots* entnommen, auf Probenhaltern befestigt, für 8 h luftgetrocknet und für 180 s bei 35 mA mit Gold beschichtet (Agar Sputter Coater, Agar Scientific Ltd., Stansted, GB). Anschließend wurden auskeimende Sporen unter dem REM (LEO 1430 VP, Carl Zeiss SMT AG, Wetzlar, D) hinsichtlich ihrer Keimungsrate und ihrer Wachstumsmuster detailliert untersucht.

2.2.5 Methoden zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene der Bionten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl von molekularbiologischen Methoden mit dem Ziel verwendet, differenziell exprimierte Gene des initialen Kontaktes der Bionten von *Fulgensia bracteata* zu identifizieren. Kernstück dieser Methodik ist die Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH), die genau jene differenziell exprimierten Gene exponentiell amplifiziert, nicht differenziell exprimierte Gene jedoch nicht oder nur linear amplifiziert. Am Anfang der Prozedur stand die Kultivierung der Bionten mit und ohne initialem Biontenkontakt (2.2.5.1). Zum einen wurden dazu beide Bionten getrennt voneinander kultiviert und ihre cDNA-Populationen erst zu Beginn der SSH vereinigt (*driver*-Ansatz). Zum anderen wurden die Bionten für einen definierten Zeitraum gemeinsam kultiviert, um die Expression der kontakt- und erkenntungsspezifischen Gene auszulösen (*tester*-Ansatz). An die Biontenkultur schloss sich die Isolation der Nukleinsäuren mit „heißem Phenol“ an (2.2.5.3), sowie ein DNase-Verdau (2.2.5.4). Aus der so von DNA bereinigten Gesamt-RNA wurde die mRNA isoliert (2.2.5.6), die das Ausgangsmaterial der anschließenden SSH bildete (2.2.5.7). Am Ende der SSH erhielt man zwei cDNA-Populationen, in der hoch- bzw. herunterregulierte, differenziell exprimierte, kontakt- und erkenntungsspezifische cDNAs aus beiden Bionten stark angereichert waren. Um diese identifizieren zu können, wurden die cDNA-Populationen in geeignete Vektoren kloniert, selektiert, vereinzelt (2.2.5.8) und sowohl die Länge der Inserts, als auch deren Qualität mittels *colony*-PCR bestimmt (2.2.5.9). Um falschpositive cDNAs auszuschließen und die unterschiedlichen Expressionsstärken der positiven cDNAs bestimmen zu können, wurden die Klone in Makroarray-Experimenten mit radioaktiv markierten *driver*- und *tester*-Sonden hybridisiert und analysiert (2.2.5.10). Anschließend wurden geeignete Klone kultiviert (2.2.5.11) und die Inserts ihrer isolierten Plasmide sequenziert (2.2.5.12). Die Identifizierung erfolgsversprechender cDNAs erfolgte durch Abgleich mit frei zugänglichen Online-Datenbanken unter Verwendung verschiedener Algorithmen (2.2.5.13).

2.2.5.1 Kultur der Bionten zur Induktion differenziell exprimierter Gene

Für die Untersuchung differenziell exprimierter Gene wurden die Bionten von *Fulgensia bracteata* sowohl in Flüssigkultur, als auch in Festkultur angezogen (vgl. Kapitel 2.2.2.2). Für den *driver*-Ansatz mussten beide Bionten getrennt voneinander kultiviert werden. Im *tester*-Ansatz wurden die differenziell exprimierten Gene des initialen Biontenkontaktes hingegen erst durch die gemeinsame Kultur der Bionten induziert.

In Flüssigkultur wurde der Mycobiont (MB) für sechs Wochen (42 d) in MYS1-Medium vorkultiviert und vermehrt, der Photobiont (PB) für den gleichen Zeitraum in TOM-Medium. Danach wurden sowohl der Mycobiont, als auch der Photobiont für weitere vier Wochen (28 d) in frisches MYS1-Medium überführt. Da die gemeinsame Kultur der Bionten zur Induktion differenziell exprimierter Gene in MYS1-Medium erfolgte, musste der Photobiont vorher an

dieses Medium „gewöhnt“ werden. Dieser frühzeitige Medienwechsel sollte in der folgenden SSH die Verwechslung von lediglich durch den Medienwechsel differenziell exprimierten Photobionten-Genen mit differenziell exprimierten Genen des initialen Biontenkontaktes ausschließen. Erst nach dieser zusätzlichen Kulturdauer von vier Wochen wurden die Nukleinsäuren aus den *driver*-Ansätzen beider Bionten isoliert, während die Biontenkulturen der *tester*-Ansätze zu diesem Zeitpunkt vereinigt wurden. Der früheste Zeitpunkt für die Ausbildung morphologischer Änderungen wurde in vorangegangenen Arbeiten nach sechs Wochen gemeinsamer Kultur beobachtet (Schaper & Ott 2003). Zu diesem Zeitpunkt war ein direkter Biontenkontakt bereits etabliert. Daher wurden die *tester*-Ansätze in diesem SSH-Experiment nur für vier Wochen gemeinsam kultiviert. Innerhalb dieses Zeitraumes war ein initialer Biontenkontakt möglich und damit auch die Möglichkeit zur Regulation erkenntnispezifisch exprimierter Gene gegeben, allerdings noch kein enger morphologischer Kontakt ausgeprägt. Nach diesen vier Wochen gemeinsamer Kultur wurden auch die *tester*-Ansätze zur Nukleinsäure-Isolation verwendet. Das zeitliche Schema der Biontenkultur wird in Abb. 2.6 dargestellt. Die Anzahl an angesetzten Erlenmeyerkolben für den Ansatz *driver*-MB betrug 13 und für den Ansatz *driver*-PB betrug sie 17. Für den kombinierten *tester*-MB+PB-Ansatz wurden je 6 ml dichter *tester*-Photobiontensuspension aus drei separaten Erlenmeyerkolben in 14 Erlenmeyerkolben mit *tester*-MB transferiert.

Die Kultur auf Festmedium erfolgte nach dem gleichen Schema und auf den entsprechenden Agar-Typen. Für den Ansatz *driver*-MB wurden 14 MYS1-Agarplatten mit jeweils ca. 50 Mycel-spots verwendet, für den Ansatz *driver*-PB 12 mit Photobionten bewachsene MYS1-Agarplatten. Für den kombinierten *tester*-MB+PB-Ansatz wurden 13 MYS1-Agarplatten mit ebenfalls ca. 50 Mycel-spots pro Platte angezogen. Zur Herstellung des Biontenkontaktes wurden zwei Tropfen aufgeschwemmter, dichter Algensuspension (von drei mit Photobionten bewachsenen MYS1-Agarplatten) auf jeden Mycel-spot überführt.

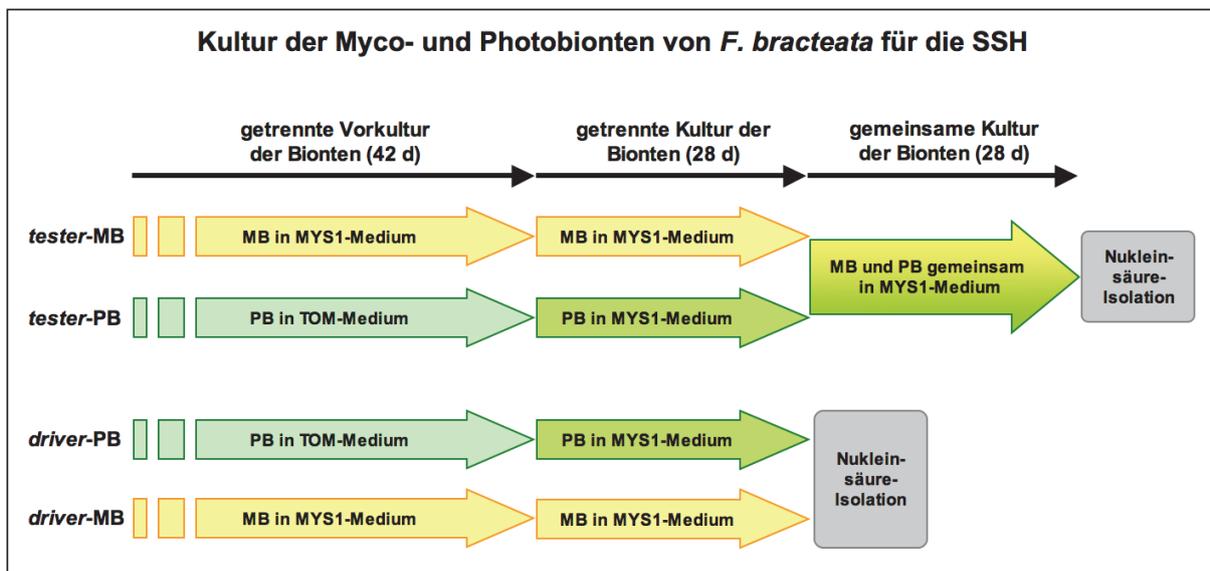


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Kulturdauer der Myco- und Photobionten von *F. bracteata* für die SSH

2.2.5.2 Arbeiten mit RNA

Für eine erfolgreiche Durchführung der SSH wurde mRNA in ausreichender Qualität und Quantität benötigt. RNA ist instabiler als DNA und kann durch ubiquitär vorkommende RNasen schnell und vollständig abgebaut werden. Exogene RNasen können durch Hautkontakt, Schweiß, Staub und bakterielle Verunreinigungen in die Probe gelangen, endogene RNasen durch die biologische Probe selbst. Daher musste mit besonderer Sorgfalt gearbeitet werden. Um den Eintrag exogener RNasen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit Handschuhen an gesonderten RNA-Arbeitsplätzen ausgeführt, alle Arbeitsmaterialien aus Glas, Keramik und Metall über Nacht bei 180 °C ausgebacken und alle Materialien aus Plastik autoklaviert (20 min bei 121 °C und 2 bar). Materialien, bei denen dies nicht möglich war, wurden für mindestens zwei Stunden in 3 %iger H₂O₂-Lösung eingelegt und mit DEPC-ddH₂O gespült. Alle verwendeten Lösungen, Puffer und Wasser wurden mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC, ein RNase-Inhibitor) versetzt, über Nacht inkubiert und autoklaviert, wobei DEPC zu CO₂ und Ethanol zerfällt. Die endogenen RNasen wurden durch die tiefen Temperaturen während der Homogenisierung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) und anschließende Kühlung auf Eis inhibiert. Während der Isolation wurden alle RNasen durch die Kombination von Phenol, SDS und Hitze denaturiert und bei den wiederholten Phasentrennungen abgeschieden.

2.2.5.3 Isolation von Nukleinsäuren aus den Bionten

Für die Isolation der Nukleinsäuren aus Flüssigkultur wurden die Bionten in Faltenfiltern abfiltriert und zum Abtropfen 2 min auf Filterpapier ausgelegt, um anhaftendes Medium zu entfernen. Alle Ansätze wurden umgehend gewogen. Die 13 Ansätze *driver*-MB, die 17 Ansätze *driver*-PB und die 14 *tester*-MB+PB-Ansätze wurden zu je sechs Ansätzen ungefähr gleicher Masse vereinigt und umgehend mit hitzesterilisierten Mörsern und Pistillen unter flüssigem Stickstoff für 2 min gründlich homogenisiert.

Für die Isolation der Nukleinsäuren aus den Bionten auf Festkultur wurden die Bionten vorsichtig und möglichst ohne anhaftenden Agar von ihren Platten entnommen, gewogen und ebenfalls zu Ansätzen weitgehend gleicher Masse vereinigt. Die 14 Ansätze *driver*-MB zu sieben Ansätzen, die 12 Ansätze *driver*-PB und die 13 Ansätze *tester*-MB+PB zu je sechs neuen Ansätzen. Die nachfolgende Homogenisierung erfolgte wie bereits beschrieben. Alle Proben wurden nach der Homogenisierung auf Eis gestellt und umgehend weiter bearbeitet. Die Proben durften zwischen den Arbeitsschritten nicht auftauen, um eine Degradierung der RNA durch die bionteneigenen RNasen zu verhindern. Die einzelnen Arbeitsschritte der Nukleinsäureisolation sind nachfolgend aufgeführt, die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen findet sich im Anhang (ab Tab. A.13 im Anhang). Nach der Prozedur erhielt man ein Pellet, das aus den Nukleinsäuren RNA und DNA bestand.

Vor der Homogenisierung der Biontenansätze:

- 1) Wasserbad auf 60 °C vorheizen
- 2) Phenol/TE im Wasserbad auf 60 °C vorwärmen
- 3) Mörser und Pistille mit flüssigem Stickstoff vorkühlen

Nach der Homogenisierung der Bionten:

- 4) homogenisierte Bionten umgehend in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführen
- 5) sofort mit 10 ml NaAc-SDS-Puffer versetzen und kurz vortexen
- 6) sofort 10 ml 60 °C warmes Phenol/TE zugeben und vortexen
- 7) 2 min abwechselnd vortexen und kurz im Wasserbad inkubieren
- 8) 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubieren
- 9) 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- 10) obere, wässrige Phase komplett und ohne Interphase in neues Röhrchen überführen
- 11) mit 1,5 Volumen Phenol/TE versetzen
- 12) 2 min vortexen und 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- 13) obere, wässrige Phase komplett und ohne Interphase in neues Röhrchen überführen
- 14) mit 1,5 Volumen Phenol/Chloroform versetzen
- 15) 2 min vortexen und 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- 16) obere, wässrige Phase komplett und ohne Interphase in neues Röhrchen überführen
- 17) mit 1,0 Volumen Phenol/Chloroform versetzen
- 18) 2 min vortexen und 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- 19) obere, wässrige Phase komplett und ohne Interphase in neues Röhrchen überführen
- 20) mit 1,0 Volumen Chloroform versetzen
- 21) 2 min vortexen und 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- 22) obere, wässrige Phase komplett und ohne Interphase in neues Röhrchen überführen
- 23) mit 3M NaAc auf 300 mM Endkonzentration NaAc bringen
- 24) kurz vortexen
- 25) mit 3,0 Volumen eiskaltem EtOH versetzen
- 26) 60 min im Eisfach (-25 °C) inkubieren
- 27) 60 min bei 6000 rpm zentrifugieren
- 28) Überstand dekantieren
- 29) Pellet 2x mit eiskaltem 80 %igen EtOH waschen
- 30) Pellet abtropfen lassen und bis zur weiteren Verwendung bei -25 °C einfrieren

2.2.5.4 DNase-Verdau der isolierten Nukleinsäuren

Dieser Arbeitsschritt diente dazu, aus den isolierten Nukleinsäuren die DNA mittels enzymatischen Abbaus zu entfernen und lediglich die Gesamt-RNA in reiner Form zurückzubehalten. Für den Abbau wurde das RQ1 RNase-freie DNase Kit (Promega Inc., Madison, USA) verwendet und nach Protokoll angewandt. Vor Beginn der Arbeiten wurde

die lyophilisierte DNase I durch Injektion von 550 µl RNase-freiem Wasser mit einer sterilen Spritze und Nadel vorsichtig resuspendiert (nicht gevortext) und mit der Spritze abgezogen. Der Probenansatz wurde gemäß dem RNeasy Mini Elute Cleanup Handbook (Appendix C, p. 12, 2009, Qiagen, Hilden, D) vorbereitet.

- 1) Pellet (2.2.5.3, Arbeitsschritt 30) in 900 µl TE resuspendieren
- 2) DNase-Verdau ansetzen

Nukleinsäure-Lösung	900 µl
RQ1 Reaktionspuffer (10x)	100 µl
RQ1 RNase-freie DNase	50 µl
Gesamtvolumen	1050 µl
- 3) 45 min bei 37 °C inkubieren
- 4) Probenansatz auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße (2,0 ml) zu je 550 µl aufteilen
- 5) mit je 2,0 Volumen Phenol/Chloroform versetzen
- 6) kurz vortexen und 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- 7) obere, wässrige Phase komplett und ohne Interphase in neues Gefäß überführen
- 8) mit je 1,0 Volumen Chloroform versetzen
- 9) kurz vortexen und 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- 10) obere, wässrige Phase komplett und ohne Interphase in neues Gefäß überführen
- 11) mit 0,05 Volumen 3M NaAc versetzen und mischen
- 12) mit 2,0 Volumen eiskaltem 100 %igen EtOH versetzen und mischen
- 13) 60 min im Eisfach (-25 °C) inkubieren
- 14) 45 min bei 14.000 rpm zentrifugieren
- 15) Überstand verwerfen
- 16) Pellet mit eiskaltem 80 %igen EtOH waschen
- 17) Pellet in 100 µl TE resuspendieren
- 18) bis zur weiteren Verwendung bei -25 °C einfrieren

2.2.5.5 Konzentration und Qualität der isolierten Gesamt-RNA

Ebenso wie DNA absorbiert RNA Licht maximal bei einer Wellenlänge von 260 nm. Aus der Extinktion von gemessenen RNA-Lösungen und dem bekannten Extinktionskoeffizienten kann die RNA-Konzentration berechnet werden. Verunreinigungen durch Proteine und phenolische Substanzen können über die Extinktion bei den Wellenlängen 280 und 230 nm abgeschätzt werden. Die Verhältnisse aus den Extinktionen bei den Wellenlängen 260 zu 280 nm und 260 zu 230 nm geben Aufschluss über die Reinheit der gemessenen Probe. Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA wurden mit dem BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, D) in TE-Puffer und mit einer Verdünnung von 1:60 (1 µl RNA-Lsg + 59 µl TE) bestimmt.

Zusätzlich wurde die Qualität der isolierten Gesamt-RNA durch Auftrennung in der Gelelektrophorese bestimmt. Dazu wurde mit 1x TBE-Puffer (Tab. A.28 im Anhang) ein 1,2 %iges Agarosegel angesetzt und vor dem Gießen mit 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (EtBr, 1 g auf 100 ml) versetzt. EtBr hat die Eigenschaft zwischen den einzelnen Basen von Nukleinsäuren zu interkalieren und ermöglicht dadurch eine gezielte Anfärbung der Nukleinsäuren. Der Nukleinsäure/EtBr-Komplex fluoresziert bei Anregung durch UV-C-Licht intensiv orange und kann so sichtbar gemacht werden. Für jeden zu untersuchenden Ansatz wurden 2 µl Gesamt-RNA-Lösung mit 8 µl Formamid-Puffer versetzt, kurz gemischt, herunter zentrifugiert, 5 min bei 65 °C inkubiert und umgehend bis zum Probenauftrag auf Eis gestellt. Die Konformation von Nukleinsäuren hat starken Einfluss auf die Laufeigenschaften in der Gelelektrophorese und besonders RNA vermag vielfältige Sekundärstrukturen zu bilden. Daher ist ein Denaturierungsschritt unerlässlich. Der Formamid-Puffer und die Inkubation bei 65 °C dienen dazu, diese Strukturen aufzulösen und eine nur von der RNA-Länge abhängige Auftrennung sicherzustellen. Das sofortige Überführen auf Eis verhinderte eine neuerliche Faltung der RNA-Moleküle. Als Längenstandard diente eine *RNA-ladder* (0,95 bis 2,40 kb, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D). Der Gellauf erfolgte in 1x TBE und dauerte nach einer 5-minütigen Einlaufphase bei 140 V ca. 80 min bei 80 V (Spannungsquelle: Consort 835, Consort SA, Turnhout, B; Gelkammer: peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D). Die Auswertung der Gele erfolgte unter UV-Licht und die Dokumentation im INTAS Gel-Dokumentationssystem/Gel-Imager (INTAS AG, Göttingen, D) mit der firmeneigenen Software INTAS GDS.

2.2.5.6 Isolation von mRNA aus Gesamt-RNA

Die Isolation von mRNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit den PolyATtract[®] mRNA Isolationssystemen I und II (Promega Inc., Madison, USA) nach den Vorgaben im Protokoll. Daher soll an dieser Stelle nur kurz die prinzipielle Funktionsweise erläutert werden. Im ersten Schritt verwendete das System Biotin-gebundene oligo(dT)-Primer, die während einer 30-minütigen Inkubationszeit mit hoher Effizienz an die poly(A)-Regionen reifer eukaryotischer mRNA hybridisieren konnten. Im zweiten Schritt wurden paramagnetische Partikel zugefügt, die an ihrer Oberfläche mit dem bakteriellen Protein Streptavidin beschichtet waren. Da die Streptavidin-Biotin-Bindung eine der stärksten bekannten, nicht-kovalenten Bindungen in biologischen Systemen ist, wurde auf diese Weise die oligo(dT)-gebundene mRNA an die paramagnetischen Partikel gekoppelt. Diese mit mRNA beladenen paramagnetischen Partikel wurden mit einem Magnetständer an den Rändern des Reaktionsgefäßes gesammelt. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, die beladenen paramagnetischen Partikel vorsichtig gewaschen und die mRNA in RNase-freiem Wasser eluiert und abgenommen. Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten mRNA wurde, wie in Kapitel 2.2.5.5 beschrieben, das BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, D) verwendet.

2.2.5.7 Die Suppressive Subtraktive Hybridisierung

Die Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH) erfolgte nach Herstellerangaben mit dem PCR-Select™ cDNA-Subtraction Kit (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA). Daher sollen das Prinzip der SSH und die einzelnen Arbeitsschritte nur kurz erläutert werden:

Die SSH ist eine Methode zur Identifizierung von Genen, die aufgrund eines experimentellen Stimulus oder eines bestehenden physiologischen Unterschiedes differenziell exprimiert sind (Diatchenko et al. 1996, Li et al. 2002). Die SSH eignet sich dabei auch zur Untersuchung von Organismen und zur Identifizierung von Genen, die bisher molekularbiologisch nicht charakterisiert bzw. unbekannt sind; ein Umstand, der auf die Bionten des Modellorganismus *Fulgensia bracteata*, wie auch auf alle anderen Flechtenarten, zutrifft. Darüber hinaus ist es mit dieser Methode prinzipiell möglich *driver* aus unterschiedlichen Geweben zu kombinieren und gegen einen *tester* zu testen (Diatchenko et al. 1996) als auch multiple *tester* gegen einen *driver* zu testen. Diese Möglichkeiten lassen einen Erfolg der SSH bei einem aus Myco- und Photobiont kombinierten Ansatz möglich erscheinen. Darüber hinaus erlaubt es ein Normalisierungsschritt, auch jene Transkripte zu identifizieren, die in geringer Kopienzahl im Ausgangsmaterial vorliegen und mit anderen Methoden (*differential display*-PCR) nicht identifiziert werden könnten. Im Falle dieser Arbeit bestand der erwähnte Stimulus im Zusammentreffen beider Bionten. In einem *tester* genannten Ansatz wurden beide Bionten in Kontakt miteinander gebracht und die kontaktspezifischen Gene wurden stärker exprimiert, bei anderen Genen sank die Expression und sie wurden herunterreguliert. Die Transkripte (mRNAs) aller Gene beider Symbionten, also auch der kontaktspezifisch hochregulierten, wurden anschließend isoliert und revers in cDNA transkribiert. In einem zweiten, *driver* genannten Ansatz wurden die Bionten isoliert voneinander kultiviert, deren mRNA-Population isoliert und nach der reversen Transkription in cDNA vereinigt (Abb. 2.7). Dieser Ansatz enthält keine mRNAs kontaktspezifisch hochregulierter Gene.

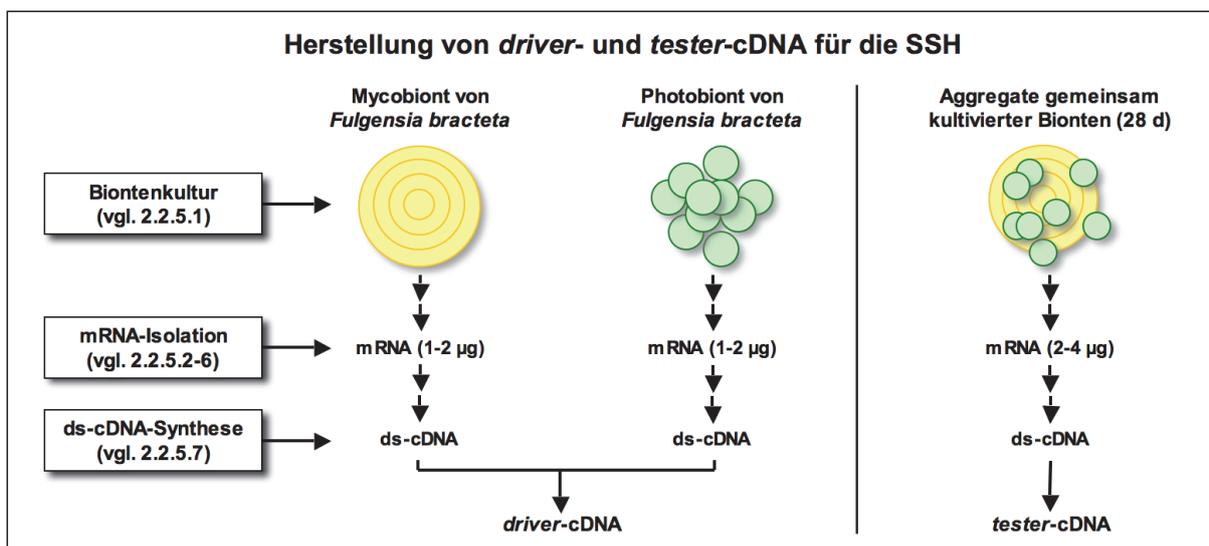


Abb. 2.7: Schematische Darstellung zur Herstellung von *driver*- und *tester*-cDNA für die SSH

In der Folge bediente sich die SSH einer suppressiven Hybridisierungsmethodik (Abb. 2.8). Dazu wurde der *tester* in zwei verschiedene Populationen aufgespalten und mit je einem Adaptor (Adaptor 1 oder Adaptor 2R) ligiert. In einem ersten Hybridisierungsschritt wurden *tester-driver*-Hybrid-cDNAs durch die Zugabe von *driver*-cDNAs im Überschuss erzeugt. Allerdings nur für die cDNAs, deren mRNAs in beiden Ansätzen exprimiert waren. Die cDNAs der kontaktspezifisch hochregulierten mRNAs verbleiben ungepaart und mit ihrem jeweiligen Adaptor in den beiden *tester*-Populationen. In einem zweiten Hybridisierungsschritt werden beide *tester*-Populationen unter Zugabe von weiterem *driver* vereinigt und hybridisiert. Daraus folgt, dass nur die cDNAs kontaktspezifisch hochregulierter mRNAs, die in der einen *tester*-Population mit dem Adaptor 1 und in der anderen mit dem Adaptor 2R ligiert wurden, nun miteinander hybridisieren können. Somit verfügen die Hybridisierungsprodukte über beide Adaptoren (Typ F in Abb. 2.8). In einer ersten PCR werden diese Hybridisierungsprodukte differenziell exprimierter mRNAs exponentiell amplifiziert, während alle anderen Hybridisierungsprodukte nicht oder lediglich linear amplifiziert werden. In einer zweiten *nested*-PCR (mit weiter innen bindenden Primern) werden die Hybridisierungsprodukte differenziell exprimierter mRNAs abermals exponentiell amplifiziert. Jene cDNAs, die im *tester*- und *driver*-Ansatz oder nur im *driver*-Ansatz vorkommen (Typ A bis E in Abb. 2.8), werden auf diese Weise im cDNA-*pool* stark verdünnt, bis (fast) ausschließlich jene cDNAs enthalten sind, deren Expression vom zu untersuchenden Stimulus erhöht wird (Typ F in Abb. 2.8). Das Funktionsprinzip wird in Abb. 2.8 verdeutlicht. Durch das simple Vertauschen der *tester*- und *driver*-Ansätze ist es zudem möglich, auch die in Reaktion auf den Stimulus herunterregulierten Gene zu identifizieren. Für die zwei PCR-Reaktionen wurde das Programm für den Thermocycler (T-Gradient 96, 4.15gr, Biometra, Göttingen D) leicht verändert, um eine bessere Ausbeute an PCR-Produkten zu erreichen (Tab 2.1). Die so amplifizierten cDNA-Spezies tragen dank des in der PCR verwendeten Advantage™ cDNA Polymerase Mix (Cat. No. 639105, Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA) ein 3'-terminales überhängendes Adenosin an beiden Enden.

	PCR 1		PCR 2	
	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer
Initiale Denaturierung	75 °C	5 min	-	-
Denaturierung	94 °C	30 s	94 °C	30 s
Annealing	66 °C	45 s	68 °C	45 s
Elongation	72 °C	90 s	72 °C	90 s
Zyklenanzahl	35		26	

Tab. 2.1: Thermocycler-Programme für die beiden PCR-Reaktionen der SSH

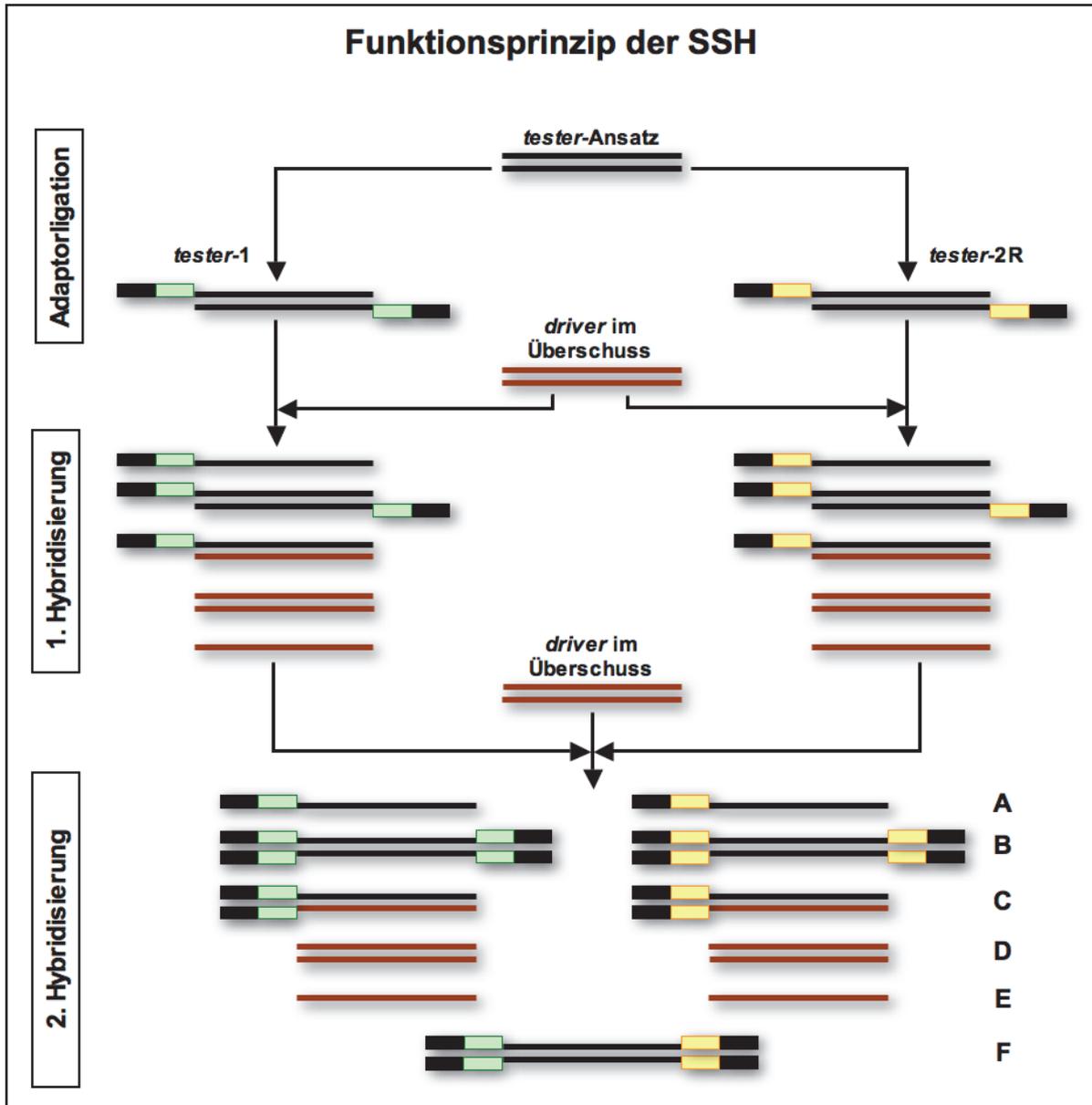


Abb. 2.8: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der SSH. Nach der 2. Hybridisierung entstehen verschiedene Typen von Hybridisierungsprodukten (A bis F). In den nachfolgenden zwei PCR-Reaktionen werden nur die Hybridisierungsprodukte exponentiell amplifiziert, die über beide Adaptoren verfügen (Typ F). Diese repräsentieren die differenziell exprimierten Gene.

Die einzelnen Schritte der SSH lauten damit wie folgt: cDNA-Erststrangsynthese aus 2 µg *tester*-MB+PB-mRNA und aus je 1 µg *driver*-MB-mRNA bzw. *driver*-PB-mRNA, cDNA-Zweitstrangsynthese, Vereinigung der *driver*-cDNAs, Rsa I-Verdau zur Herstellung kürzerer, glatt endender (*blunt-end*) Fragmente, Test zur Überprüfung eines erfolgreichen Verdau, die Adaptorligation an die beiden *tester*-Populationen, erste Hybridisierung, zweite Hybridisierung, erste PCR-Amplifikation und zweite PCR-Amplifikation (*nested-PCR*). Die SSH wurde mit den *tester*- und *driver*-Ansätzen aus Flüssigkulturen und aus Festkulturen durchgeführt, sowohl in normaler Versuchsanordnung für kontaktabhängig hochregulierte Gene als auch mit vertauschten *tester*- und *driver*-Ansätzen zur Identifizierung von kontaktabhängig herunterregulierten Genen.

2.2.5.8 Klonierung und Selektion der SSH-Amplifikate

Zur weiteren Bearbeitung des durch die SSH erhaltenen *pools* an differenziell exprimierten cDNA-Spezies und zur letztendlichen Identifizierung differenziell exprimierter Gene wurden diese cDNAs in geeignete Vektoren ligiert und kompetente *Escherichia coli*-Bakterien mit diesem Vektor transformiert. Dadurch war es möglich, die einzelnen cDNA-Spezies voneinander zu separieren und beliebig lange getrennt zu kultivieren.

Die Klonierung erfolgte mit dem pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega Corp., Madison, USA) nach dem vom Hersteller bereitgestellten Protokoll. Die verwendeten pGEM[®]-T Easy Vektoren waren linearisierte Plasmide, die ein 3'-terminales überhängendes Thymidin an beiden Enden besaßen und so mit den cDNA-Spezies aus der SSH ligiert werden konnten. Durch die Ligation wurden die Vektoren rezirkularisiert. Die Ligationsreaktion beinhaltete sowohl eine Positivkontrolle (mitgeliefert), als auch eine Negativ- bzw. Hintergrundkontrolle. Da das System für ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 1:1 optimiert wurde, wurden nach der folgenden Formel 5 ng Insert pro Ligrationsreaktion eingesetzt:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Insert-Größe [kb]} \times \text{molares Vektor/Insert-Verhältnis}}{\text{Vektor-Größe [kb]}} = \text{Menge an Insert in [ng]}$$

Die Transformation wurde mit hoch kompetenten *E. coli*-Zellen vom Stamm JM109 (mitgeliefert) durchgeführt und die Aufnahme der Vektor-Plasmide durch einen 50-sekündigen Hitzeschock bei exakt 42°C im Wasserbad (HB4 basic, IKA Labortechnik GmbH, Staufen, D) induziert. Die Bakterien wurden sofort für 2 min auf Eis gestellt und für 90 min in SOC-Medium (vgl. 2.2.2.1, Tab. A.11 im Anhang) bei 37 °C und 150 rpm geschüttelt (Infors HT Multitron, Infors AG, Bottmingen, CH).

Eine anschließende Blau-Weiß-Selektion auf LB-Agar mit Ampicillin/IPTG/X-Gal (vgl. 2.2.2.1, Tab. A.10) in ÜNK bei 37°C (Brutschrank B40, Memmert AG, Schwabach, D) diente der Auswahl jener Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten (da nur das Plasmid Träger des Ampicillin-Resistenz ist) und deren Plasmid zusätzlich ein Insert aufgenommen hatte. Die Aufnahme eines Inserts erfolgte in einer *multiple cloning site* inmitten der codierenden Sequenz der β -Galactosidase. Dieses Enzym katalysiert eine Umsetzung des farblosen X-Gal zu Galactose und dem, nach Reaktion mit Luftsauerstoff, blauen Indigo-Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo. Wenn also ein Insert in den Vektor inserierte, so wurde keine funktionelle β -Galactosidase exprimiert und die entsprechende Bakterienkolonie blieb farblos. Die farblosen Bakterienkolonien wurden anschließend mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und auf quadratische Petrischalen (120 x 120 x 17 mm, Greiner Bio-One Int. AG, Kremsmünster, A) übertragen. Die Platten waren mit LB-Agar mit Ampicillin (vgl. 2.2.2.1) beschickt und im 96er-Mikrotiterplattenmuster gestempelt (96 Pin Microplate Replicator 1400500, Boekel Scientific, Feasterville, USA). Die in diesem Muster aufgetragenen Klone wurden erneut bei 37 °C über Nacht kultiviert und die so angezogenen

Kolonien bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in der Kühlkammer aufbewahrt. Alle Klone, die sich in der anschließenden *colony*-PCR (2.2.5.9) als geeignet erwiesen, wurden in kältestabile Schraubdeckel-Reaktionsgefäße mit 1,5 ml dYT/HMNF-Einfrierpuffer (Tab. A.12 im Anhang) überimpft, bei 37 °C und 150 rpm über Nacht kultiviert (Infors HT Multitron, Infors AG, Bottmingen, CH) und anschließend sofort bei -80 °C als Glycerinstock zur weiteren Lagerung eingefroren.

2.2.5.9 Überprüfen der Klone mit Hilfe der *colony*-PCR

Um die Länge der Inserts und die Qualität der isolierten Klone, d. h. die Aufnahme von nur einem Plasmid in den Klon bzw. das Vorliegen nur eines Klons pro Bakterienkolonie, überprüfen zu können, wurden alle gepickten Klone mittels *colony*-PCR analysiert. Diese Methode erlaubt es den Klonierungserfolg zu überprüfen, ohne die Klone gesondert anziehen und aus jedem einzelnen Klon die Plasmid-DNA isolieren zu müssen. Dazu wurden nur geringe Mengen an Bakterien direkt in den Master-Mix der PCR gegeben und die Zellen durch einen initialen Denaturierungsschritt aufgeschlossen, so dass die DNA frei im PCR-Ansatz vorlag. Dazu wurde der Master-Mix wie in Tab. 2.2 angesetzt, auf PCR-geeignete 96er Mikrotiterplatten (Sarstedt AG, Nümbrecht, D) zu je 60 µl aufgeteilt und geringe Bakterienmengen mit dem 96 Pin Microplate Replicator (Boekel Scientific, Feasterville, USA) in die Mikrotiterplatten überführt. Die Mikrotiterplatten wurden mit einer PCR-geeigneten Klebefolie (Sarstedt AG, Nümbrecht, D) versiegelt. Die verwendeten Primer entsprachen den *nested*-Primern NPCR-1 (5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGCAGGT-3') und NPCR-2R (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3') der zweiten PCR der SSH (vgl. 2.2.5.7, synthetisiert durch Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, D). Als Polymerase wurde eine in *E. coli* exprimierte und isolierte *Taq*-Polymerase (DNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*) verwendet. Die Zusammensetzung des verwendeten PCR-Puffers findet sich in Tab. A.38 im Anhang.

	pro Klon	pro 96er Platte
ddH ₂ O (steril)	50,6 µl	5060 µl
PCR-Puffer (10x)	6,0 µl	600 µl
dNTPs (je 10 mM)	1,6 µl	160 µl
Primer NPCR-1	0,6 µl	60 µl
Primer NPCR-2R	0,6 µl	60 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,6 µl	60 µl
Gesamtvolumen	60,0 µl	6000 µl

Tab. 2.2: Master-Mix für die *colony*-PCR

Das verwendete PCR-Programm für den Thermocycler (T-Gradient 96, 4.15gr, Biometra, Göttingen, D) findet sich in Tab. 2.3. Die PCR-Produkte wurden, wie in Kapitel 2.2.5.5. beschrieben, gelelektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert. Das Auftragsvolumen lag bei 6 µl PCR-Produkt + 2 µl Gelladepuffer.

<i>colony</i> -PCR		
	Temp.	Dauer
Initiale Denaturierung	90 °C	10 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	68 °C	60 s
Elongation	72 °C	120 s
Zyklenanzahl	37	

Tab. 2.3: Thermocycler-Programm für die *colony*-PCR

Klone mit eventuell auftretenden Doppelbanden wurden in LB-Medium mit Ampicillin (vgl. 2.2.2.1) resuspendiert, verdünnt und erneut auf LB-Agar mit Ampicillin (vgl. 2.2.2.1) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Mehrere so vereinzelt Klone wurden erneut mit der *colony*-PCR überprüft und Klone mit geeignetem, vereinzelt Bandenmuster auf quadratischen Petrischalen mit LB-Agar mit Ampicillin weiter kultiviert. Die 96er Mikrotiterplatten mit den PCR-Produkten wurden bis zur weiteren Verwendung bei -25 °C eingefroren.

2.2.5.10 Hybridisierungsexperimente im Makroarray

Für die Hybridisierungsexperimente wurden die einzelnen Klone im *dot blot*-Verfahren in Makroarrays angeordnet. Jedes Makroarray wurde in zweifacher Ausfertigung hergestellt und anschließend mit zwei radioaktiv markierten cDNA-Sonden ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$), der *tester*- oder der *driver*-Sonde, hybridisiert. Ein Vergleich der beiden Makroarrays und eine computer-gestützte Auswertung zeigten anschließend, welche Klone tatsächlich durch die experimentellen Bedingungen differenziell exprimiert wurden und wie stark diese Expressionsunterschiede waren. Falschpositive Klone konnten auf diese Art und Weise aussortiert werden. Bei allen beschriebenen Arbeiten war eine deutliche Kennzeichnung jener Membranen, die mit der *driver*-Sonde hybridisiert werden sollten, und jener, die mit der *tester*-Sonde hybridisiert werden sollten, unerlässlich.

Für die Hybridisierungsexperimente wurden Hybridisierungsmembranen (Hybond-N, Amersham Bioscience Europe GmbH (GE Healthcare), Freiburg, D) in passende Stücke von ca. 10 x 13 cm geschnitten und mit einem Stempelrahmen auf einem Stück Filterpapier (Whatman Inc. (GE Healthcare), Florham Park, USA) und einer vollkommen ebenen Glasplatte fixiert. Die 96er Mikrotiterplatten (vgl. Kapitel 2.2.5.9) wurden aufgetaut und die verbleibenden 54 µl PCR-Produkt eines jeden PCR-Produktes mit 4,0 µl TritonX-haltigem

PCR-Puffer (10x) und 2,0 µl Gelladepuffer versetzt, kräftig gemischt und bei 4000 rpm für 8 min zentrifugiert. Der PCR-Puffer dient der Aufhebung der Oberflächenspannung und somit einer genaueren Applikation der Proben auf die Hybridisierungsmembran. Der Gelladepuffer diente als Farbmarker und erlaubte es, den nötigen pH-Wechsel zwischen Denaturierungspuffer und Neutralisierungspuffer farblich nachvollziehen zu können. Der Stempel (Multi-Blot Replicator, 2 µl, V&P Scientific, San Diego, USA) wurde in RBS-Puffer gewaschen, mit Aqua bidest. gespült und getrocknet. Mit diesem Stempel wurden anschließend parallel aus allen Reaktionsmulden der 96er Multititerplatte 2 µl PCR-Produkt luftblasenfrei aufgenommen und vollständig auf die Hybridisierungsmembran übertragen. Der Vorgang wurde wiederholt und ein leicht versetztes, aber identisches *dot blot*-Muster durch die Wahl eines diagonal versetzten Führungslochs im Stempelrahmen angelegt. Dies diente stets als internes Replicate. Die Membranen wurden bei RT getrocknet. Die Membranen wurden anschließend für jeweils 5 min in Denaturierungs- und anschließend in Neutralisierungspuffer inkubiert. Dies erfolgte in mit Filterpapier ausgeschlagenen und zu ca. 1 mm befüllten Wannen. Dabei sollte die Membran zwar den jeweiligen Puffer aufnehmen, aber nicht von ihm überspült werden. Danach wurden die Membranen 1 min in einer dritten Wanne mit ca. 1 cm hohem 2x SSC-Puffer geschwenkt, anschließend auf Filterpapier ausgelegt, über Nacht staubfrei bei RT getrocknet und für 2 h bei 80 °C fixiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer findet sich in im Anhang ab Tab. A.13.

Vor der Synthese der Hybridisierungssonden mussten je 1 µg mRNA aus Photobionten (*driver 1*), aus Mycobionten (*driver 2*) und aus gemeinsam kultivierten Bionten (*tester*) aus Kapitel 2.2.5.6 verwendet und mittels Reverser Transkription in cDNA umgesetzt werden. Die Reverse Transkription erfolgte mit der M-MLV Reversen Transkriptase (Promega Inc., Madison, USA). Die mRNA-Ansätze wurden mit 1,0 µl Oligo-dT₁₈-Primer versetzt (entspricht 0,5 µg Primer pro µg mRNA), mit DEPC-ddH₂O auf 12,0 µl gebracht, für 5 min auf 70 °C erhitzt und sofort für 2 min auf Eis platziert. Der Ansatz für die anschließende Reverse Transkription wird in Tabelle 2.4 gezeigt.

	pro Ansatz
mRNA/ Oligo-dT ₁₈ -Primer-Ansatz	12,00 µl
M-MLV Reaktionspuffer (5x)	5,00 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	5,00 µl
RNase Inhibitor RNasin (25u)	0,63 µl
M-MLV Reverse Transkriptase (200u)	1,00 µl
DEPC-ddH ₂ O	1,37 µl
Gesamtvolumen	25,00 µl

Tab. 2.4: Ansatz für die Reverse Transkription

Die Ansätze wurden für 60 min bei 42 °C im Wasserbad (Julabo V3, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D) inkubiert und anschließend wurde die cDNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D) nach Herstellerangaben aufgereinigt, in 60 µl DEPC-ddH₂O eluiert und Konzentration sowie Reinheit der isolierten cDNA wurden mit einem Nanodrop (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) bestimmt.

Die Synthese der beiden Hybridisierungs sonden (*driver* und *tester*) erfolgte mit dem MegaprimeTM DNA-labelling System (Amersham Life Sciences, Little Chalfont, UK) und unter der Annahme, dass für jede verwendete Hybridisierungsmembran 25 ng cDNA eingesetzt werden sollten, um ein verlässliches Hybridisierungsergebnis zu erhalten. Dazu wurden für jede Membran, die mit der *driver*-cDNA-Sonde hybridisiert werden sollte 12,5 ng cDNA aus den Ansätzen *driver 1* (Photobiont isoliert kultiviert) und *driver 2* (Mycobiont isoliert kultiviert) vereinigt. Für jede Membran, die mit der *tester*-cDNA-Sonde hybridisiert werden sollte, wurden 25 ng cDNA aus dem *tester*-Ansatz (Bionten gemeinsam kultiviert) verwendet. Zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonden wurde ein Master-Mix (Tab. 2.5) angesetzt. Alle Sicherheitsmaßnahmen zur Arbeit mit radioaktiven Substanzen wurden strikt eingehalten.

Ansatz für 24 Membranen	
dCTP	50,0 µl
dGTP	50,0 µl
dTTP	50,0 µl
Reaktionspuffer (10x)	62,5 µl
Gesamtvolumen	212,5 µl

Tab. 2.5: Master-Mix für die Herstellung von Hybridisierungssonden

Der eigentliche Reaktionsansatz wurde so angesetzt, wie es in Tab. 2.6 beispielhaft für eine einzelne Hybridisierungsmembran aufgeführt wird. Bei gleichzeitiger Hybridisierung von mehreren Membranen konnten entsprechend größere Mengen verwendet werden.

Ansatz für eine Membran (25 ng cDNA)	
cDNA (25 ng) in DEPC-ddH ₂ O	10,5 µl
Primer (<i>random nonamers</i>)	2,5 µl
Master-Mix (siehe Tab. 2.5)	8,5 µl
[α- ³² P]dATP	2,5 µl
Klenow-Enzym	1,0 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl

Tab. 2.6: Ansatz für die Herstellung von Hybridisierungssonden

Nach der Vereinigung von cDNA und Primer wurde der Ansatz gemischt, herunter zentrifugiert und für 5 min bei 95-98 °C denaturiert. Nach der Zugabe jeder weiteren Substanz wurde der Ansatz kurz gemischt und wenn nötig herunter zentrifugiert. Die eigentliche Reaktion, die „heiße“ Zweitstrangsynthese, erfolgte für 10 min bei 37 °C im Wasserbad (Julabo V3, Juloba Labortechnik GmbH, Seelbach, D). Zur Bestimmung der Einbaurate des radioaktiven Nukleotids in den cDNA-Zweitstrang wurden 1,0 µl auf DE81-Papier (Whatman Inc. (GE Healthcare), Florham Park, USA) gegeben, getrocknet, vier mal mit frischer Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (0,5 M) und einmal mit Aqua bidest. gewaschen. Das Papierstück wurde anschließend in 2 ml Szintillationspuffer (Beckman Instruments Inc., Brea, USA) überführt und der cpm-Wert gegen ein Kontrolle im LS-5000 CE Liquid Scintillation Counter (Beckman Instruments Inc., Brea, USA) gemessen. Wichen die cpm-Werte zwischen beiden Sonden (*driver* und *tester*) voneinander ab, so wurde die unterschiedliche Einbaurate durch eine angepasste Einsatzmenge in der folgenden Hybridisierung ausgeglichen. Die entsprechenden Mengen pro Sonde wurden mit je 100 µl Hybridisierungspuffer (Tab. A.37) versetzt und für 5 min bei 95-98 °C im Wasserbad denaturiert. Die Herstellung der Sonden wurde so angesetzt, dass der letzte Schritt mit dem Ende der Vorhybridisierung zusammenfiel und die Sonden sofort in die Hybridisierungsröhren überführt werden konnten.

Vor der eigentlichen Hybridisierungsreaktion wurden je zwei Membranen in eine Hybridisierungsröhre gegeben und mit 25-30 ml vorgewärmter Hybridisierungspuffer (Tab. A.37) bei 66,0 °C für 2 h im Hybridisierungssofen (Herahybrid 12, Kendra Lab Products, Hanau, D) vorhybridisiert. Der Vorhybridisierungspuffer wurde anschließend dekantiert und 5 ml davon sofort zurückpipettiert. Dann wurde die entsprechende Menge an radioaktiv markierter Sonde in die Hybridisierungsröhre gegeben, diese verschlossen und geschwenkt und sofort in den Hybridisierungssofen zurückgestellt. Während dieser Prozedur durfte die Röhre nicht auskühlen. Die eigentliche Hybridisierung der Sonden an die auf den Membranen fixierten PCR-Produkte aus der SSH erfolgte über Nacht bei 66,0 °C im Hybridisierungssofen. Für das anschließende Waschen der Membranen wurden die Waschpuffer WP1 und WP2 (Tab. A.30 und A.34) im Wasserbad auf 64,0 °C vorgewärmt. Die Röhren wurden nacheinander und so zügig wie möglich bearbeitet. Für jeden der folgenden vier Waschschritte wurde die Hybridisierungslösung dekantiert, entsorgt und durch ca. 50 ml WP1 ersetzt. Danach wurden die Röhren verschlossen und für jeweils 20 min im Hybridisierungssofen inkubiert. Nach dem vierten Waschschritt mit WP1 wurden die Membranen aus den Röhren entnommen und für 20 min bei 64,0 °C in einer Wanne mit WP2 unter leichtem Schwenken gewaschen. Die Membranen wurden aus dem WP2 entnommen, auf Filterpapier ausgebreitet und überstehende Flüssigkeit mit weiterem Filterpapier abgetupft. Die feuchten Membranen wurden vorsichtig in Klarsichthüllen überführt, ihre verbleibende Strahlung gemessen und zusammen mit einer aufgelegten BAS-MS Imaging Plate (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan) in Autoradiographiekassetten für 72 h

inkubiert. In dieser Zeit wurde die Energie der Zerfallsstrahlung der hybridisierten Sonden von der Imaging Plate gebunden und anschließend durch Anregung mit einem He-Ne-Laser (633 nm) im FLA-3000 Fluorescent/Radioisotope Science Imaging System (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan) ausgelesen. Die Auswertung der so erhaltenen Radiographiebilder erfolgte mit der Software Multi Gauge V3.X Science Lab 2006 (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan) und nutzte die Tatsache, dass die Stärke der Schwärzung der Autoradiographiebilder direkt proportional zur Menge an hybridisierter Sonde ist. So war es möglich, jene PCR-Produkte zu identifizieren, die tatsächlich unterschiedlich stark in den Ansätzen von *tester* und *driver* exprimiert waren. Es wurden all jene Klone für die weitere Untersuchung ausgewählt, deren Expression sich zwischen *tester* und *driver* mindestens um einen Faktor von 2 unterschied und deren stärkeres Signal mindestens die doppelte Intensität des Hintergrundes im hochregulierten Ansatz betrug bzw. die 1,8-fache Intensität im herunterregulierten Ansatz. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass während der Hybridisierung entstandene Artefakte nicht fälschlicherweise für differenziell exprimierte Klone gehalten wurden.

2.2.5.11 Kultur von Klonen mit differenziell exprimiertem Insert

Die, auf die oben beschriebene Art und Weise ausgewählten, Klone wurden für die anschließende Sequenzierung kultiviert. Dafür wurden je 5 ml autoklaviertes LB-Medium mit Ampicillin (Tab. A.9 im Anhang) mit den Klonen aus den entsprechenden Glycerinstocks (vgl. 2.2.5.8) beimpft und bei 37 °C und 150 rpm über Nacht kultiviert (Infors HT Multitron, Infors AG, Bottmingen, CH). Aus den so erhaltenen Bakteriensuspensionen wurden die Plasmide mit Hilfe des Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega Inc., Madison, USA) nach Herstellerangaben isoliert. Im Anschluss daran wurden die Konzentration und die Reinheit der isolierten Plasmide mit einem Nanodrop (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) bestimmt.

2.2.5.12 Sequenzierung von Klonen mit differenziell exprimiertem Insert

Die Sequenzierung der ausgewählten Inserts erfolgte durch die Firma GATC Biotech (Konstanz, D) im *single read*-Verfahren mit dem plasmidären M13 Reverse Sequencing Primer (Primersequenz: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'). Die Sequenzen wurden danach online zur weiteren Analyse im .ab1-, .seq- und .fas-Dateiformat bereitgestellt.

2.2.5.13 Identifizierung differenziell exprimierter cDNA-Fragmente

Die Sequenzen wurden auf ihre Qualität hin überprüft, untereinander verglichen und anschließend mit verschiedenen Suchalgorithmen des Basic Local Alignment Search Tool des National Center for Biotechnology Information (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) analysiert. Die verwendeten Algorithmen werden in der nachfolgenden Tabelle 2.7 aufgeführt:

Algorithmus	Art der Datenbank-Abfrage
blastn	Nukleotid-Abfrage gegen Nukleotid-Datenbank
blastp	Protein-Abfrage gegen Protein-Datenbank
blastx	Translatierte Nukleotid-Abfrage gegen Protein-Datenbank
tblastx	Translatierte Nukleotid-Abfrage gegen translatierte Nukleotid-Datenbank

Tab. 2.7: Verwendete Algorithmen der BLAST-Suche

Mit allen Algorithmen wurde eine Abfrage gegen die drei Datenbanken „Nucleotide collection“ (nr/nt), „Expressed sequence tags“ (est) und „High throughput genomic sequences“ (HTGS) durchgeführt. Für die blastp-Suche erfolgte die Translation der Nukleotidsequenzen in alle drei möglichen Leseraster mit Hilfe der Translation Utility auf der Internetseite <http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html>. Alle Sequenzen für herunter regulierte mRNAs wurden zusätzlich mit der Datenbank miRBase (<http://www.mirbase.org/>) abgeglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des Präkontakt-Interaktionsassays

Dieses Kapitel untersucht und beschreibt die Auswirkungen des Präkontaktes von zwei ausgewählten Photobionten und einer nicht-lichenisierenden Alge auf die Keimung der Ascosporen und das frühe Wachstumsverhalten bzw. das frühe Wachstumsmuster des Mycobionten von *Fulgensia bracteata*. Wie in Kapitel 2.2.3 ausführlich beschrieben, wird dazu der auskeimende Mycobiont unter standardisierten Bedingungen und unter Einfluss des arteigenen, spezifischen Photobionten von *F. bracteata* (*Trebouxia* sp., Clade I, Untergruppe I), des unspezifischen Photobionten von *Lecidea lurida* (*Asterochloris* sp., Var. 3) sowie der als nicht-lichenisierend bekannten kokkalen Grünalge *Myrmecia bisecta* kultiviert. Die Kultur erfolgt auf zwei verschiedenen Medien, dem nährstoffarmen Wasser-Agar und dem nährstoffreichen, das Pilzwachstum stark unterstützenden MYS1-Agar. Proben dieses Präkontakt-Interaktionsassays werden jeweils nach 10, 20 und 30 Tagen entnommen. Die Mycelien werden quantitativ hinsichtlich bestimmter, messbarer Parameter wie Keimungsrate, Verzweigungszahl und Hyphenlänge, als auch qualitativ hinsichtlich ihrer Wachstumsmuster und ihrer morphologisch-anatomischen Eigenschaften analysiert. Im Weiteren beschreibt Kapitel 3.1.1 die Ergebnisse zur Verteilung der Hyphenlängen und zu den morphologisch-anatomisch beobachtbaren Wachstumsmustern auf Wasser-Agar, Kapitel 3.1.2 die entsprechenden Ergebnisse auf MYS1-Agar. In Kapitel 3.1.3 werden zusätzlich ausgewählte Kennwerte, wie die Mittelwerte der Hyphenlänge, der Verzweigungszahl und der Keimungsrate analysiert und die Entwicklung des Mycobionten auf beiden Medien vergleichend gegenübergestellt. Für die quantitative Auswertung des Präkontakt-Einflusses werden besonders die Auswirkungen auf die Hyphenlänge betrachtet. Sie erweist sich als stärkster messbarer Indikator für die unterschiedlichen Präkontakt-Einflüsse.

Einige Ergebnisse sind unabhängig von den verwendeten Medien und Einflussgrößen identisch. So werden die Ascosporen meist alleine oder in Gruppen von 2-3 Sporen ausgestreut. Cluster von mehr als drei Sporen sind selten. Zudem variieren die Winkel der Verzweigungen sehr stark, ebenso wie die Abstände zwischen den Verzweigungen.

Generell muss festgehalten werden, dass für die quantitative Auswertung ausschließlich jene Mycelien berücksichtigt werden, deren Hyphen eindeutig einzelnen Sporen zugeordnet werden können. Mycelien also, die nicht übermäßig stark mit anderen Mycelien verflochten sind und deren Hyphen sich nicht in so starkem Maße überdecken, dass die Auswertung fehleranfällig werden kann (vgl. Abb. A1 und A2 im Anhang als Beispiele). Einzige Ausnahme sind, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, die am weitesten entwickelten Mycelien unter Einfluss von *Myrmecia bisecta*. In diesen Fall wird eine Anzahl von Mycelien ausgezählt, anhand derer die Hyphenlänge und die Verzweigungszahl weiterer Mycelien abgeschätzt werden kann. Die relativen prozentualen Klassen-Häufigkeiten ähneln sich im

Vergleich der drei Replicates eines jeden Ansatzes in den meisten Fällen stark. Aus diesem Grund erfolgt die nachfolgende statistische Auswertung der Verteilung der Hyphenlängen unter der Annahme, dass die relativen prozentualen Klassen-Häufigkeiten normalverteilt um einen „wahren“ Mittelwert streuen und dieser durch den Mittelwert als Schätzwert angegeben werden kann (Zentraler Grenzwertsatz, Oestreich & Romberg, 2009). Das gilt auch für den Vergleich der Hyphenlänge in μm pro Spore, der Anzahl der Verzweigungen und der prozentualen Keimungsrate (vgl. Kapitel 3.1.3). Obwohl die Mittelwerte der Hyphenlängen nur unzureichend die Variabilität der Hyphenlängen innerhalb eines Replicates wiedergeben, ähneln sich diese Mittelwerte meist deutlich. Auch hier wird von einer normalverteilten Streuung um den Mittelwert, als Schätzer des wahren Mittelwertes, ausgegangen. Eine alternative Darstellung mittels des Medians, der weniger stark von Ausreißern beeinflusst wird als der Mittelwert, wird im Weiteren in Form von Boxplots angegeben (Abb. 3.21a,b). Obwohl sich die Ergebnisse beider Auswertungsmethoden im Detail unterscheiden, geben jedoch beide Verfahren die stark unterschiedlichen Präkontakt-Einflüsse der Photobionten bzw. der Alge *Myrmecia bisecta* auf das Hyphenwachstums des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* wieder. Zur Angabe signifikanter Unterschiede wird der von der oben beschriebenen Normalverteilung ausgehende t-Test verwendet. (Tab. 3.4, 3.5 und 3.6).

Die Abbildungen zur qualitativen Untersuchung der Wachstumsmuster zeigen meist Mycelien, die als Beispiel für die jeweils am weitesten entwickelten Entwicklungsstadien dienen. Diese Abbildungen sollen einen Eindruck für das Entwicklungspotential unter den jeweiligen Einflussgrößen vermitteln und zeigen die beschriebenen Charakteristika meist besonders deutlich, sind aber im Falle von Kapitel 3.1.1.4 und 3.1.2.4 nicht zwangsläufig Teil der quantitativen Auswertung. Ein tabellarischer Vergleich der Merkmale der Wachstumsmuster findet sich in den Tabellen 3.1 und 3.2.

3.1.1 Experimente auf Wasser-Agar

3.1.1.1 Kontrolle auf Wasser-Agar

Verteilung der Hyphenlängen: Basierend auf der in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Einteilung der Hyphenlängen in Klassen, zeigt sich nach 10 Tagen in Kultur das in Abb. 3.1a dargestellte Verteilungsmuster: Etwas mehr als die Hälfte aller untersuchten Mycelien ($55,0 \pm 4,9$ %) bildet Hyphenlängen zwischen 1-50 μm aus und fällt damit in Klasse 1. Bei einem etwas geringeren prozentualen Anteil von $43,8 \pm 5,4$ % sind die Hyphen zu einer Länge zwischen 51-100 μm (Klasse 2) ausgewachsen und nur $1,2 \pm 3,6$ % weisen Hyphenlängen von 101-150 μm auf. Sie lassen sich daher Klasse 3 zuordnen.

Bis zum 20. Tag in Kultur wachsen die Hyphen weiter aus und zeigen damit eine zu größeren Hyphenlängen hin verschobene Verteilung (Abb. 3.1b). Der Anteil von Mycelien

mit Hyphenlängen von 1-50 μm (Klasse 1) ist von $55,0 \pm 4,9 \%$ auf $39,2 \pm 3,4 \%$ gesunken. Ebenso fällt der Anteil von Mycelien mit Hyphenlängen in Klasse 2 leicht von $43,8 \pm 5,4 \%$ auf $38,8 \pm 2,4 \%$. In Klasse 3 mit Hyphenlängen von 101-150 μm zeigt sich hingegen ein deutlicher Zuwachs von $1,2 \pm 3,6 \%$ auf $17,3 \pm 2,4 \%$. Darüber hinaus wachsen $4,6 \pm 1,7 \%$ der Mycelien zu einer Hyphenlänge von 151-200 μm (Klasse 4) aus.

Zwischen dem 20. und 30. Tag in Kultur ändert sich dieses Verteilungsmuster der Hyphenlängen allerdings nicht mehr (Abb. 3.1c), es findet kein messbarer Zuwachs der Hyphenlängen statt. Verglichen mit $39,2 \pm 3,4 \%$ nach 20 Tagen Kulturdauer fallen nach 30 Tagen Kulturdauer $40,9 \pm 1,6 \%$ aller Mycelien in Klasse 1 (1-50 μm). Der Anteil an Mycelien in Klasse 2 (51-100 μm) ändert sich leicht von $38,8 \pm 2,4 \%$ auf $43,0 \pm 3,7 \%$ und der in Klasse 3 (101-150 μm) von $17,3 \pm 2,4 \%$ auf $12,1 \pm 2,3 \%$. In Klasse 4 (151-200 μm) findet keine nennenswerte Veränderung statt ($4,0 \pm 1,9 \%$). Es ist damit deutlich festzustellen, dass das Hyphenwachstum unter Kontrollbedingungen auf Wasser-Agar bis zum 20. Tag andauert, zwischen dem 20. und 30. Tag jedoch keinen weiteren Zuwachs zeigt.

Wachstumsmuster: Wie in der Auswertung der Hyphenlängen deutlich wird, ist das Wachstum der Mycelien von *F. bracteata* unter Kontrollebedingungen auf Wasser-Agar stark limitiert. Die Abbildung 3.5c zeigt das beobachtete Maximum der Mycelentwicklung nach 30 Tagen in Kultur. In der Folge lassen sich nur wenige morphologisch-anatomische Charakteristika und keine prägnanten Wachstumsmuster erkennen (vgl. Abb. 3.1a bis 3.1c). Die Ausbildung von Lufthyphen und die Anzahl an Verzweigungen ist gering. Auch nimmt die Anzahl der Verzweigungen mit andauernder Kultur kaum zu. Darüber hinaus bilden die Mycelien so gut wie keine erkennbaren Mengen an Gallerte und nur selten *hyphal tip swellings* (Abb. 3.18a) aus, deren Anzahl allerdings mit fortschreitender Kulturdauer leicht zunimmt.

3.1.1.2 Präkontakt-Einfluss von *Asterochloris* sp. auf Wasser-Agar

Verteilung der Hyphenlängen: Nach 10 Tagen Kulturdauer unter dem Einfluss des unspezifischen und inkompatiblen Photobionten *Asterochloris* sp. aus *Lecidea lurida* ergibt sich folgendes Verteilungsmuster der Hyphenlängen von Mycelien des Mycobionten *Fulgensia bracteata*: Ein großer prozentualer Anteil von $76,7 \pm 17,9 \%$ aller Mycelien zeigt Hyphenlängen von 1-50 μm (Klasse 1), während $19,3 \pm 11,6 \%$ zu Klasse 2 (51-100 μm), $3,4 \pm 4,0 \%$ zu Klasse 3 (101-150 μm) und ein sehr kleiner Anteil von $0,6 \pm 2,3 \%$ aller beobachteten Mycelien zu Klasse 4 mit 151-200 μm gehören (Abb. 3.2a). Mit dem höheren Anteil an sehr kurzen Mycelien in Klasse 1 und dem geringeren Anteil in Klasse 2 bleibt das Hyphenwachstum tendenziell hinter dem der Kontrolle nach 10 Tagen Kulturdauer zurück.

Zwischen dem 10. und 20. Versuchstag gleicht sich dieser Unterschied jedoch aus (Abb. 3.2b). Der Anteil von Mycelien in Klasse 1 sinkt von $76,7 \pm 17,9 \%$ auf $44,0 \pm 13,2 \%$ und die

Anteile von Mycelien in den Klassen 2, 3 und 4 steigen respektive auf $36,0 \pm 6,7$ %, $12,5 \pm 6,8$ % und $6,5 \pm 5,5$ %. Darüber hinaus findet sich ein sehr geringer Anteil von Mycelien von je $0,3 \pm 0,4$ % in den Klassen 5, 6 und 7 mit Hyphenlängen von 201-250 μm , 251-300 μm und 301-350 μm . Mycelien mit derart langen Hyphen finden sich in den Proben der Kontrolle nicht.

Zwischen dem 20. und 30. Tag in Kultur wandelt sich das Verteilungsmuster der Hyphenlängen grundlegend (Abb. 3.2c). Die Häufigkeiten von Mycelien sinken stark in den Klassen 1 und 2 und weniger ausgeprägt in Klasse 3 auf $13,6 \pm 7,3$ %, $12,5 \pm 3,6$ % und $10,4 \pm 2,6$ %. Die Häufigkeit in Klasse 4 ändert sich mit $7,2 \pm 1,0$ % kaum. In den Klassen 5-10 (201-500 μm) zeigt sich eine starke Häufigkeitszunahme mit sukzessiv abnehmenden Häufigkeiten von ca 10 % in Klasse 5 (201-250 μm) hin zu ca. 2 % in Klasse 10 (451-500 μm). In den beiden höchsten Klassen 11 (501-1000 μm) und 12 (≥ 1001 μm) finden sich nach 30 Tagen Kulturdauer unter Einfluss von *Asterochloris* sp. $17,6 \pm 3,3$ % und $4,8 \pm 2,1$ % aller Mycelien wieder. Das Hyphenwachstum setzt sich bis zum Ende der Versuchsdauer fort und führt zu Mycelien, deren Hyphen deutlich länger sind als jene unter Kontrollbedingungen.

Wachstumsmuster: Verglichen mit dem Wachstum unter Kontrollbedingungen fördert der Präkontakt-Einfluss von *Asterochloris* sp., dem unspezifischen und inkompatiblen Photobionten von *L. lurida*, das Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* deutlich. Die Hyphen zeigen ein wesentlich ausgeprägteres Längenwachstum. Sowohl Lufthyphen als auch Gallerte werden von den Mycelien gebildet. Die Lufthyphen bleiben jedoch kurz und ihre Anzahl nimmt bis zum 30. Versuchstag nur geringfügig zu. Die Gallerte wird in der Regel nur in sehr geringem Maße gebildet und meist nur von kurzen Hyphenabschnitten. Auffällig ist das lange Auswachsen der Hyphen, die selten stark verzweigt sind. Dadurch bildet sich ab einer gewissen Dichte von beieinander ausgestreuten Ascosporen ein loses und weitmaschiges Netzwerk (Abb. 3.6c). Die daran beteiligten Mycelien zeigen zwar kein ausgeprägtes Wachstumsmuster, in ihrer Gesamtheit vermögen sie allerdings weite Bereiche des Probenfilters zu kolonisieren. In einigen Fällen ist eine Verbindung der Mycelien durch Anastomosen (Abb. 3.18b) klar erkennbar, in vielen Fällen jedoch ist die Intensität und Art des Kontakts bei sich berührenden Hyphen nur schwer erkennbar. *Hyphal tip swellings* sind selten, nehmen jedoch mit fortschreitender Kulturdauer leicht zu.

3.1.1.3 Präkontakt-Einfluss von *Trebouxia* sp. auf Wasser-Agar

Verteilung der Hyphenlängen: Nach 10 Tagen Mycobiontenwachstum unter dem Präkontakt-Einfluss des arteigenen, spezifischen Photobionten *Trebouxia* sp. zeigen die Mycelien ein eindeutig fortgeschrittenes Verteilungsmuster der Hyphenlängen (Abb. 3.3a) verglichen mit den Ergebnissen unter Kontrollbedingungen und denen unter Einfluss von *Asterochloris* sp. Zwar ist der Anteil von Mycelien in Klasse 1 (1-50 μm) mit $58,4 \pm 18,1$ % höher als in der Kontrolle, andererseits wachsen nach 10 Versuchstagen einige der Mycelien bereits zu Hyphenlängen von bis zu 500 μm aus und umfassen die Klassen 2-8 mit sukzessiv abnehmenden prozentualen Häufigkeiten von $13,0 \pm 5,3$ %, $9,9 \pm 8,0$ %, $6,5 \pm 2,2$ %, $6,2 \pm 5,0$ %, $2,6 \pm 1,1$ %, $1,6 \pm 1,8$ % und $1,8 \pm 1,3$ %. Damit sind nach 10 Tagen ca. 27 % aller Mycelien weiter entwickelt als unter Kontrollbedingungen und ca. 24 % weiter entwickelt als jene Mycelien unter Einfluss von *Asterochloris* sp.

Bis zum 20. Versuchstag verändert sich das Muster der Hyphenverteilung stark (Abb. 3.3b). In Klasse 1 sinkt die Häufigkeit von $58,4 \pm 18,1$ % auf $24,6 \pm 5,4$ %, während die Häufigkeiten in den Klassen 2-4 auf $26,1 \pm 2,4$ %, $16,2 \pm 3,2$ % und $13,8 \pm 2,3$ % ansteigen. In den Klassen 5-8 steigen die Häufigkeiten in jeder einzelnen Klasse an, sinken jedoch mit zunehmender Klassengröße von ca. 7 % auf 0,6 % ab. Ein geringer Anteil von Mycelien ($1,5 \pm 0,5$ %) zeigt eine Hyphenlänge von 501-1000 μm . Damit sind nach 20 Tagen Kulturdauer die Hyphen von ca. 28 % aller Mycelien länger als unter Kontrollbedingungen und von ca. 29 % aller Mycelien länger als unter Einfluss von *Asterochloris* sp.

Bis zum 30. Versuchstag hat sich das Muster der Hyphenlängenverteilung weiter zu größeren Hyphenlängen hin verschoben. Es ähnelt in den Klassen 1-10 im Wesentlichen dem Muster unter Einfluss von *Asterochloris* sp. nach gleicher Kulturdauer (vgl. Abb. 3.3c mit Abb. 3.2c). Im Vergleich zur Hyphenentwicklung nach 20 Kulturtagen sinken die Häufigkeiten in den Klassen 1-5 (1-250 μm) und steigen in den Klassen 6-10 (251-500 μm) respektive auf $4,8 \pm 1,8$ %, $6,0 \pm 1,1$ %, $4,0 \pm 2,2$ %, $4,0 \pm 2,0$ % und $3,7 \pm 2,3$ %. Der stärkste Zuwachs findet sich in Klasse 11 mit einem Häufigkeitsanstieg von $1,5 \pm 0,5$ % auf $26,2 \pm 5,2$ % und in Klasse 12 mit einem Anstieg von 0,0 % auf $23,4 \pm 3,7$ %. Verglichen mit dem Einfluss von *Asterochloris* sp. zeigen sich unter Einfluss von *Trebouxia* sp. geringere Häufigkeiten in den Klassen 1-10 (1-500 μm) und größere Häufigkeiten in Klasse 11 (+ 8,6 %) und in Klasse 12 (+ 18,6 %). Nach 30 Versuchstagen sind ca. 78 % aller Mycelien länger als unter Kontrollbedingungen und ca. 30 % länger als unter Einfluss von *Asterochloris* sp.

Wachstumsmuster: Verglichen mit den Kontrollbedingungen und dem Präkontakt-Einfluss von *Asterochloris* sp. zeigt der arteigene Photobiont *Trebouxia* sp. den stärkeren wachstumsfördernden Effekt auf junge Mycelien des Mycobionten von *F. bracteata*. Die Mycelien zeigen häufig ein spezielles Wachstumsmuster, das sich durch verschiedene Charakteristika kennzeichnen lässt. Die Mycelien zeichnen sich durch ein ausgeprägtes

Längenwachstum der Hyphen aus und zeigen eine etwas höhere Verzweigungsrate, die besonders zwischen dem 20. und 30. Versuchstag stark ansteigt. Lufthyphen werden gebildet, allerdings bleiben diese oft kurz. Dadurch entsteht in vielen Fällen ein flaches und radial auswachsendes Mycel (Abb. 3.7c), in dessen Zentrum die Hyphen oftmals relativ dicht liegen (Abb. 3.7b und Abb. 3.7c), während zu den Außenbereichen hin lange verzweigte Hyphen dominieren. Diese Mycelien zeichnen sich durch die Bildung großer Mengen gallertartiger Substanzen aus, die sowohl ganze Mycelien umgeben können (Abb. 3.7c, Abb. 3.17a), als auch entlang parallel laufender Hyphen über eine Länge von bis zu mehreren hundert Mikrometern auftreten können. Solche, über lange Strecken parallel laufenden Hyphen zeigen sich unter Einfluss von *Trebouxia* sp. häufiger als unter Einfluss von *Asterochloris* sp. In der Kontrolle treten parallel laufende Hyphen nicht auf. *Hyphal tip swellings*, die sich als keulen- bis kugelförmige Verdickung der Hyphenspitze von ca. 10 µm Durchmesser darstellen, treten unter dem Einfluss von *Trebouxia* sp. häufiger auf als bei allen anderen Versuchsanordnungen.

3.1.1.4 Präkontakt-Einfluss von *Myrmecia bisecta* auf Wasser-Agar

Verteilung der Hyphenlängen: Bereits nach 10 Tagen Kulturdauer unter Einfluss der nicht-lichenisierenden kokkalen Grünalge *Myrmecia bisecta* zeigt sich eine prozentuale Häufigkeitsverteilung in den Klassen der Hyphenlänge, die am ehesten mit der bereits beschriebenen Verteilung unter Einfluss von *Asterochloris* sp. nach 30 Tagen Kulturdauer zu vergleichen ist (vgl. Abb. 3.4a mit Abb. 3.2c). Allerdings sind die Mycelien unter Einfluss von *M. bisecta* nach 10 Tagen durch eine etwas geringere Hyphenlänge gekennzeichnet, als unter Einfluss von *Asterochloris* sp. nach 30 Tagen. Dieser Umstand zeigt sich in der höheren Häufigkeit in Klassen geringerer Hyphenlänge (Klassen 1-4, 1-200 µm) und in der geringeren Häufigkeit in Klassen größerer Hyphenlänge (Klassen 5-12). Nichtsdestotrotz kann das Hyphenwachstum innerhalb von 10 Tagen Kulturdauer als ausgesprochen stark bezeichnet werden. In den Klassen 1-10 (1-500 µm in Klassenbreiten von je 50 µm) zeigen sich relative prozentuale Häufigkeiten, die mit zunehmender Klassengröße abnehmen. In den Klassen 1-4 (1-200 µm) liegen die Werte mit $19,1 \pm 8,8 \%$, $13,7 \pm 3,5 \%$, $13,3 \pm 5,8 \%$ und $10,2 \pm 6,5 \%$ stets höher als unter Einfluss von *Asterochloris* sp. nach 30 Tagen. In den sich anschließenden Klassen 5-10 (201-500 µm) zeigen die Häufigkeiten ebenfalls eine abnehmende Tendenz mit steigender Klassengröße und reichen von ca. 6 % (Klasse 5) bis zu ca. 2 % (Klasse 10). Zu den Klassen 11 (501-1000 µm) und 12 (≥ 1001 µm) lassen sich im Mittel $13,0 \pm 6,0 \%$ und $5,8 \pm 6,8 \%$ aller Mycelien zuordnen. Verglichen mit der Hyphenentwicklung nach 10 Tagen Kulturdauer unter den anderen Versuchsbedingungen – Kontrolle, Präkontakt-Einfluss von *Asterochloris* sp. und von *Trebouxia* sp. – ist die Hyphenlänge unter Einfluss der nicht-lichenisierenden freilebenden Grünalge *Myrmecia bisecta* am weitesten fortgeschritten. So sind unter Einfluss von *M. bisecta* ca. 66% aller Mycelien weiter entwickelt als unter

Kontrollbedingungen (vgl. Abb. 3.1a). Dies gilt auch für ca. 63 % bzw. ca. 40 % aller Mycelien verglichen mit jenen unter Einfluss von *Asterochloris* sp. (Abb. 3.2a) und *Trebouxia* sp. (Abb. 3.3a)

Bis zum 20. Versuchstag hat sich das Muster der Hyphenlängenverteilung deutlich gewandelt. Während weiterhin die Hyphenlängen vieler Mycelien den Klassen 1-3 (1-150 μm) mit $22,6 \pm 1,2$ %, $15,2 \pm 2,5$ % und $9,1 \pm 3,4$ % zugeordnet werden können, sinken die prozentualen Häufigkeiten in den Klassen 4-9 (151-450 μm) und liegen durchgängig niedrig zwischen 0,0 und 3,7 %. Die Häufigkeit in Klasse 10 (451-500 μm) nimmt mit $3,0 \pm 2,0$ % nur marginal zu und die Häufigkeit in Klasse 11 sinkt von $13,0 \pm 6,0$ % auf $9,8 \pm 5,0$ %. Im Gegenzug steigt die Häufigkeit von Hyphenlängen in Klasse 12 im Mittel stark von $5,8 \pm 6,8$ % auf $27,4 \pm 15,1$ % an. Hier zeigt sich eine zweigeteilte, also bimodale Verteilung der Häufigkeiten von Hyphenlängen, die auf unterschiedlich große Geschwindigkeiten des Hyphenwachstums hindeutet. Während bei einigen Mycelien das Hyphenwachstum kurz nach der Keimung in starkem Maße einzusetzen scheint, scheint es bei anderen Mycelien langsamer zu verlaufen oder später einzusetzen.

Dieser Eindruck bestätigt sich bei der Auswertung der Verteilung der Hyphenlängen-Häufigkeiten nach 30 Versuchstagen. In diesem Falle zeigen alle Klassen der Hyphenlänge zwischen 1-500 μm (Klassen 1-10) geringe Häufigkeiten von ca. 5 % in den Klassen 1 und 2 (1-100 μm), ca. 3 % in Klasse 3 (151-200 μm) und ungefähr 1 % in den Klassen 4-10 (151-500 μm). Die Häufigkeit in Klasse 11 (501-1000 μm) ist zwischen dem 20. und 30. Versuchstag von $9,8 \pm 5,0$ % auf $16,5 \pm 5,8$ % angestiegen, ebenso steigt die Häufigkeit in Klasse 12 (≥ 1001 μm) massiv von $27,4 \pm 15,1$ % auf $63,1 \pm 4,0$ %. Nach 30 Tagen in Kultur zeigen ca. 85 % aller Mycelien größere Hyphenlängen als in der Kontrolle, ca. 58 % größere Hyphenlängen als unter Einfluss von *Asterochloris* sp. und ca. 40 % größere Hyphenlängen als unter Einfluss des arteigenen Photobionten *Trebouxia* sp. Die Anzeichen für unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten nach 20 Tagen bestätigen sich auch bei der Auswertung der Hyphenlängen nach 30 Tagen. Die Häufigkeit jener Mycelien mit relativ kurzen Hyphen nach 20 Tagen (Klasse 1-3 mit 1-150 μm) nimmt bis zum 30. Versuchstag stark ab, während auf der anderen Seite die Häufigkeit von Mycelien mit sehr langen Hyphen im gleichen Zeitraum stark zunimmt. Daraus kann abgeleitet werden, dass auch jene Mycelien, die bis zum 20. Tag noch kein ausgeprägtes Hyphenwachstum zeigen, dieses zwischen dem 20. und 30. Versuchstag „nachholen.“ Das Hyphenwachstum ist unter Einfluss von *M. bisecta* nach 30 Versuchstagen am stärksten ausgeprägt. Auch in der Betrachtung jedes einzelnen Versuchstages fördert von allen verwendeten Algen *M. bisecta* das Hyphenwachstum des Mycobionten von *F. bracteata* am stärksten.

Wachstumsmuster: Verglichen mit den anderen drei untersuchten Einflussgrößen – Kontrolle als Ansatz ohne besonderen Einfluss, Präkontakt-Einfluss von *Asterochloris* sp. sowie von *Trebouxia* sp. – bewirkt der Einfluss von *M. bisecta* ein deutlich abweichendes Wachstumsmuster der Mycelien von *F. bracteata*. Bereits am 10. Versuchstag zeigen sich weit entwickelte Mycelien, mit relativ dichten Zentralbereichen, teilweise starker Bildung von Lufthyphen, auslaufenden Hyphen auf dem Substrat, die teilweise die einzelnen Mycelien miteinander verbinden, und selten vorkommender geringfügiger Gallertbildung (Abb. 3.8a). Bei den am stärksten wachsenden Mycelien entwickeln sich auch nach 20 Versuchstagen differenzierte Wachstumsmuster (Abb. 3.8b). Es zeigen sich weit entwickelte Mycelien, mit relativ dichten Zentralbereichen und teilweise starker Bildung von Lufthyphen, die wiederum länger, häufiger und stärker verzweigt sind, als in den drei anderen Versuchsansätzen (vgl. Abb. 3.8a und Abb. 3.8b). Das dichte Wachstum im Zentrum und die starke Bildung von Lufthyphen setzen sich bis zum 30. Versuchstag fort. Dies führt zu stark dreidimensional aufgebauten Mycelien, die in ihrer stärksten Ausprägung einen sphärisch erscheinenden Zentralbereich besitzen. Zusätzlich wachsen zwischen dem 20. und 30. Versuchstag verstärkt lange und oft parallel laufende Hyphen radial aus dem Mycel aus. Eine nennenswerte Gallertbildung zeigt sich meist erst zum 20. Versuchstag und nimmt bis zum 30. Versuchstag zu. Diese Gallertbildung bleibt im Zentrumsbereich in der Regel gering und erstreckt sich meist nur auf radial auswachsende parallele Hyphen.

3.1.1.5 Darstellungen zur Auswertung auf Wasser-Agar

In den nachfolgenden Abbildungen (3.4 bis 3.8) zeigt sich die erwähnte Gallertbildung als schwärzlich unterlegter Bereich, der die Hyphen umgibt. Lufthyphen dagegen erscheinen in den Abbildungen zumeist weiß.

Wachstumscharakteristika des Mycobionten von <i>F. bracteata</i>				
	Kontrolle	<i>Asterochloris</i> sp.	<i>Trebouxia</i> sp.	<i>Myrmecia</i> <i>bisecta</i>
Hyphenlänge	+	+++	+++++	+++++++
Verzweigungen	+	++	+++	++++
Lufthyphen	+	+	++	++++
- Länge	+	+	+	+++
- Verzweigungen	-	-	+	+++
- Dreidimensionalität	-	-	-	+++
Radialhyphen	-	+	++	++
Parallelhyphen	-	-	++	++
hyphal tip swellings	+	+	++	+
Gallertbildung	-	+	+++	++
- an Parallelhyphen	-	-	+++	++
- ganzes Mycel	-	-	++	+
- zentrales Mycel	-	-	++	+
Wachstumsmuster	-	lose netzartig	kompakt flach	kompakt sphärisch

Tab. 3.1: Wachstumscharakteristika des Mycobionten von *F. bracteata* unter Einfluss zweier Photobionten bzw. der Alge *Myrmecia bisecta* auf Wasser-Agar. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Ausprägung bestimmter Charakteristika, die sich als geeignete Kriterien zur Beschreibung und Unterscheidung verschiedener Wachstumsmuster erwiesen haben. Die Stärke des Vorkommens dieser Merkmale wird durch die Häufigkeit an Pluszeichen (+) dargestellt, Minuszeichen (-) geben das vollständige oder fast vollständige Fehlen eines Merkmals an.

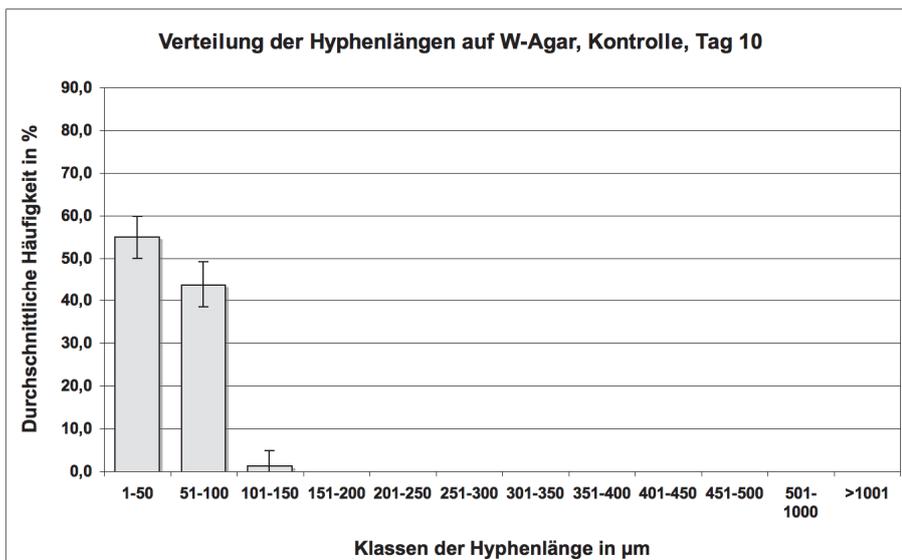


Abb. 3.1a

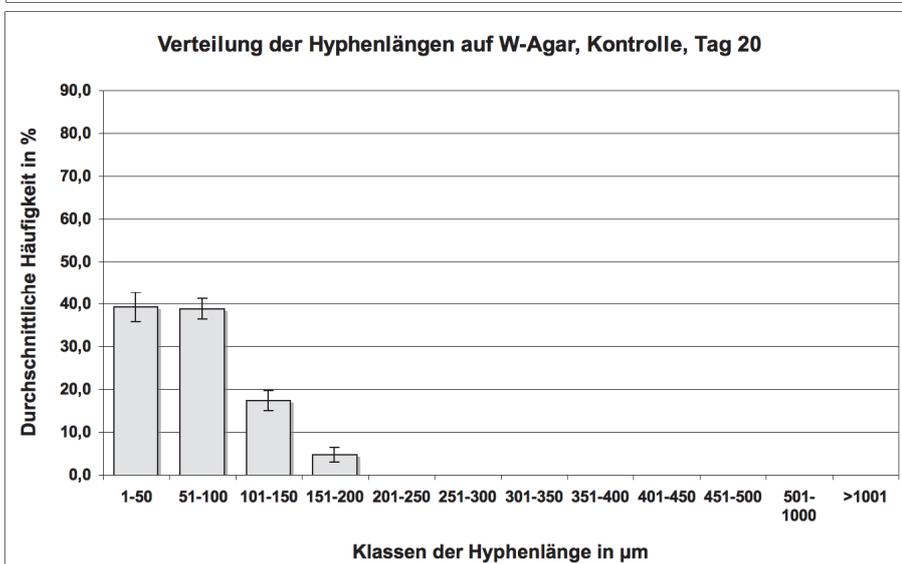


Abb. 3.1b

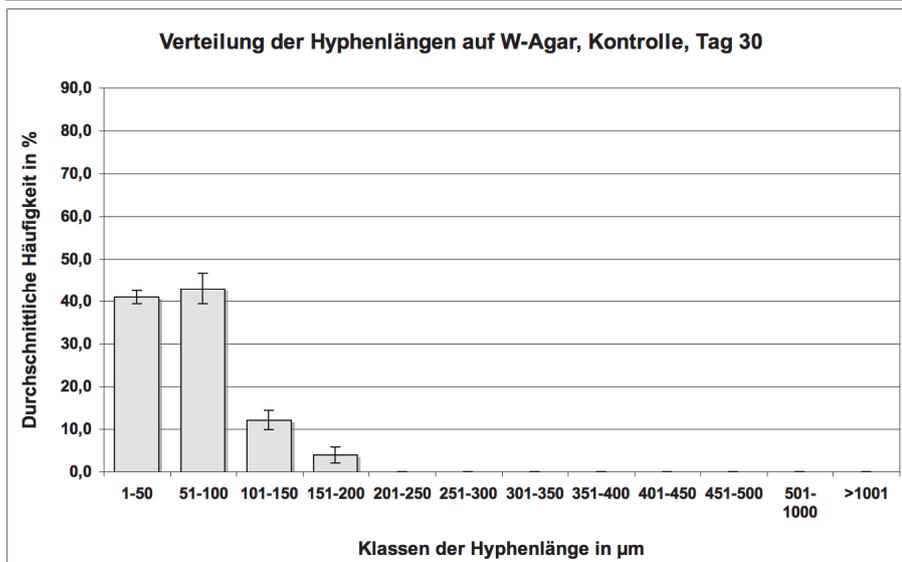


Abb. 3.1c

Abb. 3.1a,b,c: Verteilung der Hyphenlänge des Mycobionten *F. bracteata* unter Kontrollbedingungen nach 10, 20 und 30 Tagen auf Wasser-Agar. Jedes Histogramm zeigt die relativen Häufigkeiten der Klassen der Hyphenlänge als Mittelwert aus drei Wiederholungen, und die Standardabweichung als Maß der Streuung. Anzahl vermessener Sporen: 3.1a: 646 ($n_1+n_2+n_3 = 494+28+124$), 3.1b: 474 ($n_1+n_2+n_3 = 207+215+52$), 3.1c: 430 ($n_1+n_2+n_3 = 210+68+152$).

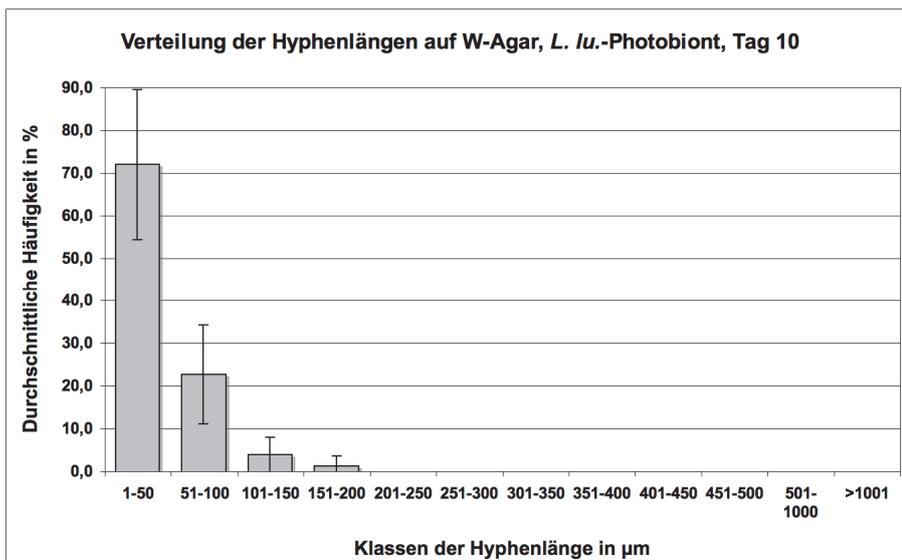


Abb. 3.2a

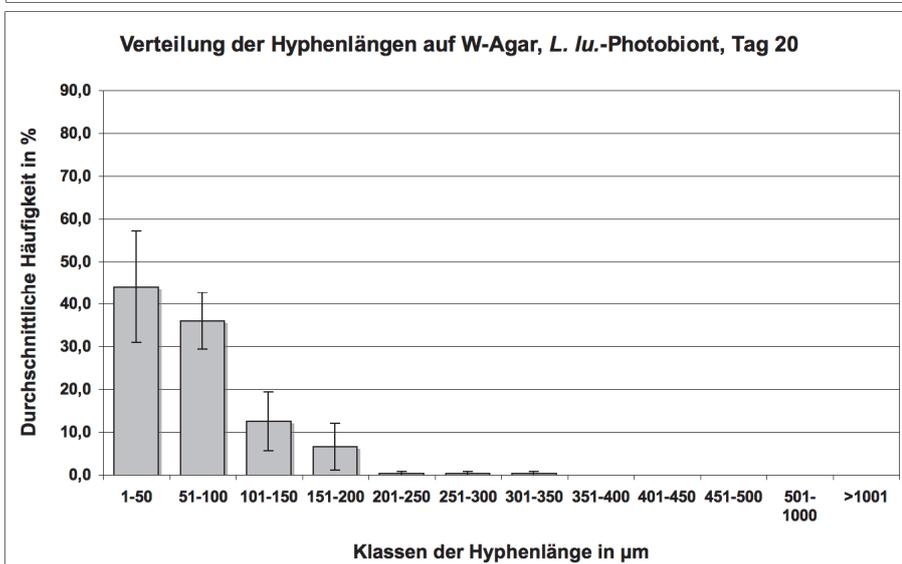


Abb. 3.2b

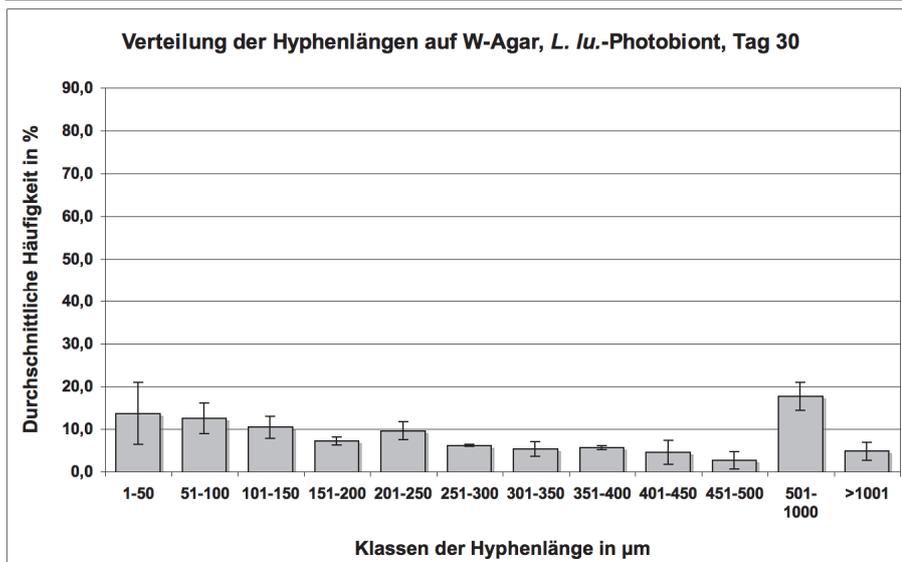


Abb. 3.2c

Abb. 3.2a,b,c: Verteilung der Hyphenlänge des Mycobionten *F. bracteata* unter dem Einfluss des unspezifischen Photobionten *Asterochloris sp.* nach 10, 20 und 30 Tagen auf Wasser-Agar. Jedes Histogramm zeigt die relativen Häufigkeiten der Klassen der Hyphenlänge als Mittelwert aus drei Wiederholungen, und die Standardabweichung als Maß der Streuung. Anzahl vermessener Sporen: 3.2a: 176 ($n_1+n_2+n_3 = 25+47+104$), 3.2b: 336 ($n_1+n_2+n_3 = 53+136+147$), 3.2c: 375 ($n_1+n_2+n_3 = 174+120+81$).

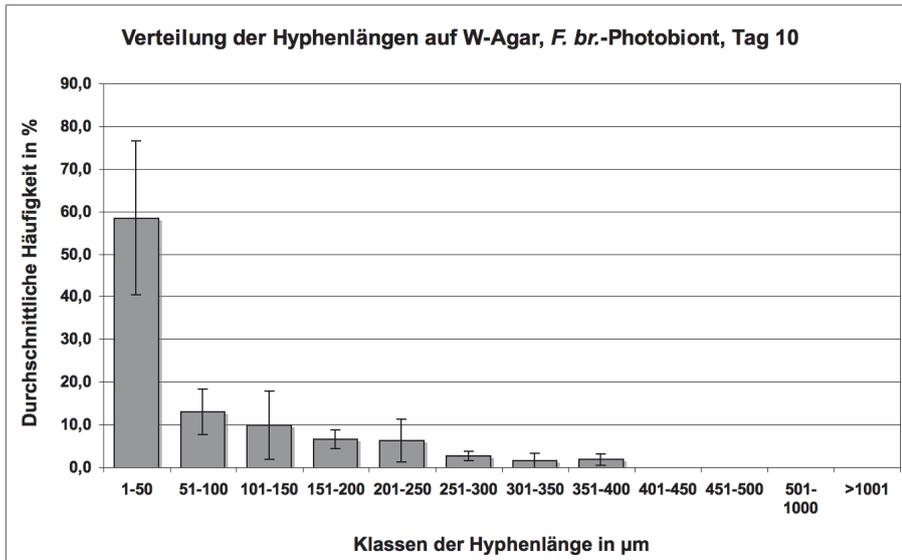


Abb. 3.3a

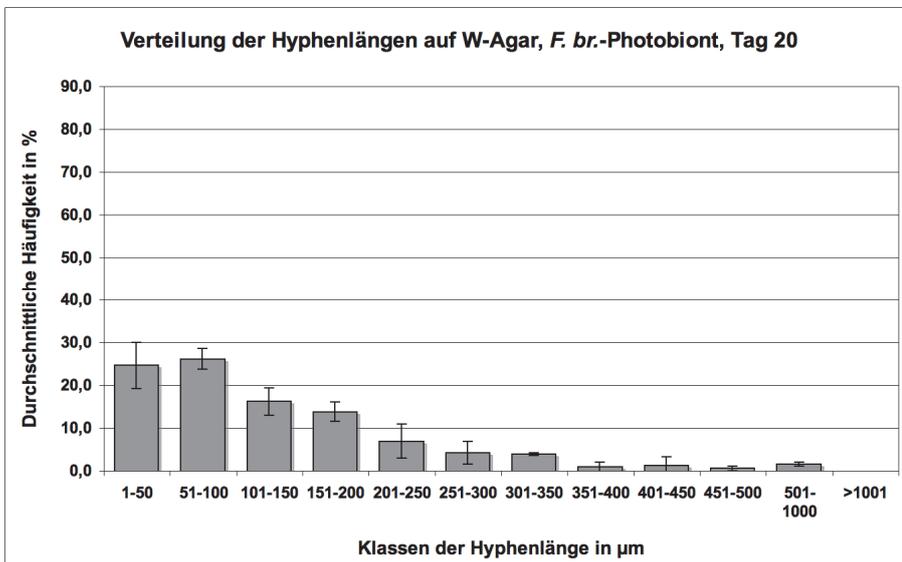


Abb. 3.3b

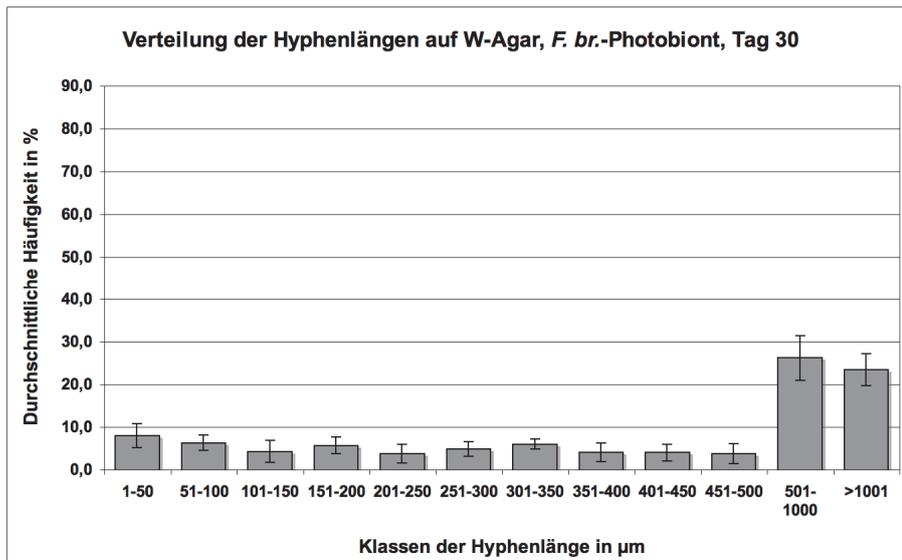


Abb. 3.3c

Abb. 3.3a,b,c: Verteilung der Hyphenlänge des Mycobionten *F. bracteata* unter dem Einfluss des arteigenen Photobionten *Trebouxia sp.* nach 10, 20 und 30 Tagen auf Wasser-Agar. Jedes Histogramm zeigt die relativen Häufigkeiten der Klassen der Hyphenlänge als Mittelwert aus drei Wiederholungen, und die Standardabweichung als Maß der Streuung. Anzahl vermessener Sporen: 3.3a: 385 ($n_1+n_2+n_3 = 211+90+84$), 3.3b: 333 ($n_1+n_2+n_3 = 164+74+95$), 3.3c: 351 ($n_1+n_2+n_3 = 91+170+90$).

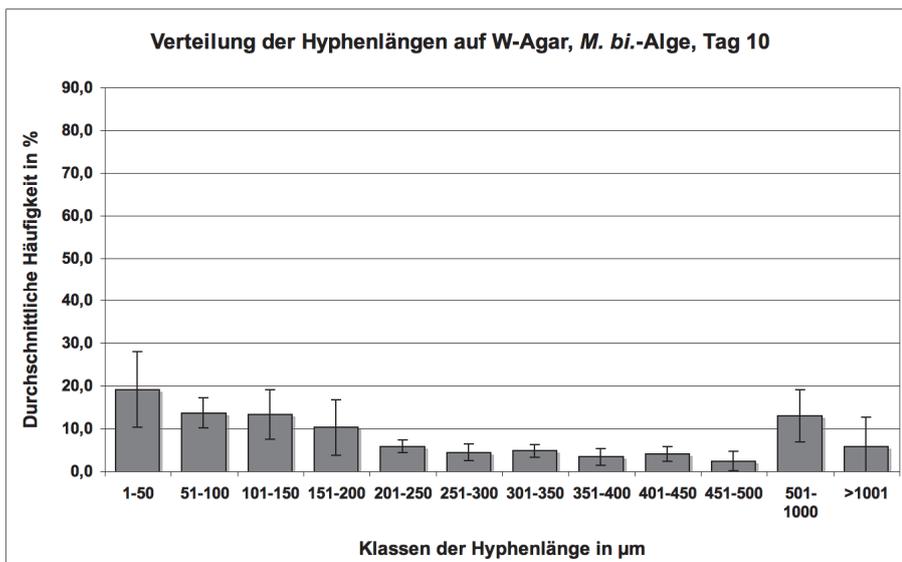


Abb. 3.4a

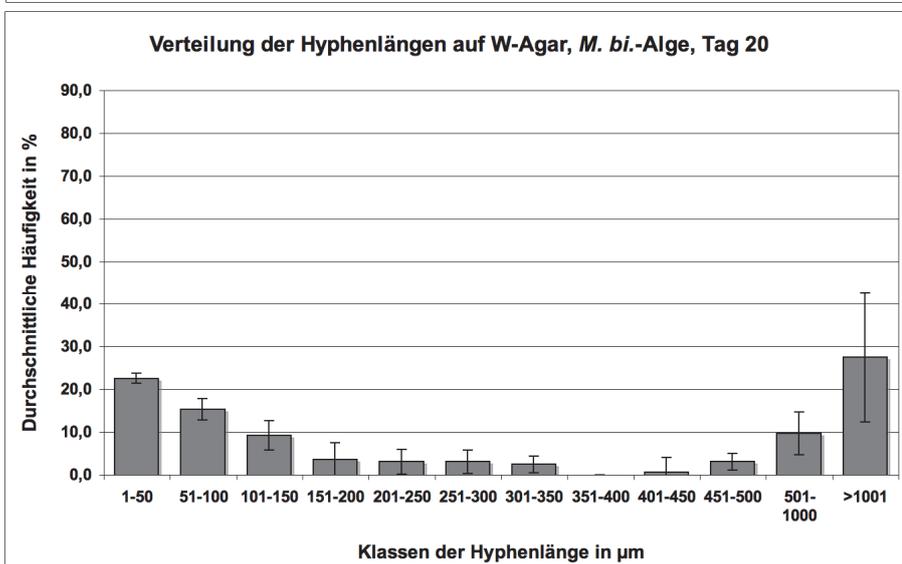


Abb. 3.4b

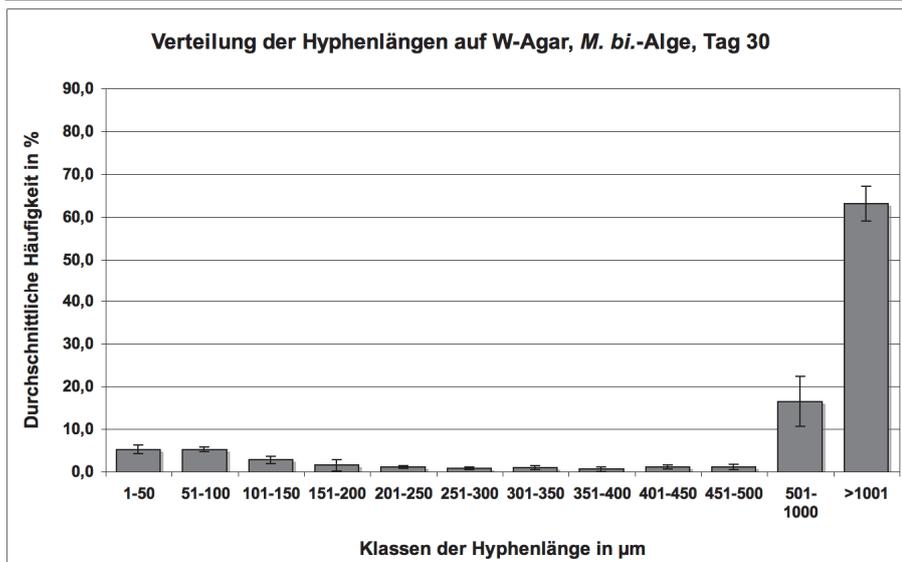


Abb. 3.4c

Abb. 3.4a,b,c: Verteilung der Hyphenlänge des Mycobionten *F. bracteata* unter dem Einfluss der nicht-lichenisierenden Alge *Myrmecia bisecta*. nach 10, 20 und 30 Tagen auf Wasser-Agar. Jedes Histogramm zeigt die relativen Häufigkeiten der Klassen der Hyphenlänge als Mittelwert aus drei Wiederholungen und die Standardabweichung als Maß der Streuung. Anzahl vermessener Sporen: 3.4a: 292 ($n_1+n_2+n_3 = 55+94+143$), 3.4b: 160 ($n_1+n_2+n_3 = 17+53+90$), 3.4c: 534 ($n_1+n_2+n_3 = 176+129+229$).

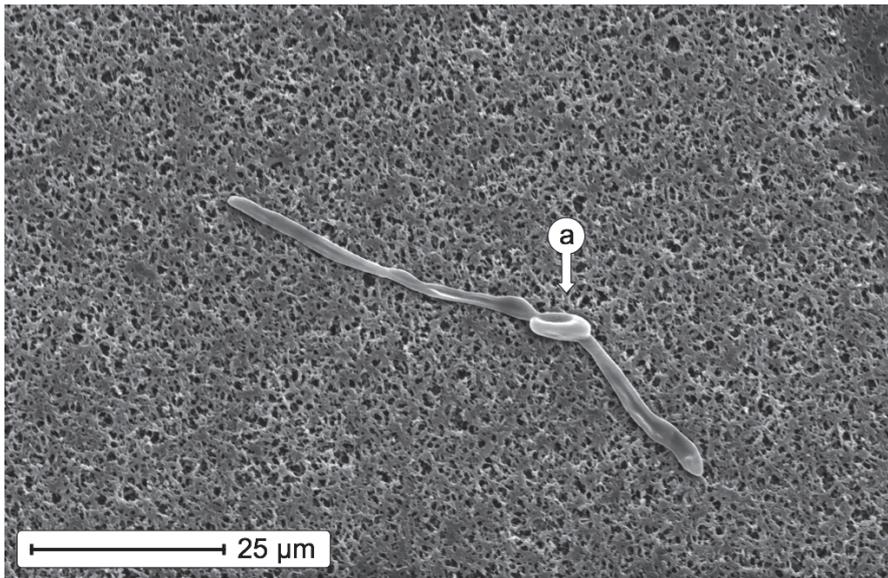


Abb. 3.5a

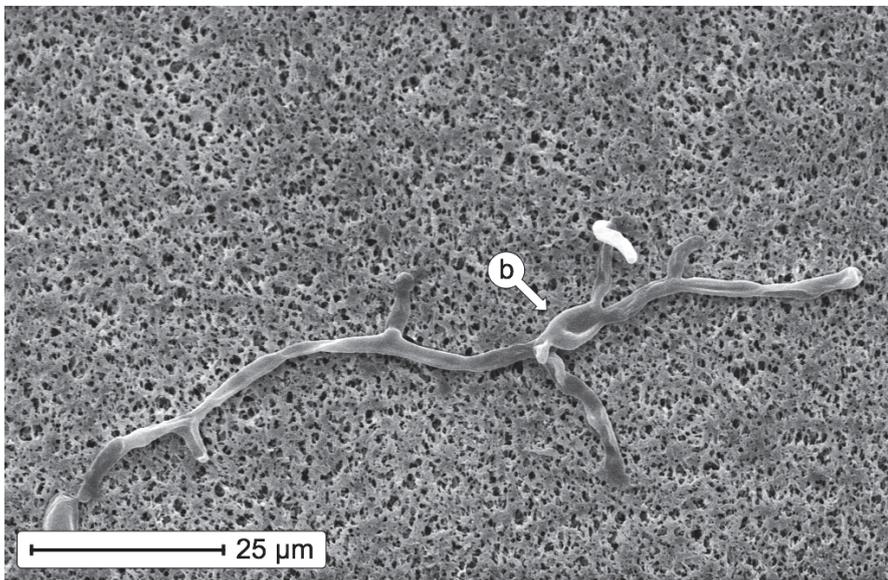


Abb. 3.5b

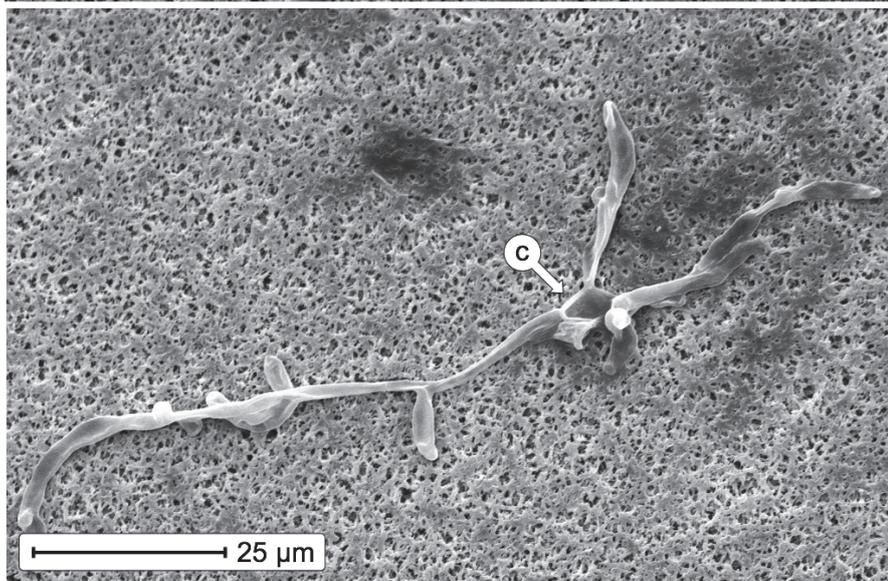


Abb. 3.5c

Abb. 3.5a,b,c: Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* auf Wasser-Agar unter Kontrollbedingungen, das heißt ohne Einfluss einer Alge oder eines Photobionten, nach 10 (3.5a), 20 (3.5b) und 30 (3.5c) Tagen unter definierten Kulturbedingungen. Die Marken a, b und c geben die Position der Sporen an.

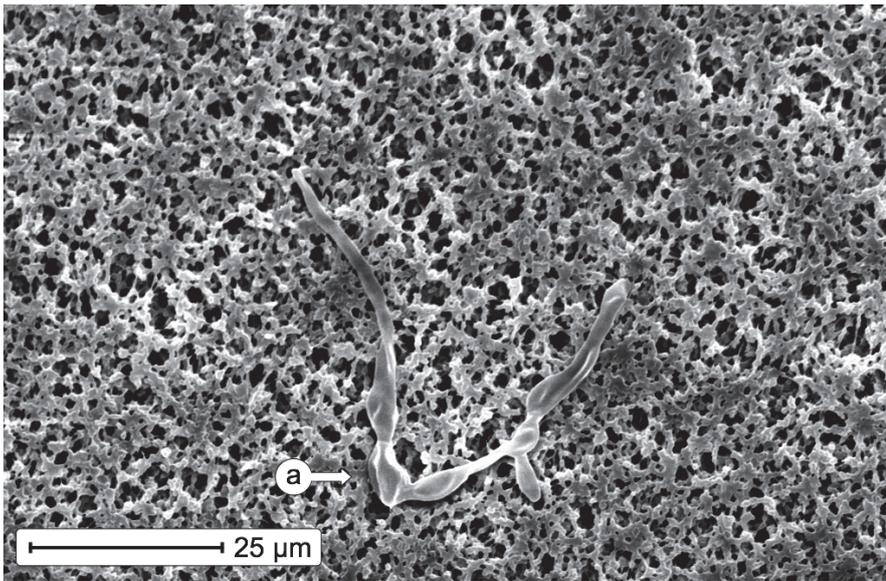


Abb. 3.6a

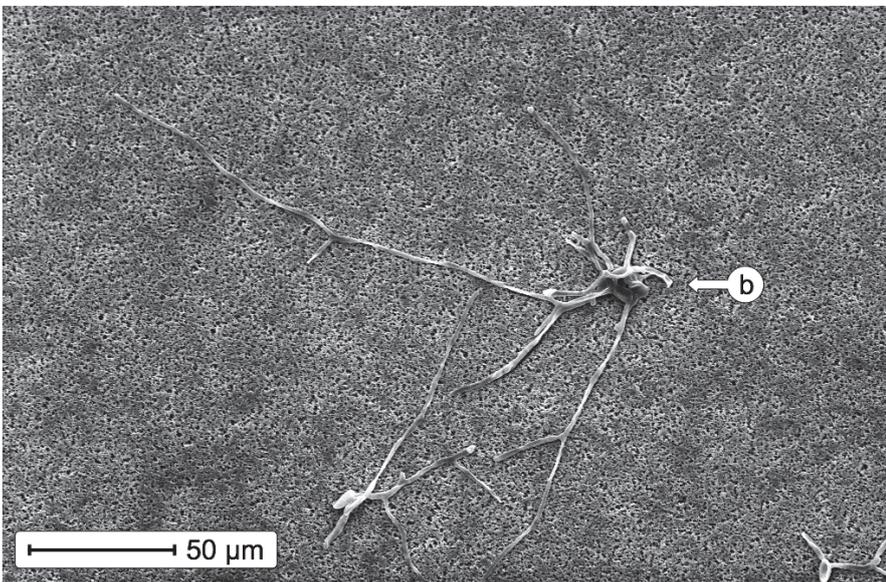


Abb. 3.6b

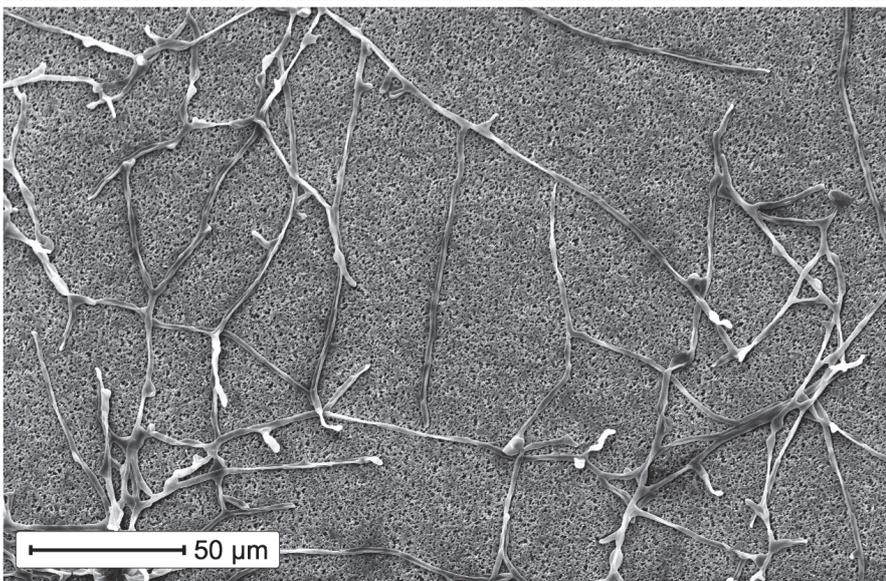


Abb. 3.6c

Abb. 3.6a,b,c: Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* auf Wasser-Agar unter Einfluss des unspezifischen Photobionten *Asterochloris* sp. aus *L. lurida* nach 10 (3.6a), 20 (3.6b) und 30 (3.6c) Tagen unter definierten Kulturbedingungen. Die Marken a und b geben die Position der Sporen an.

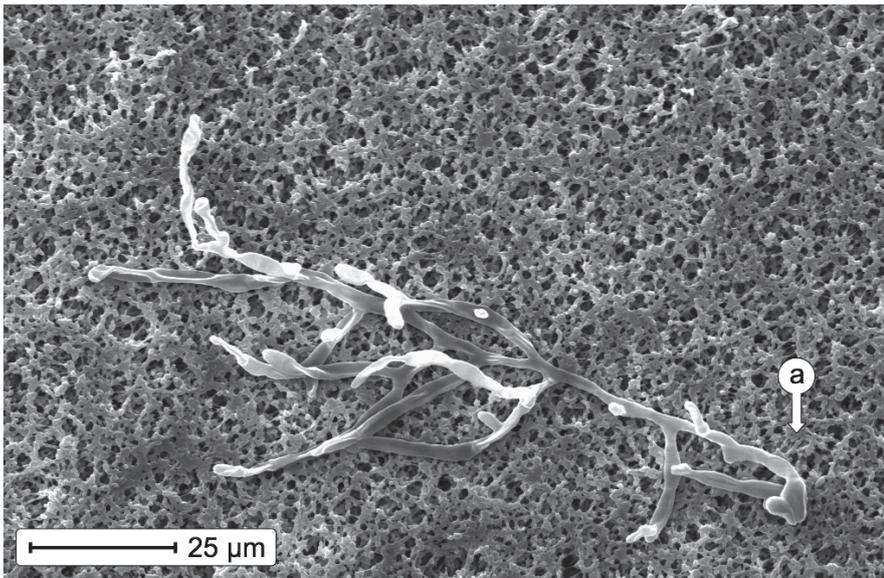


Abb. 3.7a

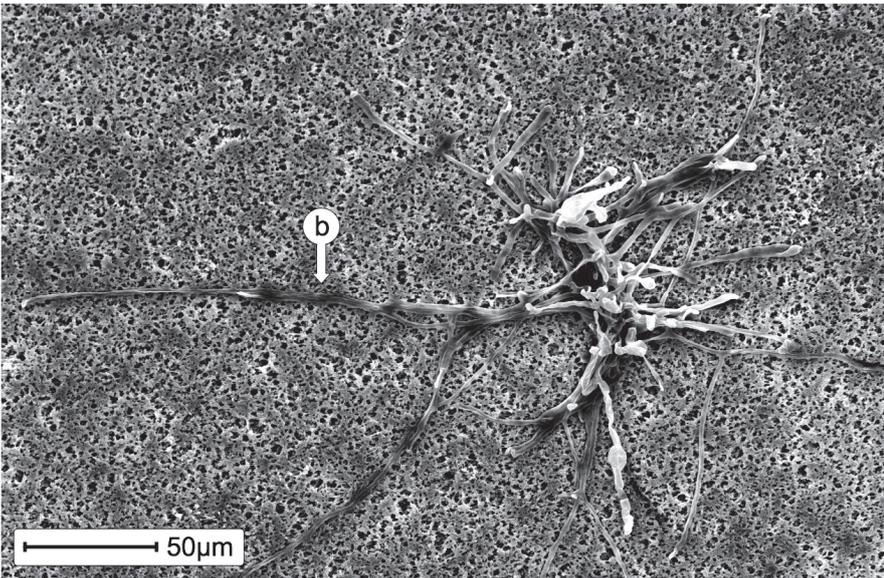


Abb. 3.7b

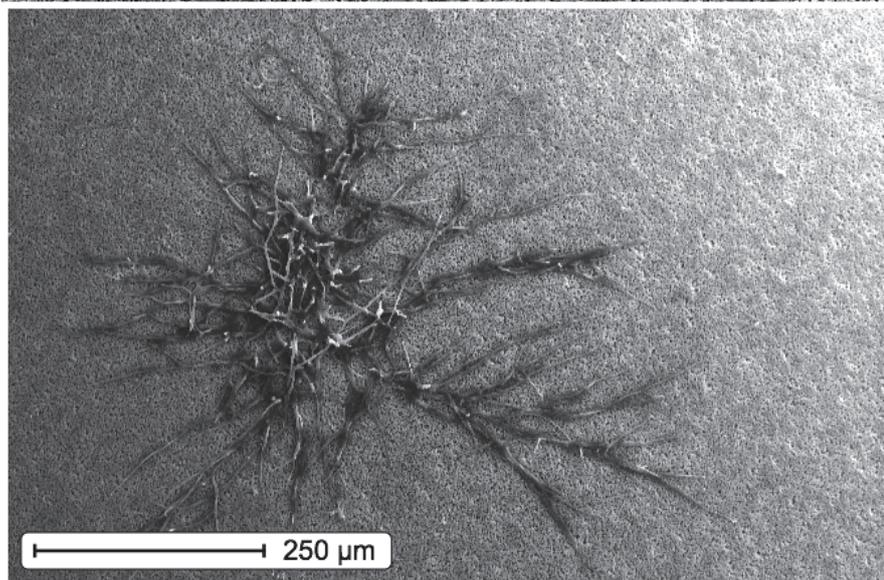


Abb. 3.7c

Abb. 3.7a,b,c: Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* auf Wasser-Agar unter Einfluss des spezifischen Photobionten *Trebouxia* sp. aus *F. bracteata*, nach 10 (3.7a), 20 (3.7b) und 30 (3.7c) Tagen unter definierten Kulturbedingungen. Marke a zeigt die auswachsende Spore an, Marke b zeigt parallele, gallertbildende Hyphen.

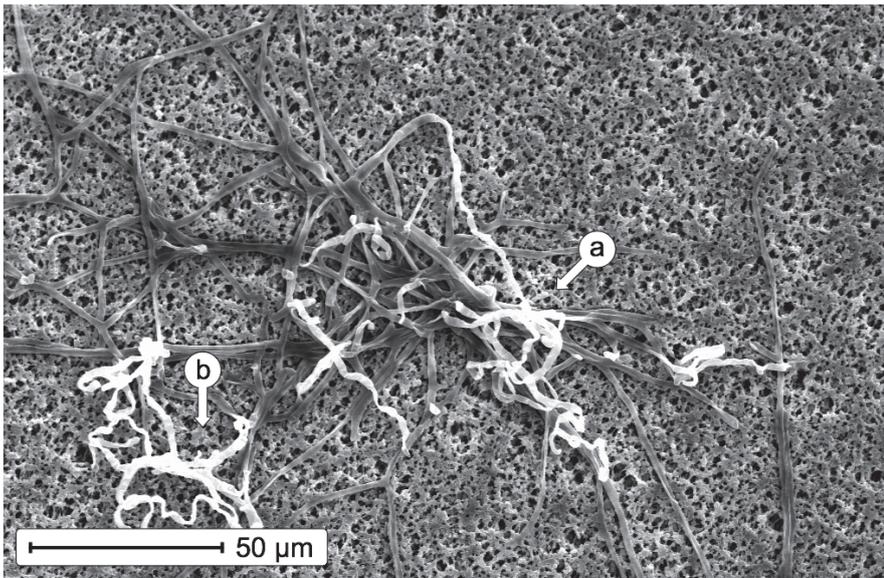


Abb. 3.8a

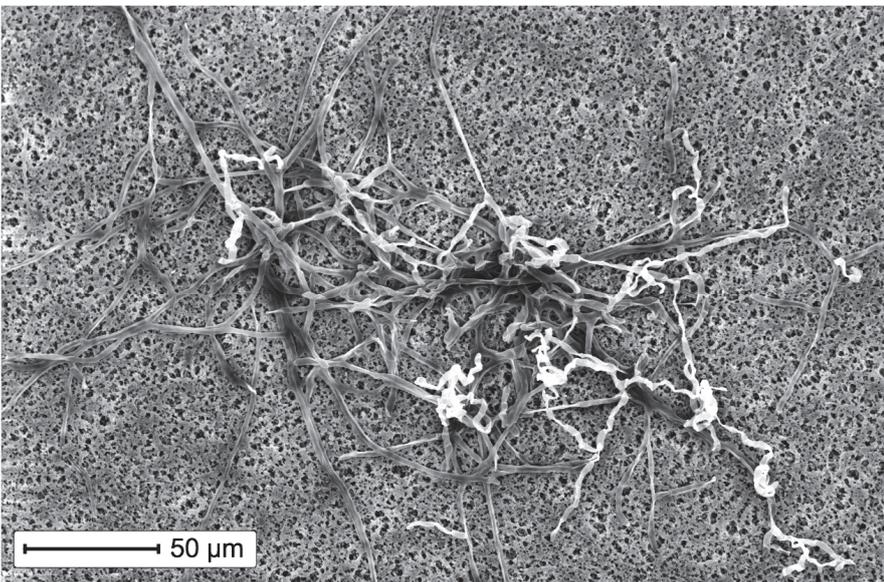


Abb. 3.8b

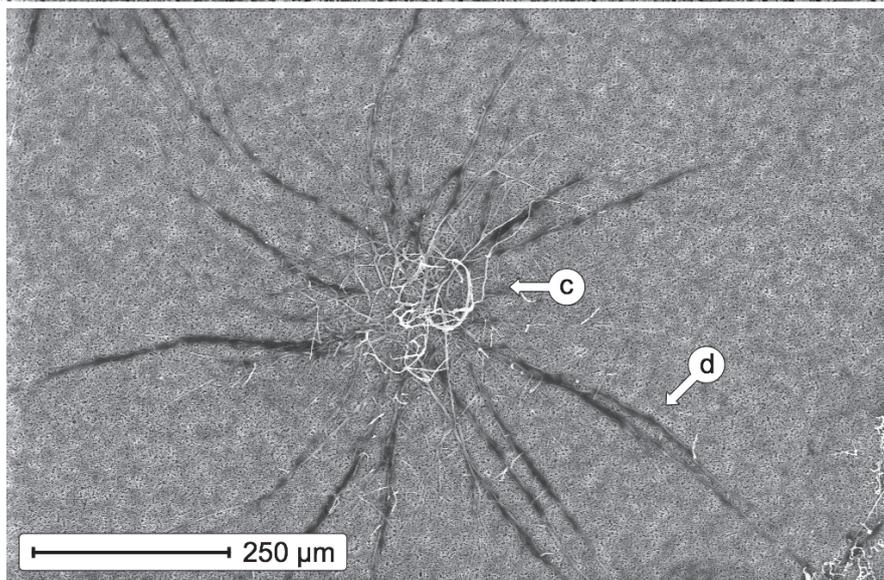


Abb. 3.8c

Abb. 3.8a,b,c: Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* auf Wasser-Agar unter Einfluss der Alge *Myrmecia bisecta* nach 10 (3.8a), 20 (3.8b) und 30 (3.8c) Tagen unter definierten Kulturbedingungen. Marken a, b und c zeigen die (frühe) Bildung von Lufthyphen, Marke d zeigt parallele, gallertbildende Hyphen.

3.1.2 Experimente auf MYS1-Agar

3.1.2.1 Kontrolle auf MYS1-Agar

Verteilung der Hyphenlängen: Die Verteilung der Hyphenlängen nach 10 Tagen unter Kontrollbedingungen auf MYS1-Agar zeigt die in Abb. 3.9a dargestellten prozentualen Häufigkeiten, die sich auf die ersten drei Klassen (1-150 μm) des Histogramms beschränken. Nach 10 Tagen Versuchsdauer lassen sich $67,7 \pm 1,6$ % der untersuchten Mycelien der Klasse 1 (1-50 μm) zuordnen, $30,9 \pm 1,7$ % der Klasse 2 (51- 100 μm) und ein geringer Anteil der Mycelien von $1,4 \pm 0,3$ % der dritten Hyphenlängenklasse (101-150 μm).

Bis zum 20. Versuchstag (Abb. 3.9b) nimmt der Anteil von Mycelien mit Hyphenlängen der Klasse 1 (1-50 μm) von $67,7 \pm 1,6$ % der untersuchten Mycelien auf $54,2 \pm 5,4$ % ab. Der Anteil in den Klassen 2 und 3 steigt hingegen respektive um ca. 11 % von $30,9 \pm 1,7$ % auf $42,1 \pm 7,9$ % bzw. um ca. 2 % von $1,4 \pm 0,3$ % auf $3,7 \pm 2,5$ % an.

Zwischen dem 20. und 30. Versuchstag sinkt der Anteil von Mycelien mit Hyphenlängen in Klasse 1 weiter um ca. 14 % auf $29,8 \pm 3,2$ % ab (Abb. 3.9c). Im Gegenzug steigt der Anteil in Klasse 2 stark um ca. 19 % von $42,1 \pm 7,9$ % auf $60,8 \pm 2,0$ % an und der Anteil der Mycelien in Klasse 3 steigt weniger stark um ca. 6 % von $3,7 \pm 2,5$ % auf $9,4 \pm 1,1$ %. Mycelien mit Hyphenlängen von mehr als 150 μm können nicht beobachtet werden.

Wachstumsmuster: In der Auswertung der Kontrollen auf MYS1-Agar zeigen sich, wie auch auf den Kontrollen auf Wasser-Agar, keine klar erkennbaren Wachstumsmuster. Es ist der geringen Länge der Hyphen zuzurechnen, dass weitere Differenzierungsmerkmale der sehr kleine Mycelien fehlen. Wie auch unter den Kontrollbedingungen auf Wasser-Agar bestehen die Mycelien meist lediglich aus einer oder mehreren unverzweigten Keimhyphen. Verzweigungen und Lufthyphen sind selten. Wenn Lufthyphen vorhanden sind, dann sind sie meist kurz und unverzweigt. Von einigen Mycelien werden mehr Gallerte und mehr *hyphal tip swellings* gebildet, als unter Kontrollbedingungen auf Wasser-Agar. Die Aussagekraft dieser Beobachtung wird durch die Tatsache relativiert, dass auf MYS1-Agar tendenziell etwas mehr Gallerte und mehr *hyphal tip swellings* gebildet werden – unabhängig vom betrachteten Versuchsansatz. Wie auf W-Agar nimmt auf MYS1-Agar die Zahl der gebildeten *hyphal tip swellings* mit zunehmender Kulturdauer zu. Eine sichtbare Differenzierung findet über die Versuchsdauer nicht statt, daher bleiben die Unterschiede zwischen Tag 10 (Abb. 3.13a), Tag 20 (Abb. 3.13b) und Tag 30 (Abb. 3.13c) marginal. Abbildung 3.13b zeigt die Einblendung eines Vermessungswerkzeugs zur Bestimmung der Hyphenlänge am REM.

3.1.2.2 Präkontakt-Einfluss von *Asterochloris* sp. auf MYS1-Agar

Verteilung der Hyphenlängen: Am 10. Tag der Kultur zeigen die Mycelien bereits stark unterschiedliche Hyphenlängen zwischen 1-500 μm (Klassen 1-10), deren prozentuale Häufigkeit in den Klassen mit zunehmender Hyphenlänge abnimmt. In den Klassen 1-4 (1-200 μm) können prozentuale Häufigkeiten von $34,9 \pm 4,5 \%$, $26,1 \pm 10,6 \%$, $13,0 \pm 2,5 \%$ und $13,0 \pm 6,2 \%$ ermittelt werden. In den Klassen 5-10 (201-500 μm) liegen die Häufigkeiten niedriger und reichen von ca. 6 % in Klasse 5 (201-250 μm) bis zu je 0,4 % in den Klassen 9 und 10 (401-500 μm). Diese Häufigkeitsverteilung der Hyphenlängen zeigt ein deutlich ausgeprägteres Hyphenwachstum unter dem Einfluss von *Asterochloris* sp. als unter Kontrollbedingungen auf MYS1-Agar und unter Einfluss von *Asterochloris* sp. auf Wasser-Agar. Ungefähr 38 % der Mycelien weisen größere Hyphenlängen auf als die Kontrolle und 42 % weisen größere Hyphenlängen auf als die Vergleichsmycelien auf Wasser-Agar.

Zwischen dem 10. und 20. Versuchstag wächst ein Großteil der untersuchten Mycelien weiter aus. Dies zeigt sich daran, dass die prozentualen Häufigkeiten in den Klassen 1 und 2 (1-100 μm) um ca. 22 % auf $12,1 \pm 0,8 \%$ und um ca. 7 % auf $19,5 \pm 2,3 \%$ fallen. In den Klassen 3-10 (101-500 μm) steigen die Häufigkeiten dagegen und liegen zwischen ca. 15 % in Klasse 3 und ca. 3 % in Klasse 10. Die Häufigkeiten nehmen mit den Klassen zunehmender Hyphenlänge sukzessiv ab. Eine Anzahl von Mycelien zeigt zusätzlich Hyphenlängen, die sich den Klassen 11 (501-1000 μm) und 12 ($\geq 1001 \mu\text{m}$) zuordnen lassen, wobei $8,5 \pm 4,4 \%$ auf erstere und $1,5 \pm 0,5 \%$ auf letztere entfallen. Nach 20 Tagen vergrößert sich damit der Unterschied zur Kontrolle und auch verglichen mit den Ergebnissen unter Einfluss von *Asterochloris* sp. auf Wasser-Agar. Ungefähr 64 % aller Mycelien weisen Hyphenlängen auf, die die der Kontrolle übertreffen, und ca. 49 % aller Mycelien übertreffen die Hyphenlängen auf Wasser-Agar.

Zwischen dem 20. und 30. Versuchstag findet ein weiteres Hyphenwachstum statt, allerdings ändert sich das Verteilungsmuster der Hyphenlängen weniger auffällig. Mit Ausnahme von Klasse 3 (101-150 μm) sinken die prozentualen Häufigkeiten in den Klassen 1-6 (1-300 μm) um Werte zwischen 5 % und 2 % ab. In den Klassen 7-9 (301-450 μm) steigen sie hingegen um 2-3 % an. Auch in den Klassen 11 und 12 gibt es geringfügige Anstiege um 4 % auf $12,6 \pm 7,6 \%$ bzw. um 1 % auf $2,5 \pm 3,0 \%$. Dies entspricht einem langsamen Zuwachs an Hyphenlänge und erreicht, trotz des schnellen Hyphenwachstum zwischen Versuchsbeginn und dem 20. Versuchstag, eine ähnliche Verteilung wie auf Wasser-Agar, allerdings mit der Einschränkung niedrigerer Werte in den höchsten Hyphenklassen 11 und 12 ($\geq 501 \mu\text{m}$).

Wachstumsmuster: Die Wachstumsmuster unter Einfluss von *Asterochloris* sp. auf MYS1-Agar ähneln eindeutig denen auf Wasser-Agar. Die Mycelien wachsen lose und wenig kompakt, besitzen sehr selten einen Bereich mit dichteren Hyphen im Zentrum des Mycelis und setzen sich oft aus lang ausgewachsenen und in großen Abständen verzweigten Hyphen

zusammen (vgl. Abb. 3.14b). Lufthyphen, Gallertbildung und *hyphal tip swellings* treten auf MYS1-Agar häufiger auf, als auf Wasser-Agar (Abb. 3.14c). Dabei fällt auf, dass alle drei Merkmale zwischen dem 20. und 30. Versuchstag zunehmen. Einige Lufthyphen wachsen zu größerer Länge aus, bleiben dann allerdings oft unverzweigt. Die Gallertbildung tritt punktuell an kurzen Hyphenabschnitten und an Verzweigungen auf, umfasst aber nur sehr selten größere Hyphenabschnitte und nie ganze Mycelien. Die *hyphal tip swellings* nehmen mit fortschreitender Versuchsdauer zu und sind häufiger als auf Wasser-Agar anzutreffen. Generell führt das Wachstumsmuster zu wenig differenzierten Mycelien, die durch ihre netzartige Verbindung untereinander weite Bereiche des Substrates kolonisieren.

3.1.2.3 Präkontakt-Einfluss von *Trebouxia* sp. auf MYS1-Agar

Verteilung der Hyphenlängen: Nach 10 Tagen Kulturdauer unter Einfluss des arteigenen Photobionten *Trebouxia* sp. ist das Hyphenwachstum fortgeschrittener als unter Einfluss von *Asterochloris* sp. und als unter Kontrollbedingungen. Das Hyphenwachstum ist ebenfalls fortgeschrittener als unter Einfluss von *Trebouxia* sp. auf Wasser-Agar. Die Verteilung der Hyphenlängen im Histogramm (Abb. 3.11a) zeigt, dass ein Anteil von nur $30,9 \pm 4,9$ % der Mycelien Hyphenlängen zwischen 1-50 μm (Klasse 1) aufweist, verglichen mit $58,4 \pm 18,1$ % auf Wasser-Agar. In den folgenden Klassen 2-4 (51-200 μm) zeigen sich höhere Häufigkeiten von $28,7 \pm 3,4$ %, $19,3 \pm 2,0$ % und $9,8 \pm 4,7$ %, was respektive 16 %, 10 % und 3 % mehr Mycelien in diesen Klassen bedeutet als auf Wasser-Agar. In den folgenden zwei Klassen 5 und 6 (201-300 μm) ähneln sich die Häufigkeiten auf beiden Medien stark. Allerdings finden sich in Klasse 7 und 8 (301-400 μm) weniger Mycelien. Klasse 9 (401-450 μm) – die auf Wasser-Agar überhaupt nicht besetzt ist – beinhaltet jedoch auf MYS1-Agar einen geringen Anteil von $0,2 \pm 0,3$ % der vermessenen Mycelien.

Auch nach 20 Versuchstagen ist das Wachstum der Hyphenlänge weiter vorangeschritten als auf Wasser-Agar (Abb. 3.11b). In den Klassen 1-3 (1-150 μm) sind die Häufigkeiten auf $8,3 \pm 0,4$ %, $14,3 \pm 1,6$ % und $14,0 \pm 1,5$ % gesunken. In Klasse 4 (151-200 μm) tritt keine Veränderung auf und in den Klassen 5-9 (201-450 μm) erfolgen Häufigkeitszunahmen auf Werte zwischen 10 % und 4 %. Zusätzlich wachsen die Hyphen nach 20 Versuchstagen erstmals soweit aus, dass die Klassen 9-12 (≥ 451 μm) prozentuale Häufigkeiten von $2,6 \pm 0,7$ %, $11,5 \pm 2,5$ % und $3,2 \pm 0,1$ % aufweisen. Das Verteilungsmuster ähnelt damit stark dem, dass bereits für den Einfluss von *Asterochloris* sp. auf MYS1-Agar beschrieben wird (vgl. Kapitel 3.1.2.2). Der Wachstumsvorsprung der Hyphenlängen, den auf Wasser-Agar der arteigene Photobiont *Trebouxia* sp. gegenüber den inkompatiblen Photobionten *Asterochloris* sp. auslöst, zeichnet sich bis zum 20. Versuchstag auf MYS1-Agar nicht ab.

Dieser fehlende Unterschied bildet sich jedoch bis zum 30. Versuchstag durch das verstärkte Hyphenwachstum auf MYS1-Agar aus. Die prozentualen Häufigkeiten in den Klassen 1-9 (1-450 μm) sinken weiter ab, zugunsten der Mycelien mit Hyphenlängen in den Klassen 11 und

12 ($\geq 501 \mu\text{m}$). Dort steigen die Häufigkeiten von $11,5 \pm 2,5 \%$ auf $19,5 \pm 4,8 \%$ und von $3,2 \pm 0,1 \%$ auf $20,2 \pm 5,7 \%$. Auch zwischen dem 20. und 30. Versuchstag zeigt sich damit ein deutliches Hyphenwachstum. Verglichen mit Wasser-Agar fällt diese Entwicklung auf MYS1-Agar allerdings schwächer aus. Während das Wachstum zwischen Versuchsbeginn und dem 20. Versuchstag auf MYS1-Agar stärker voranschreitet als auf Wasser-Agar, verlangsamt es sich zwischen dem 20. und 30. Versuchstag so stark, dass es gegenüber dem Verteilungsmuster der Hyphenlängen auf Wasser-Agar zurückbleibt. Dies zeigt sich besonders in den größeren prozentualen Häufigkeiten in den Klassen 1-3 und den leicht geringeren Anteilen in den Klassen 11 und 12 ($19,5 \pm 4,8 \%$ und $20,2 \pm 5,7 \%$ auf MYS1-Agar, verglichen mit $26,2 \pm 5,2 \%$ und $23,4 \pm 3,7 \%$ auf Wasser-Agar).

Wachstumsmuster: Das Wachstumsmuster auf MYS1-Agar zeigt ein heterogeneres Bild als auf Wasser-Agar. Bis zum 20. Versuchstag sind die gemessenen Hyphenlängen zwar größer, die Differenzierung der Mycelien ist allerdings geringer. Zwar bleiben diese flach, arm an längeren und verzweigten Lufthyphen und zeigen zahlreiche Verzweigungen auf dem Substrat, aber ihr Wachstumsmuster ist weniger kompakt (Abb. 3.15b). Bis zum 30. Versuchstag gewinnen die Mycelien an Kompaktheit und lassen grade im Zentralbereich eine verstärkte Bildung von (Luft-)Hyphen und Gallerte erkennen. Wie auf Wasser-Agar findet diese Gallertbildung auch bevorzugt an längeren und parallel laufenden Hyphen statt, die von größeren Mycelien ebenfalls zwischen dem 20. und 30. Versuchstag verstärkt gebildet werden. Zwar setzen die Gallertbildung und die Bildung von *hyphal tip swellings* zwischen dem 20. und 30. Tag analog zu den Beobachtungen auf Wasser-Agar auch auf MYS1-Agar verstärkt ein, erweisen sich jedoch als stärker. Dies scheint ein generelles Merkmal auf MYS1-Agar zu sein (vgl. Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2). Trotz dieser beschriebenen Unterschiede ähneln die Differenzierungen der Mycelien deutlich denen auf Wasser-Agar.

3.1.2.4 Präkontakt-Einfluss von *Myrmecia bisecta* auf MYS1-Agar

Verteilung der Hyphenlängen: Bis zum 10. Versuchstag wachsen die Hyphen unter Einfluss der nicht-lichenisierenden Alge *Myrmecia bisecta* auf MYS1-Agar nicht so weit aus, wie dies auf Wasser-Agar der Fall ist (vgl. Abb. 3.12a mit Abb. 3.4a). Es stellt sich bei der Verteilung der Hyphenlängen (Abb. 3.12a) heraus, dass beinahe alle Mycelien Hyphenlängen zwischen 1-300 μm (Klassen 1-6) ausbilden. Dabei steigen die prozentualen Häufigkeiten der Klassen 1-3 (1-150 μm) von $15,9 \pm 6,5 \%$ über $27,6 \pm 3,6 \%$ auf $29,1 \pm 1,1 \%$ an und fallen in den Klassen 4-6 (151-300 μm) von $16,8 \pm 3,3 \%$ über $5,8 \pm 1,8 \%$ auf $3,1 \pm 1,1 \%$ ab. Somit bilden ca. 98 % aller Mycelien Hyphenlängen von unter 300 μm in einer angenähert glockenförmigen Verteilung aus. In den Klassen 7-10 (301-500 μm) läuft diese Verteilung zu größeren Hyphenlängen hin aus und es finden sich mit jeweils $< 1 \%$ nur geringe Anteile von Mycelien in diesen Klassen.

Nach 20 Tagen Kulturdauer (Abb. 3.12b) hat sich dieses annähernd glockenförmige Verteilungsmuster abgeflacht, verbreitert und zu größeren Hyphenlängen hin verschoben. In Klasse 1 ist die Häufigkeit um ca. 8 % auf $8,2 \pm 6,7$ % gesunken, in den Klassen 2-4 liegt sie bei jeweils ca. 14 % und in den Klassen 5 und 6 ist sie um ca. 5 % und ca. 6 % auf $10,6 \pm 2,5$ % bzw. $9,3 \pm 0,4$ % gestiegen. Auch in den Klassen 7-10 steigen die Häufigkeiten auf Werte zwischen 3 % und 4,5 % an. Nach 20 Versuchstagen treten erstmals Mycelien mit Hyphenlängen $\geq 501 \mu\text{m}$ (Klassen 11 und 12) und mit Häufigkeiten von $9,8 \pm 4,2$ % und $2,9 \pm 2,6$ % auf. Dieses Verteilungsmuster ähnelt stark den zuvor beobachteten Verteilungsmustern unter Einfluss von *Asterochloris* sp. (Abb. 3,10b) und *Trebouxia* sp. (Abb. 3.11b) nach 20 Tagen auf MYS1-Agar.

Bis zum 30. Versuchstag verflacht die beschriebene glockenförmige Verteilung der Hyphenlängen stark (Abb. 3.12c). Die prozentualen Häufigkeiten sinken in den Klassen 1-9 ab; auf Werte zwischen ca. 6-9 % in den Klassen 1-6 (1-300 μm) und auf Werte zwischen ca. 1-3 % in den Klassen 7-9 (301-450 μm). Bei den Mycelien mit großen Hyphenlängen (Klasse 11 und 12 mit $\geq 501 \mu\text{m}$) steigen die Häufigkeiten stark von $9,8 \pm 4,2$ % auf $17,7 \pm 15,0$ in Klasse 11 und von $2,9 \pm 2,6$ % auf $27,4 \pm 38,3$ % in Klasse 12. Damit ähneln die Mittelwerte und das Verteilungsmuster zwar denen auf Wasser-Agar nach 20 Tagen, zeichnen sich allerdings ebenso durch eine auffallend große Streuung der Mittelwerte aus.

Wachstumsmuster: Die Wachstumsmuster des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* unter dem Einfluss der nicht-lichenisierenden Grünalge *Myrmecia bisecta* auf MYS1-Agar entsprechen weitestgehend denen auf Wasser-Agar. Allerdings entwickeln sich die Mycelien auf MYS1-Agar bis zum 30. Versuchstag nur bis zu einem Stadium, dass auf Wasser-Agar einem Zwischenstadium zwischen dem 20. und 30. Versuchstag entspräche (vgl. Abb. 3.16c mit Abb. 3.8b und Abb. 3.8c). Die Mycelien zeichnen sich durch ein kompaktes Wachstum im Zentralbereich aus, in dem die vermehrte Bildung von Lufthyphen ein beginnendes Höhenwachstum anzeigt. Der Zentrumsbereich zeigt dabei nur selten ein klar sphärisches Wachstumsmuster, wie es in Abb. 3.18c dargestellt ist. Während im Zentralbereich nur wenig bis mäßig Gallerte gebildet wird, zeigt sich an den radiär auf dem Substrat auswachsenden Hyphen vermehrte Gallertbildung. Diese konzentriert sich auf parallele Hyphen, die seltener auftreten als auf Wasser-Agar, und auf Bereiche in denen Hyphen sich kreuzen. Lange radiär auswachsende Hyphen bilden sich schon bis zum 20. Versuchstag (Abb. 3.16b), prägen das Wachstumsmuster allerdings nicht so deutlich, wie es auf Wasser-Agar der Fall ist.

3.1.2.5 Darstellungen zur Auswertung auf MYS1-Agar

In den nachfolgenden Abbildungen (3.13 bis 3.18) zeigt sich die erwähnte Gallertbildung als schwärzlich unterlegter Bereich, der die Hyphen umgibt. Lufthyphen dagegen erscheinen in den Abbildungen zumeist weiß.

Wachstumscharakteristika des Mycobionten von <i>F. bracteata</i>				
	Kontrolle	<i>Asterochloris</i> sp.	<i>Trebouxia</i> sp.	<i>Myrmecia</i> <i>bisecta</i>
Hyphenlänge	+	+++	+++++	+++++
Verzweigungen	+	++	+++	+++
Lufthyphen	+	+	++	+++
- Länge	+	+	+	++
- Verzweigungen	-	-	+	++
- Dreidimensionalität	-	-	-	+
Radialhyphen	-	+	++	++
Parallelhyphen	-	-	++	+
hyphal tip swellings	++	++	++	+
Gallertbildung	+	++	++++	+++
- an Parallelhyphen	-	-	+++	+
- ganzes Mycel	-	-	++	+
- zentrales Mycel	-	-	++	+
Wachstumsmuster	-	lose netzartig	kompakt flach	kompakt sphärisch

Tab. 3.2: Wachstumcharakteristika des Mycobionten von *F. bracteata* unter Einfluss zweier Photobionten bzw. der Alge *Myrmecia bisecta* auf MYS1-Agar. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Ausprägung bestimmter Charakteristika, die sich als geeignete Kriterien zur Beschreibung und Unterscheidung der verschiedenen Wachstumsmuster erwiesen haben. Die Stärke des Vorkommens dieser Merkmale wird durch die Häufigkeit an Pluszeichen (+) dargestellt, Minuszeichen (-) geben das vollständige oder fast vollständige Fehlen eines Merkmals an.

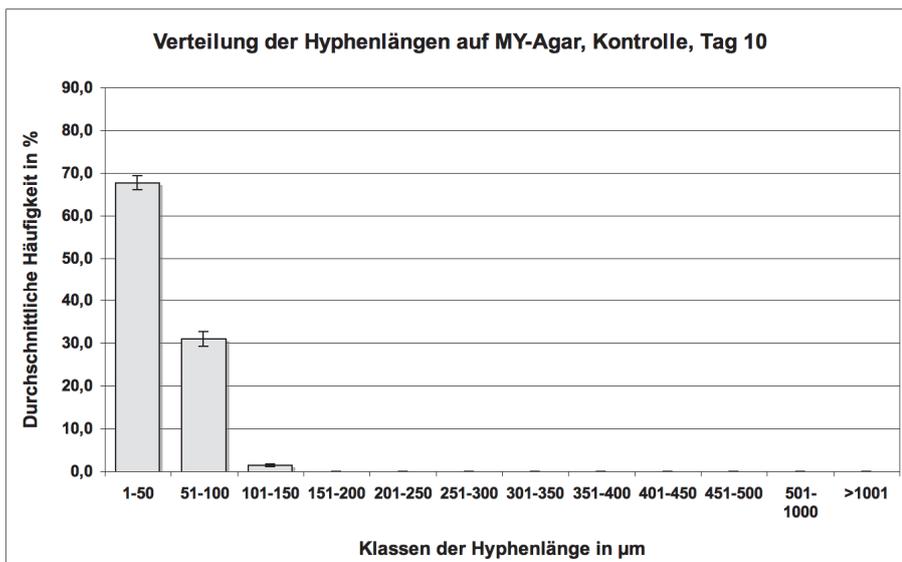


Abb. 3.9a

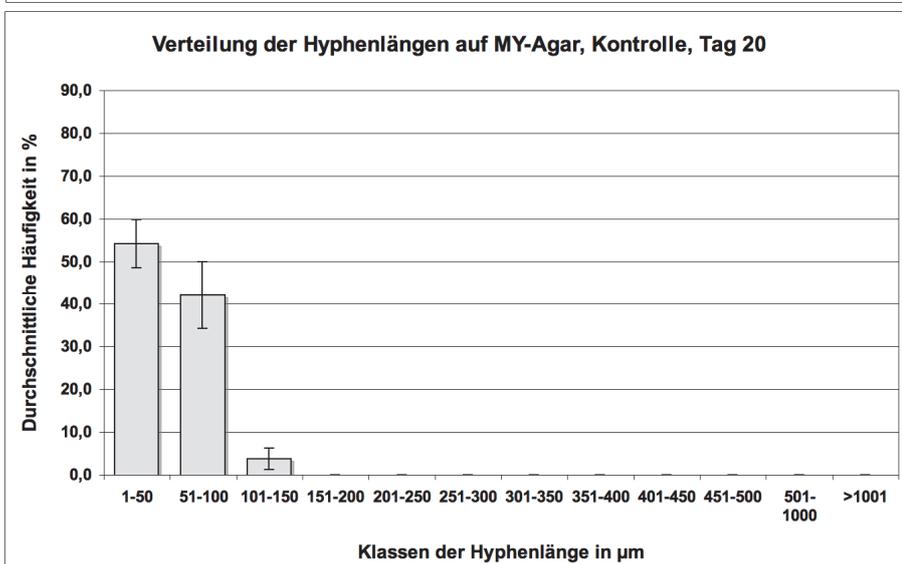


Abb. 3.9b

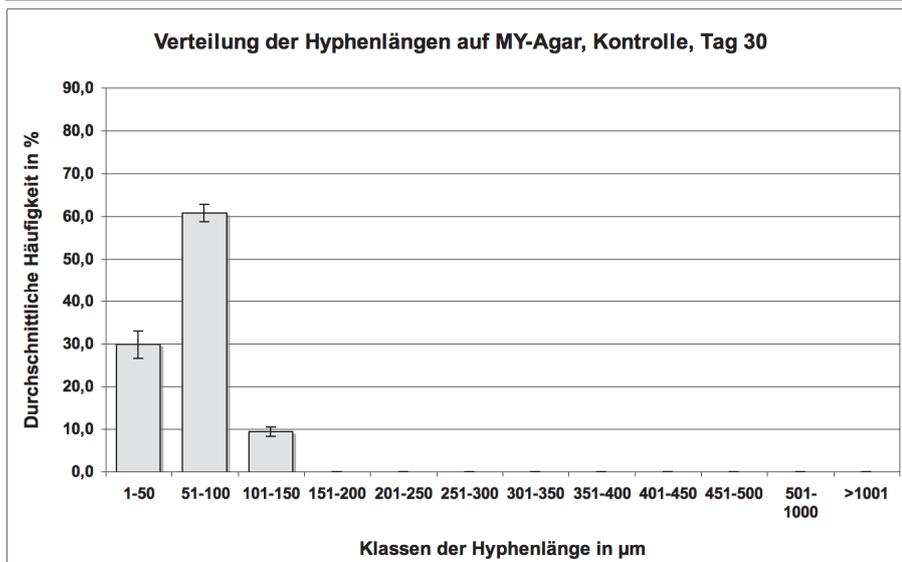


Abb. 3.9c

Abb. 3.9a,b,c: Verteilung der Hyphenlänge des Mycobionten *F. bracteata* unter Kontrollbedingungen nach 10, 20 und 30 Tagen auf MYS1-Agar. Das Histogramm zeigt die relativen Häufigkeiten der Klassen der Hyphenlänge als Mittelwert aus drei Wiederholungen und die Standardabweichung als Maß der Streuung. Anzahl vermessener Sporen: 3.9a: 285 ($n_1+n_2+n_3 = 116+85+84$), 3.9b: 107 ($n_1+n_2+n_3 = 45+13+49$), 3.9c: 329 ($n_1+n_2+n_3 = 108+108+113$).

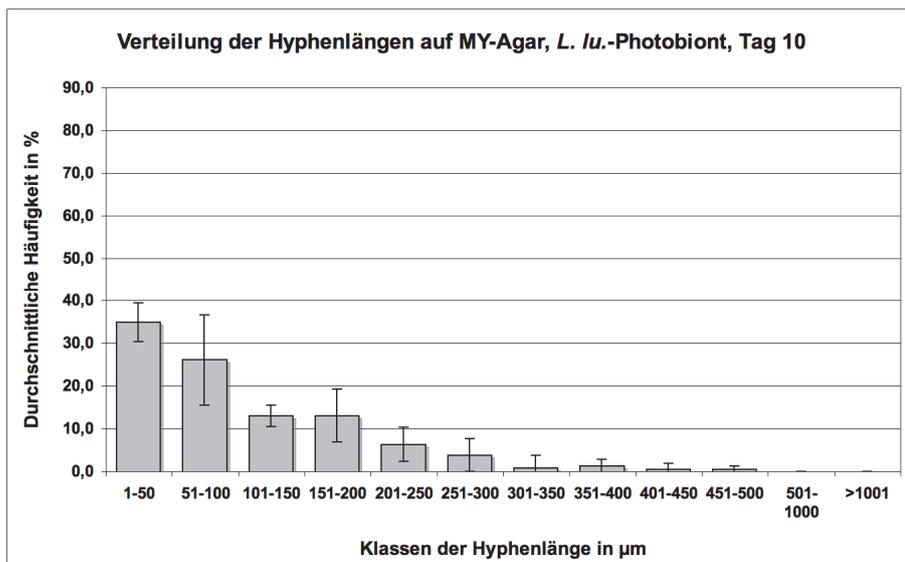


Abb. 3.10a

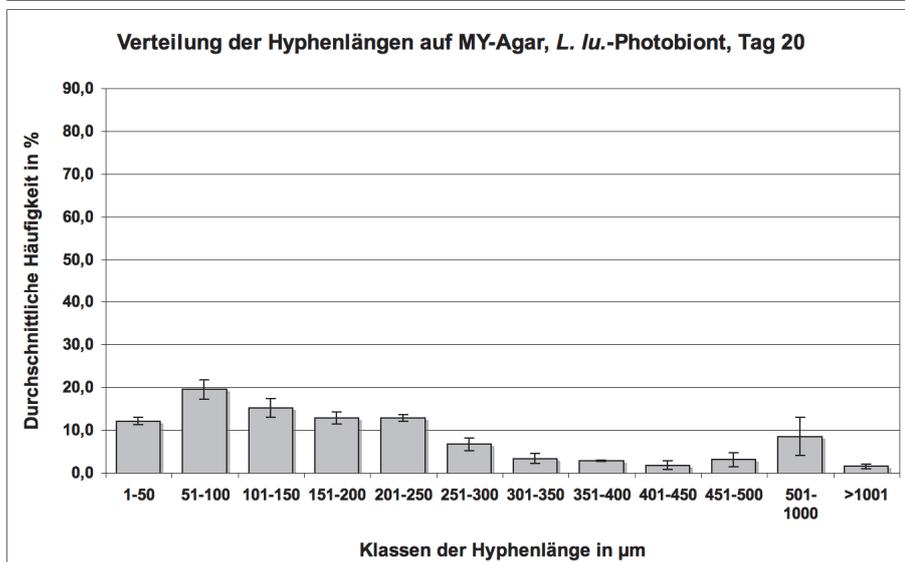


Abb. 3.10b

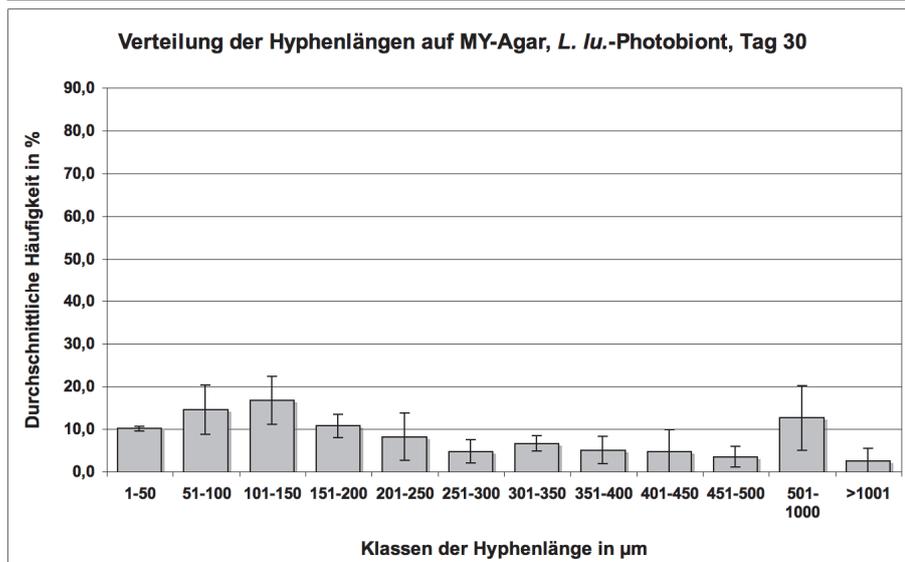


Abb. 3.10c

Abb. 3.10a,b,c: Verteilung der Hyphenlänge des Mycobionten *F. bracteata* unter dem Einfluss des unspezifischen Photobionten *Asterochloris sp.* nach 10, 20 und 30 Tagen auf MYS1-Agar. Das Histogramm zeigt die relativen Häufigkeiten der Klassen der Hyphenlänge als Mittelwert aus drei Wiederholungen und die Standardabweichung als Maß der Streuung. Anzahl vermessener Sporen: 3.10a: 238 ($n_1+n_2+n_3 = 39+128+71$), 3.10b: 390 ($n_1+n_2+n_3 = 133+108+146$), 3.10c: 317 ($n_1+n_2+n_3 = 107+107+103$).

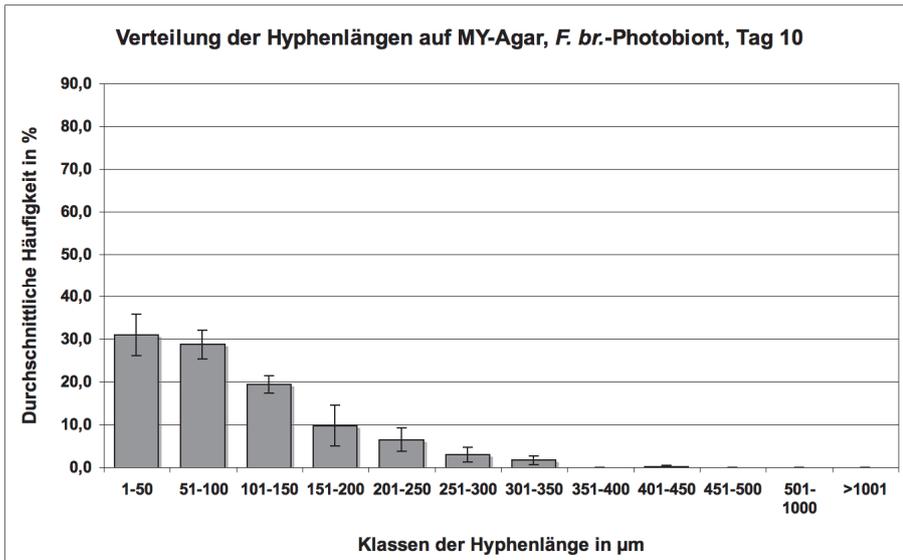


Abb. 3.11a

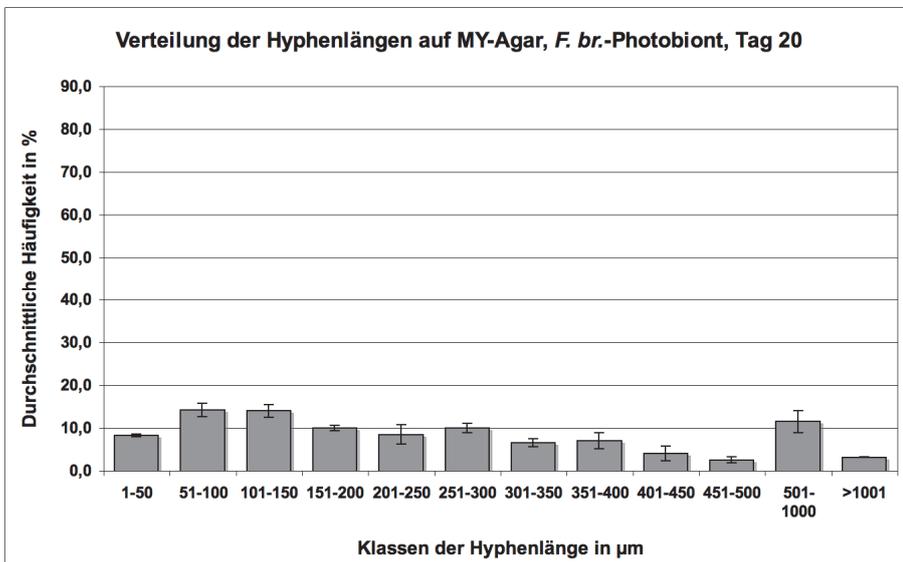


Abb. 3.11b

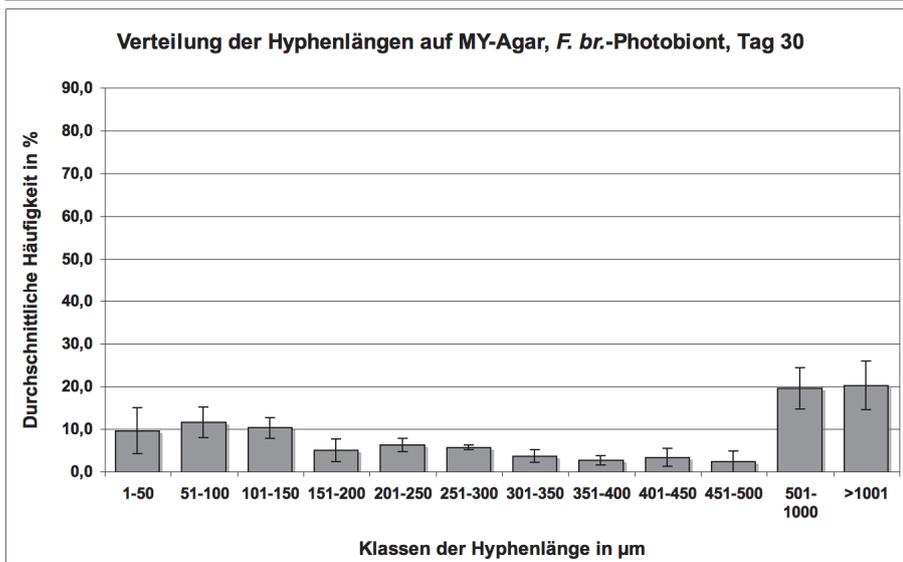


Abb. 3.11c

Abb. 3.11a,b,c: Verteilung der Hyphenlänge des Mycobionten *F. bracteata* unter Einfluss des arteigenen Photobionten *Trebouxia sp.* nach 10, 20 und 30 Tagen auf MYS1-Agar. Das Histogramm zeigt die relativen Häufigkeiten der Klassen der Hyphenlänge als Mittelwert aus drei Wiederholungen und die Standardabweichung als Maß der Streuung. Anzahl vermessener Sporen: 3.11a: 543 ($n_1+n_2+n_3 = 181+181+181$), 3.11b: 465 ($n_1+n_2+n_3 = 157+160+148$), 3.11c: 302 ($n_1+n_2+n_3 = 100+100+102$).

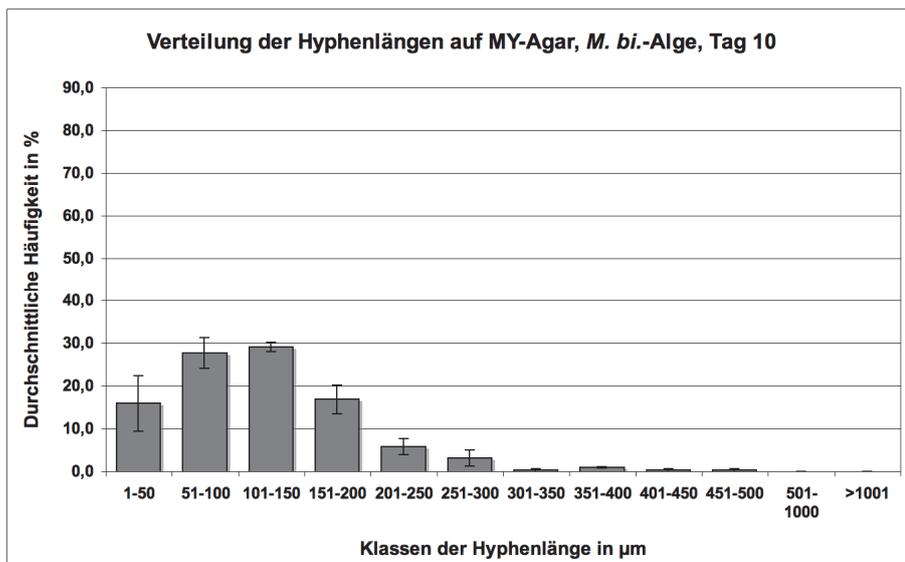


Abb. 3.12a

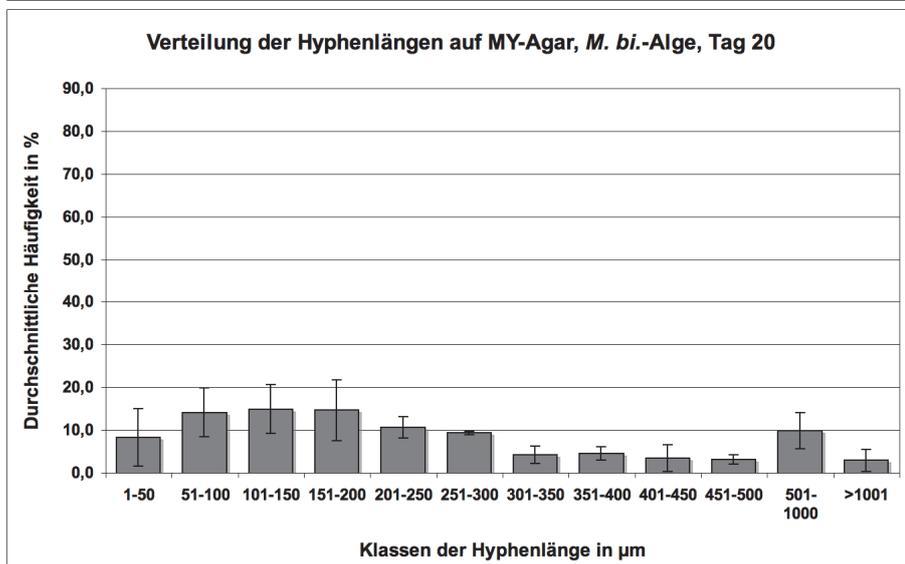


Abb. 3.12b

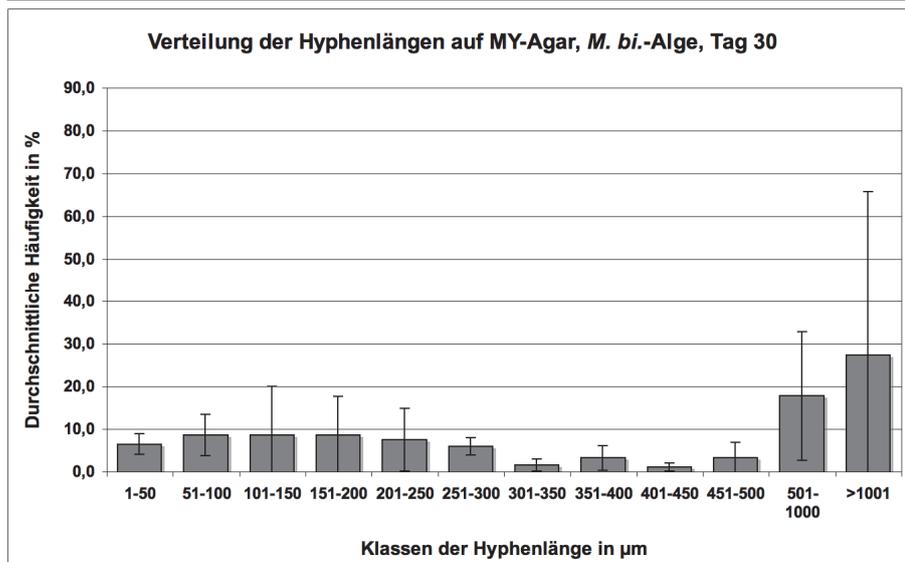


Abb. 3.12c

Abb. 3.12a,b,c: Verteilung der Hyphenlänge des Mycobionten *F. bracteata* unter Einfluss der nicht-lichenisierenden Alge *Myrmecia bisecta* nach 10, 20 und 30 Tagen auf MYS1-Agar. Das Histogramm zeigt die relativen Häufigkeiten der Klassen der Hyphenlänge als Mittelwert aus drei Wiederholungen und die Standardabweichung als Maß der Streuung. Anzahl vermessener Sporen: 3.12a: 416 ($n_1+n_2+n_3 = 176+132+108$), 3.12b: 376 ($n_1+n_2+n_3 = 171+101+104$), 3.12c: 187 ($n_1+n_2+n_3 = 77+55+55$).

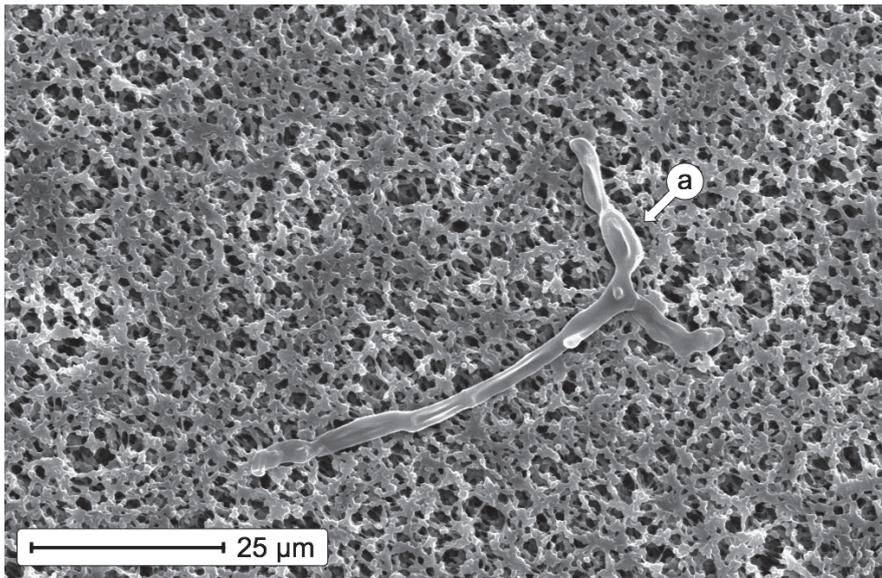


Abb. 3.13a

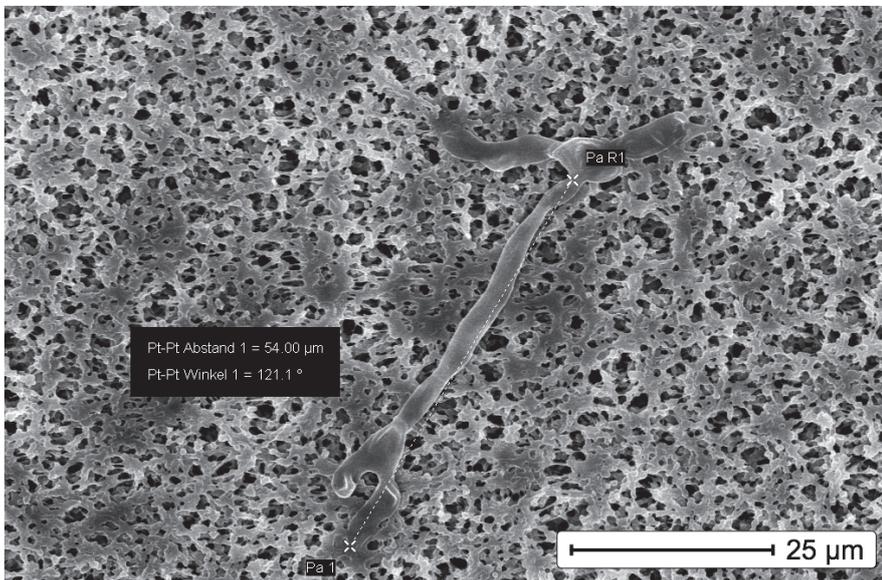


Abb. 3.13b

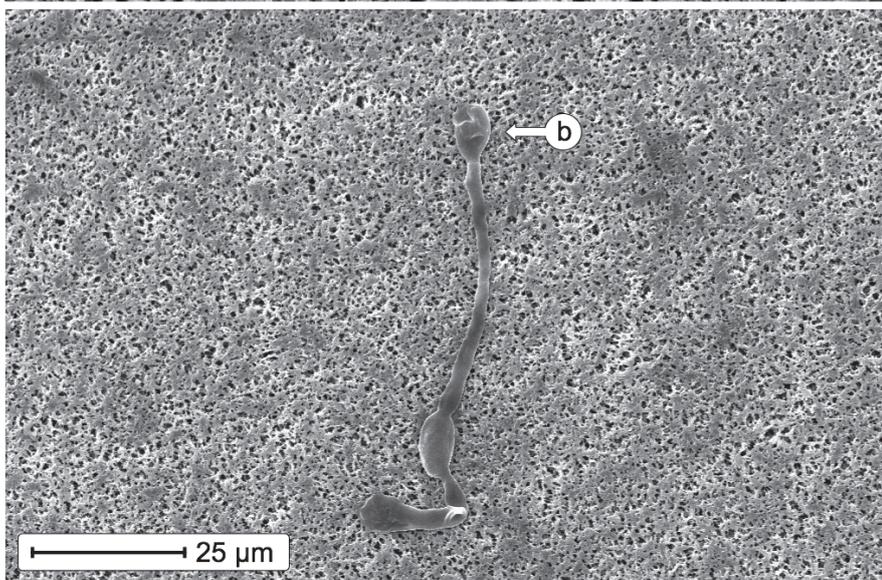


Abb. 3.13c

Abb. 3.13a,b,c: Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* auf MYS1-Agar unter Kontrollbedingungen, d. h. ohne Einfluss einer Alge bzw. Photobionten, nach 10 (3.13a), 20 (3.13b) und 30 (3.13c) Tagen unter definierten Kulturbedingungen. Die Marke a zeigt die Position einer Spore an, Marke c zeigt eine *hyphal tip swelling*.

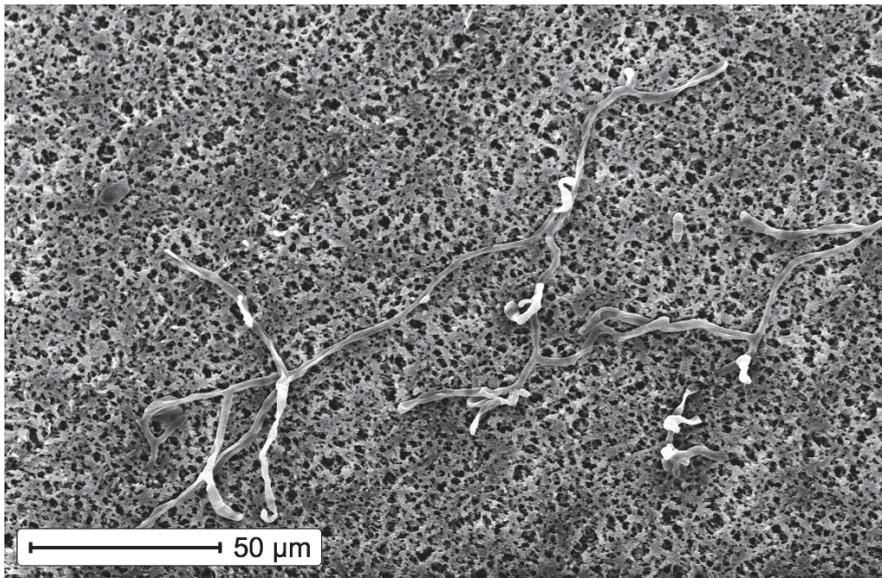


Abb. 3.14a

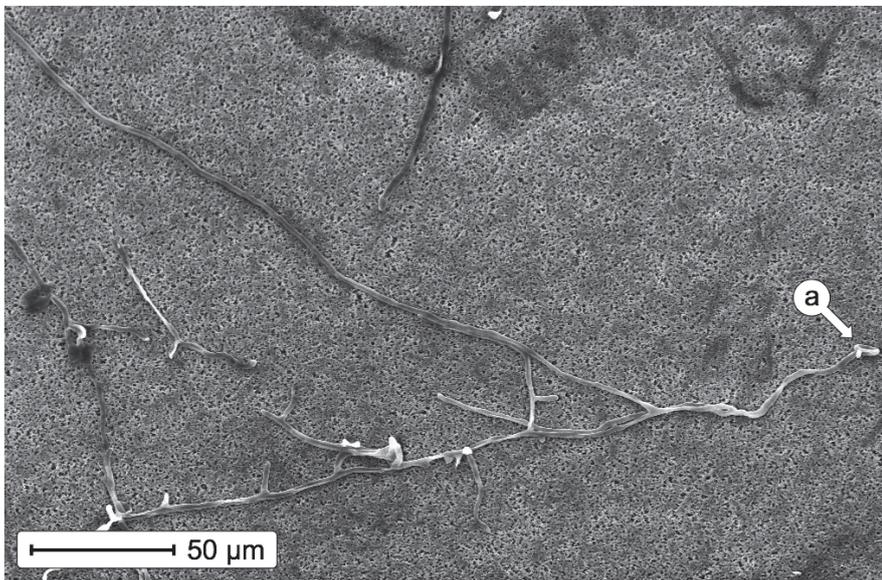


Abb. 3.14b

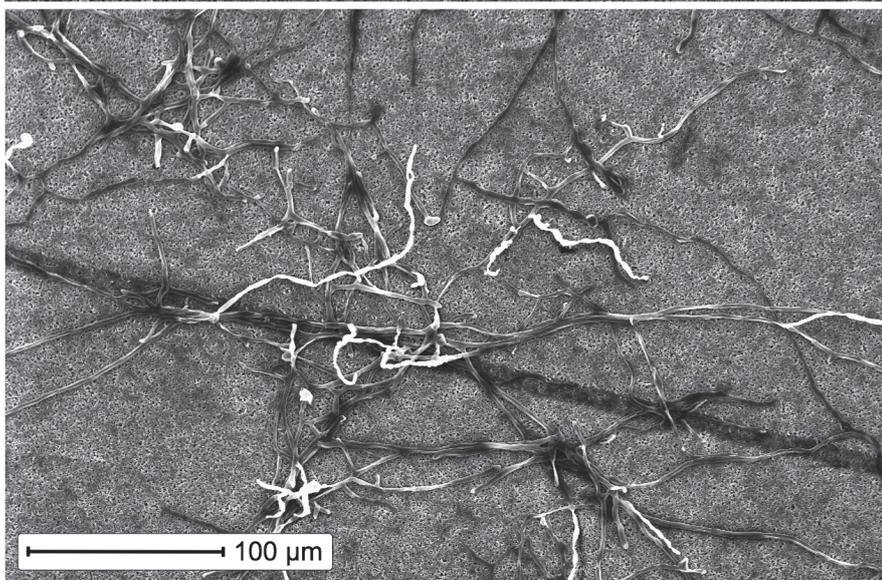


Abb. 3.14c

Abb. 3.15a,b,c: Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* auf MYS1-Agar unter Einfluss des unspezifischen Photobionten *Asterochloris* sp. aus *L. lurida* nach 10 (3.14a), 20 (3.14b) und 30 (3.14c) Tagen unter definierten Kulturbedingungen. Die Marke a zeigt die Position einer stark auswachsenden Spore an.

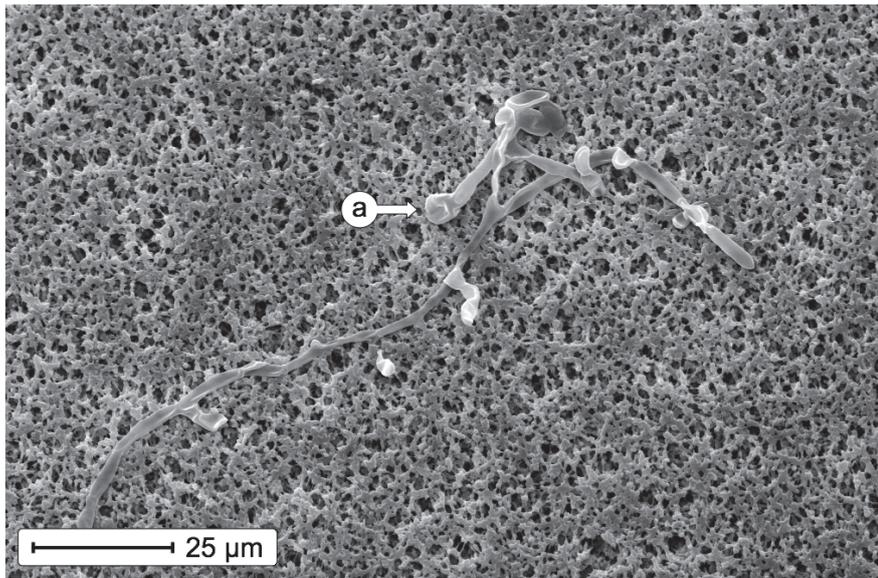


Abb. 3.15a

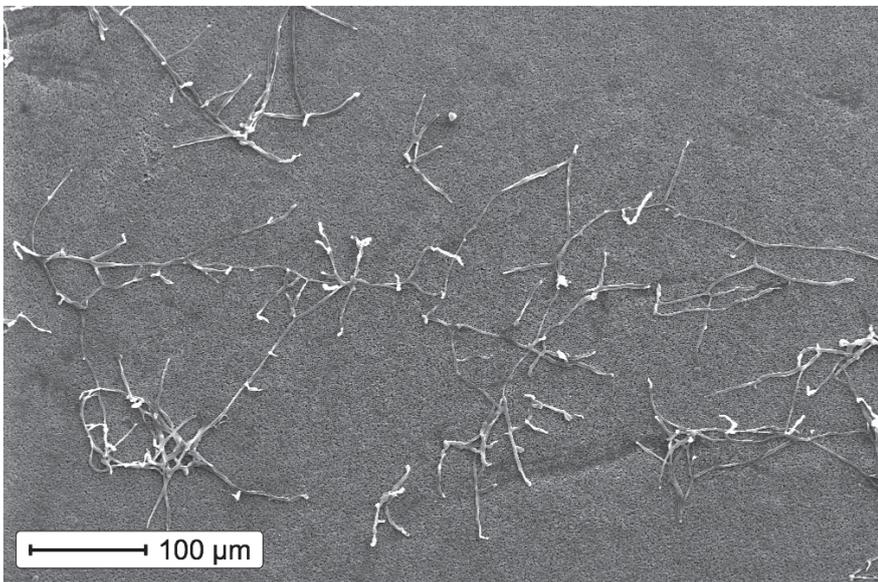


Abb. 3.15b

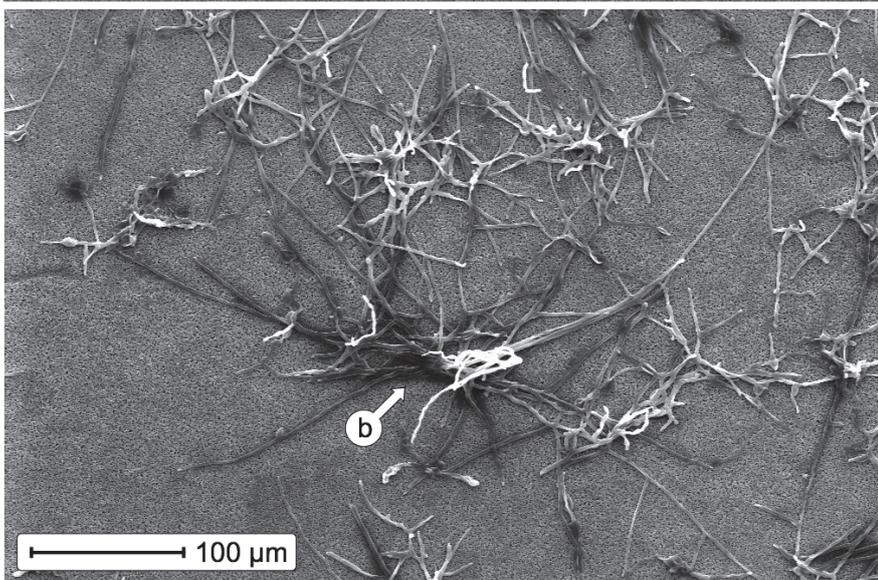


Abb. 3.15c

Abb. 3.15a,b,c: Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* auf MYS1-Agar unter Einfluss des spezifischen Photobionten *Trebouxia* sp. aus *F. bracteata*, nach 10 (3.15a), 20 (3.15b) und 30 (3.15c) Tagen unter definierten Kulturbedingungen. Marke a zeigt eine *hyphal tip swelling*, Marke b zeigt stark gallertbildende Hyphen.

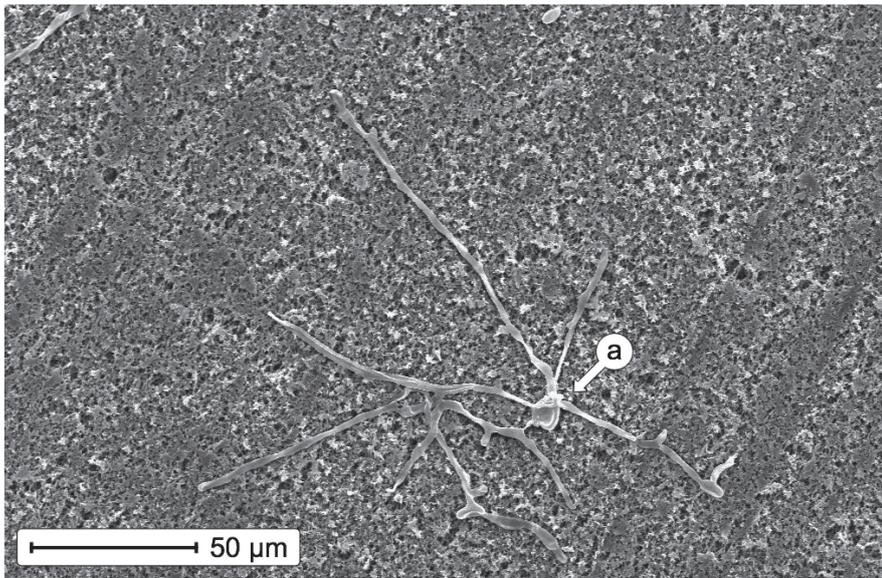


Abb. 3.16a

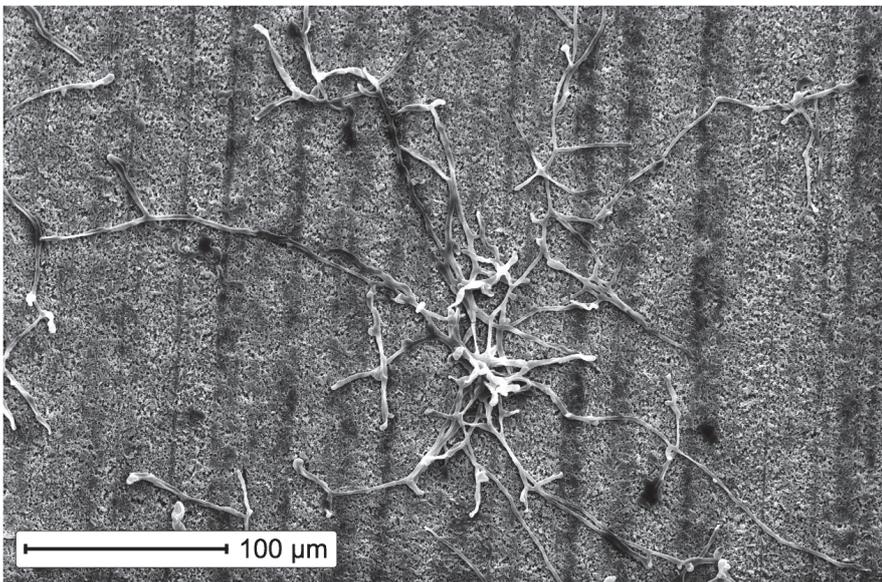


Abb. 3.16b

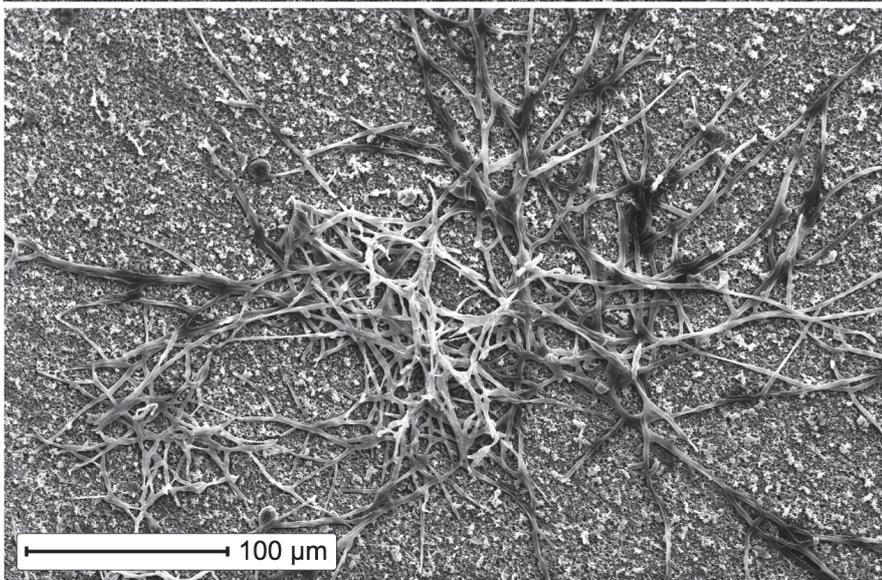


Abb. 3.16c

Abb. 3.16a,b,c: Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* auf MYS1-Agar unter Einfluss der Alge *Myrmecia bisecta* nach 10 (3.16a), 20 (3.16b) und 30 (3.16c) Tagen unter definierten Kulturbedingungen. Die Markierung a zeigt eine auskeimende Spore.

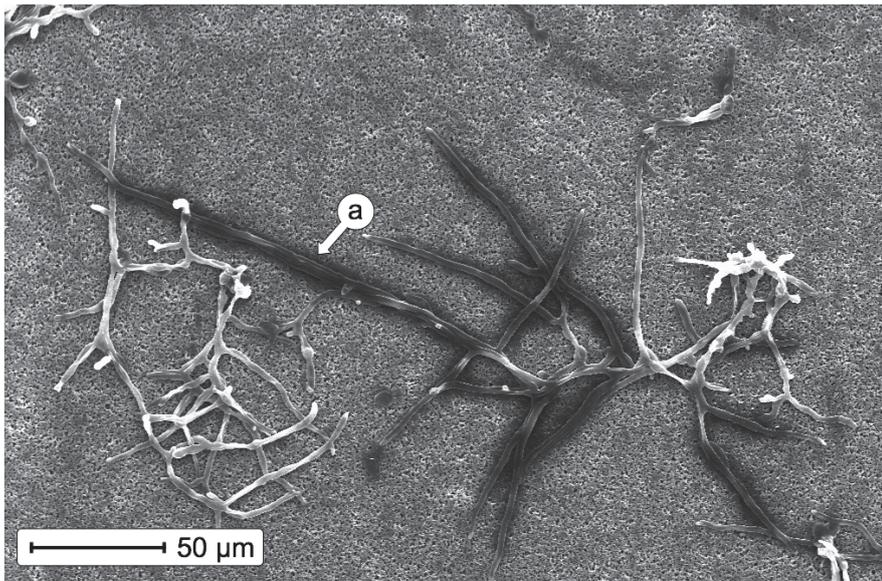


Abb. 3.17a

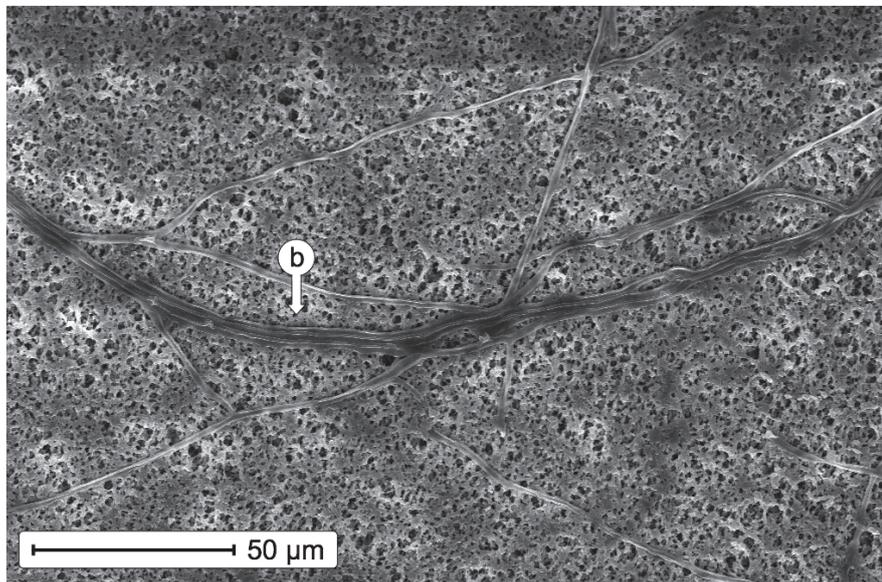


Abb. 3.17b

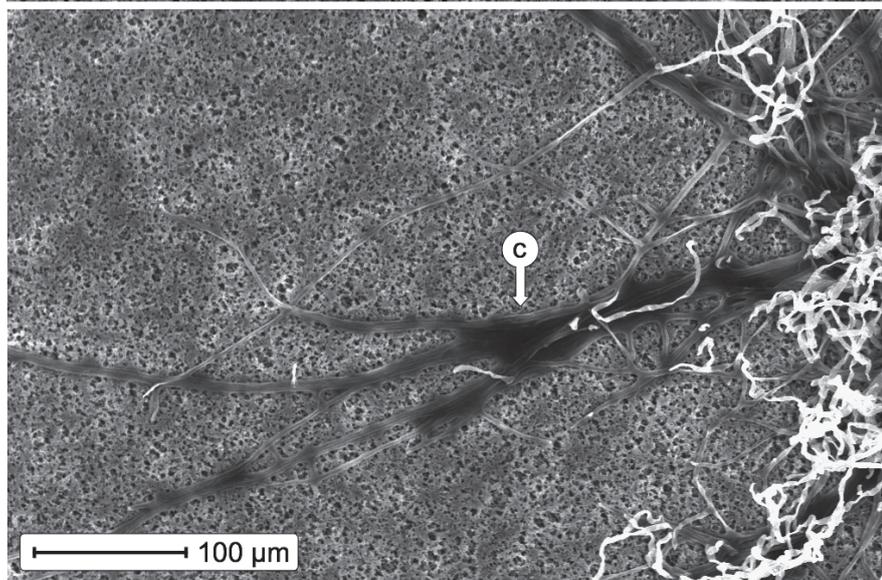


Abb. 3.17c

Abb. 3.17a,b: starke Gallertbildung (Marke a), sowie parallele Hyphen und beginnende Gallertbildung (Marke b) nach 20 Tagen unter Einfluss der spezifischen Alge *Trebouxia* sp. auf MYS1-Agar. **Abb. 3.17c:** parallele Hyphen und Gallertbildung (Marke c) nach 30 Tagen unter Einfluss von *Myrmecia bisecta* auf MYS1-Agar.

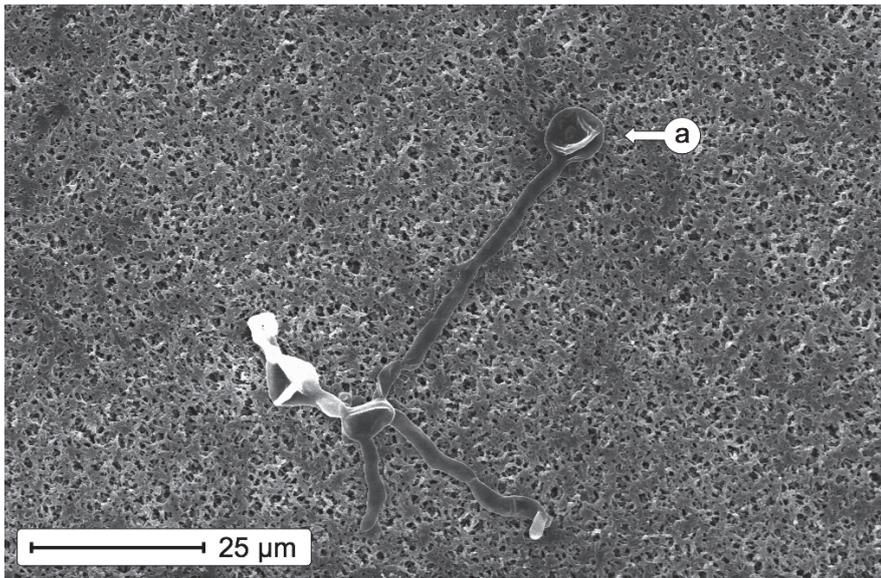


Abb. 3.18a

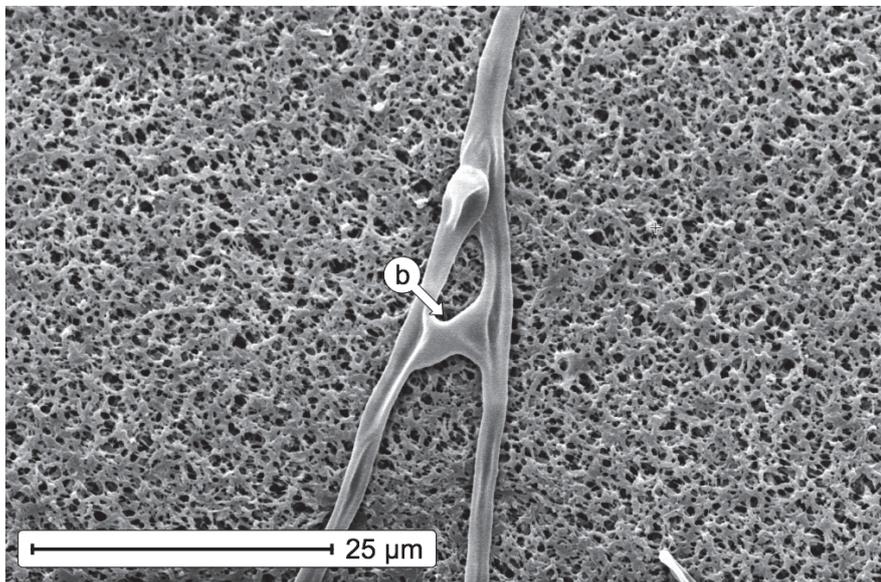


Abb. 3.18b

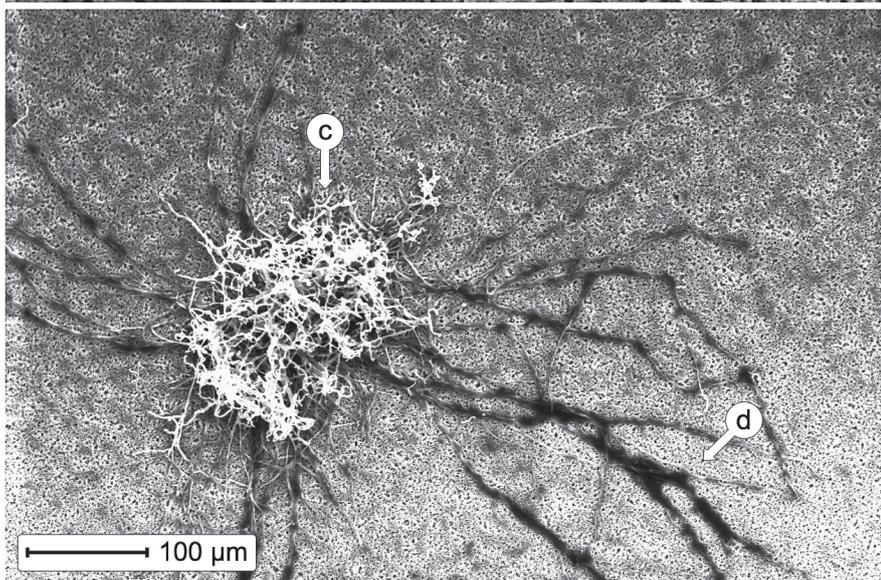


Abb. 3.18c

Abb. 3.18a,b: Ausbildung von *hyphal tip swellings* (Marke a) und Anastomosen (Marke b). **Abb. 3.18c:** Maximal beobachtetes Wachstum nach 30 Tagen unter Einfluss von *Myrmecia bisecta* auf Wasser-Agar mit starker zentraler Lufthyphenbildung (Marke c) und peripherer Gallertbildung (Marke d).

3.1.3 Generelle Wachstumsmuster

Die Wachstumsmuster der Mycobionten von *Fulgensia bracteata* zeigen gute Übereinstimmungen zwischen den Mycelien, die unter gleichen Einflussgrößen – Kontrolle als Ansatz ohne besonderen Einfluss, Präkontakt-Einfluss von *Asterochloris* sp. von *Trebouxia* sp. und von *Myrmecia bisecta* – aber auf den beiden unterschiedlichen Medien kultiviert wurden. Viele Differenzierungs- und Wachstumsprozesse unter den verschiedenen Einflüssen ähneln sich, während einige Merkmale Abweichungen zeigen. Die Unterschiede im Mycobiontenwachstum auf Wasser-Agar und auf MYS1-Agar sind gering und zeigen sich hauptsächlich in der allgemein stärkeren Bildung von Gallerte, Lufthyphen und *hyphal tip swellings*, der tendenziell geringeren Hyphenlänge nach 30 Versuchstagen und dem geringeren und weniger klar differenzierten Wachstum (besonders unter Einfluss von *M. bisecta*) auf MYS1-Agar. Auf Wasser-Agar treten die durch die verschiedenen Einflüsse hervorgerufenen Differenzierungen klarer zutage. Unter den Kontrollbedingungen kommt es, bedingt durch das stagnierende Hyphenwachstum, nicht zur Ausbildung von besonderen Wachstumsmustern. Unter Einfluss von *Asterochloris* sp. bilden sich lose und wenig differenzierte Mycelien, die miteinander vernetzt sind und weite Bereiche des Substrates kolonisieren. Unter Einfluss von *Trebouxia* sp. finden sich häufig flache, also lufthyphenarme, kompakte und oft radiär auswachsende Mycelien, die durch eine häufige Bildung von Gallerte im Zentralbereich und an den radiär und oftmals parallel auswachsenden Hyphen auffallen. Unter Einfluss von *Myrmecia bisecta* kommt es zum stärksten beobachteten Hyphenwachstum und zur Bildung von kompakten Mycelien, die durch starke Lufthyphenbildung einen radial-sphärischen Zentralbereich entwickeln und von diesem aus radiäre, manchmal parallel auswachsende und dort teilweise gallertisierende Hyphen ausbilden.

3.1.4 Durchschnittliche Hyphenlängen

Die Abb. 3.19a und 3.20a zeigen die durchschnittliche Hyphenlänge in μm pro Spore auf Wasser-Agar und auf MYS1-Agar als Mittelwert aus drei Replicates und deren Streuung als Standardabweichung an. Mittels t-Test können signifikante Unterschiede zwischen zwei zu vergleichenden Ansätzen berechnet werden. Die Ergebnisse der t-Tests finden sich in den Tab. 3.4, 3.5 und 3.6 je nachdem, welche Ansätze miteinander verglichen werden sollen.

3.1.4.1 Hyphenlängen der Kontrolle

Kontrolle auf Wasser-Agar Die Proben der Kontrolle auf Wasser-Agar zeigen zwischen Versuchsbeginn und dem 10. Versuchstag ein Wachstum von $0 \mu\text{m}$ auf $53,4 \pm 4,0 \mu\text{m}$ und bis zum 20. Versuchstag einen weiteren signifikanten Zuwachs auf $72,8 \pm 5,1 \mu\text{m}$ (vgl. Abb. 3.19a). Zwischen dem 20. und 30. Versuchstag findet kein messbares Wachstum mehr statt. Der Wert für die durchschnittliche Hyphenlänge fällt stattdessen auf $62,5 \pm 3,8 \mu\text{m}$. Dieser

Unterschied ist insignifikant, was insofern logisch erscheint, als dass es höchst unwahrscheinlich ist, davon auszugehen, dass die Länge einmal gebildeter Hyphen wieder abnehmen könnte. Es bleibt also festzuhalten, dass die Messmethode eine gewisse Unsicherheit von ca. 10 µm besitzt und dass das Hyphenwachstum zwischen dem 20. und 30. Versuchstag stagniert. Das hauptsächliche Hyphenwachstum findet bis zum 10. Tag in Kultur statt, bis zum 20 Tag in Kultur setzt es sich in geringerer Stärke fort und ungefähr um den 20. Versuchstag kommt das weitere Hyphenwachstum zum Erliegen.

Kontrolle auf MYS1-Agar: Auf MYS1-Agar (vgl. Abb. 3.20a) wachsen die Hyphen zwischen Versuchsbeginn und dem 10. Versuchstag von 0 µm auf lediglich $36,9 \pm 0,7$ µm aus und bleiben damit hinter dem Wachstum auf Wasser-Agar ($53,4 \pm 4,0$ µm) im vergleichbaren Zeitraum zurück. Zwischen dem 10. und 20. Versuchstag steigt die durchschnittliche Hyphenlänge signifikant um weitere 9 µm auf $48,4 \pm 2,5$ µm und auch zwischen dem 20. und 30. Versuchstag findet ein weiteres signifikantes Hyphenwachstum auf $67,0 \pm 2,0$ µm statt. Auch auf MYS1-Agar verhält es sich so, dass das stärkste Hyphenwachstum bis zum 10. Versuchstag stattfindet, danach wachsen die Hyphen kontinuierlich bis zum 30. Versuchstag weiter. Mit $67,0 \pm 2,0$ µm liegt die durchschnittliche Hyphenlänge leicht unter dem Wert, der nach 20 Tagen Kulturdauer auf Wasser-Agar erreicht wird ($72,8 \pm 5,1$ µm) und leicht über dem nach 30 Tagen Kulturdauer auf Wasser-Agar ermittelten Wert von $62,5 \pm 3,8$ µm.

Vergleich der Kontrollen auf beiden Medien: Unter den verwendeten Kulturbedingungen zeigen die Kontrollen auf beiden Medien das schwächste Hyphenwachstum. Auf Wasser-Agar kommt es um den 20. Versuchstag herum zum Erliegen, auf MYS1-Agar steigt es zuerst langsamer und danach kontinuierlich bis zum 30. Versuchstag. Die durchschnittlichen Hyphenlängen nach 30 Tagen Kultur unterscheiden sich auf beiden Medien nur insignifikant (Tab. 3.6). Weitere Untersuchungen nach 80 Tagen in Kultur zeigen, dass im weiteren Verlauf kein merkliches Hyphenwachstum mehr stattfindet. Erwähnenswert ist weiterhin, dass sich auf MYS1-Agar die Häufigkeiten in den Klassen 1-3 (1-150 µm) zwar zu größeren Hyphenlängen hin verschieben (vgl. Abb. 3.9b und Abb. 3.9c) und damit die Zunahme der durchschnittlichen Hyphenlänge begründen, das Hyphenwachstum aber in keinem Fall – im Gegensatz zur Kontrolle auf Wasser-Agar – über 150 µm hinaus geht. Dieses Wachstumsverhalten kann als *growth arrest* (nach Giovanetti 2002), also als „Wachstumsstillstand“ oder als „Aussetzen des Wachstums“ ab einem bestimmten Punkt in der Entwicklung des Mycobionten, angesehen werden. Besonders in Hinblick auf das weitaus massivere Wachstum unter Einfluss der Photobionten bzw. der Alge *Myrmecia bisecta*, das in den folgenden Abschnitten beschrieben wird.

3.1.4.2 Hyphenlängen unter Einfluss von *Asterochloris* sp.

Einfluss von *Asterochloris* sp. auf Wasser-Agar kultiviert: Unter Einfluss des unspezifischen Photobionten *Asterochloris* sp. zeigt sich nach 10 Tagen Kulturdauer auf Wasser-Agar eine durchschnittliche Hyphenlänge von $41,7 \pm 13,8 \mu\text{m}$ (vgl. Abb. 3.19a), die tendenziell aber insignifikant unter der der Kontrolle ($53,4 \pm 4,0 \mu\text{m}$) liegt. Bis Versuchstag 20 steigt die Hyphenlänge insignifikant auf $66,3 \pm 17,5 \mu\text{m}$ und liegt weiterhin insignifikant unter der durchschnittlichen Hyphenlänge der Kontrolle ($72,8 \pm 5,1 \mu\text{m}$). Zwischen Versuchstag 20 und 30 kommt es zu einem starken und erstmals signifikanten Anstieg der durchschnittlichen Hyphenlänge um ca. $260 \mu\text{m}$ auf $342,2 \pm 79,0 \mu\text{m}$, die damit auch signifikant die durchschnittliche Hyphenlänge der Kontrolle ($62,5 \pm 3,8 \mu\text{m}$) auf Wasser-Agar übersteigt.

Einfluss von *Asterochloris* sp. auf MYS1-Agar kultiviert: Auf MYS1-Agar (vgl. Abb. 3.20a) zeigt sich ein anderes Verhalten bezüglich der Zunahme der durchschnittlichen Hyphenlänge. Bereits nach 10 Tagen in Kultur beträgt diese $115,5 \pm 29,0 \mu\text{m}$ und unterscheidet sich damit signifikant von der Kontrolle ($36,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$) und liegt ebenso deutlich über dem vergleichbaren Hyphenwachstum auf Wasser-Agar ($41,7 \pm 13,8 \mu\text{m}$). Dieses starke Hyphenwachstum setzt sich bis zum 20. Tag in Kultur fort und steigt signifikant auf $226,2 \pm 19,6 \mu\text{m}$ an, womit sich auch der signifikante Unterschied zur Kontrolle auf MYS1-Agar und zur Vergleichsprobe auf Wasser-Agar ($66,3 \pm 17,5 \mu\text{m}$) deutlich erhöht. Zwischen dem 20. und 30. Tag in Kultur lässt sich hingegen nur ein schwächeres Wachstum dokumentieren. Die durchschnittliche Hyphenlänge steigt um ungefähr $60 \mu\text{m}$ auf $283,3 \pm 99,9 \mu\text{m}$ an, sie liegt damit ungefähr vierfach und signifikant über der Kontrolle auf MYS1-Agar, aber insignifikant um ca. $40 \mu\text{m}$ niedriger als die der Vergleichsprobe auf Wasser-Agar ($324,2 \pm 79,0 \mu\text{m}$).

Vergleich der Einflüsse von *Asterochloris* sp. auf beiden Medien: Am Ende der Versuchsdauer (Tag 30) unterscheiden sich auf beiden Medien weder die durchschnittlichen Hyphenlängen unter Einfluss des unspezifischen Photobionten *Asterochloris* sp. signifikant, noch die generellen Wachstumsmuster (vgl. Kapitel 3.1.2). Auffällig ist, trotz eines ähnlichen Endergebnisses, die unterschiedliche Entwicklung zwischen dem Versuchsbeginn und dem Versuchsende an Tag 30. Die Mycelien nach 10 und 20 Versuchstagen auf Wasser-Agar weisen nur geringe Hyphenlängen auf und sind tendenziell kürzer als die der Kontrolle, zeigen aber zwischen dem 20. und 30. Versuchstag ein sehr starkes Hyphenwachstum. Auf MYS1-Agar hingegen sind schon nach 10 Tagen in Kultur Hyphenlängen zu messen, die deutlich größer als die Kontrolle und die Vergleichsprobe auf Wasser-Agar sind. Dieses Wachstum setzt sich danach kontinuierlich fort, bleibt aber zum 30. Tag in Kultur insignifikant unter dem der Vergleichsprobe auf Wasser-Agar. Diese Entwicklung ist an den

Histogrammen zur Häufigkeitsverteilung der Hyphenlänge nachvollziehen (Abb. 3.2a,b,c und Abb. 3.10a,b,c).

3.1.4.3 Hyphenlängen unter Einfluss von *Trebouxia* sp.

Einfluss von *Trebouxia* sp. auf Wasser-Agar kultiviert: Am 10. Tag in Kultur weisen Mycelien von *F. bracteata* unter Einfluss des arteigenen Photobionten eine durchschnittliche Hyphenlänge von $84,8 \pm 30,7 \mu\text{m}$ auf (vgl. Abb. 3.19a). Das Hyphenwachstum ist damit insignifikant stärker als in der Kontrolle ($53,4 \pm 4,0 \mu\text{m}$) oder unter Einfluss von *Asterochloris* sp. ($41,7 \pm 13,5 \mu\text{m}$). Bis zum 20. Tag in Kultur erhöht sich die durchschnittliche Hyphenlänge um ca. $50 \mu\text{m}$ auf $135,6 \pm 17,5 \mu\text{m}$ und liegt signifikant über dem Wert der Kontrolle und dem unter Einfluss von *Asterochloris* sp. ($66,3 \pm 17,5 \mu\text{m}$). Das Wachstum unter Einfluss von *Trebouxia* sp. verstärkt sich und beschleunigt sich bis zum 30. Versuchstag weiter. Bis zu diesem Zeitpunkt steigt die durchschnittliche Hyphenlänge massiv und signifikant um ungefähr $630 \mu\text{m}$ auf insgesamt $769,2 \pm 123,6 \mu\text{m}$ an. Damit liegt sie signifikant um ca. $700 \mu\text{m}$ über dem Wert der Kontrolle und um ca. $440 \mu\text{m}$ über dem Wert unter Einfluss von *Asterochloris* sp. Der Großteil des Zuwachses der Hyphenlänge erfolgt zwischen dem 20. und 30. Versuchstag.

Einfluss von *Trebouxia* sp. auf MYS1-Agar kultiviert: Am 10. Tag in Kultur weisen die Mycelien hier (vgl. Abb. 3.20a) eine Durchschnittshyphenlänge von $100,0 \pm 18,0 \mu\text{m}$ auf (vgl. Abb. 3.20a). Dieser Wert liegt signifikant über dem Wert der Kontrolle ($39,6 \pm 0,7$), aber tendenziell unter dem Wert unter Einfluss von *Asterochloris* sp. ($115,5 \pm 29,0 \mu\text{m}$). Ebenso liegt der Wert tendenziell über dem Vergleichswert auf Wasser-Agar ($84,8 \pm 30,7 \mu\text{m}$). Nach 20 Tagen in Kultur steigt die durchschnittliche Hyphenlänge signifikant um ca. $190 \mu\text{m}$ auf $290,9 \pm 14,1 \mu\text{m}$. Dieser Wert liegt signifikant über dem Wert der Kontrolle ($48,4 \pm 2,5 \mu\text{m}$) und dem Wert unter Einfluss von *Asterochloris* sp. ($226,2 \pm 19,6 \mu\text{m}$). Der Wert ist darüber hinaus mehr als doppelt so hoch, wie der der Vergleichsprobe auf Wasser-Agar. Bis zum 30. Versuchstag verdoppelt sich die durchschnittliche Hyphenlänge annähernd auf $572,4 \pm 146,5 \mu\text{m}$. Dies bedeutet einen signifikanten Anstieg, auch im Vergleich zur Kontrolle ($67,0 \pm 2,0 \mu\text{m}$) und einen doppelt so hohen Anstieg im Vergleich zu dem Einfluss von *Asterochloris* sp. ($283,3 \pm 99,9 \mu\text{m}$).

Vergleich der Einflüsse von *Trebouxia* sp. auf beiden Medien: Betrachtet man die Entwicklung der durchschnittlichen Hyphenlängen auf beiden Medien (Abb. 3.19a und Abb. 3.20a), so zeigt sich ein Wachstumsmuster, dass dem bereits beschriebenen unter *Asterochloris* sp.-Einfluss ähnelt. Auf Wasser-Agar zeigt das Hyphenwachstum nach 10 Tagen ein Niveau, dass auf dem der Kontrolle und auf dem mit Einfluss von *Asterochloris* sp. liegt, wenn auch leicht erhöht. Bis zum 20. Versuchstag steigt die Durchschnittshyphenlänge deutlich an und überschreitet das Niveau von Kontrolle und Einfluss von *Asterochloris* sp.

signifikant. Zwischen dem 20. und 30. Versuchstag verstärkt sich das Wachstum der Hyphen massiv um einen Faktor von 5,6 und erreicht mit ca. 770 μm einen hohen Durchschnittswert. So zeigt sich – wie auch unter Einfluss von *Asterochloris* sp. – ein Wachstum, das erst zwischen dem 20. und 30. Versuchstag einen starken Längenzuwachs aufweist. Es lässt sich allerdings feststellen, dass die nach 30 Tagen in Kultur erreichte durchschnittliche Hyphenlänge jene unter Einfluss von *Asterochloris* sp. signifikant übertrifft. Auf MYS1-Agar zeigt sich – ebenfalls wie für den Einfluss von *Asterochloris* sp. beschrieben – das Bild einer kontinuierlichen Wachstumsgeschwindigkeit mit einer durchschnittlichen Hyphenlänge, die am Ende der Versuchsdauer tendenziell hinter der auf Wasser-Agar zurückbleibt. Das Wachstum verläuft auch auf MYS1-Agar stärker, als unter Einfluss von *Asterochloris* sp. und übertrifft dieses nach 30 Tagen signifikant.

3.1.4.4 Hyphenlängen unter Einfluss von *Myrmecia bisecta*

Einfluss von *Myrmecia bisecta* auf Wasser-Agar: Die durchschnittliche Hyphenlänge unter Einfluss der Alge *M. bisecta* liegt nach 10 Tagen Kultur auf Wasser-Agar bei $320,5 \pm 117,1 \mu\text{m}$. Sie übertrifft damit die aller anderen Ansätze signifikant. Bis zum 20. Versuchstag steigt der Mittelwert um ca. 350 μm auf $668,6 \pm 451,0 \mu\text{m}$. Auffällig ist in diesem Fall die starke Streuung des Mittelwertes, da sich die Mycelien trotz identischer Versuchs- und Kulturbedingungen unterschiedlich schnell zu entwickeln scheinen. Damit liegt der Mittelwert nach 20 Tagen zwar durchschnittlich, aber nicht signifikant über dem der drei anderen Versuchsansätze. Bis zum 30. Tag in Kultur nimmt die durchschnittliche Hyphenlänge massiv zu, sie verdoppelt sich annähernd auf $1255,9 \pm 154,1 \mu\text{m}$. Nach 30 Tagen in Kultur scheinen sich die Hyphenlängen also wieder aneinander angeglichen zu haben. Dies zeigt sich in der geringeren Streuung. Die durchschnittliche Hyphenlänge nach 30 Versuchstagen liegt signifikant über der der drei anderen Ansätze und übertrifft diese um ca. 1200 μm (Kontrolle), 930 μm (*Asterochloris* sp.-Einfluss) und 480 μm (*Trebouxia* sp.-Einfluss).

Einfluss von *Myrmecia bisecta* auf MYS1-Agar: Die durchschnittliche Hyphenlänge auf MYS1-Agar zeigt nach 10 Tagen in Kultur einen Wert von $118,0 \pm 12,0 \mu\text{m}$ und gleicht damit denen unter Einfluss der beiden Photobionten ($115,5 \pm 29,0 \mu\text{m}$ für *Asterochloris* sp. und $100,0 \pm 18,0 \mu\text{m}$ für *Trebouxia* sp.). Bis zum 20. Versuchstag steigt der Wert auf $270,8 \pm 30,2 \mu\text{m}$ und ähnelt wieder stark denen der beiden Photobionten ($226,2 \pm 19,8 \mu\text{m}$ für *Asterochloris* sp. und $290,9 \pm 14,1 \mu\text{m}$ für *Trebouxia* sp.). Das Wachstum beschleunigt sich im Mittel bis zum 30. Versuchstag und erreicht eine durchschnittliche Hyphenlänge von $615,0 \pm 473,6 \mu\text{m}$. Dieser Wert zeichnet sich ebenfalls durch eine starke Streuung aus und liegt daher nur insignifikant über den durchschnittlichen Hyphenlängen der anderen Versuchsansätze.

Vergleich der Einflüsse von *Myrmecia bisecta* auf beiden Medien: Während auf Wasser-Agar das durchschnittliche Hyphenwachstum unter Einfluss von *M. bisecta* eindeutig am ausgeprägtesten ist und das aller anderen Versuchsansätze übertrifft, ist es auf MYS1-Agar über die gesamte Versuchsdauer eher mit dem unter Einfluss des arteigenen Photobionten *Trebouxia* sp. zu vergleichen. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang sind die sehr ähnlichen Mittelwerte und deren hohe Streuung nach 20 Tagen auf Wasser-Agar und nach 30 Tagen auf MYS1-Agar ($668,6 \pm 451,0 \mu\text{m}$ versus $615,0 \pm 473,6 \mu\text{m}$). Diese Ähnlichkeit spiegelt sich ebenfalls in den Darstellungen zur Verteilung der Häufigkeiten der Hyphenlängensklassen wieder (Abb. 3.4b und Abb. 3.12c), die sowohl hohe prozentuale Anteile in den niedrigen Klassen der Hyphenlänge als auch in den hohen Klassen aufweisen. In Anbetracht der Tatsache, dass auch unter Einfluss der beiden Photobionten das durchschnittliche Hyphenwachstum nach 30 Tagen auf MYS1-Agar hinter dem auf W-Agar zurückbleibt, kann man annehmen, dass sich beide Ansätze in einem ähnlichen – auf MYS1-Agar lediglich verzögert eintretenden – Entwicklungsschritt befinden. In diesem Entwicklungsschritt existiert trotz identischer Versuchs- und Kulturbedingungen eine sehr große Variabilität der Hyphenlänge.

3.1.4.5 Darstellung der Hyphenlängen im Boxplot

Die Abbildungen 3.21a und 3.21b stellen die Auswertung der durchschnittlichen Hyphenlängen mittels Boxplots für die Ansätze auf Wasser-Agar und die auf MYS1-Agar dar. Die Boxplots werden mit der Software BrightStat (Stricker 2008) erstellt. Sie geben die statistische Verteilung der Hyphenlängen graphisch wieder. Hier findet nicht der arithmetische Mittelwert Verwendung sondern der Median der Hyphenlängenmittelwerte der drei Replicates. Er wird als fetter Strich dargestellt und der arithmetische Mittelwert als Kreuz. Die Boxen (grau) umfassen jeweils die mittleren 50 % der Daten, die durch das obere und das untere Quartil begrenzt werden, die Fehlermarker (*whisker*) umfassen 100 % der Daten. Der Median ist weniger sensibel für Ausreißer als das arithmetische Mittel und der Boxplot gibt prinzipiell einen robusten und detaillierten Überblick über die Daten, dennoch spiegeln die Boxplots sehr gut die bereits beschriebenen Ergebnisse aus dem Abbildungen 3.19a und 3.20a wieder und unterstützen damit die bereits getroffenen Aussagen, die sich aus der Auswertung der Mittelwerte ableiten lassen.

3.1.4.6 Darstellung der Hyphenlängen im Quantil-Quantil-Plot

In fast allen Darstellungen zur Verteilung der Hyphenlängen deutet sich bereits an, dass die Hyphenlängen keiner Normalverteilung unterliegen. Während die relativen prozentualen Häufigkeiten größerer Klassen mit zunehmender Kulturdauer zunehmen (außer in den Ansätzen der Kontrolle), findet sich in allen Ansätzen auch nach fortgeschrittener Kulturdauer ein nenneswerter Anteil an Mycelien mit kurzen und sehr kurzen Hyphenlängen. In der

statistischen Auswertung zeigt sich weiterhin, dass die Hyphenlängen aller untersuchten Ansätze nicht normalverteilt sind, sondern eher einer bimodalen Verteilung entsprechen. Ob dies unter anderem die bereits beschriebene starke Streuung der Daten unter Einfluss von *Mymecia bisecta* nach 20 Tagen auf Wasser-Agar und nach 30 Tagen auf MYS1-Agar erklären kann, muss diskutiert werden (vgl. Abb. 3.4b und 3.12c sowie Abb. 3.19a und 3.20a). Solch eine Verteilung lässt sich eindeutig in der dazugehörigen Darstellung der Gesamt-Datensätze als Quantile-Quantile-Plot (QQ-Plot) mit Hilfe der Statistik-Software R zeigen, die sich beispielhaft für den Versuch unter Einfluss von *Asterochloris* sp. nach 30 Tagen auf Wasser-Agar in Abb. 3.22 findet. Der Plot zeigt deutlich, dass im unteren und oberen Bereich die Werte deutlich nach oben von der hier als grader Linie dargestellten Normalverteilung abweichen und auch über die Konfidenzintervalle (gestrichelte Linien) hinausgehen. In der Mitte hingegen weichen sie nach unten ab. Besonders große und besonders kleine Mycelien sind daher für eine Normalverteilung überrepräsentiert, mittelgroße Mycelien unterrepräsentiert. Eine derartige Verteilung ergibt sich für alle untersuchten Ansätze, und nimmt stets mit zunehmender Kulturdauer zu. Die bereits beschriebenen Beobachtungen und solche QQ-Plots zeigen deutlich, dass sich trotz der standardisierten Kulturbedingungen und der gemeinsamen Herkunft der ausstreuenden Apothecien nicht alle Mycelien auf einem Replicate in identischer Weise und/oder Geschwindigkeit entwickeln. Stattdessen scheinen verschiedene Mycelien verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten zu verfolgen. Während, verglichen mit den Kontrollbedingungen, einige Mycelien unter dem Präkontakt-Einfluss der Photobionten bzw. der Alge starkes Hyphenwachstum zeigen, wächst ein gewisser Prozentsatz der untersuchten Mycelien nicht über ein gewisses Maß hinaus oder wächst nur sehr langsam.

3.1.5 Anzahl der Verzweigungen

Die durchschnittliche Anzahl an Verzweigungen auf Wasser- und MYS1-Agar ist auf den Abbildungen 3.19b und 3.20b dargestellt. Auf beiden Abbildungen wird ersichtlich, dass die Anzahl an beobachteten Verzweigungen in klarer Abhängigkeit zur Hyphenlänge und deren Zunahme steht. So zeigt sich unter Einfluss von *Asterochloris* sp. und *Trebouxia* sp., dass die Anzahl mit den beiden Photobionten besonders stark zwischen dem 20. und 30. Versuchstag auf $4,1 \pm 1,2$ bzw. $18,6 \pm 8,6$ Verzweigungen pro Spore zunimmt und damit im gleichen Zeitraum, in dem die durchschnittliche Hyphenlänge ebenfalls stark ansteigt (vgl. Abb. 3.19a und 3.19b). Auch unter Einfluss von *Myrmecia bisecta* steigen beide Parameter in ähnlicher Weise und mit ähnlicher Streuung an. In der Kontrolle bleibt die Anzahl an Verzweigungen gering und nimmt ebenso wenig zu, wie die durchschnittliche Hyphenlänge. Im Vergleich von durchschnittlicher Verzweigungszahl und durchschnittlicher Hyphenlänge von *Asterochloris* sp. und *Trebouxia* sp. zeigt sich allerdings, dass die Verzweigungsrate stärker unter Einfluss von *Trebouxia* sp. ansteigt, als unter Einfluss von *Asterochloris* sp. Dies bestätigt das Ergebnis der qualitativen Auswertung, dass die Verzweigungszahl bei

spezifischen Biontenkontakt höher ist, als bei Kontakt zum inkompatiblen Photobionten. Diese verstärkte Verzweigung ist allerdings an das ebenfalls verstärkte Hyphenwachstum gekoppelt.

3.1.6 Keimungsraten

Die Keimungsraten auf Wasser-Agar zeigen für alle Versuchsansätze ähnlich hohe und nur insignifikant unterschiedliche Werte nach 10, 20 und 30 Tagen Kulturdauer (Abb. 3.19c). Sie liegen nach 10 Tagen zwischen 63 % und 74 % und steigen bis zum 30. Tag in Kultur auf Werte zwischen 82 % und 96 % an. Alle Versuchsansätze zeigen einen Anstieg der Keimungsrate mit zunehmender Kulturdauer. Analog zum massiv geförderten Mycobiontenwachstum unter Einfluss von *Myrmecia bisecta* liegt dort die Keimungsrate mit $95,7 \pm 0,6$ % am höchsten. Dieses Muster der über die Kulturdauer kontinuierlich zunehmenden Keimungsrate zeigt sich auf MYS1-Agar nicht (Abb. 3.20c). Hier liegen die Keimungsraten unabhängig vom Zeitpunkt der Messung zwischen $65,8 \pm 4,1$ % und $80,9 \pm 4,2$ %. Abgesehen vom der fehlenden Zunahme der Keimungsrate über die Zeit ähneln diese Werte denen auf Wasser-Agar nach 10 Tagen Kulturdauer.

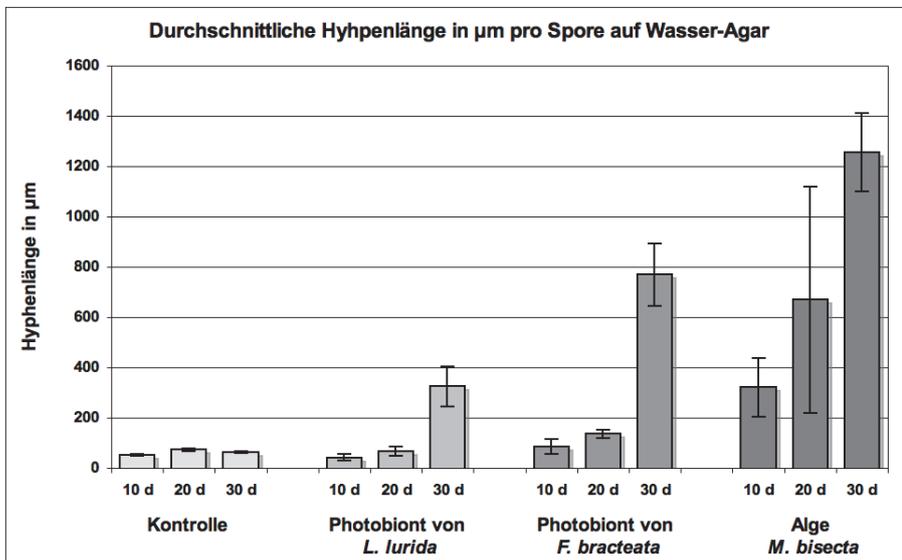


Abb. 3.19a

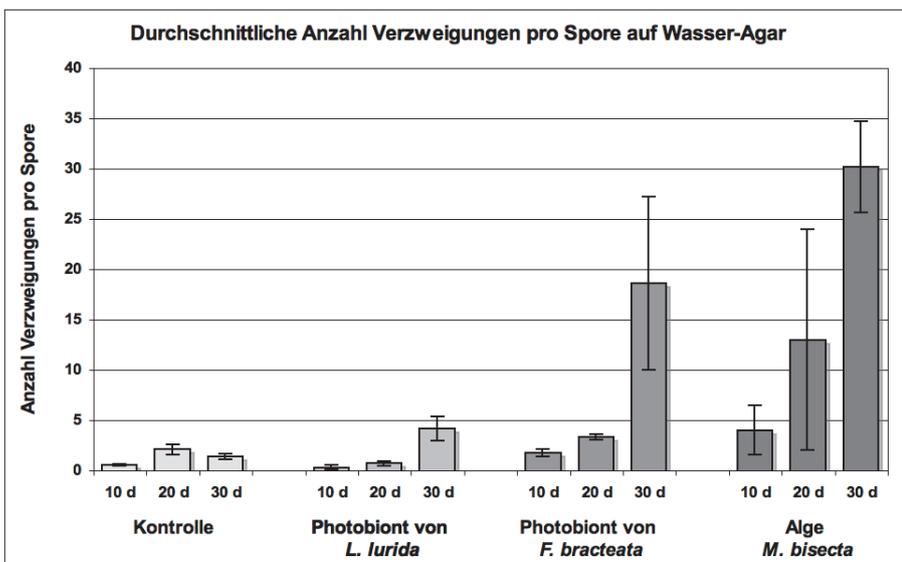


Abb. 3.19b

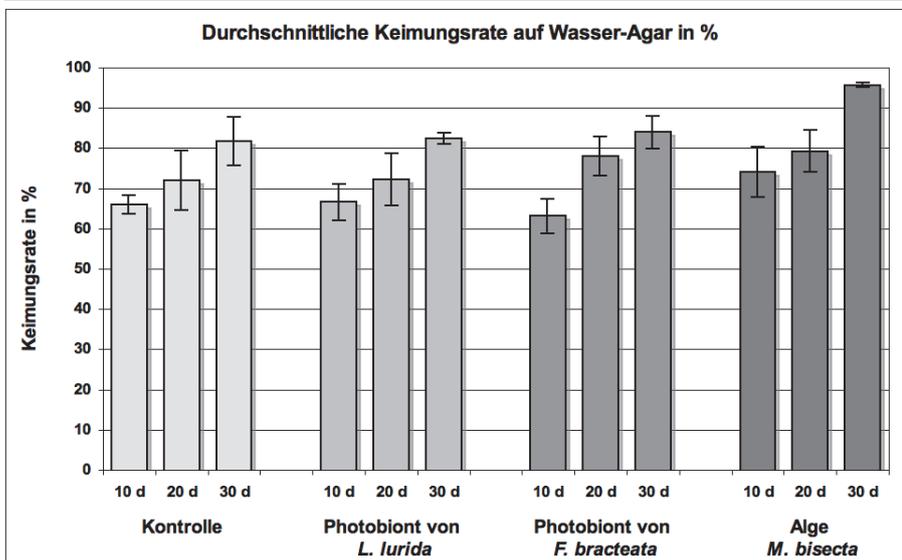


Abb. 3.19c

3 Ergebnisse

Abb. 3.19a,b,c: Vergleichende Darstellung von Hyphenlänge in μm , Verzweigungszahl und Keimungsrate in % des Mycobionten *Fulgensia bracteata* unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss ausgewählter Algen nach 10, 20 und 30 Tagen auf Wasser-Agar. Die Balkenlänge der Histogramme zeigt die Mittelwerte des jeweiligen Parameters aus drei Wiederholungen, die *whisker* geben deren Streuung als Standardabweichung an.

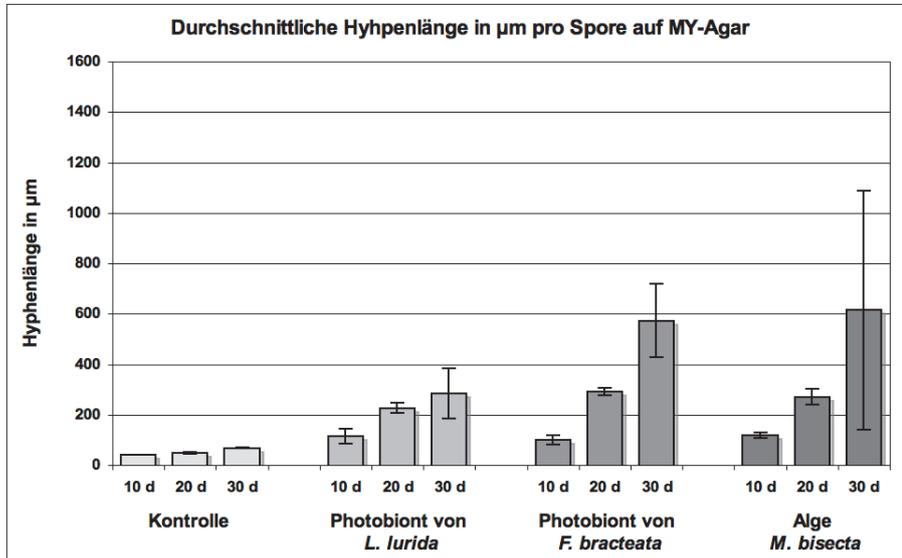


Abb.3.20a

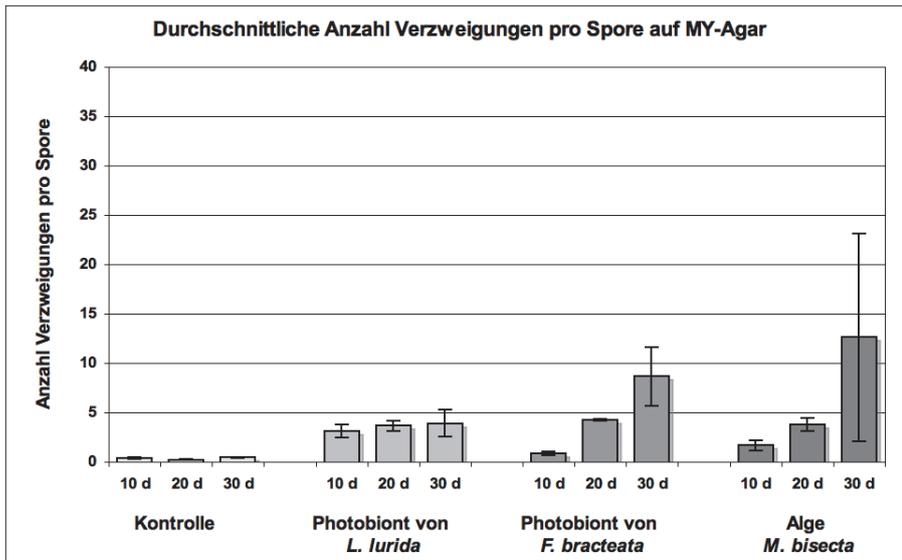


Abb.3.20b

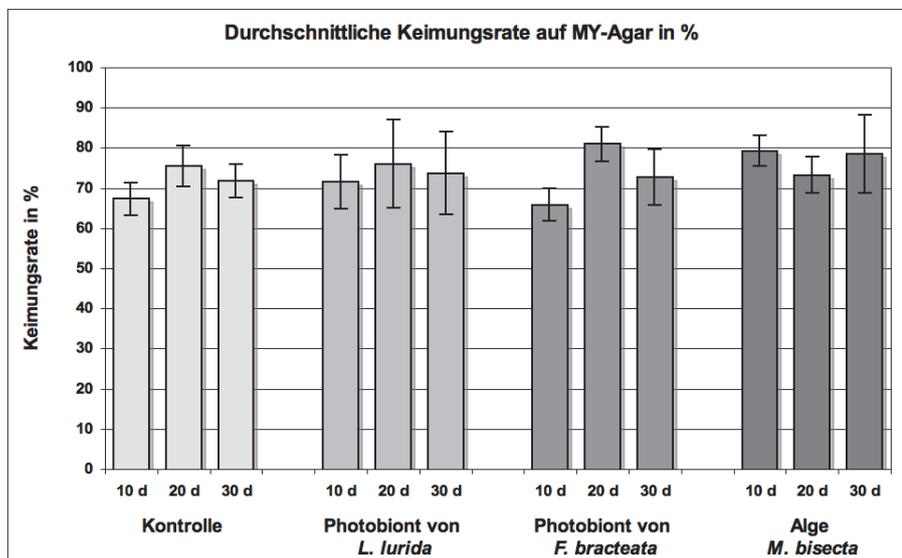


Abb.3.20c

Abb. 3.20a,b,c: Vergleichende Darstellung von Hyphenlänge in μm , Verzweigungszahl und Keimungsrate in % des Mycobionten *Fulgensia bracteata* unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss ausgewählter Algen nach 10, 20 und 30 Tagen auf MYS1-Agar. Die Balkenlänge der Histogramme zeigt die Mittelwerte des jeweiligen Parameters aus drei Wiederholungen, die *whisker* geben deren Streuung als Standardabweichung an.

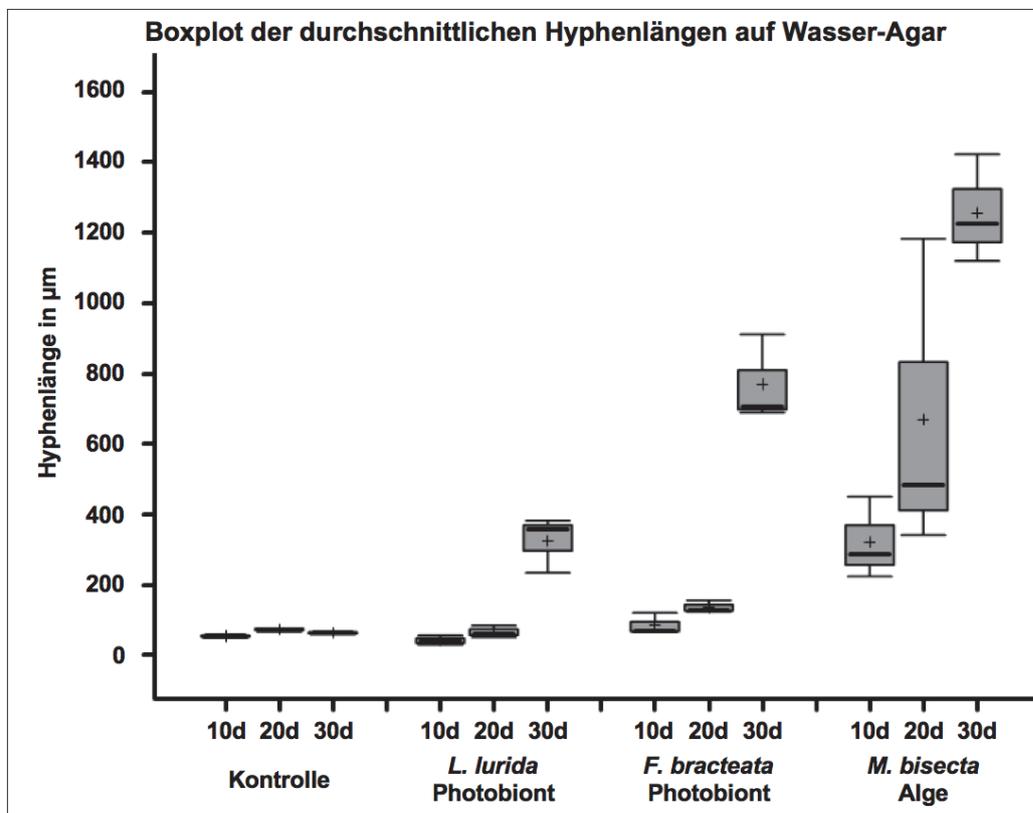


Abb. 3.21a

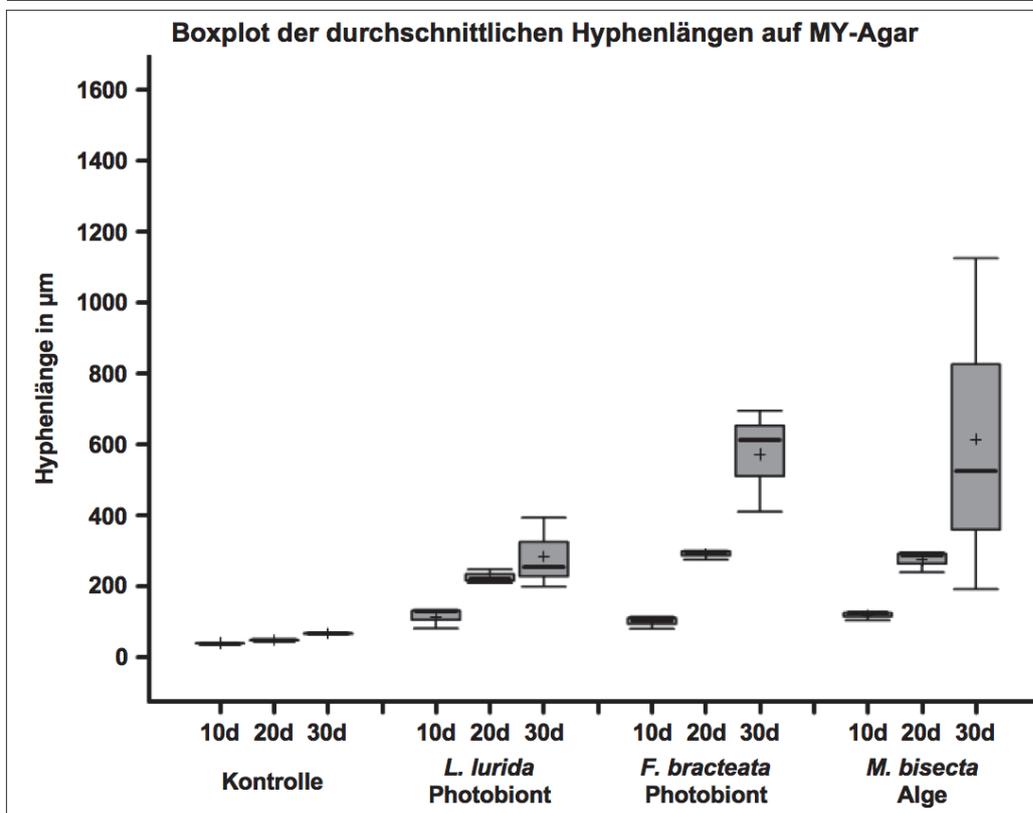


Abb. 3.21b

Abb. 3.21a,b: Die Abbildungen 3.21 geben die durchschnittliche Hyphenlänge in μm auf Wasser-Agar (a) und MYS1-Agar (b) in einer Darstellung mittels des Boxplots wieder. Sie wurden mit der Software BrightStat (Stricker 2008) erstellt. Die Boxplots geben die statistische Verteilung der Hyphenlängen graphisch wieder: Median der Hyphenlängenmittelwerte der drei Replicates als fetter Strich und arithmetrischer Mittelwert als Kreuz. Die Box (grau) umfasst die mittleren 50 % der Daten, die durch das obere und das untere Quartil begrenzt werden, die *whisker* umfassen 100 % der Daten. Der Median ist weniger sensibel für Ausreißer als das arithmetische Mittel und der Boxplot gibt prinzipiell einen robusten und detaillierten Überblick über die Daten.

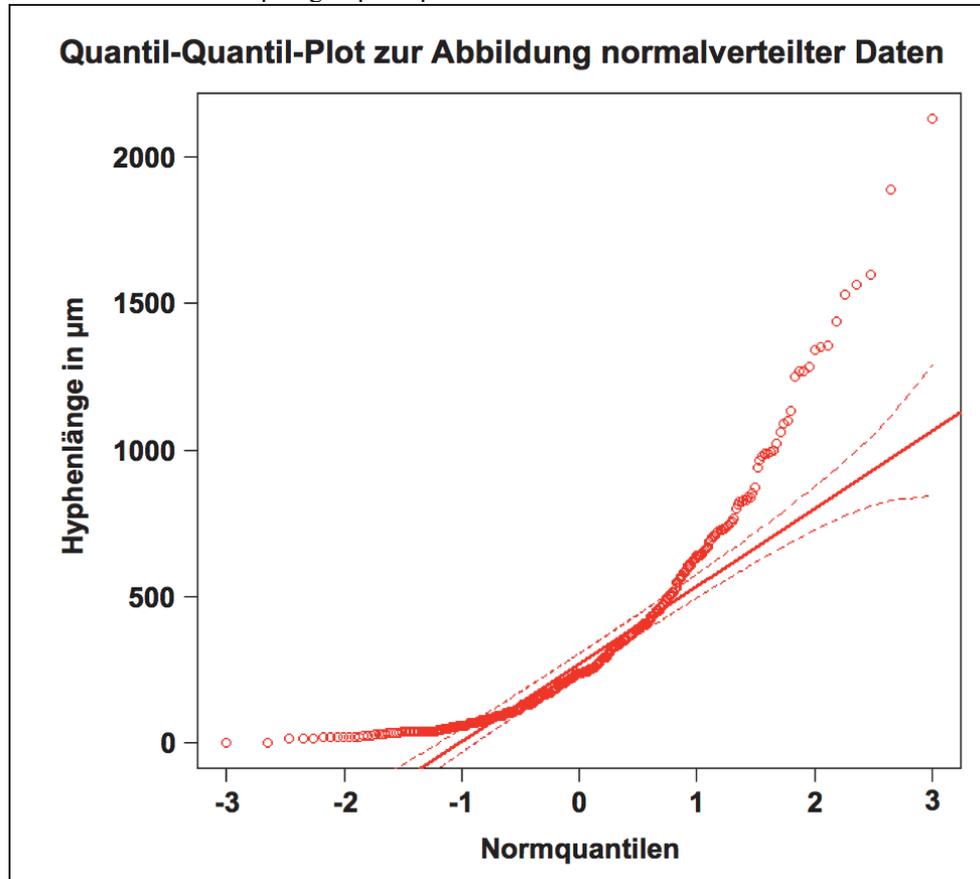


Abb. 3.22: Quantil-Quantil-Plot zur Darstellung normalverteilter Daten, hier am Beispiel der Gesamtdaten des Mycobionten von *F. bracteata* unter dem Einfluss des Photobionten von *L. lurida* nach 30 Tagen auf Wasser-Agar. Die rote Linie stellt die Normalverteilung dar, die gestrichelten Linien die Konfidenzintervalle. Die Auftragung der Hyphenlängen zeigt deutlich die Abweichung von der Normalverteilung im Bereich kurzer und im Bereich sehr langer Hyphenlängen. Dies zeigt eine bimodale Verteilung der Hyphenlängen.

3 Ergebnisse

Versuchsansatz	Arithmetischer Mittelwert der Gesamthyphenlänge pro Spore in μm		Arithmetischer Mittelwert der Verzweigungszahl pro Spore in μm		Arithmetischer Mittelwert der Keimungsrate in %	
	Wasser-Agar	MY-Agar	Wasser-Agar	MY-Agar	Wasser-Agar	MY-Agar
Kontrolle						
10 d	53,4 \pm 4,0	39,6 \pm 0,7	0,6 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	66,0 \pm 2,3	67,3 \pm 4,1
20 d	72,8 \pm 5,1	48,4 \pm 2,5	2,1 \pm 0,5	0,2 \pm 0,1	72,0 \pm 7,3	75,5 \pm 5,1
30 d	62,5 \pm 3,8	67,0 \pm 2,0	1,4 \pm 0,3	0,4 \pm 0,1	81,7 \pm 6,0	71,7 \pm 4,1
<i>L. lurida</i>-Photobiont						
10 d	41,7 \pm 13,8	115,5 \pm 29,0	0,3 \pm 0,2	3,1 \pm 0,7	66,6 \pm 4,6	71,5 \pm 6,6
20 d	66,3 \pm 17,5	226,2 \pm 19,6	0,7 \pm 0,2	3,7 \pm 0,5	72,2 \pm 6,4	76,0 \pm 11,0
30 d	324,2 \pm 79,0	283,3 \pm 99,9	4,1 \pm 1,2	4,0 \pm 1,4	82,4 \pm 1,5	73,7 \pm 10,3
<i>F. bracteata</i>-Photobiont						
10 d	84,8 \pm 30,7	100,0 \pm 18,0	1,8 \pm 0,4	0,9 \pm 0,2	63,1 \pm 4,3	65,8 \pm 4,1
20 d	135,6 \pm 17,5	290,9 \pm 14,1	3,3 \pm 0,3	4,2 \pm 0,1	78,1 \pm 4,9	80,9 \pm 4,2
30 d	769,2 \pm 123,8	572,4 \pm 146,5	18,6 \pm 8,6	8,6 \pm 3,0	83,9 \pm 4,0	72,6 \pm 7,0
<i>M. bisecta</i>-Alge						
10 d	320,5 \pm 117,1	118,0 \pm 12,0	4,0 \pm 2,5	1,7 \pm 0,5	74,1 \pm 6,4	79,3 \pm 3,8
20 d	668,6 \pm 451,0	270,8 \pm 30,2	14,7 \pm 14,0	3,8 \pm 0,6	79,3 \pm 5,2	73,2 \pm 4,6
30 d	1255,9 \pm 154,1	615,0 \pm 473,6	30,2 \pm 4,6	12,6 \pm 10,5	95,7 \pm 0,6	78,5 \pm 9,8

Tab. 3.3: Kennwert-Tabelle für Gesamthyphenlänge, Verzweigungszahl und Keimungsrate

Signifikante Unterschiede der Hyphenlängen im t-Test nach Tagen						
Versuchsansätze mittels t-Test verglichen		Ergebnisse auf Wasser-Agar		Ergebnisse auf MY-Agar		
		t_{cr} -Wert	Signifikanz	t_{cr} -Wert	Signifikanz	
		(p=0,95; n=3; f=4; t-Wert $H_0 = 2,776$)		(p=0,95; n=3; f=4; t-Wert $H_0 = 2,776$)		
Vergleich nach 10 d						
Kontrolle	↔ <i>L.lu.-PB</i>	-1,414	nein	4,537	ja	
Kontrolle	↔ <i>F.br.-PB</i>	1,757	nein	5,817	ja	
Kontrolle	↔ <i>M.bi.-Alge</i>	3,950	ja	11,295	ja	
<i>L.lu.-PB</i>	↔ <i>F.br.-PB</i>	2,219	nein	-0,786	nein	
<i>L.lu.-PB</i>	↔ <i>M.bi.-Alge</i>	4,098	ja	0,138	nein	
<i>F.br.-PB</i>	↔ <i>M.bi.-Alge</i>	3,374	ja	1,440	nein	
Vergleich nach 20 d						
Kontrolle	↔ <i>L.lu.-PB</i>	-0,618	nein	15,646	ja	
Kontrolle	↔ <i>F.br.-PB</i>	5,963	ja	29,321	ja	
Kontrolle	↔ <i>M.bi.-Alge</i>	2,288	nein	12,722	ja	
<i>L.lu.-PB</i>	↔ <i>F.br.-PB</i>	4,851	ja	4,656	ja	
<i>L.lu.-PB</i>	↔ <i>M.bi.-Alge</i>	2,311	nein	2,148	nein	
<i>F.br.-PB</i>	↔ <i>M.bi.-Alge</i>	2,046	nein	-1,049	nein	
Vergleich nach 30 d						
Kontrolle	↔ <i>L.lu.-PB</i>	5,734	ja	3,751	ja	
Kontrolle	↔ <i>F.br.-PB</i>	9,880	ja	5,973	ja	
Kontrolle	↔ <i>M.bi.-Alge</i>	13,413	ja	2,004	nein	
<i>L.lu.-PB</i>	↔ <i>F.br.-PB</i>	5,248	ja	2,823	ja	
<i>L.lu.-PB</i>	↔ <i>M.bi.-Alge</i>	9,321	ja	1,187	nein	
<i>F.br.-PB</i>	↔ <i>M.bi.-Alge</i>	4,265	ja	0,149	nein	

Tab. 3.4: Vergleich der verschiedenen Einflussgrößen innerhalb der Versuchstage (10, 20 und 30 d) mittels

3 Ergebnisse

t-Test in Hinblick auf signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Hyphenlängen. Die Berechnung des t-Tests erfolgte unter der Annahme der Gültigkeit des Zentralen Grenzwertsatzes (vgl. Oestreich & Romberg, 2009) für die Verteilung der Replicatmittelwerte um ihr arithmetisches Mittel.

Signifikante Unterschiede der Hyphenlängen im t-Test nach Ansätzen						
Versuchsansätze mittels t-Test verglichen			Ergebnisse auf Wasser-Agar		Ergebnisse auf MY-Agar	
			t_{gr} -Wert ($p=0,95$; $n=3$; $f=4$; t -Wert $H_0 = 2,776$)	Signifikanz	t_{gr} -Wert ($p=0,95$; $n=3$; $f=4$; t -Wert $H_0 = 2,776$)	Signifikanz
Vergleich Kontrolle						
Tag 10	↔	Tag 20	5,188	ja	5,890	ja
Tag 20	↔	Tag 30	-2,768	nein	9,985	ja
Tag 10	↔	Tag 30	2,868	ja	22,352	ja
Vergleich <i>L.lu.</i>-PB						
Tag 10	↔	Tag 20	1,917	nein	5,493	ja
Tag 20	↔	Tag 30	5,524	ja	0,972	nein
Tag 10	↔	Tag 30	6,106	ja	2,796	ja
Vergleich <i>F.br.</i>-PB						
Tag 10	↔	Tag 20	2,489	nein	14,477	ja
Tag 20	↔	Tag 30	8,776	ja	3,311	ja
Tag 10	↔	Tag 30	9,292	ja	5,542	ja
Vergleich <i>M.bi.</i>-Alge						
Tag 10	↔	Tag 20	1,294	nein	8,152	ja
Tag 20	↔	Tag 30	2,134	nein	1,256	nein
Tag 10	↔	Tag 30	8,373	ja	1,817	nein

Tab. 3.5: t-Test-Vergleich der verschiedenen Versuchstage innerhalb der jeweiligen Einflussgrößen (Kontrolle, *L. lurida*-Photobiont, *F. bracteata*-Photobiont und *Myrmecia bisecta*) in Hinblick auf signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Hyphenlängen. Die Berechnung des t-Tests erfolgte unter der Annahme der Gültigkeit des Zentralen Grenzwertsatzes (vgl. Oestreich & Romberg, 2009) für die Verteilung der Replicatmittelwerte um ihr arithmetisches Mittel.

Signifikante Unterschiede der maximalen Hyphenlängen im t-Test nach Kulturmedien				
Versuchsansätze mittels t-Test verglichen			t_{gr} -Wert	Signifikanz
Vergleich				
Kontrolle, 30 d, W-Agar	↔	Kontrolle, 30 d, MY-Agar	-1,789	nein
<i>L.lu.</i> -PB, 30 d, W-Agar	↔	<i>L.lu.</i> -PB, 30 d, MY-Agar	0,556	nein
<i>F.br.</i> -PB, 30 d, W-Agar	↔	<i>F.br.</i> -PB, 30 d, MY-Agar	1,777	nein
<i>M.bi.</i> -Alge, 30 d, W-Agar	↔	<i>M.bi.</i> -Alge, 30 d, MY-Agar	2,229	nein

Tab. 3.6: t-Test-Vergleich der zwei verwendeten Medien innerhalb der verwendeten Einflussgrößen (Kontrolle, *L. lurida*-Photobiont, *F. bracteata*-Photobiont und *Myrmecia bisecta*) in Hinblick auf signifikante Unterschiede zwischen den maximalen Mittelwerten der Hyphenlängen nach 30 d. Die Berechnung des t-Tests erfolgte unter der Annahme der Gültigkeit des Zentralen Grenzwertsatzes (vgl. Oestreich & Romberg, 2009) für die Verteilung der Replicatmittelwerte um ihr arithmetisches Mittel.

3.2 Exudate der Photobionten und der Alge *Myrmecia bisecta*

Sowohl die Ethylacetat- als auch die Wasser-Extrakte – wobei erstere der Detektion lipophiler, letztere der Detektion hydrophiler Substanzen dienen – aller fünf untersuchten Photobionten und der nicht-lichenisierenden Alge *Myrmecia bisecta* zeigen in den Chromatogrammen von HPLC und LCMS eine Vielzahl von unterschiedlichen Signalen. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen lassen sich definierte Signale bestimmten Substanzen zuordnen, die entweder originärer Bestandteil der verwendeten Kulturmedien sind, oder von den darin kultivierten Photobionten/Algen exudiert (also: ausgeschieden) werden. Ein Großteil dieser Signale wird dabei von Komponenten der Kulturmedien erzeugt, wie sich durch Vergleich mit den Retentionszeiten (RT) und den UV/VIS-Spektren der Signale reiner Kulturmedien eindeutig zeigen lässt. Die für die untersuchten Photobionten/Algen spezifischen HPLC-Signale werden für die Ethylacetat-Extrakte in Tabelle 3.7 und für die Wasser-Extrakte in Tabelle 3.8 aufgeführt. Beide Tabellen veranschaulichen die Unterschiede der Signalverteilung in Abhängigkeit von der jeweiligen Photobionten- bzw. Algenart, aber auch vom verwendeten Medium. Die verwendeten Medien sind TOM mit Glucose und TOM ohne Glucose.

3.2.1 Exudate der Ethylacetat-Extrakte

Die Tabelle 3.7 zeigt die für die Photobionten bzw. Algen spezifischen Signale der Ethylacetat-Extrakte, die mit der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen HPLC-Methodik detektiert werden können. Im Allgemeinen zeigen sich in den Ethylacetat-Extrakten mehr Signale, als in den nachfolgend beschriebenen Wasser-Extrakten. Die Anzahl der Signale liegt in Extrakten aus glukosehaltigem und glukosefreiem Kulturmedium ungefähr gleich hoch, unterscheidet sich aber in der Identität der Signale. Die sechs verschiedenen untersuchten Algenarten zeigen in der HPLC deutlich unterscheidbare Signalmuster: Der Photobiont von *F. bracteata* exudiert insgesamt sechs detektierbare Substanzen, davon fünf in glukosefreiem und vier in glukosehaltigem TOM. Von den sechs Signalen können sich drei in beiden Medien nachweisen lassen (RT = 12,8; 18,7; 19,1 min). Der Photobiont von *F. fulgens* exudiert insgesamt sieben detektierbare Substanzen, jeweils sechs finden sich in den einzelnen Medien und fünf von diesen Signalen treten in beiden Kulturmedien auf (RT = 12,8; 18,5; 18,7; 19,1; 22,7 min). Der Photobiont von *T. sedifolia* zeigt sechs Signale in glukosefreiem TOM und acht in glukosehaltigem TOM, wobei sich zwischen den einzelnen Medien allerdings nur eine Übereinstimmung feststellen lässt (RT = 12,8) und beide Signalmuster auffallend unterschiedlich sind. Der Photobiont von *X. elegans* zeigt hingegen wieder eine größere Übereinstimmung zwischen den Signalverteilungen auf glukosefreiem und glukosehaltigem

TOM. Von den acht bzw. zehn detektierten Signalen stimmen sieben überein (RT = 12,8; 17,0; 18,5; 18,7; 19,1; 22,7; 51,0 min) und die Signalmuster ähneln auch stärker denen der Photobionten von *F. bracteata* und *F. fulgens*, als dies bei *T. sedifolia* der Fall ist. Der *Asterochloris*-Photobiont aus *L. lurida* lässt zehn Signale in glucosefreiem TOM erkennen und acht in glucosehaltigem Medium. Vier dieser Signale (RT = 10,2; 12,8; 31,0; 51,0 min) stimmen auf beiden Medien überein. Die nicht-lichenisierende *Myrmecia bisecta* zeigt in der HPLC die geringste Anzahl an detektierbaren Signalen: Für glucosefreies TOM lassen sich vier Signale detektieren, für glucosehaltiges lediglich drei, wobei letztere auch in beiden Medien auftreten (RT = 2,7 B; 4,0; 12,8 min). Bei der Auswertung der Ergebnisse fällt auf, dass nur ein Signal (RT = 12,8 min) in allen untersuchten Proben auftritt und ein weiteres in allen untersuchten glucosefreien Medien (RT = 2,7 B). Desweiteren findet sich in glucosehaltigen Medien ein Signal (RT = 22,7), das sich bei allen Photobionten nachweisen lässt, nicht aber bei *M. bisecta*, und zwei Signale (RT = 18,7 und 19,1 min), die in allen Kulturmedien von *Trebouxia*-Photobionten auftreten, nicht aber bei *Asterochloris* sp. und der nicht-lichenisierenden *M. bisecta*. Mit zusätzlichen Nachweisverfahren gelingt die eindeutige Identifizierung von zwei der dargestellten Signale („b“ und „e“ in Tab. 3.7) und die auf der HPLC-Datenbank beruhende, und damit uneindeutige, Identifikation von drei weiteren Substanzen („a“, „c“ und „d“ in Tab. 3.7).

HPLC-Signale der Ethylacetat-Phasen von sechs Photobionten / Algen													
RT in min	ohne Glucose						mit Glucose						
	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	
B 2,7	■	■	■	■	■	■	-	-	-	-	-	■	
4,0	■	-	■	-	■	■	-	-	-	-	-	■	
5,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	
5,5	-	-	-	-	-	-	-	■	-	■	-	-	
7,5	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10,2	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	■	-	
11,8	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	
12,8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	(a)
13,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	(b)
13,9	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	
15,1	-	-	-	-	-	-	-	-	■	■	-	-	
15,3	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17,0	-	-	-	■	■	-	-	-	■	■	-	-	
18,5	-	■	-	■	-	■	-	■	■	■	■	-	(c)
18,7	■	■	-	■	■	-	■	■	■	■	-	-	(d)
19,1	■	■	-	■	-	-	■	■	■	■	-	-	(e)
22,7	-	■	-	■	-	-	■	■	■	■	■	-	
26,7	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
31,0	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	■	-	
40,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	
51,0	-	-	-	■	■	-	-	-	■	■	■	-	

Tabelle 3.7: Diese Tabelle zeigt die Signale aufgetrennter Substanzen aus den Ethylacetat-Phasen der Kulturmedien von sechs Photobionten/Algen mit und ohne Glucose. Signale (■) werden nur aufgeführt, wenn sie in allen drei Replicates auftraten. Die untersuchten Organismen sind die Photobionten aus *Fulgensia bracteata* (*F. bra.*),

Fulgensia fulgens (*F. ful.*), *Toninia sedifolia* (*T. sed.*), *Xanthoria elegans* (*X. ele.*), *Lecidea lurida* (*L. lur.*) und die Alge *Myrmecia bisecta* (*M. bis.*). Einzelne Signale konnten identifiziert werden: a) 2'-Desoxyadenosin, b) Cyclo-(leucyl-tyrosyl), c) Cyclo-(alanyl-tryptophanyl), d) Cyclo-(prolyl-tyrosyl), e) Indol-3-carbaldehyd, Details siehe dazu im Text.

3.2.2 Exudate der Wasser-Extrakte

Die Tabelle 3.8 stellt jene Signale dar, die mit der HPLC-Methodik in den Wasser-Extrakten glucosehaltiger und -freier Kulturmedien detektiert werden können. Anders als bei den Ethylacetat-Extrakten zeigen sich bei den glucosefreien Wasser-Extrakten weniger Signale, als bei den glucosehaltigen, wobei die Kulturmedien von *M. bisecta* eine Ausnahme darstellen. Die Wasser-Extrakte der Kulturmedien des Photobionten von *F. bracteata* zeigen in glucosefreiem TOM drei Signale und in glucosehaltigem TOM sieben Signale. Zwei von diesen Signalen (RT = 5,7; 18,6 min) finden sich in beiden Medien. In Wasser-Extrakten der Photobiontenkultur von *F. fulgens* finden sich ebenfalls drei und sieben Signale in glucosefreiem und -haltigem TOM. Auch in diesen Medien finden sich zwei Übereinstimmungen (RT = 5,7; 18,6 min), die auch in den erwähnten Kulturmedien des *F. bracteata*-Photobionten vorkommen. In den Wasser-Extrakten der Kulturmedien von *T. sedifolia* lassen sich zwei und sechs Signale mit einer Übereinstimmung (RT = 5,7) detektieren und in den Kulturmedien des *X. elegans*-Photobionten finden sich drei und sechs Signale mit insgesamt drei Übereinstimmungen zwischen glucosefreiem und -haltigem Medium (RT = 5,7; 18,6; 52,0). Der *Asterochloris*-Photobiont aus *L. lurida* produziert zwei Signale in glucosefreiem TOM und fünf in glucosehaltigem TOM mit einem übereinstimmenden Signal in beiden Medien (RT = 5,7 min). Die nicht-lichenisierende Alge *M. bisecta* erzeugt zwei Signale in glucosefreiem TOM und eines in glucosehaltigem TOM, wobei letzteres auch in glucosefreiem TOM zu finden ist (RT = 5,7 min). Ein einzelnes Signal bei RT = 5,7 min lässt sich durchgängig in allen untersuchten Proben und in beiden Medien detektieren. In glucosehaltigem TOM tritt ein Signal bei allen fünf Photobionten auf (RT = 18,6 min) und eines bei allen vier untersuchten *Trebouxia*-Photobionten (RT = 14,0 min), ansonsten erscheint das Verteilungsmuster der HPLC-Signale der Wasser-Extrakte heterogener als das der Ethylacetat-Extrakte (vgl. Tab.3.8 mit Tab. 3.7). Mit zusätzlichen Nachweisverfahren (LCMS) gelingt im weiteren Verlauf die eindeutige Identifizierung von einem der dargestellten Signale („g“ in Tab. 3.8) und die auf der HPLC-Datenbank beruhende, und damit unvollständige und uneindeutige, Identifikation von einer weiteren Substanz („f“ in Tab. 3.8).

HPLC-Signale der Wasser-Phasen von sechs Photobionten / Algen													
RT in min	ohne Glucose						mit Glucose						
	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	
B 1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	■	■	■	-	
C 1,1	-	-	-	-	-	-	■	■	-	-	-	-	
1,6	-	■	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	
1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	
2,2	-	-	-	-	■	-	-	■	-	■	-	-	
2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	
3,1	-	-	-	-	-	-	■	-	■	-	-	-	
4,7	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5,7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	(f)
9,9	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	
11,1	■	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	(g)
14,0	-	-	-	-	-	-	■	■	■	■	-	-	
18,6	■	■	-	■	-	-	■	■	■	■	■	-	
36,0	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	
52,0	-	-	-	■	-	-	-	■	-	■	■	-	

Tabelle 3.8: Diese Tabelle zeigt die Signale aufgetrennter Substanzen aus Wasser-Phasen der Kulturmedien von sechs Photobionten/Algen mit und ohne Glucose. Signale (■) werden nur aufgeführt, wenn sie in allen drei Replicates auftraten. Die untersuchten Organismen sind die Photobionten aus *Fulgensia bracteata* (*F. bra.*), *Fulgensia fulgens* (*F. ful.*), *Toninia sedifolia* (*T. sed.*), *Xanthoria elegans* (*X. ele.*), *Lecidea lurida* (*L. lur.*) und die Alge *Myrmecia bisecta* (*M. bis.*). Einzelne Signale konnten identifiziert werden: f) 2'-Desoxythymidin, g) Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl), Details siehe dazu im Text.

3.2.3 Identifizierte Substanzen

3.2.3.1 Indol-3-carbaldehyd

Die Substanz Indol-3-carbaldehyd kann in den untersuchten Ethylacetat-Extrakten von glucosefreiem und glucosehaltigem TOM nach einer Retentionszeit von RT = 19,1 min in der HPLC und RT = 11,6 min in der LCMS (Tab 3.9) nachgewiesen werden. Beide Spektren zeigen vier charakteristische Signalpeaks bei 208, 244, 260 und 298 nm (vgl. Abb. 3.23), die sich damit in HPLC und LCMS gleichermaßen erkennen und identifizieren lassen. Die Übereinstimmung des gemessenen UV/VIS-Spektrums mit dem Spektrum von Indol-3-carbaldehyd in der Datenbank der HPLC beträgt mehr als 99,9 % (vgl. Tab 3.9 und Abb. 3.23). Darüber hinaus kann diese Substanz mit beiden Methoden, HPLC und LCMS, deren MS-Komponente präzisere Messungen erlaubt, in beiden Kulturmedien aller vier *Trebouxia*-Photobionten nachgewiesen werden (Tab 3.9). Indol-3-carbaldehyd scheint damit spezifisch für die untersuchten Photobionten der Gattung *Trebouxia* zu sein. Die charakteristischen UV/VIS-Spektren werden in der nachfolgenden LCMS-Analyse durch das Auftreten einer Pseudomolekülmasse [M-H]⁻ von 144,5 u im negativen Elektrospray-Ionisationskanal (-ESI, vgl. Abb. 3.24) ergänzt. Die Pseudomolekülmasse impliziert dabei ein ungefähres Molekulargewicht der gesuchten Substanz von 145,5 u was gut mit der realen Molekülmasse von Indol-3-carbaldehyd von 145,2 u übereinstimmt (Dictionary of Natural Products 2007). Die Strukturformel von Indol-3-carbaldehyd ist in Abb. A.3 im Anhang dargestellt.

Vorkommen von Indol-3-carbaldehyd in der Ethylacetat-Phase (99,94%)												
RT in min	ohne Glucose						mit Glucose					
	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>
mit HPLC												
19,1	■	■	-	■	-	-	■	■	■	■	-	-
mit LCMS												
11,6	■	■	■	■	-	-	■	■	■	■	-	-

Tabelle 3.9: Diese Tabelle stellt die als Indol-3-carbaldehyd identifizierten Signale aus den Ethylacetat-Phasen der Kulturmedien von sechs Photobionten / Algen mit und ohne Glucose dar. Signale (■) werden nur aufgeführt, wenn sie in allen drei Replicates auftraten. Die untersuchten Organismen sind die Photobionten aus *Fulgensia bracteata* (*F. bra.*), *Fulgensia fulgens* (*F. ful.*), *Toninia sedifolia* (*T. sed.*), *Xanthoria elegans* (*X. ele.*), *Lecidea lurida* (*L. lur.*) und die Alge *Myrmecia bisecta* (*M. bis.*).

3 Ergebnisse

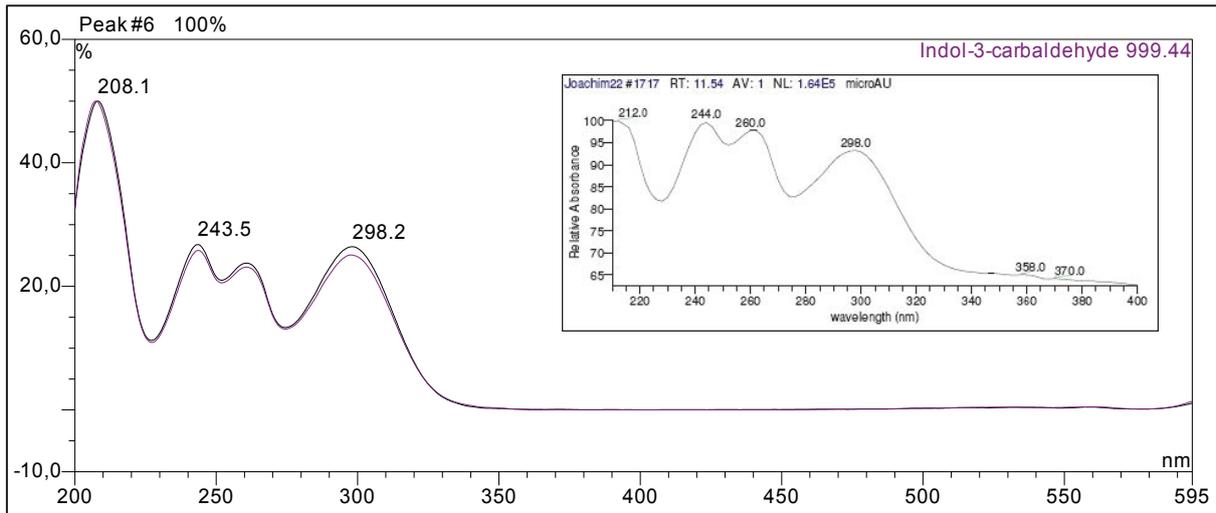


Abbildung 3.23: Identische UV/VIS-Spektren von Indol-3-carbaldehyd in der HPLC (große Abbildung) und in der LCMS (kleine Abbildung). Beide UV/VIS-Spektren zeigen ein charakteristisches Muster und vier deutliche Signalpeaks bei 212 nm, 244 nm, 260 nm und 298 nm.

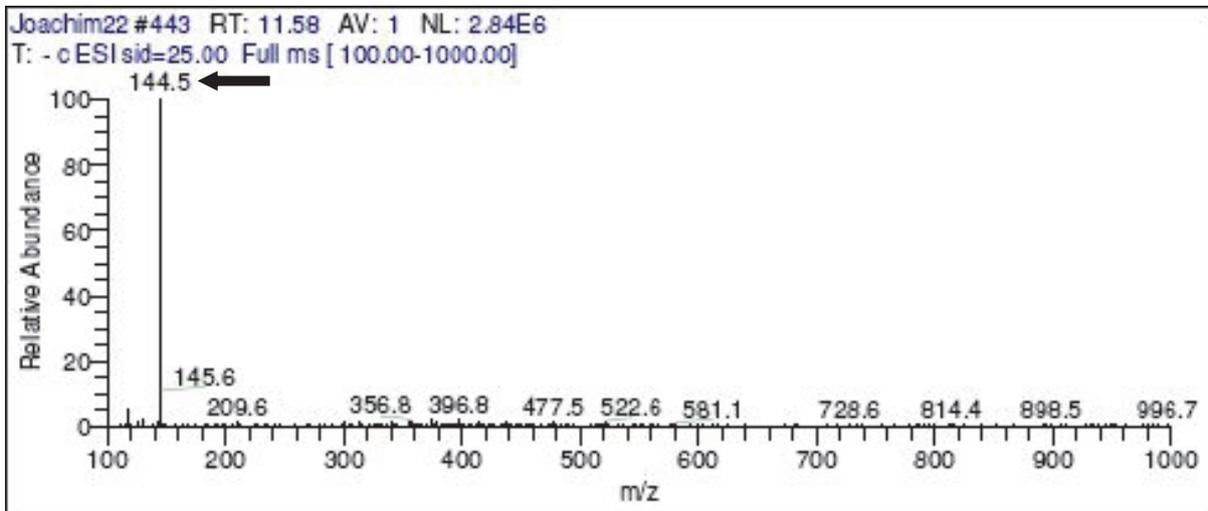


Abbildung 3.24: ESI-Massenspektrum mit negativer Ionisierung von Indol-3-carbaldehyd in der LCMS mit $[M-H]^- = 144,5$ (Pfeil); wobei die Masse von Indol-3-carbaldehyd real 145,2 u beträgt.

3.2.3.2 L-Rhamnose

Der Zucker L-Rhamnose, der auch als 6-Desoxy-L-mannose bezeichnet wird, kann mit der in Kapitel 2.2.4.5 beschriebenen dünn-schichtchromatographischen Methode (TCL) und durch den Vergleich mit mitlaufenden Zucker-Standards identifiziert werden. L-Rhamnose wird dabei lediglich in den glucosefreien TOM-Extrakten des Photobionten von *F. bracteata* nachgewiesen und repräsentiert damit ein hoch spezifisches Photobionten-Exudat. Auf die Untersuchung von glucosehaltigen Medien, das immerhin 1% Glucose zu Kulturbeginn enthielt, wird aufgrund der Fragestellung – Identifikation von Zuckern – verzichtet. Alle untersuchten Replicates (n = 9) zeigen in der Dünnschichtchromatographie kleine Spots, die nach der Entwicklung der Silicagel-Platten eine für Rhamnose charakteristische Grünfärbung und einen durchschnittlichen R_f -Wert von 0,84 aufweisen (Abb. 3.25). Beide Merkmale, Grünfärbung und R_f -Wert, stimmen mit den Literaturwerten für Rhamnose (Hansen 1975) überein und bestätigen sich auch in parallel zu den Proben aufgetragenen und aufgetrennten 0,2 %igen Standardlösungen (vgl. Abb. 3.25). Verdünnungsreihen von L-Rhamnose in glucosefreiem TOM erlauben eine Konzentrationsabschätzung, so dass von ungefähr 0,01 mg/ml L-Rhamnose im Kulturmedium des Photobionten von *F. bracteata* ausgegangen werden kann. Die Strukturformel von L-Rhamnose ist in Abb. A.4 im Anhang dargestellt. In der Natur kommt Rhamnose – außer in *Pseudomonas aeruginosa*, das auch D-Rhamnose synthetisiert – nur im L-Konformation vor (Koivistoinen 2008). Aus diesem Grund kann auf eine Überprüfung der Stereochemie verzichtet werden.

Vorkommen von Rhamnose im Wasser-Extrakt (TLC)												
R _f -Wert	ohne Glucose						mit Glucose					
	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>
0,84	■	-	-	-	-	-	n.D.	n.D.	n.D.	n.D.	n.D.	n.D.

Tabelle 3.10: Diese Tabelle zeigt die als L-Rhamnose identifizierten Signale aus Wasser-Phasen der Kulturmedien von sechs Photobionten / Algen mit und ohne Glucose. Signale (■) werden nur aufgeführt, wenn sie in allen drei Replicates auftraten. Die untersuchten Organismen sind die Photobionten aus *Fulgensia bracteata* (*F. bra.*), *Fulgensia fulgens* (*F. ful.*), *Toninia sedifolia* (*T. sed.*), *Xanthoria elegans* (*X. ele.*), *Lecidea lurida* (*L. lur.*) und die Alge *Myrmecia bisecta* (*M. bis.*).

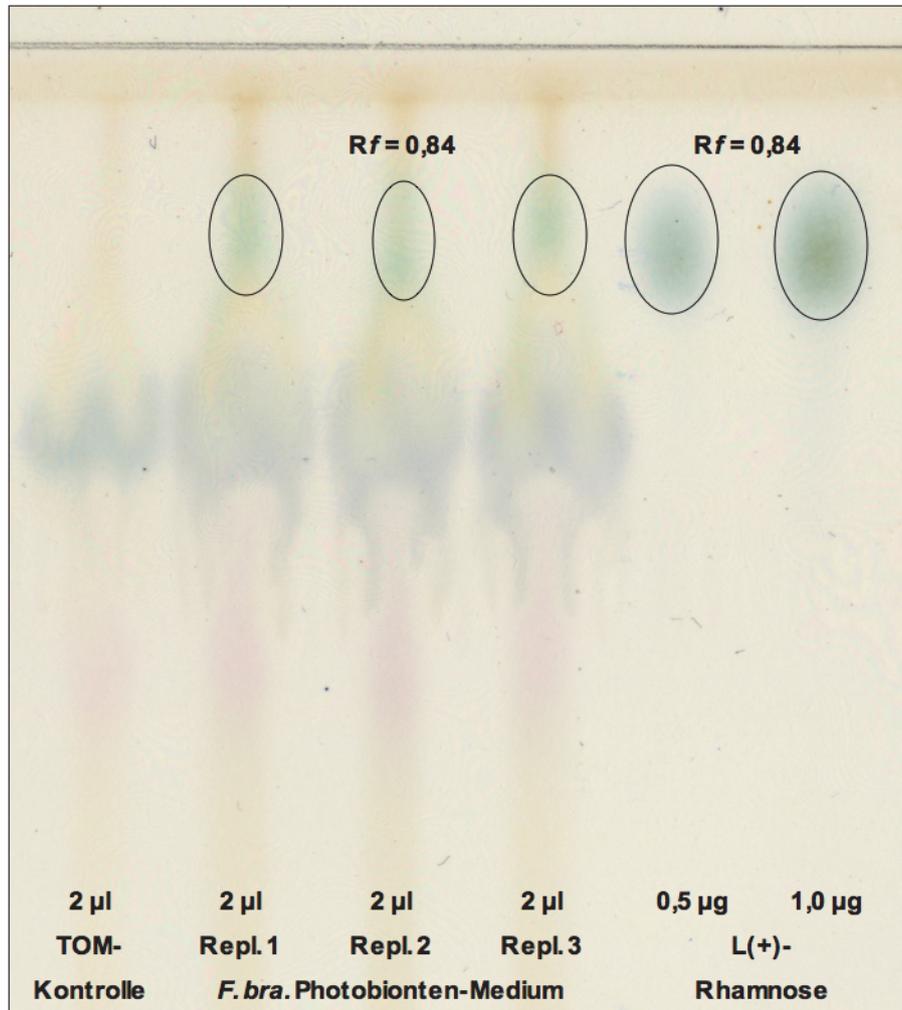


Abbildung 3.25: TOM-Kontrolle (2 µl), 3 Replicates des Kulturmediums von *F. bracteata* (2 µl) und 2 Kontroll-Standards von 0,5 und 1,0 µg L(+)-Rhamnose auf Dünnschichtchromatographie

3.2.3.3 Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl)

Bei der als Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) identifizierten Substanz handelt es sich um ein zyklisches Dipeptid, auch Diketopiperazin genannt, das aus zwei Aminosäuren Tryptophan besteht. Diese Substanz wird zunächst mit der HPLC anhand ihres UV/VIS-Spektrums als Cyclo-(alanyl-tryptophanyl) identifiziert (siehe Abb. 3.26) aber anschließend mittels der Massenspektrogramme der LCMS als das strukturell ähnliche Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) identifiziert. Das aufgenommene UV/VIS-Spektrum weist allgemein auf ein Tryptophanderivat hin (Ebel, mündl. Mitteilung). Die Abbildungen 3.27 und 3.28 zeigen das positive beziehungsweise das negative ESI-Massenspektrum der Substanz und deren Pseudomolekülmassen von $[M+H]^+ = 373,4$ u und $[M-H]^- = 371,7$ u. Dies legt ein reales Molekulargewicht der gesuchten Substanz von ungefähr $[M] = 372,5$ u nahe und stimmt damit recht genau mit dem Literaturwert für Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) von 372,4 u überein (Dictionary of Natural Products, 2007). Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) wird nach einer Retentionszeit von ungefähr 11,1 min mit der HPLC in beiden Kulturmedien des Photobionten von *Fulgensia bracteata* und in glucosehaltigem TOM der Alge *Myrmecia bisecta* detektiert. In der präziseren LCMS Analyse hingegen zeigt sich das entsprechende Signal von Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) nach 4,9 min in allen glucosefreien Photobionten-Medien, aber nicht in glucosehaltigem TOM (Tabelle 3.11). Aufgrund der geringen Probenmenge ist eine LCMS-Identifikation in den Kulturmedien von *Myrmecia bisecta* mit der LCMS nicht mehr möglich gewesen, Retentionszeiten und Spektren in der HPLC stimmen allerdings mit den Charakteristika der anderen Proben überein. Die Strukturformel von Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) ist in Abb. A.5 im Anhang dargestellt.

Vorkommen von Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) in der Wasser-Phase (99,54%*)												
RT in min	ohne Glucose						mit Glucose					
	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>
mit HPLC												
11,1	■	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	■
mit LCMS												
4,9	■	■	■	■	■	n.D.	-	-	-	-	-	n.D.

Tabelle 3.11: Diese Tabelle die als Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) identifizierten Signale aus den Wasser-Phasen der Kulturmedien von sechs Photobionten/Algen mit und ohne Glucose. Signale (■) werden nur aufgeführt, wenn sie in allen drei Replicates auftraten. Die untersuchten Organismen sind die Photobionten aus *Fulgensia bracteata* (*F. bra.*), *Fulgensia fulgens* (*F. ful.*), *Toninia sedifolia* (*T. sed.*), *Xanthoria elegans* (*X. ele.*), *Lecidea lurida* (*L. lur.*) und die Alge *Myrmecia bisecta* (*M. bis.*).

3 Ergebnisse

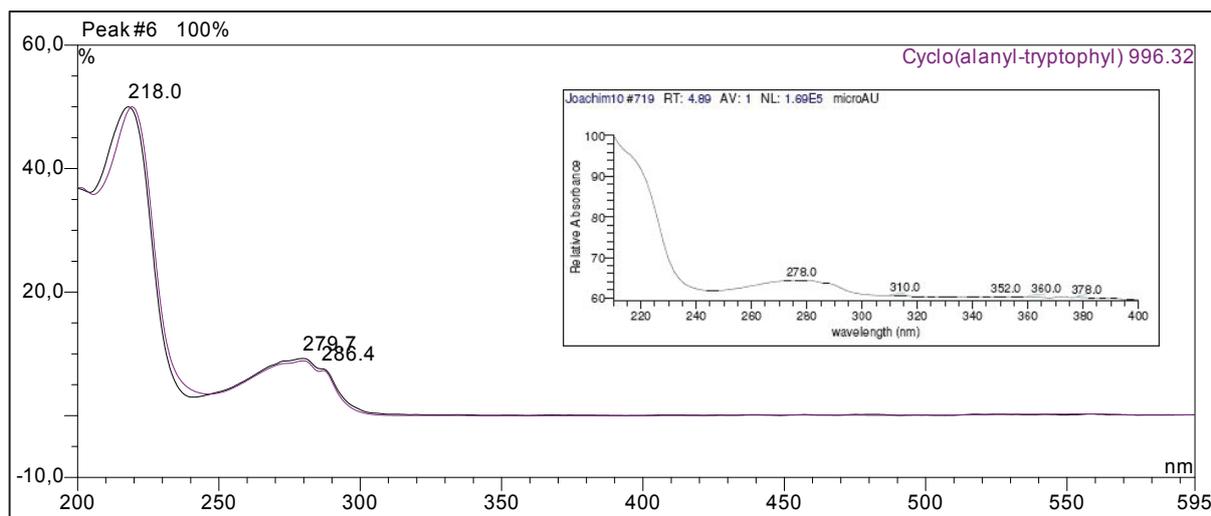


Abbildung 3.26: Identische UV/VIS-Spektren in der HPLC (große Abbildung) und in der LCMS (kleine Abbildung), in der HPLC anfänglich als Cyclo-(alanyl-tryptophanyl) identifiziert

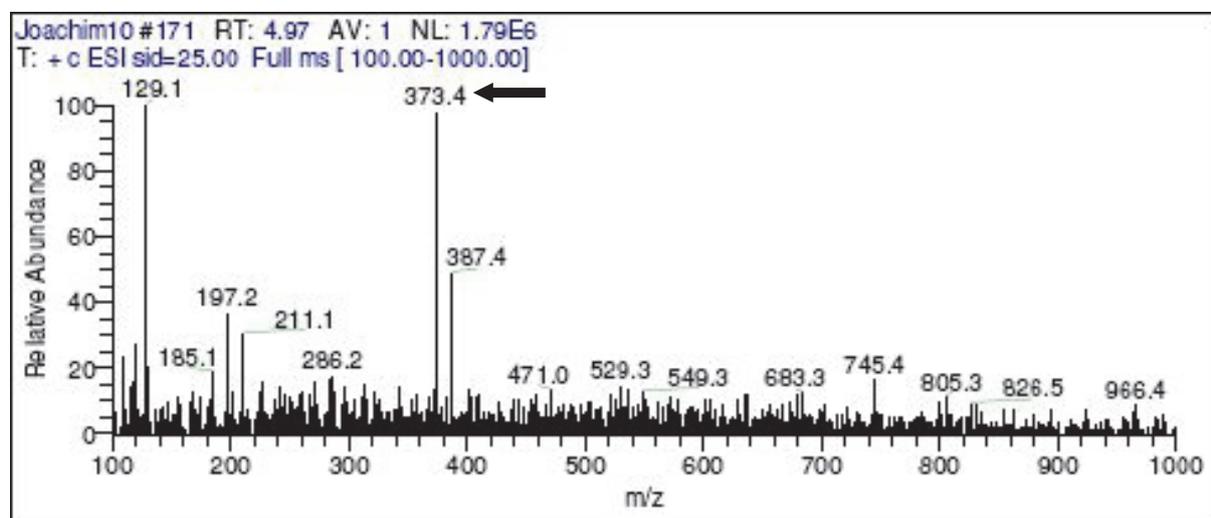


Abbildung 3.27: ESI-Massenspektrum mit positiver Ionisierung von Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) in der LCMS mit $[M+H]^+ = 373,4$ (Pfeil); wobei die Masse von Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) real 372,4 u beträgt.

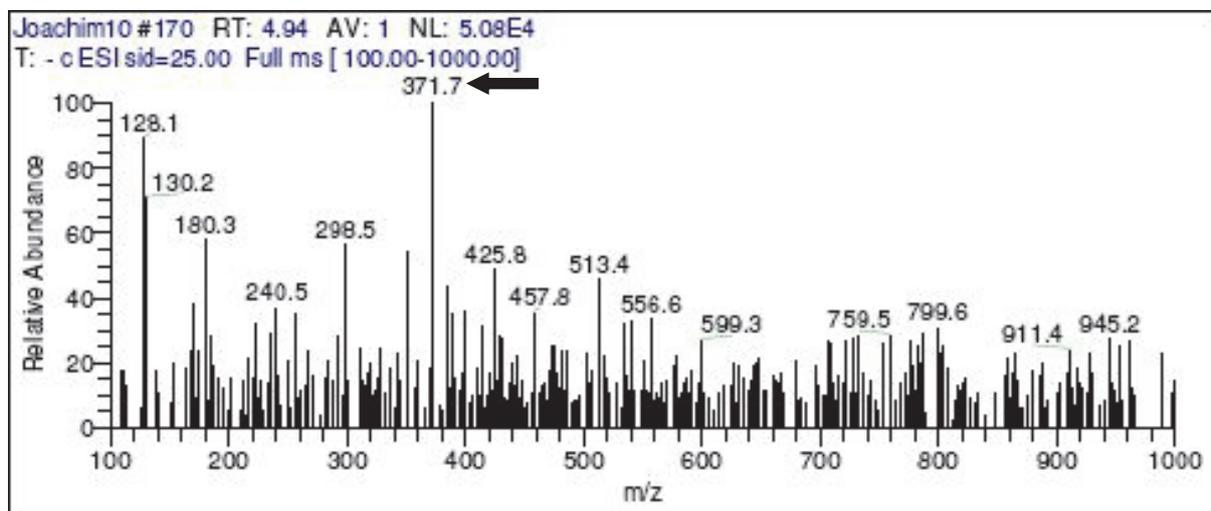


Abbildung 3.28: ESI-Massenspektrum mit negativer Ionisierung von Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) in der LCMS mit $[M+H]^+ = 371,7$ (Pfeil); wobei die Masse von Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) real 372,4 u beträgt.

3.2.3.4 Cyclo-(leucyl-tyrosyl)

Eine weitere Substanz kann in der HPLC nach 13,8 min in glucosehaltigem TOM des Photobionten von *Lecidea lurida* gefunden werden und ebenfalls bei der anschließenden und präziseren LCMS-Analyse nach RT = 7,0 min zusätzlich in glucosefreiem TOM des Photobionten von *L. lurida* nachgewiesen werden (Tab. 3.12). Mit beiden Analyseverfahren zeigt sich ein charakteristisches, aber unbekanntes UV/VIS-Spektrum (Abb. 3.29), das in der LCMS mit einer Pseudomolekülmasse von $[M-H]^- = 275,3$ u im negativen ESI-Massenspektrum korreliert war (Abb. 3.30). Da diese Ergebnisse keine hinreichende Identifikation ermöglichen, ist diese Substanz mittels präparativer HPLC aufgereinigt und mit der EIMS-Methodik (vgl. Kapitel 2.2.4.4) analysiert worden. Dabei ergibt sich ein eindeutiges EIMS-Fragmentierungsmuster, das mittels internem Datenbankabgleich als Cyclo-(leucyl-tyrosyl) identifiziert werden kann (Abb. 3.31). Das reale Molekulargewicht von Cyclo-(leucyl-tyrosyl) stimmt mit 276,4 u sehr gut mit der ermittelten Pseudomolekülmasse von $[M-H]^- = 275,3$ u überein. Damit kann ein weiteres Signal als zyklisches Dipeptid identifiziert werden, dessen Exudation spezifisch für den *Asterochloris*-Photobionten aus *L. lurida* zu sein scheint. Die Strukturformel von Cyclo-(leucyl-tyrosyl) ist in Abb. A.6 im Anhang dargestellt.

Vorkommen von Cyclo-(leucyl-tyrosyl) in der Ethylacetat-Phase												
RT in min	ohne Glucose						mit Glucose					
	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>
mit HPLC												
13,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-
mit LCMS												
7,0	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	■	-
mit EIMS												
12,8	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	■	-

Tabelle 3.12: Diese Tabelle die als Cyclo-(leucyl-tyrosyl) identifizierten Signale aus Wasser-Phasen der Kulturmedien von sechs Photobionten/Algen mit und ohne Glucose. Signale (■) werden nur aufgeführt, wenn sie in allen drei Replicates auftraten. Die untersuchten Organismen sind die Photobionten aus *Fulgensia bracteata* (*F. bra.*), *Fulgensia fulgens* (*F. ful.*), *Toninia sedifolia* (*T. sed.*), *Xanthoria elegans* (*X. ele.*), *Lecidea lurida* (*L. lur.*) und die Alge *Myrmecia bisecta* (*M. bis.*).

3 Ergebnisse

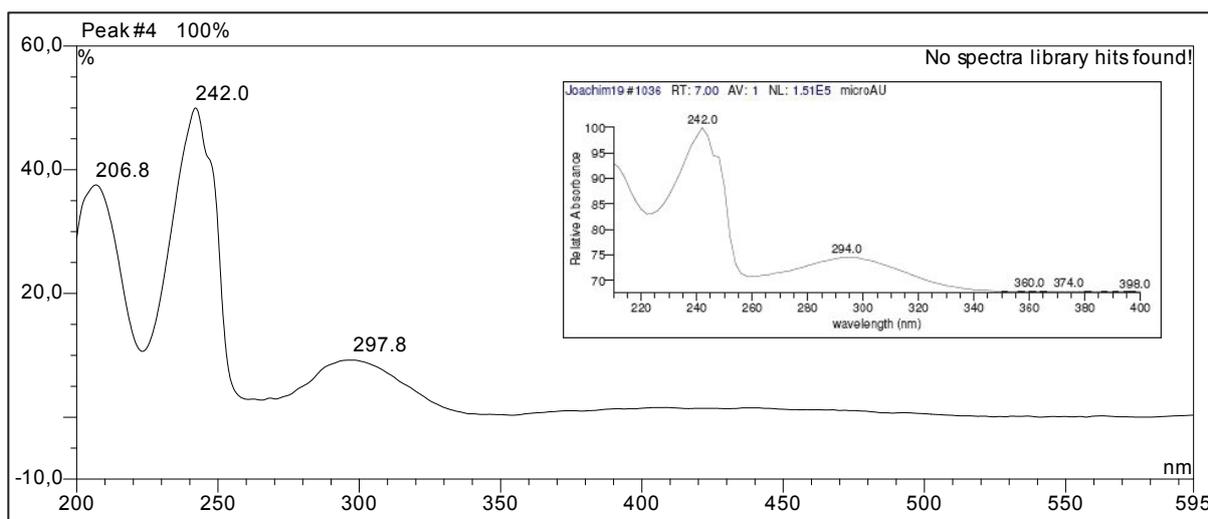


Abbildung 3.29: Identische UV/VIS-Spektren in der HPLC (große Abbildung) und in der LCMS (kleine Abbildung), allein nach diesem Spektrum war eine Identifizierung nicht möglich.

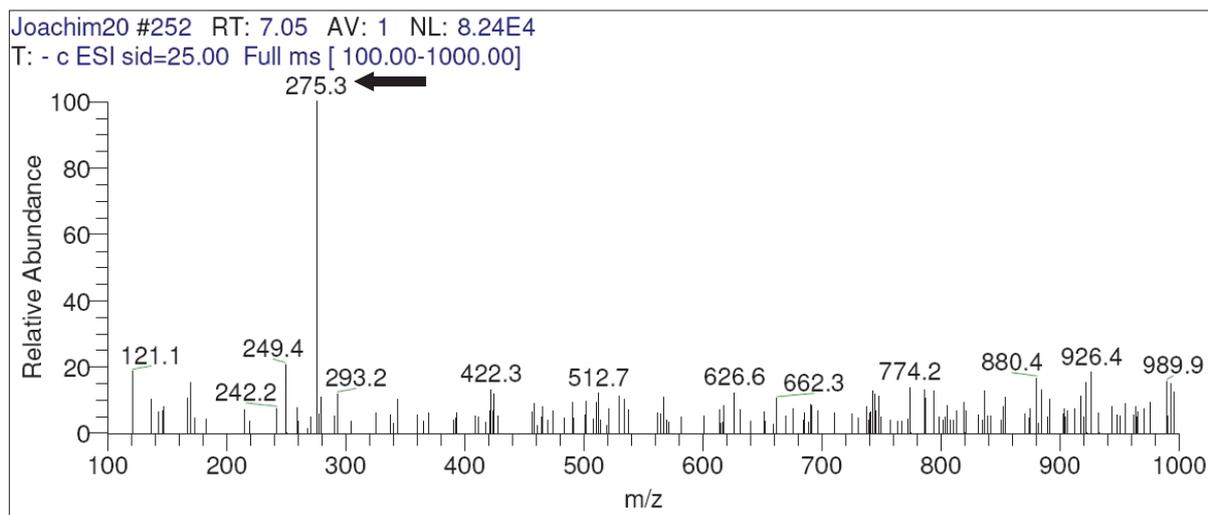


Abbildung 3.30: ESI-Massenspektrum mit negativer Ionisierung von einer Substanz in der LCMS mit $[M-H]^- = 275,3$ (Pfeil); eine eindeutige Identifizierung war mit den Mitteln von HPLC und LCMS nicht möglich.

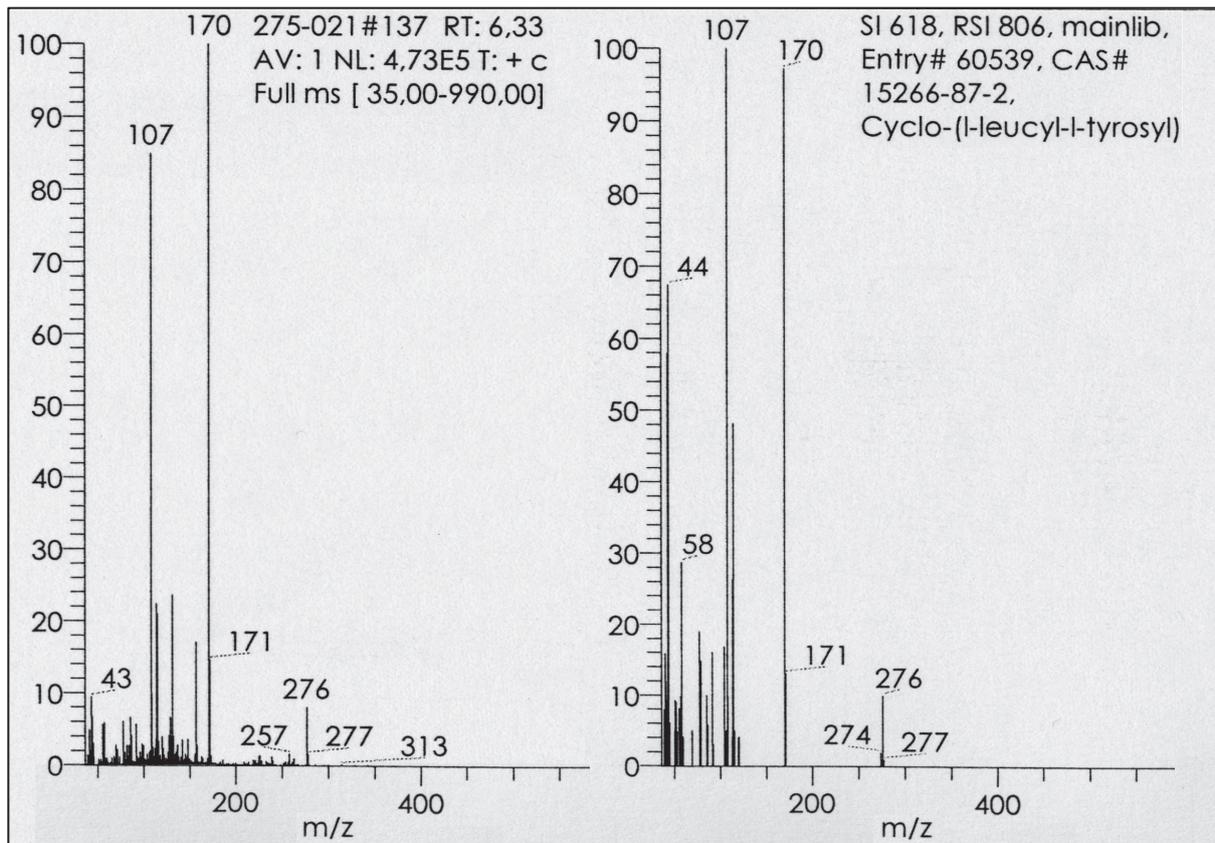


Abbildung 3.31: EIMS-Fragmentierungsmuster der unbekanntes Substanz (links) und ein Vergleichsspektrum aus der internen Datenbank (rechts) mit positiver Ionisierung. Die Substanz konnte als Cyclo-(leucyl-tyrosyl) identifiziert werden.

3.2.3.5 Weitere Substanzen

Neben den bisher beschriebenen vier Photobionten-Exudaten, die als sicher identifiziert angesehen werden können, gibt es noch weitere Substanzen, die in der HPLC zwar mit guter Übereinstimmung zu den Daten der internen Datenbank passen, allerdings nicht in der LCMS durch die entsprechenden Pseudomolekülmassen bestätigt werden können. Dies könnte mehrere Gründe haben, wie zum Beispiel eine ungenügende Ionisation unter den „sanften“ Ionisationsbedingungen der ESI-LCMS oder eine zu niedrige Konzentration für ein eindeutiges Signal. Daher müssen die nachfolgend vorgestellten Ergebnisse bis zur weiteren Bestätigung durch eine zweite Methodik als vorläufige Ergebnisse betrachtet werden.

Wie bereits beschrieben, findet sich in allen glucosefreien und den glucosehaltigen Ethylacetat-Extrakten der untersuchten Photobionten/Algen ein Signal bei einer Retentionszeit von 12,8 min (vgl. Tab. 3.7 und Tab. 3.13). Das dazugehörige UV/VIS-Spektrum kann in der HPLC mit einer Genauigkeit von stets größer 99 % als 2'-Desoxyadenosin identifiziert werden (Abb. 3.32). Analog dazu findet sich in allen glucosefreien und den glucosehaltigen Wasser-Extrakten der untersuchten Photobionten/Algen ein Signal bei einer Retentionszeit von 5,7 min (vgl. Tab. 3.8 und Tab. 3.14) und dessen UV/VIS-Spektrum wurde mittels internem Datenbankvergleich der HPLC als 2'-Desoxythymidin identifiziert. Die ausgegebene Genauigkeit liegt ebenfalls stets über 99 %. So findet sich in beiden Medien je ein exudiertes Nucleosid. Dabei bleibt fraglich, warum sich die beiden Nucleoside in den unterschiedlichen polaren Extrakten befinden.

Desweiteren zeigen sich in der HPLC-Analyse der Ethylacetat-Extrakte verschiedener Photobionten/Algen nach Retentionszeiten von 18,5 und 18,7 min zwei weitere Signale, die anhand ihrer UV/VIS-Spektren als Cyclo-(alanyl-tryptophanyl) und Cyclo-(prolyl-tyrosyl) mit Genauigkeiten von mehr als 99 % identifiziert werden können. In Anbetracht der Fehlinterpretation der HPLC-Datenbank von Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) als Cyclo-(alanyl-tryptophanyl) (vgl. Abb. 3.26) müssen diese Ergebnisse einerseits mit besonderer Vorsicht betrachtet werden. Andererseits lässt sich aus den Ergebnissen zur Identifikation von Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) und Cyclo-(leucyl-tyrosyl) ableiten, dass die Algen in der Lage sind, zumindest einige zyklische Dipeptide zu bilden. Dies lässt es zumindest möglich erscheinen, dass auch andere zyklische Dipeptide bzw. Diketopiperazine gebildet werden und dieser Stoffklasse der in der Exudation von Photobionten/Algen eine wichtige Rolle zukommen könnte.

Vorkommen von 2'-Desoxyadenosin in der Ethylacetat-Phase (99,48%)												
RT in min	ohne Glucose						mit Glucose					
	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>
mit HPLC												
12,8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Tabelle 3.13: Diese Tabelle zeigt die als 2'-Desoxyadenosin identifizierte Signale aus den Wasser-Phasen der Kulturmedien von sechs Photobionten/Algen mit und ohne Glucose. Signale (■) in allen drei Replicates.

Vorkommen von 2'-Desoxythymidin in der Wasser-Phase (99,52-99,88%)												
RT in min	ohne Glucose						mit Glucose					
	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>
mit HPLC												
5,7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Tabelle 3.14: Diese Tabelle zeigt die als 2'-Desoxythymidin identifizierte Signale aus den Wasser-Phasen der Kulturmedien von sechs Photobionten/Algen mit und ohne Glucose. Signale (■) in allen drei Replicates.

Vorkommen von Cyclo-(alanyl-tryptophanyl) in der Ethylacetat-Phase (99,63%)												
RT in min	ohne Glucose						mit Glucose					
	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>
mit HPLC												
18,5	-	■	-	■	-	■	-	■	■	■	■	-

Tabelle 3.15: Diese Tabelle zeigt die als Cyclo-(alanyl-tryptophanyl) identifizierte Signale aus den Wasser-Phasen der Kulturmedien von sechs Photobionten/Algen mit und ohne Glucose. Signale (■) in allen drei Replicates.

Vorkommen von Cyclo-(prolyl-tyrosyl) in der Ethylacetat-Phase (98,11%)												
RT in min	ohne Glucose						mit Glucose					
	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>	<i>F. bra.</i>	<i>F. ful.</i>	<i>T. sed.</i>	<i>X. ele.</i>	<i>L. lur.</i>	<i>M. bis.</i>
mit HPLC												
18,7	■	■	-	■	■	-	■	■	■	■	-	-

Tabelle 3.16: Diese Tabelle zeigt die als Cyclo-(prolyl-tyrosyl) identifizierte Signale aus Wasser-Phasen der Kulturmedien von sechs Photobionten/Algen mit und ohne Glucose. Signale (■) in allen drei Replicates.

3 Ergebnisse

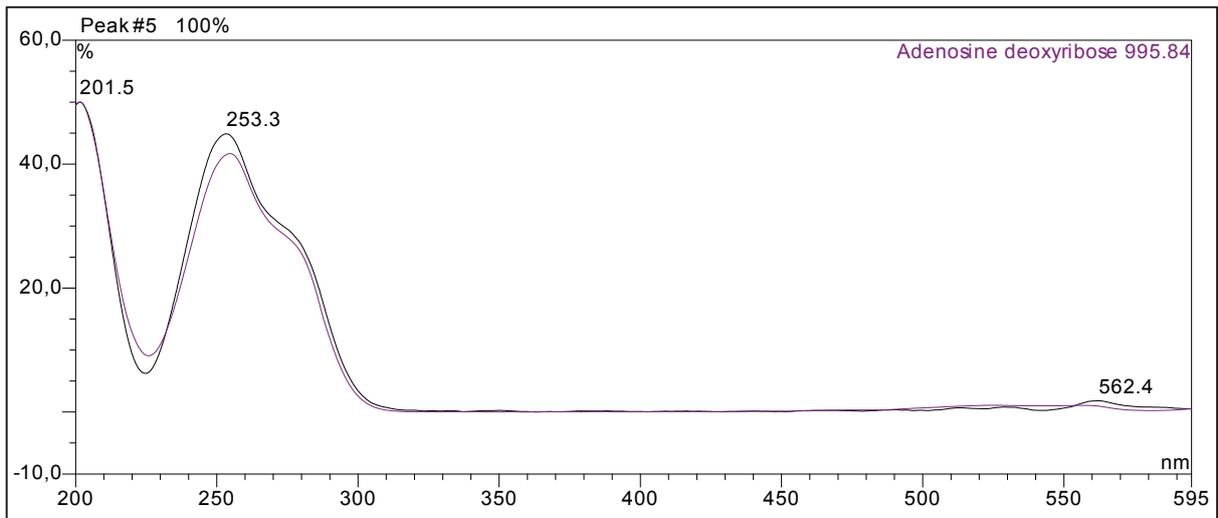


Abbildung 3.32: UV/VIS-Spektrum in der HPLC, als 2'-Desoxyadenosin identifiziert

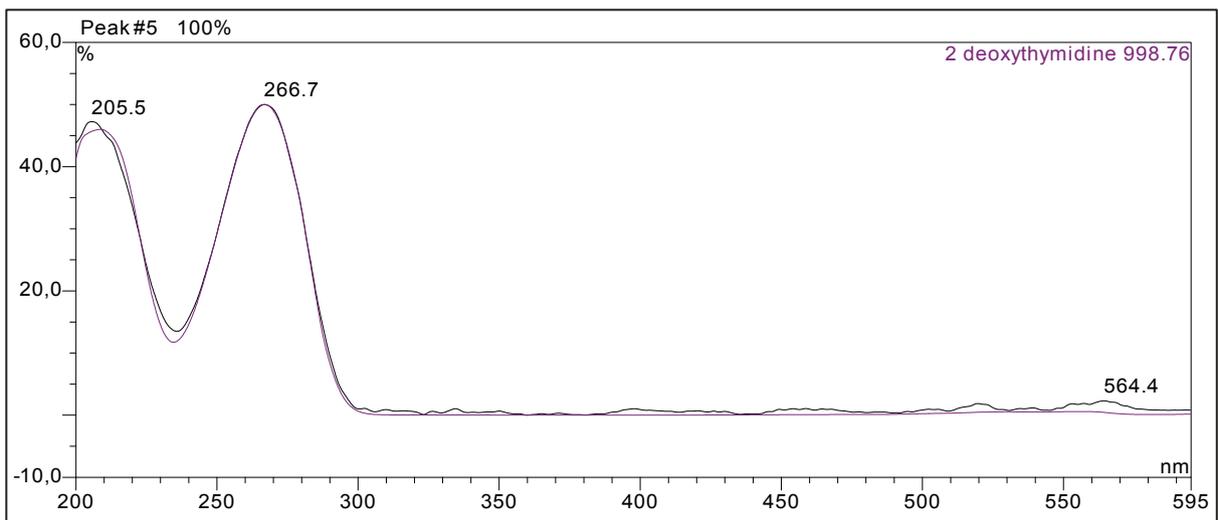


Abbildung 3.33: UV/VIS-Spektrum in der HPLC, als 2'-Desoxythymidin identifiziert

3.2.4 Auswirkungen auf den Mycobionten von *Fulgensia bracteata*

Das Kapitel 3.2.3 beschreibt die Auswirkungen, die die Zugabe der vier sicher identifizierten Substanzen (Indol-3-carbaldehyd, L-Rhamnose, Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) und Cyclo-(leucyl-tyrosyl) auf das Keimungs- und das Wachstumsverhalten des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* hervorruft. Die Substanzen werden dazu nach der in Kapitel 2.2.4.6 beschriebenen Methode den Kulturmedien zugefügt. Anschließend werden die Keimungsraten quantitativ (Kapitel 3.2.4.1) und das Hyphenwachstum (Kapitel 3.2.4.2) qualitativ erfasst.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen ist die Beobachtung, dass keine der applizierten Substanzen in der Lage ist, den bereits in Kapitel 3.1.4.1 beschriebenen „*growth arrest*“ des Mycobionten zu überwinden. Nach 10, aber auch nach 30 Tagen Kulturdauer zeigen sich in keinem Fall Hyphenlängen oder Wachstumsmuster, die größer oder differenzierter sind, als die in Kapitel 3.1.1.1 für die Kontrollproben beschriebenen. Trotz der im Folgenden dargestellten Einflüsse der Substanzen auf den auskeimenden Mycobionten von *F. bracteata* wird dieser „*growth arrest*“ in keinem untersuchten Fall aufgehoben.

3.2.4.1 Auswirkungen auf die Keimungsrate

Für die vier identifizierten Substanzen kann gezeigt werden, dass sie die Keimung bzw. die Keimungsrate des Mycobionten von *F. bracteata* beeinflussen. Die Stärke dieses Einflusses ist in Abb. 3.34 als Keimungsrate in Abhängigkeit von der applizierten Substanz, der Konzentration (10^{-4} M oder 10^{-6} M) und der Kulturdauer (10 d oder 30 d) wiedergegeben. Für diese Untersuchung wird Wasser-Agar verwendet, der sich schon in den zuvor beschriebenen Versuchen (vgl. Kapitel 3.1.1) als geeigneteres Medium erwiesen hat. Parallel durchgeführte Untersuchungen auf MYS1-Agar ergeben – auch hier in Übereinstimmung mit den in Kapitel 3.1 dargestellten Resultaten – ein wesentlich heterogeneres Bild und sollen daher hier nicht weiter aufgeführt werden. Auch auf MYS1-Agar wird weder der *growth arrest* aufgehoben, noch zeigen sich Hyphenlängen oder Wachstumsmuster, die über die hier für Wasser-Agar dargestellten Ergebnisse hinausgehen. Die Anzahl der Replicates, also die Anzahl der Petrischalen in denen die Ascosporen ausgestreut und den verschiedenen Substanzen ausgesetzt wurden, beträgt für jeden Ansatz sechs und die Gesamtzahl der untersuchten Ascosporen ($n_1 + n_2 + \dots + n_6$) wird im Folgenden für jeden Ansatz angegeben.

Nach 10 Tagen beträgt die Keimungsrate von $n = 441$ Ascosporen in der Kontrolle $49 \pm 2,4$ %. Dieser Wert ist zwar geringer, als der der vergleichbaren Kontrollprobe in Kapitel 3.1.6 (ca. 63 %), allerdings wurden die hier verwendeten Apothecien zu einem anderen Zeitpunkt gesammelt (2004 anstelle von 2006). Jahrgangs- und Jahreszeitabhängige Sporenzahlen und Keimungsraten sind dabei nicht ungewöhnlich (vgl. Schaper 2004, Meeßen 2005). Nach 30 Tagen steigt die Keimungsrate von $n = 780$ untersuchten Ascosporen leicht auf $52 \pm 1,8$ %. Auch dieser Wert liegt, aus dem gleichen Grund, unter dem der vergleichbaren Kontrollprobe

in Kapitel 3.1.6 (ca. 82 %), zeigt aber wie dieser eine schwache Tendenz zur zeitverzögerten Nachkeimung mit zunehmender Kulturdauer. Diese Tendenz zeigt sich auch unabhängig von der Konzentration in den Ansätzen unter Einfluss von L-Rhamnose und von Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) und unter Einfluss von 10^{-6} M Cyclo-(leucyl-tyrosyl). Bei Zugabe von 10^{-4} M Cyclo-(leucyl-tyrosyl) zeigt sich dieser Effekt der Nachkeimung ebensowenig, wie bei Zugabe von Indol-3-carbaldehyd (10^{-4} und 10^{-6} M).

Die Zugabe der Substanzen Indol-3-carbaldehyd und L-Rhamnose bewirkt in beiden eingesetzten Konzentrationen und nach beiden Kulturauern eine auffällige Reduzierung der Keimungsrate. Mit 10^{-4} M Indol-3-carbaldehyd liegt sie nach 10 Tagen bei $33 \pm 2,6$ % (n = 323) und nach 30 Tagen bei $28 \pm 4,4$ % (n = 105), mit 10^{-6} M Indol-3-carbaldehyd nach 10 Tagen bei $39 \pm 3,2$ % (n = 227) und nach 30 Tagen bei $35 \pm 6,3$ % (n = 57).

Das spezifische Exudat des *F. bracteata*-Photobionten zeigt keinen keimungsfördernden Effekt auf den Mycobionten. Mit 10^{-4} M L-Rhamnose liegt die Keimungsrate nach 10 Tagen bei $33 \pm 2,6$ % (n = 922) und nach 30 Tagen bei $28 \pm 4,4$ % (n = 983), mit 10^{-6} M L-Rhamnose nach 10 Tagen bei $39 \pm 3,2$ % (n = 178) und nach 30 Tagen bei $35 \pm 6,3$ % (n = 101). Die nicht stattfindende Nachkeimung unter Einfluss von Indol-3-carbaldehyd deutet dabei auf eine Keimungshemmung hin, die erfolgende Nachkeimung unter Einfluss von L-Rhamnose hingegen auf eine Verzögerung oder Verlangsamung der Keimung.

Nach 10 Tagen unter Einfluss von 10^{-4} M und von 10^{-6} M Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) lässt sich mit Keimungsraten von $50 \pm 2,8$ % (mit n = 329) und $48 \pm 1,8$ % (mit n = 783) kein signifikanter Unterschied zur Keimungsrate der Kontrolle ($49 \pm 2,4$ %) feststellen. Allerdings fällt bei beiden Konzentrationen die Nachkeimung bis zum 30. Versuchstag sehr deutlich aus. Nach 30 Tagen unter Einfluss von 10^{-4} M Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) steigt die Keimungsrate auf $80 \pm 2,14$ % (mit n = 351) an, unter Einfluss von 10^{-6} M Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) steigt sie auf $60 \pm 1,6$ % an (n = 911). In beiden Fällen wird die Keimungsrate der Kontrolle ($52 \pm 1,8$ %) übertroffen und es zeigt sich eine deutlich positiv korrelierte Keimungsförderung mit der Konzentration an appliziertem Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl). Die höhere Konzentration an Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) führt dabei zu einer höheren Keimungsrate der Sporen des Mycobionten.

Das für den *Asterochloris*-Photobionten aus *Lecidea lurida* spezifische zyklische Dipeptid Cyclo-(leucyl-tyrosyl) hat in einer Konzentration von 10^{-4} M keinerlei Effekt auf die Keimungsrate der Sporen des *F. bracteata*-Mycobionten. Mit $51 \pm 2,6$ % nach 10 Tagen (n = 377) und $52 \pm 3,4$ % nach 30 Tagen (n = 213) zeigen sich nur marginale Unterschiede zur Kontrolle ($49 \pm 2,4$ % nach 10 und $52 \pm 1,8$ % nach 30 Tagen). Bei der geringeren Konzentration von 10^{-6} M lässt sich allerdings ein leicht keimungsverzögernder Einfluss feststellen ($37 \pm 2,9$ % nach 10 Tagen, n = 289), der sich allerdings mit fortschreitender Kulturdauer auf einen nur leicht verminderten Wert nivelliert ($44 \pm 4,3$ % nach 30 Tagen, n = 135).

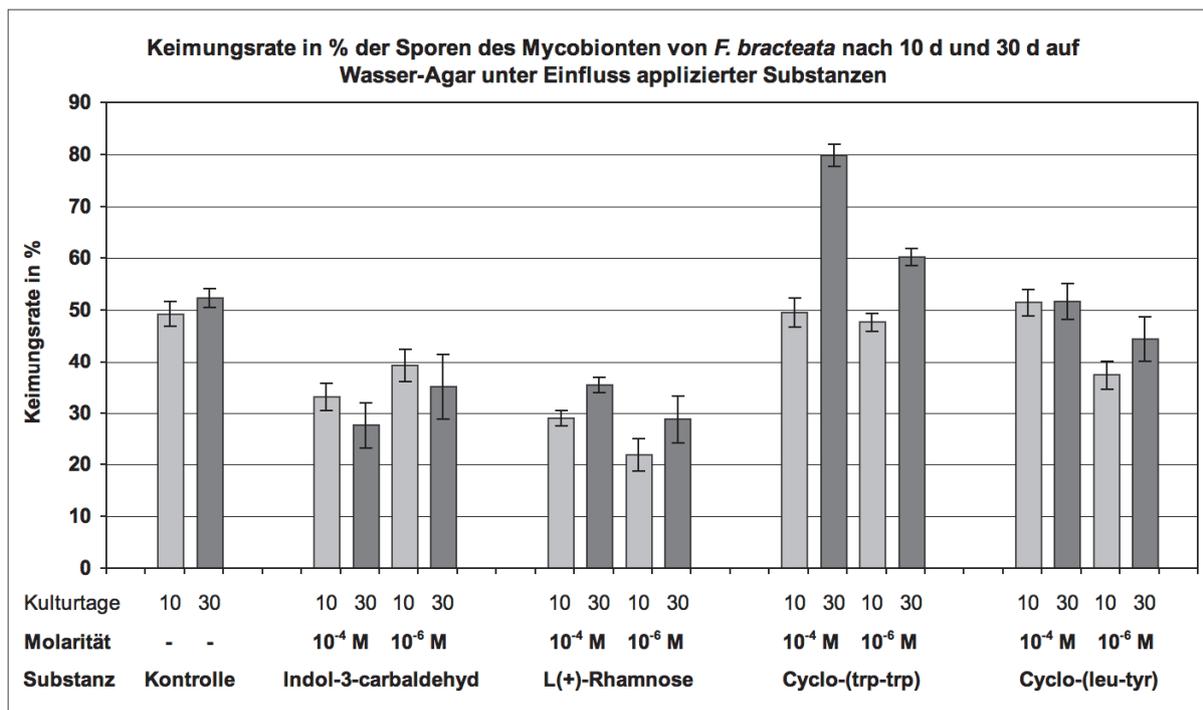


Abb. 3.34: Keimungsrate in % der Sporen des Mycobionten von *F. bracteata* nach 10 und 30 Tagen auf Wasser-Agar unter Einfluss von vier applizierten Substanzen. Die obere Zeile der x-Achsenbeschriftung gibt die Kulturdauer in Tagen an, die mittlere Zeile die Konzentration der vier Substanzen und die untere Zeile die Identität der Substanzen bzw. der Kontrolle. Die Keimungsrate ist in % mit jeweiliger Standardabweichung angegeben.

3.2.4.2 Auswirkungen auf das Hyphenwachstum

Neben der Keimungsrate wird das frühe Hyphenwachstum des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* untersucht. Wie bereits beschrieben, kann keine der Substanzen das Mycobiontenwachstum soweit stimulieren, dass der „*growth arrest*“ aufgehoben wird und die Mycobionten-Entwicklung über sehr frühe Stadien hinausgeht. Das begrenzte Hyphenwachstum führt zur fehlenden Differenzierung der Mycelien. Das Wachstum der Kontrolle entspricht dem in Kapitel 3.1.1 beschriebenen, Gallertbildung und Verzweigungen sind selten. Letztere werden nach 10 Tagen von ca. 2 % aller Mycelien gebildet, diese Zahl steigt zum 30. Versuchstag auf ca. 10 % an. *Hyphal tip swellings* in der beschriebenen, bauchigen Form sind selten, allerdings zeigen viele Hyphen Verbreiterungen der Hyphenspitze (Abb. 3.35a, h, i). Abbildung 3.35 zeigt keimende Sporen von *F. bracteata* nach 10 Tagen Kulturdauer. Aufgrund des „*growth arrest*“ zeigt sich zwar bis zum 30. Versuchstag ein geringer Zuwachs, aber die generellen Wachstumsmuster ändern sich nicht. Abbildung 3.35a zeigt das typische Hyphenwachstum unter Kontrollbedingungen. Die Abbildungen 3.35b-d zeigen ein Hyphenwachstum mit 10^{-4} und 10^{-6} M Indol-3-carbaldehyd (b, c) sowie 10^{-4} und 10^{-6} M L-Rhamnose (d, e). Unter diesen Bedingungen weisen viele Hyphen ein gehemmtetes Wachstum mit kurzen, hakenförmig gekrümmten Keimhyphen auf, das in dem gezeigten Zustand verhartet (Abb. 3.35 b,d,e). Der negative Effekt beider Substanzen auf die Keimungsrate wird durch ein gehemmtetes Hyphenwachstum begleitet.

Abbildung 3.35f-g zeigt das Hyphenwachstum mit 10^{-4} M (g) und 10^{-6} M (f) Cyclo-(trp-trp). Die erhöhte Keimungsrate geht mit einer leichten Zunahme von Hyphenlänge (g) und Verzweigungsrate (ca. 25 %, f, 10^{-6} M) einher. Die Abbildungen 3.35h-i belegen, dass Cyclo-(leu-tyr) ebensowenig einen Effekt auf das Hyphenwachstum zeigt, wie auf die Keimungsrate.

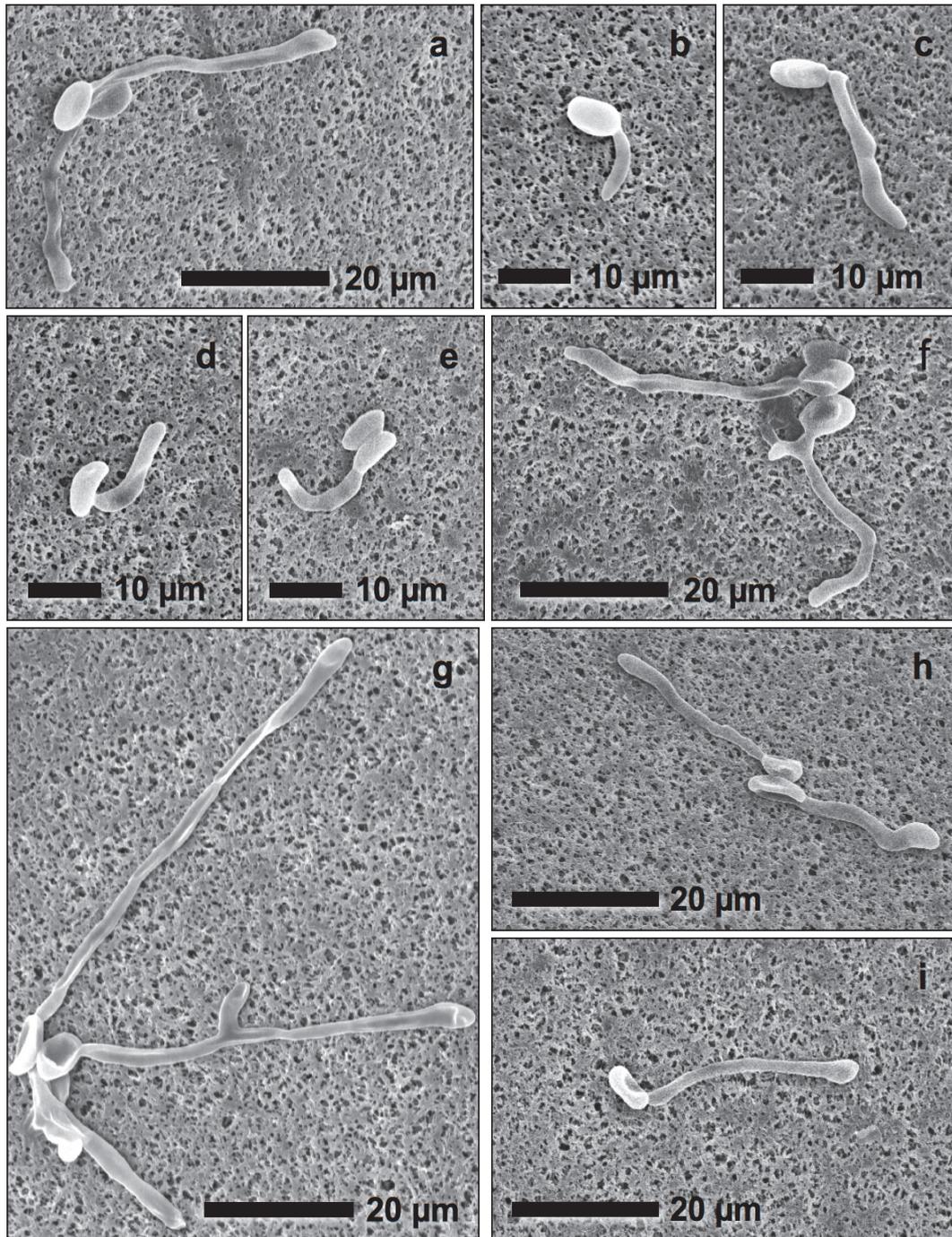


Abb. 3.35: Hyphenwachstum von *F. bracteata* nach 10 Tagen unter Einfluss applizierter Substanzen. a) Kontrolle, b,c) 10^{-4} und 10^{-6} M Indol-3-carbaldehyd, d,e) 10^{-4} und 10^{-6} M L-Rhamnose, f,g) 10^{-6} und 10^{-4} M Cyclo-(trp-trp), h,i) 10^{-4} und 10^{-6} M Cyclo-(leu-tyr). Erläuterungen im Text

3.2.5 Exkurs: Exudate des Mycobionten von *Fulgensia bracteata*

Neben den Photobionten wird auch der Mycobiont von *Fulgensia bracteata* auf Exudate hin untersucht, nachdem es gelungen ist, den Mycobionten in Flüssigmedium zu kultivieren. Aufgrund von zeitlichen Beschränkungen konnte das Exudationsverhalten des Mycobionten nicht detailliert untersucht werden. Es können lediglich die Chromatogramme und UV/VIS-Spektren von HPLC-Untersuchungen der Ethylacetat-Extrakte mit je vier Replicates des sterilen Kulturmediums MYS1 und des darin für sechs Wochen kultivierten Mycobionten ausgewertet werden. Es können auch in dieser Untersuchung Substanzen detektiert werden, die sich nicht im Kontrollmedium finden lassen. Dies legt nahe, dass auch der Mycobiont, ebenso wie die Photobionten, Substanzen in das Kulturmedium exudiert. Die nachfolgende Tabelle 3.17 zeigt die Retentionszeiten (RT in min) der gefundenen Signale. Dabei können vier Signale (RT = 15,9; 16,5; 25,2 und 31,3 min) in allen vier Replicates nachgewiesen werden, während fünf weitere Signale zwar spezifisch für den Mycobionten zu sein scheinen, sich aber nicht in allen vier Replicates nachweisen lassen (RT = 8,8; 18,5; 25,8; 30,3 und 32,5 min). In den Wasser-Extrakten finden sich keine eindeutig Mycobionten-spezifischen Signale. Über die Identität der gefundenen Substanzen lassen sich keine weiteren Angaben machen, da weder die UV/VIS-Spektren aussagekräftige Übereinstimmungen mit der Datenbank ergeben, noch die Substanzen aus den oben genannten Gründen einer genaueren Untersuchung unterzogen worden sind. Trotz dieser Unwägbarkeiten bleibt festzustellen, dass auch der Mycobiont Substanzen exudiert und diese eine potenzielle Signalwirkung aufweisen könnten.

RT in min	Signale in 4/4 der Replicates	Signale in 3/4 der Replicates
8,8	-	□
15,9	■	-
16,5	■	-
18,5	-	□
25,2	■	-
25,8	-	□
30,3	-	□
31,3	■	-
32,5	-	□

Tabelle 3.17: HPLC-Signale der Ethylacetat-Phase des Mycobionten von *F. bracteata*. Signale, die sich in allen 4 Replicates (■) oder in 3 von 4 untersuchten Replicates (□) finden.

3.3 Differenzielle Genexpression der Bionten

3.3.1 Ergebnisse zur mRNA-Isolation aus den Bionten

Dieses Unterkapitel fasst die Ergebnisse der Biontenkultur, der Gesamt-RNA-Isolation und der mRNA-Isolation zusammen. Die Durchführung dieser Experimente wird in den Kapiteln 2.2.5.1 bis 2.2.5.6 ausführlich beschrieben. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgt dabei mit einer heißen Phenol-Chloroform-Extraktion, an die sich ein DNase-Verdau, eine Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Gesamt-RNA, eine nachfolgende mRNA-Isolation mit dem PolyAtract[®] mRNA Isolationssystem (Promega Inc., Madison, USA) und eine abermalige Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der mRNA anschließt.

Die SSH wird sowohl mit Bionten durchgeführt, die auf Agar kultiviert werden, als auch mit solchen, die in Flüssigmedium angezogen werden. Für den ersten SSH-Ansatz werden 14 Agarplatten mit dem Mycobionten von *Fulgensia bracteata* verwendet, 12 Platten mit dem Photobionten von *F. bracteata* und 14 Platten, auf denen beide Bionten für 28 d gemeinsam kultiviert werden. Die Ausbeute in Gramm Frischgewicht (g FG) liegt für den Mycobionten bei 0,56 bis 1,59 g FG mit einem Mittelwert von 1,12 g FG pro Platte und insgesamt 15,73 g FG Mycobiontenmaterial für die nachfolgende Gesamt-RNA-Isolation. Für den Photobionten liegt sie bei 0,38 bis 1,55 g FG pro Platte mit durchschnittlich 0,66 g FG und einer Ausbeute von 7,90 g FG. Für die kombinierte Biontenkultur ergeben sich Werte zwischen 0,27 und 2,04 g FG mit einem Mittelwert von 1,36 g FG und einer Gesamtausbeute von 19,09 g FG.

Für die Flüssigkulturen werden 16 Kolben mit Mycobiont, 17 Kolben mit Photobiont und 18 Kolben mit einer Suspension gemeinsam kultivierter Bionten eingesetzt. Die Gesamtausbeute beträgt für den Mycobionten 13,45 g FG mit durchschnittlich 0,84 g FG pro Kolben, für den Photobionten 18,57 g FG mit durchschnittlich 1,09 g FG pro Kolben und bei den gemeinsam kultivierten Bionten 44,33 g FG mit durchschnittlich 2,46 g FG pro Kolben. Als erstes Ergebnis zeigt sich, dass die gemeinsam kultivierten Bionten in Flüssigmedium ein stärkeres Wachstum gegenüber den isoliert angezogenen Bionten zeigen. Dies wird insofern deutlich, als dass sich die Mycobiontenbewuchsdichte der Kolben vor der Zugabe des Photobionten zwischen den Ansätzen MB und MB+PB nicht unterscheiden und der Photobiont nur in geringen Mengen (6 ml Zellsuspension) zugegeben wird. Nach der gemeinsamen Kulturdauer zeigt sich ebenfalls, dass so gut wie alle Photobionten während der gemeinsamen Kultur im Schüttler in die kugelförmigen Mycelien des Mycobionten inkorporiert werden. Die gemeinsame Kultur führt zu einem intensiven Kontakt der beiden Bionten. In der gemeinsamen Kultur auf Agar zeigen sich weder auffällige morphologische Veränderungen, noch ein bemerkenswerter Zuwachs gegenüber den einzeln kultivierten Bionten.

Da die SSH eine besonders kosten- und zeitintensive Methodik ist, werden diese einzelnen Proben – also die 12 bis 18 Platten bzw. Kolben pro Ansatz als Replicates im eigentlichen Sinne – im Verlauf der mRNA-Isolation sukzessive vereinigt bis am Ende jeweils ein Ansatz an aufgereinigter und konzentrierter mRNA pro Versuchsansatz zur Verfügung steht. In

diesem Ansatz nivellieren sich eventuelle individuelle Expressionsunterschiede in den Kolben in einem Maße, als dass sich eine ausgeglichene und repräsentative mRNA-Population eines jeden Ansatzes herausbildet.

Die jeweiligen Ergebnisse der einzelnen Arbeitsschritte bis zur endgültigen mRNA-Isolation und -Aufreinigung finden sich in Tabelle 3.18 für die Kultur auf Agar und in Tabelle 3.19 für die Kultur in Flüssigmedium. Bei den Agar-Kulturen ergibt sich eine Ausbeute an Gesamt-RNA von 513,7 µg für den MB-Ansatz, 1236,0 µg für den PB-Ansatz und 633,7 µg für den MB+PB-Ansatz, während die mRNA-Ausbeuten bei 11,8 sowie 23,7 und 7,7 µg liegen. Bei den Flüssigkulturen ergibt sich stets eine größere Ausbeute an Gesamt-RNA und mRNA. Die Gesamt-RNA-Ausbeuten betragen 632,1 µg für den MB-Ansatz, 2521,7 µg für den PB-Ansatz und 2778,0 µg für den MB+PB-Ansatz. Die mRNA-Ausbeuten liegen dementsprechend höher bei respektive 14,7 sowie 69,4 und 55,7 µg. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Menge an mRNA, die isoliert werden kann, sehr gut mit den Literaturwerten über den Anteil von 1-5 % an mRNA an der Gesamt-RNA übereinstimmt (Janning & Knust 2008). Die Werte schwanken in dieser Isolation zwischen 1,2 % und 2,8 % und liegen damit in fünf von sechs Fällen nahe an den für Eukaryoten durchschnittlichen 2 % (Mülhardt 2009). Die Werte betragen bei Agarkultur 2,3 % (MB), 2,8 % (PB) und 2,0 % (MB+PB), sowie bei Flüssigkultur 2,3 % (MB), 1,9 % (PB) und 1,2 % (MB+PB). Die finalen Ausbeuten liegen aufgrund von Verlusten in den zur Aufkonzentrierung notwendigen Fällungsschritten niedriger. Sie betragen bei den Agarkulturen 5,5 µg (MB), 17,6 µg (PB) und 4,5 µg (MB+PB), bei der Flüssigkultur 7,0 µg (MB), 42,5 µg (PB) und 28,0 µg (MB+PB).

Die isolierten Proben der Gesamt-RNA werden in 1,2 %igen Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Auf diese Weise lässt sich die Qualität der Gesamt-RNA überprüfen. Die Abbildungen 3.34a-c zeigen exemplarisch diese Auftrennung der Gesamt-RNA von Mycobionten-, Photobionten- und Kulturen gemeinsam angezogener Bionten. In diesen Gelen sind deutlich die breiten Banden der rRNA in der Mitte der Laufstrecke und die verwaschenen Wolken an kleiner tRNA zu erkennen, die sich in den unteren Bildbereichen an der Lauffront des Gele ansammeln. Die oberhalb, zwischen und unterhalb der rRNA-Banden sichtbaren lang ausgezogenen und diffusen Schatten stellen die mRNA dar, die wie oben beschrieben nur einen geringen Teil der Gesamt-RNA ausmacht. Der Asterisk (*) in Abb. 3.34b markiert zum Vergleich eine Probe, deren Gesamt-RNA durch RNase-Aktivität degradiert ist. So zeigt sich anschaulich der Abbau von RNA durch RNasen hin zu kleineren RNA-Fragmenten.

Während Qualität und Quantität der Gesamt-RNA sowohl photometrisch, als auch gelelektrophoretisch überprüft werden, wird die mit dem PolyATtract[®] mRNA Isolationssystem (Promega Inc., Madison, USA) isolierte mRNA aufgrund der zu erwartenden geringen Menge an Ausbeute nur photometrisch und nicht mehr zusätzlich in

Biontenkultur		RNA-Isolation				mRNA-Isolation			Gesamt	
Nr. der Platte	Menge [g] FG	Nr. der Probe	Menge [g] FG	RNA [µg/ml]	RNA [µg]	vereinigte Proben-Nr.	mRNA [µg/ml]	mRNA [µg]	mRNA [µg]	
1	1,52	1	2,69	574	94,4	1	5,7	1,4	5,5	
2	1,18									
3	1,21	2	2,65	498	196,5	2	25,3	6,3		
4	1,44									
5	1,01	3	2,09	657	222,8	3	16,4	4,1		
6	1,09									
7	0,66	4	1,81	840	383,3	3	32,3	8,1		
8	1,16									
9	1,06	5	2,37	1124	276,3	4	19,1	4,8		
10	1,31									
11	1,18	6	2,77	1044	297,6	5	14,8	3,7		
12	1,59									
13	0,79	7	1,38	1184	121,7	1	5,4	1,4		
27	0,56									
1	0,57	1	0,95	1054		150,9	2	12,5	3,1	
2	0,38									
3	0,54	2	0,94	1734		175,1	3	12,5	3,1	
4	0,40									
5	0,47	3	1,14	1701		186,0	4	12,2	3,1	
6	0,67									
9	0,40	5	1,04	2132		186,0	1	5,4	1,4	
10	0,64									
7	0,69	4	1,39	2763			175,1	3	12,5	3,1
8	0,70									
11	1,55	6	2,45	2976	175,1		3	12,5	3,1	
12	0,90									
14	1,41	1	2,82	819	175,1		3	12,5	3,1	
15	1,41									
16	2,04	2	3,17	808	175,1		3	12,5	3,1	
17	1,13									
18	1,53	3	3,17	1108	175,1		3	12,5	3,1	
19	1,65									
20	1,38	4	3,01	1334	175,1	3	12,5	3,1		
21	1,37									
23a	0,27	5	3,53	834	175,1	3	12,5	3,1		
22	1,70									
24	1,83	6	3,39	1443	175,1	3	12,5	3,1		
25	1,44									
26	1,31	6	3,39	1443	175,1	3	12,5	3,1		
23b	0,64									

Tab. 3.18: Ergebnisse für die SSH-Kulturen auf MYS1-Agar: Die Tabelle gibt unter „Biontenkultur“ die Ausbeute für die drei Kulturansätze in [g] Frischgewicht (FG) aus den einzelnen Kulturansätzen wieder, unter „RNA-Isolation“ die dafür eingesetzte Menge in [g] FG, die Konzentration der erhaltenen RNA [µg/ml] und die Gesamtmenge [µg] und unter „mRNA-Isolation“ die Ausbeuten an mRNA in [µg/ml] und in [µg]. Für die mRNA-Isolation wird die Ausbeute der RNA-Isolationen vollständig eingesetzt. Ganz rechts wird die Gesamtmenge an mRNA angegeben, die für die nachfolgende SSH und die Hybridisierungsexperimente zur Verfügung steht. Die einzelnen Ansätze werden – statt Replicates – für die ressourcenintensive SSH vereinigt.

der Gelelektrophorese überprüft. Allerdings wird in einer zusätzlichen Versuchsprobe die mRNA mit dem Oligotex[®] mRNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, D, nach Oligotex[®] Spin Column Protocol) isoliert und danach gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.35 dargestellt und zeigt eine Aufreinigung von jeweils ca. 30 µg Gesamt-RNA aus Mycobiontenkulturen. Deutlich zeigt sich die breite und verwaschene Spur von mRNA mit den zwei Banden an rRNA, die sich in der Aufreinigung mit säulenbasierten Kits nur schwer vollkommen beseitigen lassen (Lucassen, mündl. Mitteilung). Die Menge an aufgetragener mRNA liegt, nach den oben beschriebenen prozentualen Verteilungen der einzelnen RNA-Arten zwischen 0,3 und 1,5 µg, ungefähr bei ca. 0,6 µg mRNA.

3 Ergebnisse

Biontenkultur		RNA-Isolation			mRNA-Isolation			Gesamt
Nr. des Kolbens	Menge [g] FG	Nr. der Probe	RNA [µg/ml]	RNA [µg]	RNA [µg]	vereinigte Proben-Nr.	mRNA [µg/ml]	mRNA [µg]
1								
2								
3	3,61	1	326	32,6				
4					206,4	1	17,6	4,4
7	1,63	4	957	78,1				
9 b								
12	2,16	6	781	95,7				
13								7,0
5	1,39	2	1159	115,9	215,7	2	19,2	4,8
8								
14	0,95	7	999	99,9				
15								
6	1,53	3	1040	104,0	210,0	3	21,9	5,5
9 a								
10	2,17	5	1060	106,0				
11								
19								
20	3,70	1	4139	413,9	413,9	1	51,7	12,9
26								
21								
22	2,72	2	4578	457,8	457,8	2	48,5	12,1
27								
23								
24	4,34	3	4838	483,8	483,8	3	60,2	15,1
28								42,5
1								
2	2,66	4	5321	532,1	532,1	4	55,7	13,9
11								
A								
B	2,62	5	3771	377,1	634,1	5	61,7	15,4
C								
D	2,55	6	2571	257,1				
E								
31								
32	9,30	1	1867	373,5	373,5	1	32,0	8,0
30 a								
33								
34	9,51	2	1997	427,3	427,3	2	35,1	8,8
30 b								
36								
37	7,58	3	2136	399,4	399,4	3	41,8	10,5
30 c								
38								28,0
39	6,02	4	1736	347,1	671,9	4	64,8	16,2
44 a								
40								
41	6,58	5	1624	324,8				
44 b								
42								
43	5,34	6	4530	905,9	905,9	5	48,9	12,2
44 c								

Tab. 3.19: Ergebnisse für die SSH-Kulturen in Flüssigkultur: Die Tabelle gibt unter „Biontenkultur“ die Ausbeute für die drei Kulturansätze in [g] Frischgewicht (FG) aus den einzelnen Kulturansätzen wieder, unter „RNA-Isolation“ die dafür eingesetzte Menge in [g] FG, die Konzentration der erhaltenen RNA [µg/ml] und die Gesamtmenge [µg] und unter „mRNA-Isolation“ die Ausbeuten an mRNA in [µg/ml] und in [µg]. Für die mRNA-Isolation wird die Ausbeute der RNA-Isolationen vollständig eingesetzt. Ganz rechts wird die Gesamtmenge an mRNA angegeben, die für die nachfolgende SSH und die Hybridisierungsexperimente zur Verfügung steht. Die einzelnen Ansätze werden – statt Replicates – für die ressourcenintensive SSH vereinigt.

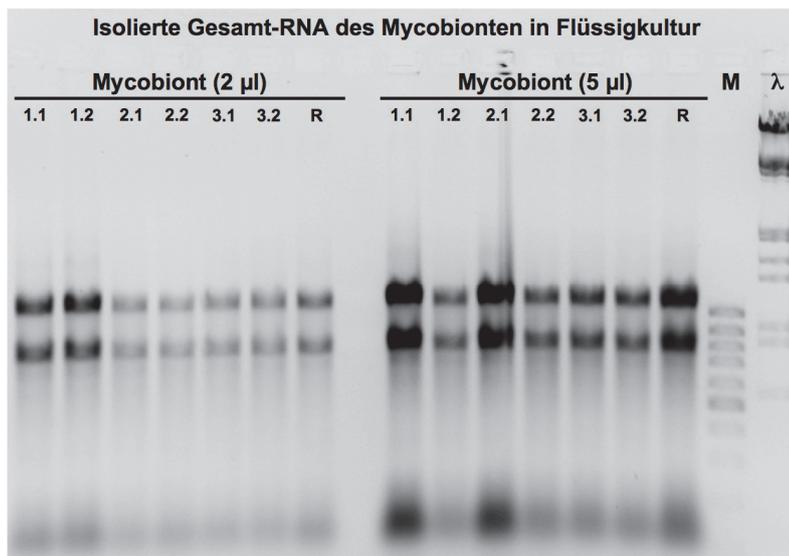


Abb. 3.36a



Abb. 3.36b

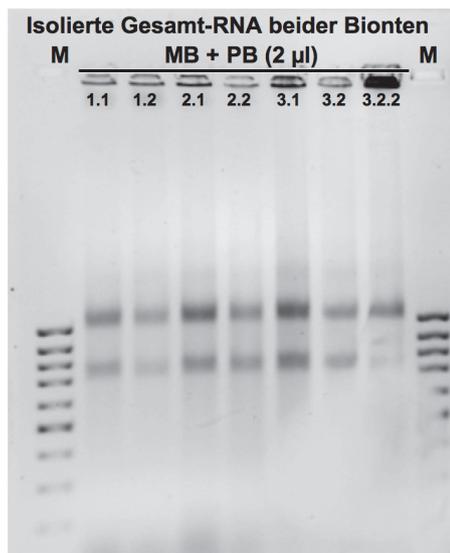


Abb. 3.36c

Abb. 3.36: Gelelektrophoretische Überprüfung der Qualität isolierter Gesamt-RNA aus Mycobionten (a), Photobionten (b) und gemeinsam kultivierter Bionten (c). Deutlich sind die breiten rRNA-Banden, oft der diffuse Verlauf der mRNA über einen Großteil der Laufstrecke und die Wolke an tRNAs an der Lauffront erkennbar. Die Probenidentität und die Auftragsmenge sind in den Abbildungen angegeben. λ = Hind III-verdaute Lambda-Phagen-DNA, M = Marker, der Asterisk (*) markiert eine Probe degradierter Gesamt-RNA zum Vergleich.

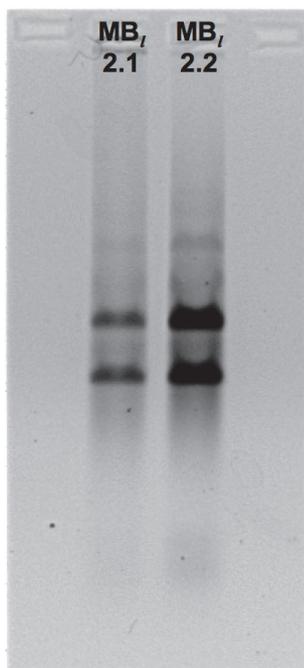


Abb. 3.37: mRNA-Isolation mit Oligotex[®] mRNA Mini Kit aus jeweils ca. 30 µg Gesamt-RNA aus Mycobiontenkulturen in Flüssigmedium

3.3.2 Suppressive Subtraktive Hybridisierung

Die Durchführung der SSH orientiert sich am Protokoll des Herstellers (PCR-Select[™] cDNA-Substraction Kit, Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA) und nach den in Kapitel 2.2.5.7 beschriebenen Prinzipien. Ziel der SSH-Methodik ist es, am Ende der Prozedur eine Population differenziell hochregulierter und eine Population differenziell herunterregulierter cDNA-Spezies zu erhalten. Die SSH wird für Kulturen von Festmedium und solchen aus Flüssigmedium durchgeführt. Im Folgenden sind lediglich die Zwischenergebnisse in diesem Prozess und die Ergebnisse der SSH aufgeführt. Die Überprüfung und die Identifikation der einzelnen cDNA-Spezies findet sich in den folgenden Kapiteln.

Nach der Transkription der mRNA in doppelsträngige cDNA wird ein Verdau der cDNA-Populationen mit dem Restriktionsenzym Rsa I (5'...GT↓AC...3') durchgeführt, um kürzere *blunt-end* cDNA-Fragmente zu generieren, die für die Adaptorligation nötig und für die Subtraktionsreaktion geeignet sind. Nach dem Verdau wird der Restriktionserfolg gelelektrophoretisch überprüft (Abb. 3.36). Die Abbildung zeigt die Testeransätze cDNA 1f (*forward, tester* für differenziell hochregulierte cDNA), cDNA 2r (*reverse, driver* für differenziell herunterregulierte cDNA) und 3 (cDNA aus menschlichem Skelettmuskulatur, als mitgelieferte Kontrolle, die parallel zu allen Schritten zur Überprüfung des Arbeitserfolges dient) vor und nach dem Verdau. Deutlich ist zu erkennen, dass die unverdaute cDNA (-) Längen zwischen 0,1 kb und deutlich über 1,0 kb aufweist und von guter Qualität ist. Nach dem Rsa I-Verdau (+) hat sich die durchschnittliche Länge der cDNAs hin zu kleineren Fragmenten verschoben, was an der größeren Laufstrecke zu erkennen ist. Abbildung 3.36 zeigt, dass die eingesetzte cDNA von guter Qualität ist und der Verdau erfolgreich.

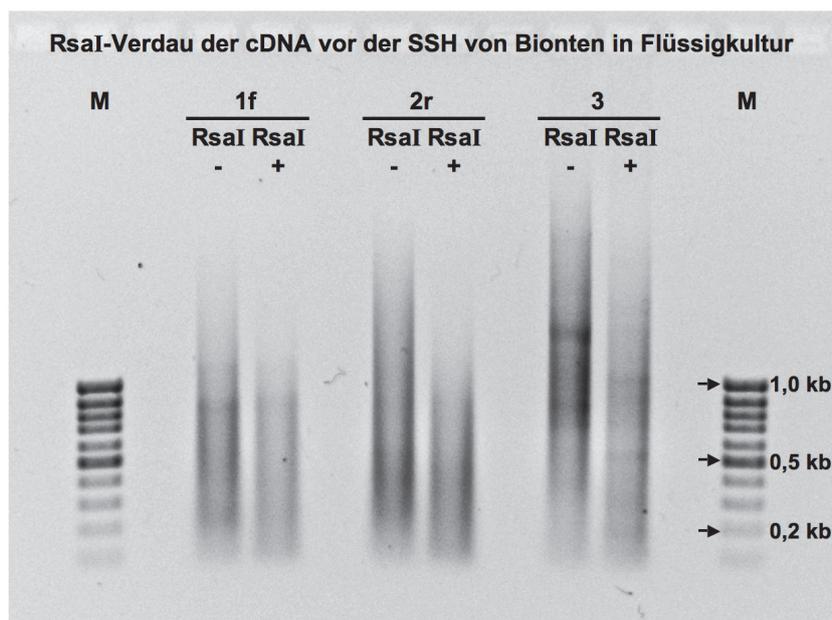


Abb. 3.38: Rsa I-Verdau der cDNA vor der SSH von Bionten in Flüssigkultur. Auftrag von je 2,5 µl der Proben 1f (*tester*), 2r (*driver*) und 3 vor Rsa I-Verdau (-) und danach (+) auf 1,2 % Agarosegel mit EtBr in TAE-Puffer. cDNA von guter Qualität, mit erfolgreichem Verdau verschieben sich die cDNA-Längen hin zu kürzeren cDNA-Fragmenten (Erläuterung im Text).

Im nächsten Arbeitsschritt werden die Adaptoren an die jeweiligen, in zwei Fraktionen aufgespaltenen tester-Ansätze, nicht aber an die driver-Ansätze ligiert. Nur so ist es möglich, in nachfolgenden subtraktiven PCR-Schritten die differenziell hochregulierten, also nur im tester vorhandenen cDNAs exponentiell zu amplifizieren, während alle anderen cDNAs überhaupt nicht oder nur linear amplifiziert werden können. Das Gelingen dieses Arbeitsschrittes wird mit einer Ligationseffizienzanalyse überprüft. Dieses PCR-Experiment ist derart gestaltet, dass nur PCR-Templates amplifiziert werden können, die die Verbindungsstellen zwischen Adaptor und cDNA überspannen. Dazu wird einerseits der zum Protokoll gehörende, die Adaptoren 1 und 2R gleichermaßen bindende PCR-Primer 1 verwendet, als auch der Primer für ein *housekeeping*-Gen, also ein stets exprimiertes Gen des Versuchorganismus. Da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung sowohl für den Mycobionten, als auch für den Photobionten von *Fulgensia bracteata* kein solches *housekeeping*-Gen bekannt war und damit auch der entsprechende Primer fehlte, konnte das Experiment nur mit der Kontrolle durchgeführt werden. Dazu wird die Adaptor-ligierte Kontrolle von cDNA aus menschlicher Skelettmuskulatur mit verschiedenen Primerkombinationen verwendet. Ziel dieses zusätzlichen Experimentes ist es, zu zeigen, dass die Ligationseffizienz der verwendeten Adaptoren bei $\geq 25\%$ lag, um eine anschließende Hybridisierung sicher zu ermöglichen. Neben einer Negativkontrolle ohne Primer-Zugabe werden vier PCR-Reaktionen in der unten aufgeführten Primer-Kombination angesetzt. Die Abbildung 3.37 zeigt das zu dieser PCR gehörende Gelbild und zeigt ebenso, dass die Adaptorligation in beiden Fällen – Adaptor 1 in Spur 1 und Adaptor 2R in Spur 4 – den

geforderten Wert von 25 % knapp erreicht. Die Abschätzung der Ligationseffizienz erfolgt anhand der bekannten Mengen des Markers. Zumindest für die parallel und identisch bearbeitete Kontrolle kann also von einer ausreichend erfolgreichen Ligation ausgegangen werden.

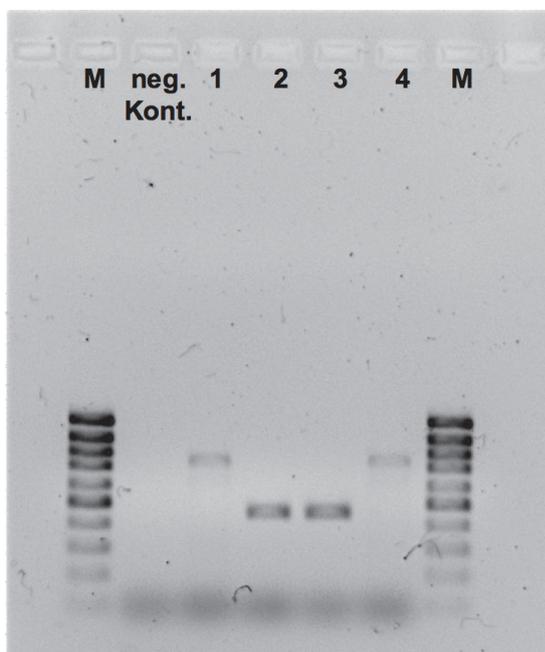


Abb. 3.39: Kontrolle der Ligationseffizienz der Adaptoren am Beispiel der Kontrolle von cDNA aus menschlicher Skelettmuskulatur mit einer Kombination von Adaptor-spezifischen PCR-Primern und Primern des *housekeeping*-Genes G3PDH. 1,2 %iges Agarosegel mit EtBr in TAE-Puffer: 1) 1 μ l *tester* 3-1 mit Adaptor 1 mit G3PDH 3'-Primer + PCR-Primer 1, 2) 1 μ l *tester* 3-1 mit Adaptor 1 mit G3PDH 3'-Primer + G3PDH 5'-Primer, 3) 1 μ l *tester* 3-2 mit Adaptor 2R mit G3PDH 3'-Primer + G3PDH 5'-Primer, 4) 1 μ l *tester* 3-2 mit Adaptor 2R mit G3PDH 3'-Primer + PCR-Primer 1. Erläuterungen im Text

Nach der Hybridisierung werden die PCR-Experimente der SSH durchgeführt, in denen differenziell exprimierte cDNAs exponentiell, nicht-differenzielle cDNAs nicht oder nur linear amplifiziert werden sollen. Die Ergebnisse dieser PCRs sind exemplarisch für Bionten in Flüssigkultur dargestellt (Abb. 3.38). Untersucht werden der subtrahierte *tester* zur Identifikation von kontaktspezifisch hochregulierten mRNAs (1f), der subtrahierte *tester* zur Identifikation von kontaktspezifisch herunterregulierten mRNAs (2r), der subtrahierte *tester* der Kontrolle von cDNA aus menschlicher Skelettmuskulatur (3) und mitgelieferte, bereits subtrahierte Kontroll-cDNA (4c). Parallel werden von jedem Ansatz Kontrollen nicht-subtrahierter cDNAs aufgetragen (1c, 2c, 3c). Nach 35 Zyklen in der ersten PCR-Reaktion zeigen sich keine sichtbaren Banden in den subtrahierten Ansätzen (1f, 2r, 3), wohl aber in den nicht-subtrahierten Kontrollen (1c, 2c, 3c). Nach 25 Zyklen in der zweiten *nested*-PCR finden sich in allen drei Proben (1c, 2r, 3) deutliche Banden, die kontaktspezifisch hochregulierte (1f) und herunterregulierte (2r) mRNAs repräsentieren. Auffällig ist in allen Fällen – auch bei zahlreichen Wiederholungen der SSH-PCR-Reaktionen – die stets geringe Länge der amplifizierten PCR-Fragmente. Dieses Phänomen lässt sich weder durch Konzentrationsänderungen von Primern oder *templates*, noch durch Änderung der Annealingtemperatur oder der Elongationsdauer umgehen.

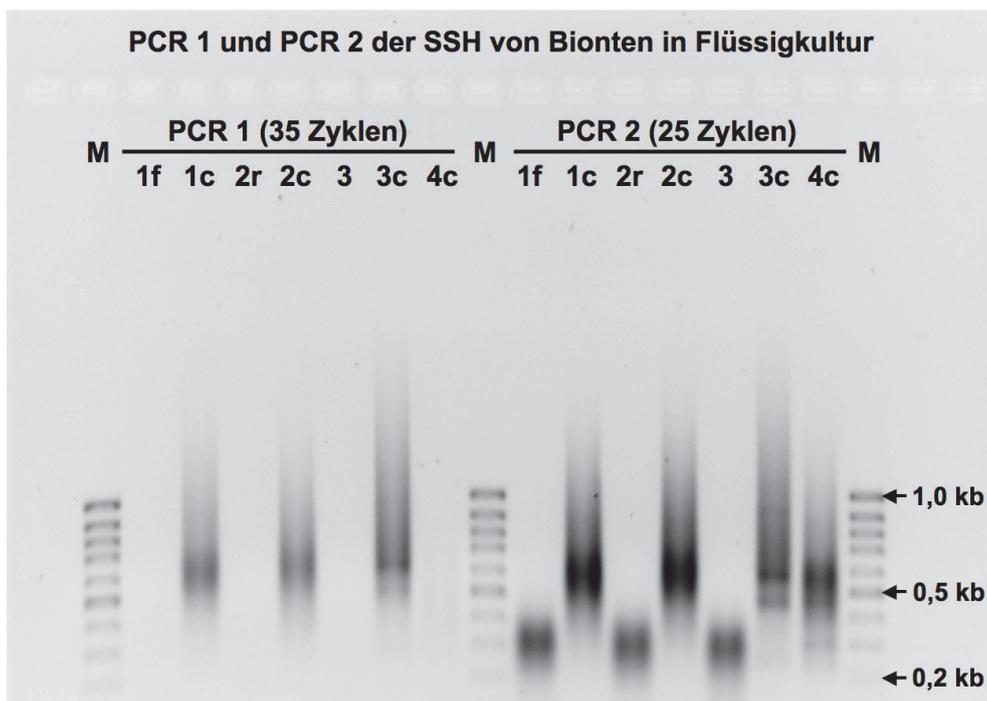


Abb. 3.40: PCR 1 und PCR 2 der SSH von Bionten in Flüssigkultur. PCR 1 mit 35 Zyklen, PCR 2 mit 25 Zyklen, 1f = *tester* subtrahierter hochregulierter cDNAs, 1c = *tester* nicht-subtrahierter hochregulierter cDNAs, 2r = *tester* subtrahierter runterregulierter cDNAs, 2c = *tester* nicht-subtrahierter runterregulierter cDNAs, 3 = *tester* subtrahierter Kontroll-cDNAs, 3c = *tester* nicht-subtrahierter Kontroll-cDNAs, 4c = subtrahierte Kontroll-cDNA. 1,2 %iges Agarosegel mit EtBr in TAE-Puffer. Erläuterungen im Text.

3.3.3 Ergebnisse der Klonierung und der Selektion

Nach der SSH werden beide cDNA-Populationen – die mit kontaktspezifisch hochregulierten und die mit kontaktspezifisch herunterregulierten cDNAs (1f und 2r aus Abb. 3.38) – sowohl aus Flüssigkultur, als auch aus Festkultur in einen Vektor ligiert und kompetente *E. coli*-Bakterien mit diesem Vektor transformiert (vgl. Kapitel 2.2.5.8). Die transformierten *E. coli*-Bakterien werden anschließend ausplattiert, blau-weiß selektioniert und die farblosen Bakterienkolonien werden auf Petrischalen mit LB-Agar (+Amp) im 96er-Mikrotiterplattenmuster überimpft. Die so aufgetragenen Klone werden erneut kultiviert und der Transformationserfolg, ebenso wie die Länge des Inserts für jede Kolonie mittels *colony*-PCR überprüft (vgl. Kapitel 2.2.5.9). Ab diesem Zeitpunkt werden nur die Ansätze 1f und 2r aus der SSH von Bionten in Flüssigkultur weiter bearbeitet. Dabei werden für den Ansatz 1f insgesamt 576 Klone ausgewählt (je 96 auf 6 quadratischen Petrischalen) und 480 Klone (je 96 auf 5 Petrischalen) für Ansatz 2r. Klone, die in der *colony*-PCR längere Inserts zeigen werden zusätzlich auf gesonderten Platten (1-1 und 2-1) angezogen. In den Gelbildern der *colony*-PCRs zeigen sich stets kurze Banden von 0,1 bis 0,3 kb, deren Länge mit der Länge der SSH-Banden in Abb. 3.38 korrelierte. 92 % der *colony*-PCRs zeigen klare Einzelbanden, während in den restlichen 8 % distinkte Einzelbanden oder verwaschene Banden auftreten. Kolonien die diese uneindeutigen Banden zeigen werden bei Bedarf durch Verdünnen und

Ausplattieren vereinzelt und einzelne Kolonien abermals mit *colony*-PCR überprüft. Exemplarisch werden die *colony*-PCR-Ergebnisse in den Abbildungen 3.39 und 3.40 gezeigt.

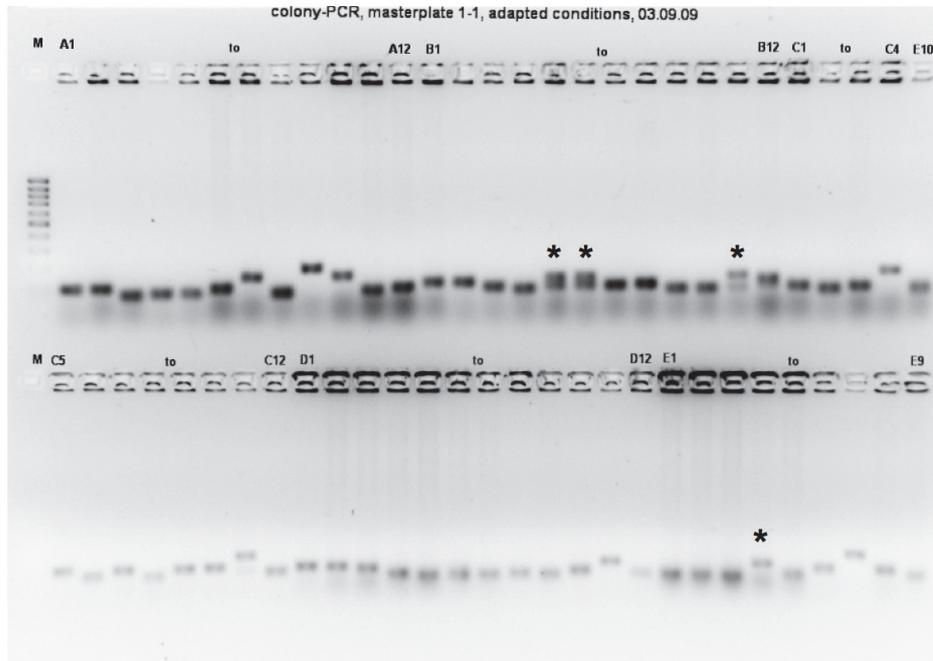


Abb. 3.41a

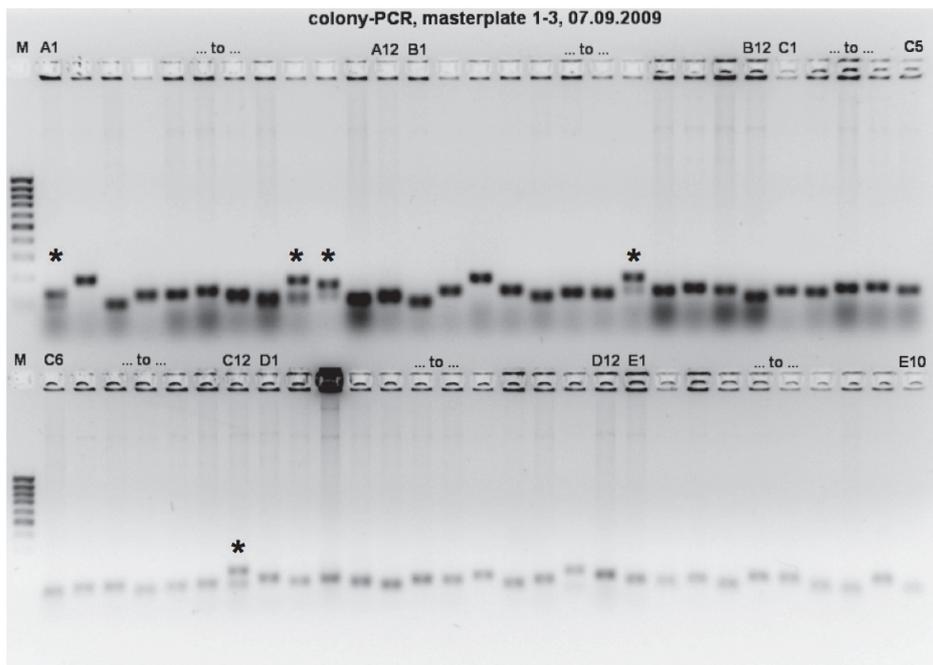


Abb. 3.41b

Abb. 3.41: Gelläufe der *colony*-PCRs der Platten 1-1 (a) und 1-3 (b) von Ansatz 1f für kontaktspezifisch hoch-regulierte cDNAs zur Überprüfung der Klone auf Inserts. Banden zeigen das Vorhandensein eines Inserts. Die Proben A1 bis E10 sind dargestellt, die restlichen (E11 bis H12) nicht. Die untere Bandenreihe erscheint wegen des ausgelaufenen EtBr stets blasser. Der Asterisk (*) markiert unerwünschte Doppelbanden (siehe Text).

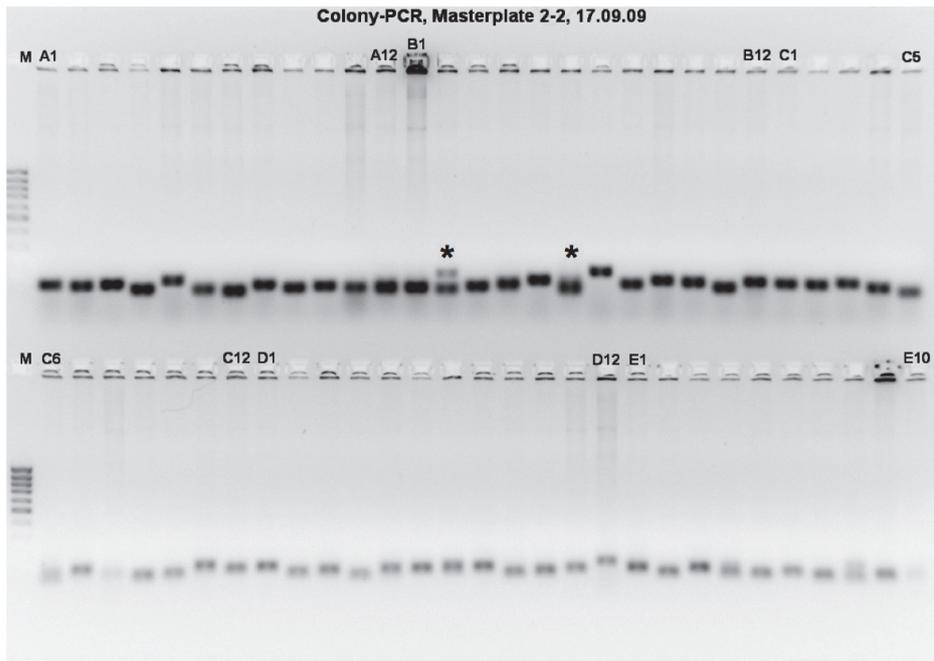


Abb. 3.42a

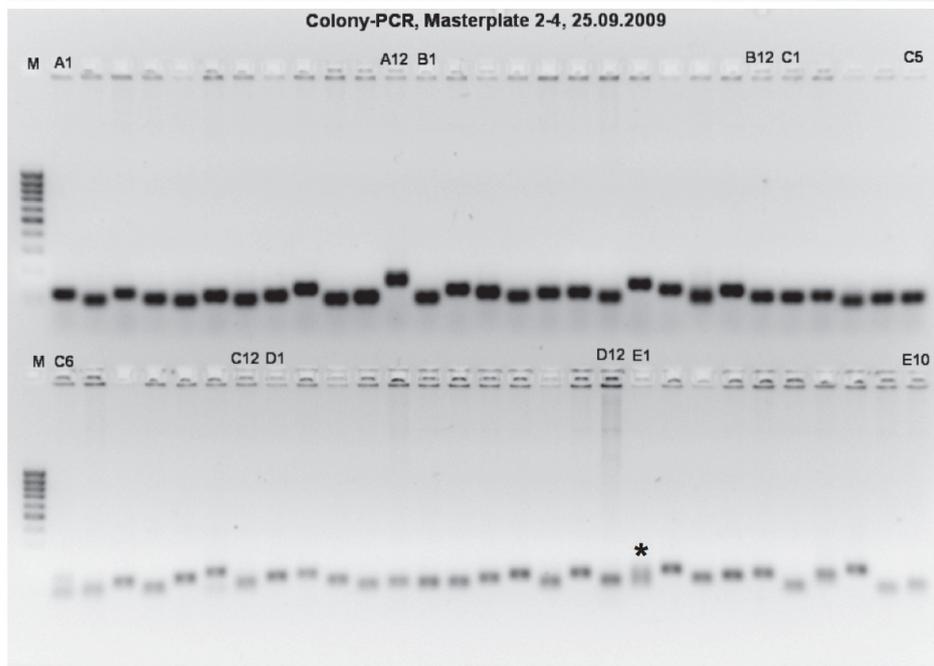


Abb. 3.42b

Abb. 3.42: Gelläufe der *colony*-PCRs der Platten 2-2 (a) und 2-4 (b) von Ansatz 2r für kontaktspezifisch herunter-regulierte cDNAs zur Überprüfung der Klone auf Inserts. Banden zeigen das Vorhandensein eines Inserts. Die Proben A1 bis E10 sind dargestellt, die restlichen (E11 bis H12) nicht. Die untere Bandenreihe erscheint wegen des ausgelaufenen EtBr stets blasser. Der Asterisk (*) markiert unerwünschte Doppelbanden (Erläuterungen siehe Text).

3.3.4 Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente

Die Hybridisierungsexperimente dienen in erster Linie dazu, die in der SSH amplifizierte cDNA-Spezies auf ihre tatsächliche kontakt-spezifisch differenzielle Expression hin zu überprüfen. Damit wird die Problematik falsch positiver Ergebnisse reduziert, aber auch die umfangreiche Menge an Klonen aus der SSH für die folgenden Sequenzierungen eingegrenzt. Das verwendete Verfahren wird in Kapitel 2.2.5.10 erläutert, die Ergebnisse im Folgenden beschrieben.

Die Auswertung ergibt, dass von den insgesamt 576 Klonen im hochregulierten Ansatz 1f 74 Klone (ca. 13 %) einen Expressionsunterschied von ≥ 2 und eine Intensität von $\geq 1,8$ des Hintergrundes aufweisen. Von den insgesamt 480 Klonen im herunterregulierten Ansatz 2r zeigen 35 Klone (ca. 7 %) einen Expressionsunterschied mit den gleichen Parametern. Die genauen Positionen dieser Klone auf den verschiedenen Petrischalen und ihre damit verbundene Bezeichnungen finden sich in den folgenden Tabellen 3.20 und 3.21. Die Stärke des Expressionsunterschiedes ist für jeden Klon angegeben. Einige Hybridisierungsexperimente werden zu Vergleichszwecken sowohl auf Hybond-N, als auch auf Hybond-N+ Hybridisierungsmembranen durchgeführt. In diesen Fällen zeigen sich zwar materialbedingte Unterschiede in den Expressionsstärken, in den meisten Fällen zeigen die Klone aber auf beiden Filtern ein übereinstimmend differenzielles bzw. nicht-differenzielles Expressionsmuster gemäß den oben aufgeführten Parametern.

In Abbildung 3.41 sind zwei identische Makroarrays dargestellt, von denen der obere mit einer cDNA-Sonde gemeinsam kultivierter Bionten (MB+PB) hybridisiert wird, während der untere mit einer cDNA-Sonde aus getrennt kultivierten Bionten (MB und PB) hybridisiert wird. Die nach obigen Parametern als differenziell exprimierte Klone geltenden Messpunkte sind markiert. Insgesamt werden mit den Hybridisierungsexperimenten 109 Klone bestimmt und weiter bearbeitet. Dabei werden alle 35 Klone des Ansatzes 2r verwendet, ebenso wie jene 74 Klone des Ansatzes 1f, die eine Signalstärke vom ≥ 2 -fachen des Hintergrundes aufweisen.

3 Ergebnisse

Kontakt-spezifisch hochregulierte cDNA-Spezies in Hybridisierungsexperimenten (I)							
Petruschale	Position	Faktor auf		Petruschale	Position	Faktor auf	
		N+ Hybond	N Hybond			N+ Hybond	N Hybond
1-lb	A 01	2,0	4,2	1-la	G 08	5,2	
1-lb	A 03	1,7	4,3	1-la	G 09	10,3	
1-lb	A 09	5,3	4,4	1-la	H 05	3,7	
1-lb	A 12*	2,3	5,1				
1-lb	B 01	4,2	7,1	1-1	A 06	3,7	
1-lb	B 02	3,2	6,3	1-1	A 07*	4,8	
1-lb	B 09	5,4	3,5	1-1	A 10	8,5	
1-lb	B 11*	1,7	2,7	1-1	B 11	11,2	
1-lb	C 01	-	9,2	1-1	C 11	15,1	
1-lb	E 01*	1,5	3,3	1-1	C 12	8,5	
1-lb	E 02	2,7	2,3	1-1	D 10	6,5	
1-lb	E 03	3,0	2,5	1-1	E 07	10,0	
1-lb	E 06*	3,4	2,3	1-1	F 02	6,5	
1-lb	E 08	4,1	2,7	1-1	F 05	13,1	
1-lb	E 10	-	5,2	1-1	F 08	10,4	
1-lb	G 08	3,8	2,7	1-1	F 12	10,1	
1-lb	G 09	3,1	2,1	1-1	G 10	5,0	
1-lb	H 05	1,5	2,7	1-1	G 12	13,5	
1-lb	H 12	2,8	2,7	1-1	H 10	7,7	
				1-1	H 11	2,7	
1-la	A 02*	2,3		1-5	B 08	3,2	
1-la	A 09	4,5		1-5	D 04	3,5	
1-la	B 01	2,1		1-5	E 09	3,1	
1-la	B 02	2,1		1-5	H 01	4,5	
1-la	E 08	2,0					

Tab. 3.20a

Kontakt-spezifisch hochregulierte cDNA-Spezies in Hybridisierungsexperimenten (II)							
Petruschale	Position	Faktor		Petruschale	Position	Faktor	
		N+ Hybond	N Hybond			N+ Hybond	N Hybond
1-2	C 08*	6,6		1-3	D 04	5,3	
1-2	C 12	15,6		1-3	D 10	8,6	
1-2	D 02	7,5		1-3	D 11	6,5	
1-2	D 03	7,6		1-3	E 03	6,5	
1-2	D 05	5,8		1-3	E 06	6,4	
1-2	D 06	5,8		1-3	E 10	7,8	
1-2	D 09	15,0		1-3	F 04	6,8	
1-2	D 12	6,9		1-3	F 06	10,0	
1-2	E 06*	4,2		1-3	F 07	6,5	
1-2	E 07*	6,2		1-3	F 11*	5,7	
1-2	E 10	4,5		1-3	G 01*	6,1	
1-2	F 10*	7,9		1-3	G 08	6,3	
1-2	G 04*	6,1					
1-2	G 08*	12,6		1-4	A 02	4,0	
1-2	H 03	3,6		1-4	D 07	3,7	
1-2	H 05	7,6		1-4	E 07*	2,3	
1-2	H 08*	9,4		1-4	F 02	6,9	
1-2	H 09	4,5		1-4	F 08	5,4	
				1-4	F 09	4,9	
1-3	B 01	4,8		1-4	F 10	3,1	
1-3	B 02*	4,2		1-4	F 11	5,2	
1-3	B 10*	5,9					
1-3	B 11*	3,5		1-6	A 02	2,3	
1-3	D 01	4,5		1-6	B 03	2,3	
1-3	D 02	4,3		1-6	E 05	2,6	

Tab. 3.20b

Tab 3.20: Nachweis kontaktspezifisch hochregulierter cDNAs mittels Hybridisierungsexperimenten. Der Faktor gibt an, um wieviel Mal die Sonde aus cDNAs gemeinsam kultivierter Bionten (MB+PB) besser an die Makroarray-Dots bindet, als die Sonde aus getrennt kultivierten Bionten (MB und PB). Dies ist ein Maß für die Hochregulation der entsprechenden mRNAs/Gene. Betrachtet werden alle Signale mit einer Signalstärke vom $\geq 1,8$ -fachen Hintergrund und einem Expressionsfaktor von ≥ 2 (im Falle von zweifach erfolgter Hybridisierung auf Hybond-N+ und -N Membranen (2-la), wenn wenigstens ein Wert ≥ 2 und der andere $> 1,5$). Positionsbezeichnungen ohne Asterisk (*) zeigen eine Signalstärke vom ≥ 2 -fachen des Hintergrundes.

Kontakt-spezifisch herunterregulierte cDNA-Spezies in Hybridisierungsexperimenten							
Petrischale	Position	Faktor		Petrischale	Position	Faktor	
		N+ Hybond	N Hybond			N+ Hybond	N Hybond
2-la	A 09	8,1	23,2	2-lb	B 09	10,6	
2-la	B 03	3,1	-	2-lb	E 08	24,5	
2-la	B 06	2,0	2,9	2-lb	F 01	6,6	
2-la	B 08	3,5	10,6	2-lb	F 09	2,7	
2-la	B 09	3,6	6,2				
2-la	C 04	2,8	5,9	2-1	B 02	39,9	
2-la	C 08	1,8	4,5	2-1	E 11	19,9	
2-la	D 02	2,9	-	2-1	H 07	30,4	
2-la	D 10	2,9	7,9				
2-la	E 01	2,1	4,1	2-2	D 07	25,0	
2-la	E 03	13,6	15,7	2-2	E 04	22,7	
2-la	E 05	3,7	5,0				
2-la	F 01	14,6	25,7	2-3	E 06	2,8	
2-la	F 02	1,7	4,8				
2-la	F 03	2,0	7,3	2-4	A 12	3,3	
2-la	F 04	2,1	7,5				
2-la	F 06	8,3	12,3				
2-la	F 09	1,7	11,4				
2-la	G 02	1,9	5,4				
2-la	G 08	3,6	11,0				
2-la	G 09	1,9	12,3				
2-la	G 12	2,7	10,2				
2-la	H 01	2,4	6,8				
2-la	H 07	4,1	8,0				

Tab. 3.21

Tab 3.21: Nachweis kontaktspezifisch herunterregulierter cDNAs mittels Hybridisierungsexperimenten. Der Faktor gibt an, um wieviel Mal die Sonde aus cDNAs getrennt kultivierter Bionten (MB und PB) besser an die Makroarray-Dots bindet, als die Sonde aus gemeinsam kultivierten Bionten (MB+PB). Dies ist ein Maß für die Herunterregulation der entsprechenden mRNAs/Gene. Betrachtet werden alle Signale mit einer Signalstärke von $\geq 1,8$ -fachem Hintergrund und einem Expressionsfaktor von ≥ 2 (im Falle von zweifach erfolgter Hybridisierung auf Hybond-N+ und -N Membranen (2-la), wenn wenigstens ein Wert ≥ 2 und der andere $> 1,5$).

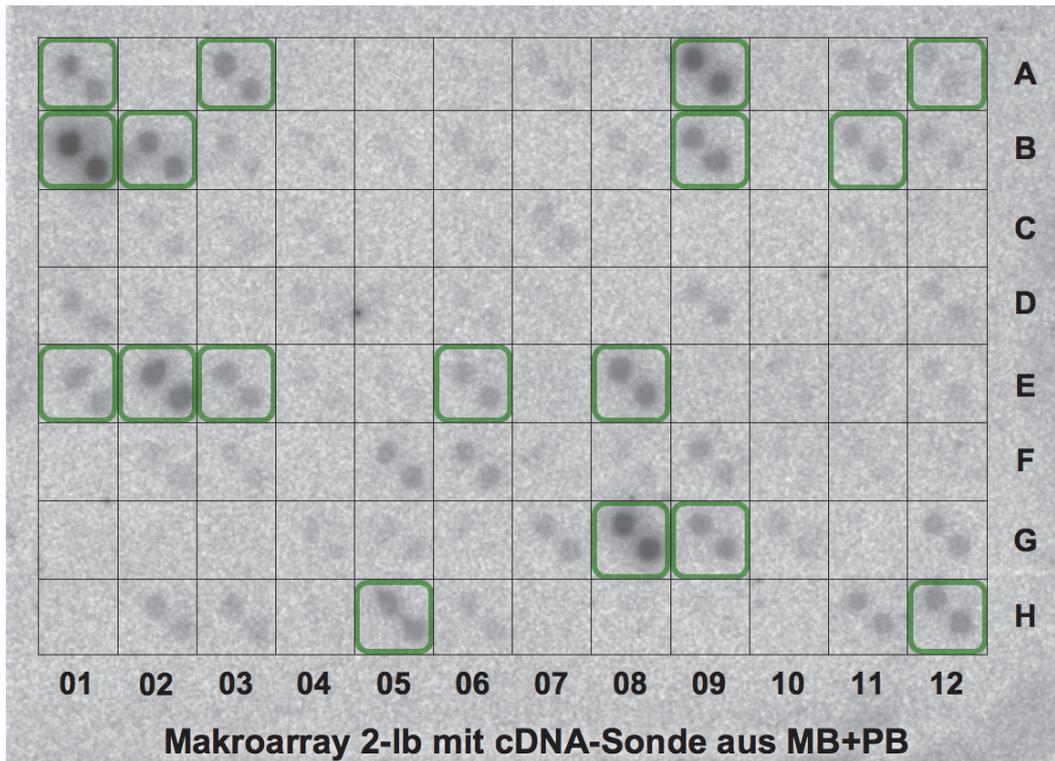


Abb. 3.43a

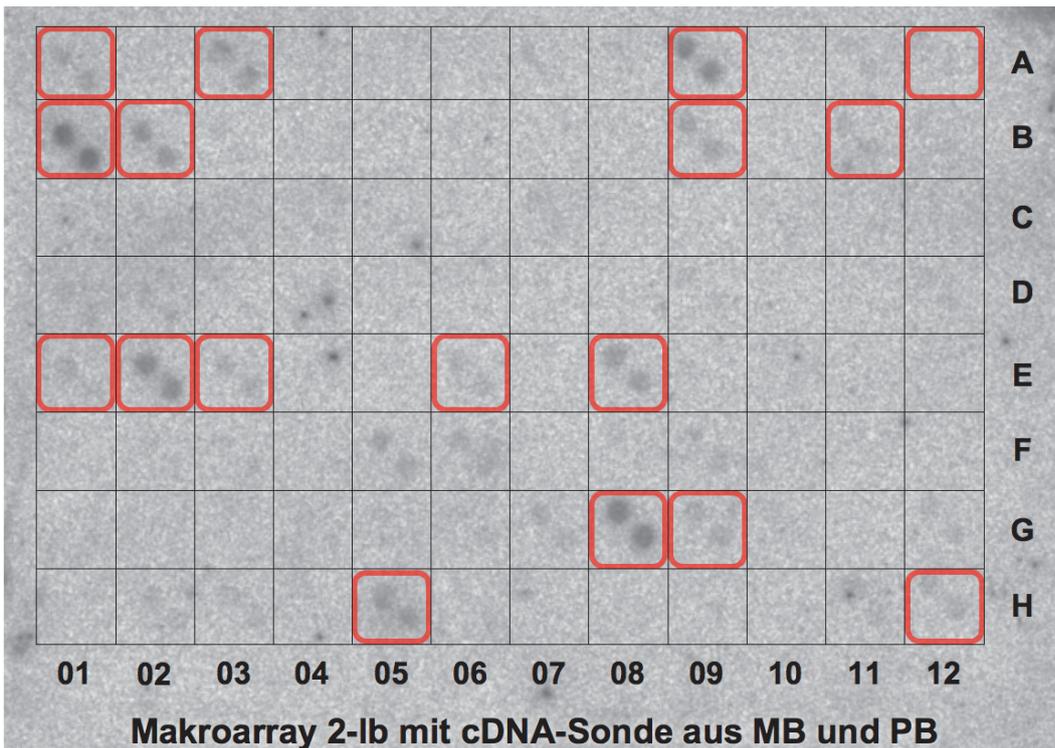


Abb. 3.43b

Abb. 3.43: Zwei identische Makroarrays, wobei das obere mit der cDNA-Sonde „MB+PB“ (gemeinsam kultivierte Bionten), das untere mit der cDNA-Sonde „MB und PB“ (getrennt kultivierte Bionten) hybridisiert wurde. Damit können *spots*, die auf dem oberen Makroarray stärkere Signale erzeugen, gemäß den gewählten Parametern, als kontaktspezifisch hochregulierte cDNA-Spezies betrachtet werden. Die hier gezeigten Makroarrays zeigen den Ansatz 2-lb auf Hybond-N-Membranen (vgl. auch Tab. 3.21a).

3.3.5 Identifikation differenziell exprimierter cDNA-Spezies

Für die Sequenzierung der differenziell exprimierten cDNAs werden die in Kapitel 3.3.4 aufgeführten 74 Klone des Ansatzes 1f und die 35 Klone des Ansatzes 2r kultiviert. Die Plasmide der insgesamt 109 Klone werden aufgereinigt und zur Sequenzierung gegeben (vgl. Kapitel 2.2.5.11 und 2.2.5.12). auf diese Weise können insgesamt 95 Sequenzen gewonnen werden, 67 für den Ansatz 1f, der kontaktspezifisch hochregulierte Gene repräsentiert, und 28 für den Ansatz 2r, der kontaktspezifisch herunterregulierte Gene repräsentiert. Unter diesen 67 Sequenzen für 1f und 28 Sequenzen für 2r finden sich jeweils 35 bzw. 17 unterschiedliche Sequenzen. Von den 35 Sequenzen aus Ansatz 1f werden 26 Sequenzen einmal gefunden, vier Sequenzen zweimal, eine Sequenz dreimal und von jeweils einer Sequenz werden je vier, sieben, acht und elf Klone gefunden. Von den 17 verschiedenen Sequenzen aus Ansatz 2r werden neun Sequenzen einmal gefunden, fünf Sequenzen werden zweimal gefunden und drei Sequenzen dreimal. Die Länge der Sequenzen schwankt in Ansatz 1f zwischen 41 und 196 bp, in Ansatz 2r zwischen 41 und 137 bp. Diese Werte stimmen – nach Abzug der Längen der flankierenden Adaptoren von insgesamt 86 bp – gut mit den kurzen, in Abbildung 3.38 dargestellten cDNA-Fragmenten aus der zweiten PCR der SSH überein.

Hochregulierte Sequenzen										
#	Klon(e)			Länge	#	Klon(e)			Länge	
1	1-la A9	1-la B1	1-la G8	167 bp	15	1-1 C12			72 bp	
	1-lb A9	1-lb B1	1-lb B2			16	1-1 F2			103 bp
	1-lb G8	1-1 E7	1-1 F8			17	1-1 G12			63 bp
	1-2 H1	1-5 H5				18	1-1 H10			148 bp
2	1-la B9	1-2 C12	1-2 D3	73 bp	19	1-1 H12			73 bp	
	1-3 D2	1-3 D10	1-3 E3			20	1-2 D6			119 bp
	1-3 F6	1-5 B8				21	1-2 D9			64 bp
3	1-la E8	1-lb E8	1-4 A2	147 bp	22	1-2 D12			96 bp	
	1-4 F8	1-4 F9	1-4 F10			23	1-2 E10			63 bp
	1-4 F11					24	1-2 H9			53 bp
4	1-la G9	1-la H12	1-lb G9	196 bp	25	1-3 B1			41 bp	
	1-2 H3					26	1-3 D11			113 bp
5	1-1 F5	1-1 G10	1-la B2	112 bp	27	1-3 E6			88 bp	
6	1-la E2	1-4 D7		111 bp	28	1-3 E10			55 bp	
7	1-la A3	1-1 A10		122 bp	29	1-3 G8			95 bp	
8	1-la A10	1-1 B11		115 bp	30	1-4 F2			66 bp	
9	1-2 D2	1-2 D5		79 bp	31	1-5 D4			138 bp	
10	1-la C1			95 bp	32	1-5 E9			99 bp	
11	1-la E3			156 bp	33	1-6 A2			74 bp	
12	1-la E10			85 bp	34	1-6 B3			43 bp	
13	1-1 A6			68 bp	35	1-6 E5			142 bp	
14	1-1 C11			158 bp						

Tab. 3.22: Die Tabelle zeigt die Längen der sequenzierten, kontaktspezifisch hochregulierten cDNA-Fragmente (in bp) und identifiziert die Klone in denen die jeweiligen Sequenzen gefunden werden. Die Inserts grau unterlegter Klone konnten im Folgenden identifiziert werden.

#	Herunterregulierte Sequenzen			Länge
1	2-la A9	2-la E3	2-2 E6	85 bp
2	2-la C4	2-la E1	2-la G12	79 bp
3	2-la F3	2-la F9	2-lb F9	100 bp
4	2-la B3	2-la D2		82 bp
5	2-la B6	2-la B9		91 bp
6	2-la F2	2-la F4		78 bp
7	2-la G8	2-la H1		80 bp
8	2-lb B9	2-1 H7		137 bp
9	2-la C8			67 bp
10	2-la F6			109 bp
11	2-la G2			82 bp
12	2-la G9			131 bp
13	2-la H7			121 bp
14	2-lb E8			93 bp
15	2-1 B2			41 bp
16	2-1 E11			88 bp
17	2-2 D7			82 bp

Tab. 3.23: Die Tabelle zeigt die Längen der sequenzierten, kontaktspezifisch herunterregulierten cDNA-Fragmente (in bp) und identifiziert die Klone in denen die jeweiligen Sequenzen gefunden wurden.

Die Längen der 35 Sequenzen aus Ansatz 1f und der 17 Sequenzen aus Ansatz 2r, sowie die Klone aus denen sie gewonnen werden, finden sich in Tabelle 3.22 und 3.23, die exakten Sequenzen finden sich zusätzlich in den Tabellen A.39a-d im Anhang.

Mit Hilfe der BLAST-Suchalgorithmen (Kapitel 2.2.5.13) ist es letztendlich möglich, sechs der 35 kontaktspezifisch hochregulierten Sequenzen zu identifizieren, während keine von den 17 kontaktspezifisch herunterregulierten Sequenzen identifiziert werden können. Die sechs inserierten cDNA-Fragmente, bei denen eine Identifikation möglich ist, werden in Abbildung 3.22 durch die Nummern 3, 4, 7, 9, 21 und 32 repräsentiert und sind markiert.

Die so identifizierten, differenziell hochregulierten cDNA-Fragmente repräsentieren in allen sechs Fällen höchstwahrscheinlich Gene des Mycobionten. Zumindest deuten die gefundenen Treffer der unterschiedlichen Suchläufe in BLAST darauf hin, da sie ausschließlich zu Genen aus Ascomyceten die höchsten Übereinstimmungen berechneten. Die für diese Identifikation zugrundeliegenden Suchergebnisse der verschiedenen BLAST-Suchläufe werden in Form der Tabellen 3.25 bis 3.30 für jedes einzelne identifizierte Gen aufgeführt und ergänzende Tabellen im Anhang bereitgestellt (A.40 bis A.43). Die Identität der cDNA-Fragmente ist:

#	identifiziertes Gen	Herkunftsorganismus
3	Peptidyl-Prolyl-Isomerase (FKBP-C-Typ)	Ascomycet → Mycobiont
4	GTP-bindendes EsdC	Ascomycet → Mycobiont
7	60S Ribosomales Protein L29	Ascomycet → Mycobiont
9	ATP-Sulfurylase	Ascomycet → Mycobiont
21	Protein aus Domänenfamilie Aha 1	Ascomycet → Mycobiont
32	dTDP-bindende 4,6-Glucose-Dehydratase	Ascomycet → Mycobiont

Tab. 3.24: Liste der identifizierten Gene

3.3.5.1 Peptidyl-Prolyl-Isomerase

Das Gen, das für die Peptidyl-Prolyl-Isomerase kodiert, wird in Fragment #3 identifiziert und weist eine Länge von 147 bp auf. Das Fragment #3 findet sich häufig, es kann in sieben verschiedenen Klonen nachgewiesen werden, nämlich in 1-la E8, 1-lb E8, 1-4 A2, 1-4 F8, 1-4 F9, 1-4 F10 und 1-4 F11. In den Hybridisierungsexperimenten zeigt sich dabei eine mittlere Hochregulation auf Hybond-N+-Membranen von $4,1 \pm 1,2$ und auf der Hybond-N-Membran eine Hochregulation um einen Faktor von 2,7. In der BLAST-Suche zeigt sich bei allen verwendeten Suchalgorithmen ein konsistentes Bild. Alle Treffer in den BLAST-Algorithmen blastn (nr/nt), blastx (nr/nt) und blastp (Leseraster 3), die eine Identifikation ermöglichten – also ohne Treffer, die als „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“ annotiert worden sind – führen stets zur größten Übereinstimmung mit Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (auch Rotamasen, Fpr oder FKBP_s genannt) aus Ascomyceten mit einer Domäne vom Typ FKBP_C. Die Tabellen 3.25 a,b und A.41 a,b zeigen die entsprechenden Werte für die blastn- und blastx- bzw. für die blastp- und Domänen-Suche. In der blastn-Suche ergeben sich dabei E-Values von bis zu 1,00E-09.

3 Ergebnisse

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Maximum Identity	Query Coverage	Referenznummer
7	chromosome B, complete sequence, similar to <i>S. cer. peptidyl-prolyl isomerase</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1,00E-09	83%	45%	CU928174.1
8	chromosome V, complete sequence homolog of <i>S. cer. (FPR3) and (FPR4)</i>	<i>Ashbya gossypii</i>	1,00E-08	83%	44%	AE016818.2
9	Fpr3p (FPR3), mRNA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,00E-08	85%	40%	NM_001182433.1
13	FPR3 = FKBP-70, genomic, 2943 nt	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,00E-08	85%	40%	S73876.1
15	gene for proline isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,00E-08	85%	40%	X79379.1
17	proline rotamase (FPR3) gene, complete cds	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,00E-08	85%	40%	L34569.1
19	FK506-binding protein 1A, partial mRNA	<i>Aspergillus terreus</i>	4,00E-08	81%	44%	XM_001215777.1
22	FKBP-type peptidyl-prolyl isomerase, putative, mRNA	<i>Aspergillus flavus</i>	5,00E-07	80%	45%	XM_002381972.1
30	FKBP-type peptidyl-prolyl isomerase, putative, partial mRNA	<i>Aspergillus clavatus</i>	2,00E-05	78%	44%	XM_001268113.1
31	FKBP-type peptidyl-prolyl isomerase, putative, partial mRNA	<i>Neosartorya fischeri</i>	2,00E-05	78%	44%	XM_001257973.1
33	FKBP-type peptidyl-prolyl isomerase, partial mRNA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,00E-05	78%	44%	XM_745654.1
36	FK506-binding protein 3, mRNA	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	7,00E-05	81%	39%	XM_001930648.1

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
1	YML074Cp-like protein with FKBP_C domain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7,00E-04	47,0	EDZ70288.1
2	FK506-binding nuclear protein with FKBP_C domain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7,00E-04	47,0	EDV11435.1
3	peptidyl-prolyl isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7,00E-04	47,0	EDN64321.1
5	proline rotamase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7,00E-04	47,0	AAB04165.1
6	Fpr3p, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7,00E-04	47,0	NP_013637.1
7	TPA: FK506-binding protein 4 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Aspergillus nidulans</i>	1,00E-03	46,6	CBF75117.1
8	FK506-binding protein 1 with FKBP_C domain	<i>Microsporium canis</i>	1,00E-03	46,6	EEQ31695.1
11	FK506-binding protein 1A with FKBP_C domain	<i>Aspergillus terreus</i>	1,00E-03	46,6	XP_001215777.1
12	FKBP4_EMEN1: FK506-binding protein 4 with FKBP_C domain	<i>Aspergillus nidulans</i>	1,00E-03	46,6	POC1B0.1
13	Fpr4p, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,00E-03	46,2	EEU06193.1
16	FKBP-type peptidyl-prolyl isomerase, putative	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,00E-03	46,2	EDP49427.1
17	FKBP proline rotamase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,00E-03	46,2	EDN59346.1

Tab. 3.25a,b: Ergebnisse der BLAST-Suche mit den Algorithmen blastn (a, oben) und blastx (b, unten): Die Treffer mit dem höchsten E-Value (ohne „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“) werden u. a. mit ihrem Herkunftsorganismus, ihrem E-Value, als Maß für die Zufälligkeit dieser Übereinstimmung, und ihrer Referenznummer dargestellt. Treffer, die die als am wahrscheinlichsten erachtete Identifikation unterstützen, sind grau unterlegt. Alle konkret bezeichneten Treffer sprechen für eine Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase mit einer funktionalen Domäne vom Typ FKBP_C.

3.3.5.2 GTP-bindendes EsdC

Das GTP-bindende EsdC (esd für: early sexual development) wird anhand von Fragment #4 identifiziert, das eine Länge von 196 bp aufweist und in den vier Klonen 1-la G9, 1-la H12, 1-lb G9 und 1-2 H3 nachgewiesen werden kann. Der mittlere Faktor der Hochregulation beträgt auf Hybond-N+ $5,0 \pm 2,6$, während er auf Hybond-N bei $2,4 \pm 0,4$ liegt. In der BLAST-Suche zeigt sich bei allen verwendeten Suchalgorithmen ein konsistentes Bild. Alle Treffer in den BLAST-Algorithmen blastn (nr/nt), tblastx und blastp (Leseraster 2), die eine Identifikation ermöglichen – also ohne Treffer, die als „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“ annotiert worden sind – führen stets zur größten Übereinstimmung mit dem Gen GTP-bindenden EsdC, das aus Ascomyceten stammt. Die Tabellen 3.26 a und 3.26 b zeigen die entsprechenden Werte für die tblastx- und blastp- mit E-Values von bis zu $4,00E-10$ und die Tabelle A.42 a zeigt die entsprechenden Werte für die blastn-Suche. In der blastn-Suche ergeben sich dabei E-Values von bis zu $2,00E-06$.

3 Ergebnisse

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
4	GTP-binding protein EsdC, mRNA	<i>Talaromyces stipitatus</i>	4,00E-10	68,9	XM_002488266.1
5	GTP-binding protein EsdC, mRNA	<i>Aspergillus flavus</i>	4,00E-10	68,9	XM_002380627.1
6	esdC gene, complete cds	<i>Aspergillus parasiticus</i>	4,00E-10	68,9	FJ666347.1
7	GTP-binding protein EsdC, mRNA	<i>Penicillium mameffei</i>	4,00E-10	68,9	XM_002153106.1
10	sexual development protein EsdC, putative, partial mRNA	<i>Neosartorya fischeri</i>	4,00E-10	68,9	XM_001262829.1
13	RIB40 DNA, SC038	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,00E-10	68,9	AP007169.1
14	GTP-binding protein EsdC, partial mRNA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,00E-10	68,9	XM_741646.1
15	TPA: TPA_reasm: A. nidulans FGSC A4 enthält esdC	<i>Aspergillus nidulans</i>	2,00E-09	66,6	BN001306.1
17	sexual development protein EsdC, putative, partial mRNA	<i>Aspergillus clavatus</i>	2,00E-09	66,6	XM_001272353.1
19	ESDC (esdC) gene, complete	<i>Aspergillus nidulans</i>	2,00E-09	66,6	AF532169.1
24	GTP-binding protein EsdC, mRNA	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	2,00E-08	63,4	XM_001934852.1
32	GTP-binding protein EsdC, mRNA	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	4,00E-08	62,0	XM_002624783.1

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
2	esdC	<i>Aspergillus parasiticus</i>	2,00E-07	58,9	ACN41349.1
4	GTP-binding protein EsdC	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,00E-07	57,8	XP_746739.1
5	Pc21g12690	<i>Penicillium chrysogenum</i>	4,00E-07	57,8	XP_002568296.1
7	GTP-binding protein EsdC	<i>Talaromyces stipitatus</i>	4,00E-07	57,8	XP_002488311.1
8	sexual development protein EsdC, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	4,00E-07	57,8	XP_001262830.1
9	GTP-binding protein EsdC	<i>Penicillium mameffei</i>	6,00E-07	57,0	XP_002153142.1
12	sexual development protein EsdC, putative	<i>Aspergillus clavatus</i>	1,00E-06	56,2	XP_001272354.1
16	esdC homologue	<i>Sordaria macrospora</i>	5,00E-06	53,9	CAH03680.1
18	unnamed protein product	<i>Podospora anserina</i>	5,00E-06	53,9	XP_001910869.1
20	GTP-binding protein EsdC	<i>Ajellomyces capsulata</i>	1,00E-05	52,8	EEH10901.1

Tab. 3.26a,b: Ergebnisse der BLAST-Suche mit den Algorithmen tblastx (a, oben) und blastp (Leseraster 2, b, unten): Die Treffer mit dem höchsten E-Value (ohne „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“) werden u. a. mit ihrem Herkunftsorganismus, ihrem E-Value, als Maß für die Zufälligkeit dieser Übereinstimmung, und ihrer Referenznummer dargestellt. Treffer, die die als am wahrscheinlichsten erachtete Identifikation unterstützen, sind grau unterlegt. Alle konkret bezeichneten Treffer sprechen für eine EsdC, als Gen der frühen ascomycetischen Sexualentwicklung.

3.3.5.3 60S Ribosomales Protein L29

Das 60S Ribosomale Protein L29 wird mittels des Fragmentes #7 identifiziert. Das Fragment besitzt eine Länge von 122 bp und kommt in den beiden Klonen 1-la A3 und 1-1 A10 vor. Der Faktor der Hochregulation bei spezifischem Biontenkontakt liegt bei 4,3 auf Hybond-N+ und bei 8,3 auf Hybond-N. In der BLAST-Suche mit den Algorithmen blastn (nr/nt), blastx, tblastx und blastp im Leseraster 1, wird es bei annähernd allen Treffern, die eine Identifikation erlaubten – also ohne Treffer, die als „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“ annotiert worden sind – mit teilweise sehr hohen E-Values gefunden. In der blastn-Suche erreichen die E-Values sehr geringe Werte bis hinab zu 4,00E-20, in der blastp-Suche bis hinab zu 9,00E-22.

3 Ergebnisse

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
1	60S ribosomal protein L29, putative	<i>Talaromyces stipitatus</i>	9,00E-22	104,0	XP_002484361.1
2	60S ribosomal protein L29, putative	<i>Penicillium mameffei</i>	9,00E-22	104,0	XP_002149901.1
3	60S ribosomal protein L29	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	2,00E-21	103,0	XP_001550019.1
4	60S ribosomal protein L29	<i>Chaetomium globosum</i>	2,00E-21	103,0	XP_001229506.1
5	60S ribosomal protein L29	<i>Neurospora crassa</i>	2,00E-20	100,0	XP_957786.1
6	60S ribosomal protein L29	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6,00E-19	95,6	XP_750061.1
7	60S ribosomal protein L29, putative	<i>Aspergillus flavus</i>	8,00E-19	95,2	XP_002372940.1
8	TPA: 60S ribosomal protein L29, putative	<i>Aspergillus nidulans</i>	8,00E-18	91,8	CBF89826.1
9	60S ribosomal protein L29, putative	<i>Aspergillus clavatus</i>	8,00E-18	91,8	XP_001269822.1
10	Pc22g25660	<i>Penicillium chrysogenum</i>	1,00E-17	91,4	XP_002566451.1

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Maximum Identity	Query Coverage	Referenznummer
2	60S ribosomal protein L29, putative, mRNA	<i>Penicillium mameffei</i>	4,00E-20	81%	90%	XM_002149865.1
3	60S ribosomal protein L29, putative, mRNA	<i>Talaromyces stipitatus</i>	4,00E-19	80%	90%	XM_002484316.1
11	60S ribosomal protein L29, partial mRNA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,00E-15	79%	83%	XM_744968.1
12	60S ribosomal protein L29, putative, mRNA	<i>Aspergillus flavus</i>	3,00E-14	78%	83%	XM_002372899.1
13	60S ribosomal protein L29, putative, partial mRNA	<i>Aspergillus clavatus</i>	3,00E-14	78%	83%	XM_001269821.1
14	60S ribosomal protein L29, putative, partial mRNA	<i>Neosartorya fischeri</i>	3,00E-14	78%	83%	XM_001265335.1
18	60S ribosomal protein L29, partial mRNA	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	1,00E-12	76%	85%	XM_001549969.1
24	60S ribosomal protein L29, partial mRNA	<i>Chaetomium globosum</i>	7,00E-10	75%	85%	XM_001229505.1
26	60S ribosomal protein L29, partial mRNA	<i>Neurospora crassa</i>	9,00E-09	73%	90%	XM_952693.2
29	60S ribosomal protein L29 (RL29) gene, complete cds	<i>Oikopleura dioica</i>	1,00E-07	82%	51%	AY292617.1

Tab. 3.27a,b: Ergebnisse der BLAST-Suche mit den Algorithmen blastp (Leseraster 1, a, oben) und blastn (b, unten): Die Treffer mit dem höchsten E-Value (ohne „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“) werden u. a. mit ihrem Herkunftsorganismus, ihrem E-Value, als Maß für die Zufälligkeit dieser Übereinstimmung, und ihrer Referenznummer dargestellt. Treffer, die die als am wahrscheinlichsten erachtete Identifikation unterstützen, sind grau unterlegt. Fast alle konkret bezeichneten Treffer sprechen für das 60S Ribosomale Protein L29.

3.3.5.4 Gen der Aha1-Domänenfamilie

Als weiterer Treffer kann das cDNA-Fragment #21 einer mRNA zugeordnet werden, die für ein Protein aus der Aha1-Familie kodiert. Dieses Fragment findet sich in Klon 1-2 D9, besitzt eine Länge von 64 bp und seine Expression steigt nach den Ergebnissen des Hybridisierungsversuchs bei spezifischem Biontenkontakt um den Faktor 15 an. Es kann in der Auswertung mit dem BLAST-Algorithmus tblastx mit nur geringen E-Values von bestenfalls $7,60E-02$ nachgewiesen werden, findet sich allerdings auch bei Auswertung mit blastp im Leseraster 2. Dort zeigt es bessere E-Values von bis zu $6,00E-06$. Mit beiden Algorithmen sind die Treffer, die sich einer bestimmten Funktion zuordnen lassen – also nicht Treffer, die als „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“ annotiert worden sind – stets solche, die auf ein Protein der Aha1-Familie hinweisen.

3 Ergebnisse

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
1	hypothetical protein, partial mRNA	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	5,50E-02	41,4	XM_001804448.1
2	Aha1 domain family protein, mRNA	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	7,60E-02	40,9	XM_001932709.1
3	Aha1 family protein, mRNA	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	3,70E-01	38,6	XM_002620771.1
4	Aha1 domain family, mRNA	<i>Talaromyces stipitatus</i>	3,70E-01	38,6	XM_002341715.1
5	Aha1 domain family, mRNA	<i>Penicillium mameffeii</i>	3,70E-01	38,6	XM_002151242.1
6	Aha1 domain family, mRNA	<i>Penicillium mameffeii</i>	3,70E-01	38,6	XM_002151241.1
7	hypothetical protein (PODANSg3259), partial mRNA	<i>Podospora anserina</i>	3,70E-01	38,6	XM_001906196.1
8	genomic DNA chromosome 4, supercontig 4	<i>Podospora anserina</i>	3,70E-01	38,6	CU633895.1
9	hypothetical protein, partial mRNA	<i>Aspergillus oryzae</i>	3,70E-01	38,6	XM_001820134.1
10	hypothetical protein (SS1G_11648), partial mRNA	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	3,70E-01	38,6	XM_001587605.1

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Query Coverage	Referenznummer
1	Aha1 domain family protein	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	6,00E-06	52,4	76%	XP_001932744.1
2	hypothetical protein, with Aha1_N like domain	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	6,00E-06	52,4	76%	XP_001804500.1
3	hypothetical protein, with Aha1_N like domain	<i>Magnapothe oryzae</i>	2,00E-05	50,7	76%	XP_368430.2
4	TPA: co-chaperone (Eurofung)	<i>Aspergillus nidulans</i>	4,00E-05	49,8	76%	CBF81583.1
5	Aha1 domain family	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	4,00E-05	49,8	76%	EER39776.1
6	Aha1 family protein	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	4,00E-05	49,8	76%	XP_002620817.1
7	Aha1 family protein	<i>Arthroderma otae</i>	4,00E-05	49,8	76%	XP_002844404.1
8	Aha1 domain family	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	4,00E-05	49,8	76%	EEH08143.1
9	Aha1 domain family	<i>Talaromyces stipitatus</i>	4,00E-05	49,8	76%	XP_002341756.1
10	Aha1 domain family	<i>Penicillium mameffeii</i>	4,00E-05	49,8	76%	XP_002151277.1

Tab. 3.28a,b: Ergebnisse der BLAST-Suche mit den Algorithmen tblastx (a, oben) und blastp (b, unten): Die Treffer mit dem höchsten E-Value (ohne „hypothetical“, „predicted“ und „unknown“) werden u. a. mit ihrem Herkunftsorganismus, ihrem E-Value, als Maß für die Zufälligkeit dieser Übereinstimmung, und ihrer Referenznummer dargestellt. Treffer, die die als am wahrscheinlichsten erachtete Identifikation unterstützen, sind grau unterlegt. Fast alle konkret bezeichneten Treffer weisen auf Aha1 hin. Auch das Cochaperon in 3.28b könnte auf Aha1 hinweisen, da dieses eine ähnliche Funktion besitzt.

3.3.5.5 dTDP-bindende 4,6-Glucose-Dehydratase

Das cDNA-Fragment #32 wird im Klon 1-5 E9 mit einer Länge von 99 Basenpaaren gefunden. Bei spezifischem Biontenkontakt steigt die Expression um den Faktor 3,1 an. Die BLAST-Suche ergibt mit den Suchalgorithmen blastn, blastp und tblastx übereinstimmend eine Identifizierung des Fragmentes als dTDP-bindende 4,6-Glucose-Dehydratase. Dabei werden sowohl in der blastp-Suche (Leseraster 2), als auch in der tblastx-Suche deutliche und teilweise gut unterstützte Übereinstimmungen mit dTDP-bindenden 4,6-Glucose-Dehydratasen aus verschiedenen Taxa gefunden. Stets mit bester Unterstützung (E-Values von bis zu 1,00E-18) finden sich Treffer aus der Abteilung der Ascomycota. Mit geringerer Unterstützung finden sich Treffer aus den Amoebozoa und den Spermatophytina.

3 Ergebnisse

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
1	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	<i>Verticillium albo-atrum</i>	1,00E-18	94,4	EEY20676.1
2	unnamed protein product	<i>Podospora anserina</i>	6,00E-18	92,3	XP_001908195.1
4	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	8,00E-17	88,4	XP_001938042.1
7	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	6,00E-10	65,5	XP_002291084.1
8	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	<i>Entamoeba dispar</i>	2,00E-09	64,3	XP_001737366.1
9	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	<i>Entamoeba dispar</i>	2,00E-09	64,3	XP_001741245.1
10	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	<i>Entamoeba histolytica</i>	2,00E-09	64,3	XP_656509.1
11	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	<i>Entamoeba histolytica</i>	2,00E-09	64,3	XP_652489.1
12	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	<i>Neosartorya fischeri</i>	2,00E-09	63,8	XP_001267087.1
15	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, putative	<i>Ricinus communis</i>	3,00E-09	63,4	XP_002515360.1

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
7	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, mRNA	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	3,00E-11	72,1	XM_001938007.1
16	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase (DGD3) mRNA	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	2,00E-07	59,3	XM_002291048.1
18	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, partial mRNA	<i>Neosartorya fischeri</i>	2,00E-07	59,3	XM_001267086.1
20	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, putative, mRNA	<i>Ricinus communis</i>	6,00E-07	57,9	XM_002515314.1
23	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, putative, mRNA	<i>Entamoeba dispar</i>	6,00E-07	57,9	XM_001737314.1
25	NAD-dependent epimerase/dehydratase, putative, mRNA	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	6,00E-07	57,9	XM_001422246.1
26	RHM3; UDP-L-rhamnose synthase putative, mRNA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6,00E-07	57,9	NM_112340.3
28	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, putative, mRNA	<i>Entamoeba histolytica</i>	6,00E-07	57,9	XM_651417.1
31	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, putative, mRNA	<i>Entamoeba histolytica</i>	6,00E-07	57,9	XM_647397.1
35	rhamnose synthase (RHM3), mRNA	<i>Gossypium hirsutum</i>	8,00E-07	57,4	GQ292793.1

Tab. 3.29a,b: Ergebnisse der BLAST-Suche mit den Algorithmen blastp (a, oben) und tblastx (b, unten): Die besten Treffer (ohne „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“) werden u. a. mit ihrem Herkunftsorganismus, ihrem E-Value, als Maß für die Zufälligkeit dieser Übereinstimmung, und ihrer Referenznummer dargestellt. Treffer, die die als am wahrscheinlichsten erachtete Identifikation unterstützen, sind grau unterlegt. Mit Ausnahme der NAD-abhängigen Epimerase/Dehydratase in Tab. 3.29b weisen alle konkret bezeichneten Treffer eine dDTP-bindende 4,6-Glucose-Dehydratase hin. Die zugehörige Domäne konnte ebenfalls identifiziert werden (Tab. A.43b im Anhang).

3.3.5.6 ATP-Sulfurylase

Die ATP-Sulfurylase wird mittels des cDNA-Fragmentes #9 identifiziert, das eine Länge von 79 bp aufweist und in den Klonen 1-2 D2 und 1-2 D5 nachgewiesen werden kann. Der Faktor der Hochregulation bei spezifischem Biontenkontakt liegt auf der entsprechenden Hybond-N+-Membran bei $6,7 \pm 1,2$. Die ATP-Sulfurylase kann nur mit dem BLAST-Suchalgorithmus blastp identifiziert werden, und dort auch nur mit geringer Unterstützung von bis zu $6,00E-04$ im E-Value. In diesem Fall sprechen allerdings alle Treffer für die Tatsache, dass es sich bei dem untersuchten Fragment um die ATP-Sulfurylase eines Ascomycoten handeln könnte.

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
1	ATP sulfurylase	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	6,00E-04	45,6	XP_001594508.1
2	sulfate adenyltransferase	<i>Verticillium albo-atrum</i>	3,00E-03	43,5	EEY15889.1
3	hypothetical sulfate adenyltransferase, adenylsulfate kinase protein	<i>Chaetomium globosum</i>	5,00E-03	42,6	XP_001222656.1
4	sulfate adenyltransferase	<i>Neurospora crassa</i>	5,00E-03	42,6	XP_964349.1
5	sulfate adenyltransferase	<i>Gibberella zeae</i>	2,90E-02	40,1	Q411N3.2
6	sulfate adenyltransferase	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	3,90E-02	39,7	EER38725.1
7	sulfate adenyltransferase	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	3,90E-02	39,7	XP_002623263.1
8	sulfate adenyltransferase	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3,90E-02	39,7	EEH23516.1
9	sulfate adenyltransferase	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	3,90E-02	39,7	EEH03556.1
10	sulfate adenyltransferase	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	3,90E-02	39,7	XP_001544165.1

Tab. 3.30: Ergebnisse der BLAST-Suche mit dem Algorithmus blastp: Die besten zehn Treffer werden u. a. mit ihrem Herkunftsorganismus, ihrem E-Value, als Maß für die Zufälligkeit dieser Übereinstimmung, und ihrer Referenznummer dargestellt. Alle zehn Treffer weisen auf ATP-Sulfurylase als identifizierte Sequenz hin.

4 Diskussion

Alle Experimente, deren Ergebnisse detailliert in den Kapiteln 3.1 (Ergebnisse des Präkontakt-Interaktionsassays), 3.2 (Exudate der Photobionten und der Alge *Myrmecia bisecta*) und 3.3 (Ergebnisse zur differenziellen Genexpression der Bionten) sollten dazu dienen, verschiedene Hypothesen bezüglich der initialen Interaktion von Flechtenbionten am Beispiel des Modellsystems *Fulgensia bracteata* zu verifizieren oder zu falsifizieren.

Die folgende Diskussion orientiert sich an der Gliederung des Ergebnisteils, so gut wie es die thematische Fülle und die Verschränkung der angeschnittenen Themenfelder zulässt. Zuerst werden die eingangs formulierten Hypothesen aufgeführt und eine Bewertung ihrer Richtigkeit abgegeben. Im Anschluss daran werden die markanten Ergebnisse kurz zusammengefasst und die sich aus ihnen ergebenden Schlussfolgerungen und Implikationen unter Verwendung der vorhandenen Literatur detailliert diskutiert. Die in der Diskussion entwickelten Hypothesen und Modellvorstellungen beruhen auf den Daten, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, als auch auf Ergebnissen und Erkenntnissen aus der zitierten Literatur. Daher können die hier formulierten Hypothesen als begründet gelten. Eine weitere Bearbeitung ist nicht nur erstrebenswert sondern auch notwendig, um die aufgestellten Hypothesen verifizieren, falsifizieren oder gegebenenfalls modifizieren zu können.

4.1 Resultate des Präkontakt-Interaktionsassays

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur initialen Kontaktphase der Flechtenbionten im Präkontakt-Interaktionsassay diskutiert. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 3.1 dargestellt, und sollen dazu dienen, drei verschiedene Hypothesen bezüglich der initialen Bionteninteraktion am Beispiel des Modellsystems *F. bracteata* zu überprüfen. Die drei Hypothesen sind:

- 1) Existiert die von Galun (1988) postulierte und für andere symbiotische Interaktionen bereits nachgewiesene Präkontaktphase auch in der Flechtensymbiose?
- 2) Gibt es morphologische Veränderungen des Mycobionten, die die Präkontaktphase begleiten und wie lassen sich diese möglichen Veränderungen charakterisieren?
- 3) Sind solche morphologischen Veränderungen abhängig von der Identität des potenziellen Photobionten und könnten sie Aufschluss über Spezifität und Selektivität im initialen Kontaktstadium geben?

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente gestatten es, dass alle drei Hypothesen positiv beantwortet werden können. Die postulierte Präkontaktphase lässt sich im *in vitro* Interaktionsassay für den Mycobionten der Flechte *Fulgensia bracteata* an Hand von

vielfältigen morphologischen Veränderungen nachweisen. Damit bestätigt sich auch die zweite Hypothese, da es genau diese morphologischen Veränderungen des Mycobionten sind, die durch den Präkontakt mit potenziellen Photobionten hervorgerufen werden und den deutlichsten Beleg für eine Präkontaktphase liefern. Die dritte Hypothese kann ebenfalls als bestätigt angesehen werden, da die beobachteten morphologischen Veränderungen des Mycobionten von der Art und somit von der Spezifität des experimentell angebotenen, potenziellen Photobionten abhängig sind. Die morphologischen Unterschiede in der Entwicklung des Mycobionten werden als Reaktion auf eine differenzielle Bionterkennung im Präkontakt interpretiert. Dies wäre nach Wissen des Autors das erste Mal, dass die initiale Interaktion zwischen potenziellen Flechtenbionten und die Existenz einer Präkontaktphase aufgrund von morphologischen Reaktionen eines der beiden Symbiosepartner bewiesen werden konnte. In jüngster Zeit sind zusätzlich von anderen Forschern Ergebnisse erzielt worden, die nahelegen, dass auch eine Präkontaktphase bei den Bionten der Flechte *Cladonia grayii* existiert und die die hier vorgestellten Ergebnisse stützen (Joneson, mündl. Mitteilung, unpublizierte Ergebnisse).

4.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Präkontaktstudien

Wie bereits erwähnt, lässt sich die Existenz einer Präkontaktphase durch die morphologischen Reaktionen des Mycobionten beweisen. Diese Reaktionen sind deutlich und statistisch signifikant. Sie lassen sich damit als das Resultat einer erfolgten Präkontakt-erkennung interpretieren. Da diese morphologischen Reaktionen zudem von der Identität des potenziellen Photobionten abhängen, zeigen die erzielten Ergebnisse ferner, dass bereits in dieser initialen Präkontaktphase die für das Zustandekommen einer Flechtensymbiose so bedeutsamen Mechanismen von Spezifität, Selektivität und Kompatibilität (Schaper & Ott 2003) wirken.

Dies lässt sich deutlich an der differenzierten und vom Kulturmedium unabhängigen Reaktion des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* auf die drei angebotenen, potenziellen Photobionten erkennen: Unter dem Einfluss des unspezifischen und inkompatiblen Photobionten aus *Lecidea lurida* (*Asterochloris* sp. Var. 3) zeigt sich ein Hyphenwachstum, das über das unbeeinflusste Mycobiontenwachstum der Kontrolle hinausgeht, allerdings deutlich hinter dem unter Einfluss des arteigenen Photobionten zurückbleibt. Ferner bilden die Mycelien weniger Gallerte und weniger *hyphal tip swellings* und zeigen ein weniger kompaktes, eher netzartig mit anderen Mycelien verbundenes Wachstumsmuster. Unter dem Einfluss des spezifischen und arteigenen Photobionten (*Trebouxia* sp. Clade I, Untergruppe 1) zeigt sich ein weit über die Kontrollergebnisse hinausgehendes Hyphenwachstum mit einer größeren Anzahl an *hyphal tip swellings*, einer verstärkten Gallertbildung und einem radialen, kompakt-flachen Wachstumsmuster. Der Präkontakt mit der nicht-lichenisierenden Alge *Myrmecia bisecta* führt zu einem überraschenden Ergebnis. Diese Alge fördert das Hyphenwachstum und die Bildung von Lufthyphen, die unter allen anderen Bedingungen nur

in geringem Maße gebildet werden, am stärksten. Die Ausbildung von Gallerte und von *hyphal tip swellings* bleibt dabei hinter der des arteigenen Photobionten zurück. Die große Anzahl auswachsender Lufthyphen führt ferner zu einem ebenfalls radialen, aber sphärisch-kompakten Wachstumsmuster.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Hyphenlänge, Gallertisierung, Lufthyphenbildung, *hyphal tip swellings* und Wuchsform Faktoren sind, die von der Identität des potenziellen Photobionten beeinflusst werden. Der am stärksten beeinflusste Faktor ist dabei das Längenwachstum der Hyphen, während die Verzweigungszahl eher eine Funktion der Hyphenlänge ist, als dass sie direkt durch die dargebotenen potenziellen Partner beeinflusst wird. Die Auswertung der Ergebnisse zeigt ferner, dass der Gallertbildung eine erkenntnispezifische Funktion zukommt, während die Bedeutung von *hyphal tip swellings* und den, unter Einfluss von *Trebouxia* sp. und *Myrmecia bisecta* auftretenden, parallelen Hyphensträngen unklar bleibt. Die Ergebnisse der Kontrollexperimente legen die Existenz eines *growth arrests* nahe, der weitestgehend von der Art des Kulturmediums unabhängig ist. Statistische Auswertungen nach dem Quantil-Quantil-Plot legen ferner die Existenz von unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten in den untersuchten Mycelien nahe.

4.1.2 Präkontakt mit dem unspezifischen inkompatiblen Photobionten

Mycelien, die während des Präkontakt-Interaktionsassay dem Einfluss des Photobionten *Asterochloris* sp. aus *Lecidea lurida* ausgesetzt sind, zeigen ein netzförmiges Wachstumsmuster, das nahe beieinander liegende Mycelien miteinander verbindet. Die einzelnen Mycelien weisen jedoch geringere Hyphenlängen, geringe Verzweigungsraten sowie weniger Gallertbildung, *hyphal tip swellings* und Lufthyphen auf, als Mycelien unter dem Einfluss von *Trebouxia* sp. oder *Myrmecia bisecta*. Das Hyphenwachstum und die zu beobachtenden Differenzierungen sind, abgesehen von der Kontrolle, am geringsten ausgeprägt. Diese Ergebnisse zeigen Übereinstimmungen mit den Ergebnissen anderer Arbeiten und erlauben einige Rückschlüsse.

Der Photobiont *Asterochloris* sp. wird in vorangegangenen Arbeiten (Schaper & Ott 2003, Schaper 2003), die eine direkte Kontakt-Interaktion mit dem Mycobionten von *Fulgensia bracteata* untersuchten, als unspezifisch und inkompatibel beschrieben. Eine langfristige gemeinsame Kultur führte nur zu gering ausdifferenzierten Mycobiont-Photobiont-Aggregaten, in denen der Pilz ein teilweise parasitisch geprägtes Verhalten gegenüber der Alge zeigte. Eine solche Reaktion wurde bereits am Beispiel des Mycobionten von *Cladonia cristatella* untersucht, der gegenüber nicht-kompatiblen Algen ein ähnliches, gering differenziertes und teilweise parasitisches Verhalten im direkten Kontakt zeigt (Ahmadjian & Jacobs 1983). Die hier durchgeführten Untersuchungen unterstützen die bereits erzielten Ergebnisse und zeigen, dass unspezifische und inkompatible Kontakte nicht nur im direkten Biontenkontakt, sondern bereits im Präkontakt zu geringer ausdifferenzierten Mycelien führen können.

Der hier beschriebene Wachstumstypus – wenige Hyphen, die oft lang und unverzweigt auswachsen, Kontaktstellen mit anderen Mycelien bilden und so ein netzartiges Wachstumsmuster erzeugen – zeigt klare Parallelen zum Wachstumsmuster von Jugendstadien des Mycobionten von *Xanthoria parietina* auf Rinde am natürlichen Standort. Auch dort bildet der Mycobiont von *X. parietina* ein loses und weiträumiges Netzwerk miteinander verknüpfter Mycelien, die auf diese Weise weite Bereiche des Substrates besiedeln (Ott 1987b). In diesem Hyphennetz sind nicht-lichenisierende, substratbesiedelnde Grünalgen vom *Pleurococcus*-Typ eingebettet. Für den Mycobionten von *X. parietina* stellen diese Algen einen unspezifischen und inkompatiblen Partner dar, folglich sind sie weniger intensiv in das Hyphennetz inkorporiert, als es mit spezifischen Photobionten auf dem gleichen Substrat geschieht. In der Flechte *Caloplaca aurantia* stellt sich das Initialstadium der Lichenisierung ebenfalls als ein loses Netzwerk aus Hyphen des Mycobionten, auf dem Substrat vorkommenden trebouxioden Algenzellen und Staubpartikeln dar (Garty & Delarea 1987).

Stellt man die Ergebnisse der eigenen und der hier zitierten Arbeiten in einen Kontext, so zeigt sich ein übereinstimmendes Wachstumsmuster bei den untersuchten Arten *Fulgensia bracteata*, *Xanthoria parietina* und *Caloplaca aurantia*. Zusätzlich unterstützen Kontakt-Interaktionsstudien mit *Xanthoria elegans* und einem inkompatiblen *Asterochloris*-Photobionten das hier vorgestellte generelle Wachstumsmuster (Bauten 2010). Die vier Arten stehen in enger verwandtschaftlicher Beziehung, da sie alle zur Familie der Teloschistaceae gehören. Solch ein Wachstumsmuster kann als eine gemeinsame Anpassungsstrategie verstanden werden, die es den Mycobionten erlaubt, weite Teile des Substrates bereits vor dem Kontakt zum spezifischen Photobionten zu kolonisieren (Ott 1987b). Die inkompatiblen Algen können den Mycobionten bis zum Kontakt mit dem spezifischen Photobionten ernähren und sein Überleben sichern (Beck et al. 1989), sei es über eine parasitisch geprägte (*F. bracteata*) oder eine anders geartete (*X. parietina*, *C. aurantia*) temporäre Interaktion.

Das netzartige Wachstum des Mycobionten von *F. bracteata* scheint eine wichtige evolutionäre Anpassung zu sein, die den Pilz befähigt, einen passenden Photobionten zu erreichen. Während Molina et al. (1997a) vermuten, das radiäre Wachstum sei für diesen Zweck gut geeignet, ist es für den Mycobionten von *F. bracteata* das netzartige Wachstum.

Der evolutionäre Wettbewerbsvorteil einer solchen Strategie könnte in einer erhöhten Wahrscheinlichkeit auf einen Kontakt zum spezifischen Photobionten liegen und die Dauer bis zu einem spezifischen Biontenkontakt überbrücken. Zusätzlich könnte ein, wenn auch gering differenziertes, dafür aber weiträumiges Mycel dem Mycobionten als Ressource dienen und ihm einen Startvorteil für eine erfolgreiche Lichenisierung und Thallognese bieten, sobald der spezifische Photobionten-Kontakt hergestellt wird. Wie die gezeigten Ergebnisse nahe legen, kann solch ein unspezifischer Biontenkontakt bereits in der Präkontaktphase stattfinden. Dies würde eine weitergehende Anpassung an die unvorhersehbaren Gegebenheiten am Keimungsort darstellen. Eine morphologische Reaktion des Mycobionten vor dem direkten Biontenkontakt würde die Umsetzung einer angepassten Wachstumsstra-

tegie frühzeitig ermöglichen. Dadurch könnten die begrenzten Ressourcen des Mycels effizienter verwertet werden, sowie die Besiedlung des Standortes erleichtert und beschleunigt werden. Diese Wachstumsstrategie scheint in jedem Fall eine wichtige evolutionäre Adaption zu sein, die die Überlebenschancen maßgeblich mitzubestimmen vermag.

4.1.3 Präkontakt mit dem spezifischen kompatiblen Photobionten

Mycelien, die während des Präkontakt-Interaktionsassay dem Einfluss des arteigenen und damit spezifischen Photobionten *Trebouxia* sp. aus *Fulgensia bracteata* ausgesetzt sind, zeigen ein radial-planares und kompaktes Wachstum. Besonders in den fortgeschrittenen Entwicklungsstadien am 30. Versuchstag ist dies, ebenso wie das Hyphenwachstum generell, deutlich ausgeprägter als unter dem Einfluss des unspezifischen Photobionten *Asterochloris* sp. Darüber hinaus zeichnen sich die Mycelien durch eine deutlich stärkere Bildung von Gallerte, eine höhere Anzahl von *hyphal tip swellings* und eine geringe Anzahl von Lufthyphen aus. Diese Ergebnisse zeigen Übereinstimmungen mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. So berichten mehrere Autoren übereinstimmend davon, dass ein erfolgreicher Biontenkontakt mit der Bildung größerer Mengen an gallertartigen Substanzen an den Kontaktstellen zwischen den Bionten einhergeht (Ott 1987b, Galun 1988, Ahmadjian 1992, Trembley et al. 2002, Schaper & Ott 2003, Schaper 2003). Das stärkere Hyphenwachstum im Kontakt mit dem arteigenen Photobionten – verglichen mit dem inkompatiblen Photobionten *Asterochloris* sp. – bestätigt sich auch an Kontakt-Interaktionsstudien mit den Bionten aus *Xanthoria elegans* (Bauten 2010). Ott (1987b) konnte zeigen, dass ein erfolgreicher Kontakt zwischen substratbesiedelnden Mycelien von *Xanthoria parietina* und dem spezifischen Photobionten *Trebouxia* sp. zur verstärkten Bildung von Gallerte und zu einem stärkeren sowie differenzierteren Hyphenwachstum führt.

In Interaktionsstudien zwischen dem Mycobionten aus *Fulgensia bracteata* und dem eigenen sowie fünf weiteren Photobionten konnte die Bedeutung der Gallertbildung als Indikator für einen erfolgreichen Biontenkontakt bestätigt werden (Schaper & Ott 2003). Die Bildung von Gallerte erfolgt mit dem spezifischen Photobionten innerhalb der ersten sechs Wochen nach Kontakt und nach neun Wochen wird bereits eine kompakte Gallertmatrix geformt, die beide Bionten umschließt. In der weiteren Entwicklung nimmt diese Gallertbildung zu und verbindet nach sechs Monaten die Bionten in einem dichten gallertartigen Netzwerk miteinander. Mit abnehmend kompatiblen Photobionten nimmt sowohl die Intensität der Gallertbildung, als auch deren Geschwindigkeit ab. Dies zeigt sich daran, dass die Gallerte nur an den direkten Kontaktstellen zwischen den Partnern gebildet wird, die Gallertmatrix lückenhaft oder instabil bleibt und sich teilweise erst nach zwölf Monaten bildet. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse unterstützen die Bedeutung der Gallertbildung als Indikator für einen erfolgreichen Biontenkontakt. Bereits nach 30 Versuchstagen und ohne direkten Biontenkontakt zeigt sich unter dem Einfluss des spezifischen Photobionten eine verstärkte und in vielen Fällen das gesamte Mycel bedeckende

Gallertbildung. Die Signale des Photobionten, die im Mycobionten die gesteigerte Gallertbildung auslösen, scheinen also auch ohne direkten Biontenkontakt übertragen und beantwortet zu werden. Gleiches gilt für jene Signale, die ein spezifisches Wachstumsmuster induzieren und das Wachstum des Mycobionten soweit stimulieren, dass es signifikant stärker ausfällt als in der Kontrolle und in den Versuchen mit *Asterochloris* sp.

Wie im folgenden Abschnitt dargelegt wird, ist das Hyphenwachstum des Mycobionten unter dem Einfluss der nicht-lichenisierenden Grünalge *Myrmecia bisecta* stärker ausgeprägt und zeigt ein gänzlich anderes Muster, als unter dem Einfluss des spezifischen Photobionten *Trebouxia* sp. Dies könnte als Indiz dafür gewertet werden, dass die Signale des spezifischen Photobionten zwar das Wachstum des Mycobionten stimulieren, es gleichzeitig aber auch kontrollieren. Es kann angenommen werden, dass ein an die Erfordernisse beider Partner angepasstes Wachstum eher von Vorteil für die Etablierung der Flechtensymbiose ist, als ein übermäßig starkes Wachstum. Ein unbegrenztes und unkoordiniertes Hyphenwachstum des Mycobionten könnte durch ein entsprechendes Signal des Photobionten zugunsten eines wohl koordinierten und auf den bevorstehenden Kontakt abgestimmten Wachstums inhibiert werden. Solch eine vorab stattfindende Koordination vor dem eigentlichen Biontenkontakt würde dem Mycobionten einen Startvorteil verschaffen und es ihm erlauben, schneller eine erfolgreiche Lichenisierung abzuschließen und Thallogenese einzuleiten.

4.1.4 Präkontakt mit der nicht-lichenisierenden Alge

Unter Präkontakt einfluss der nicht-lichenisierenden Grünalge *Myrmecia bisecta* ist das Hyphenwachstum signifikant stärker vorangeschritten, als in allen anderen Versuchsansätzen. Die Mycelien sind nicht nur größer, sie bilden auch eine große Anzahl an Lufthyphen aus, die den Mycelien ein radial-sphärisches und kompaktes Wachstumsmuster verleihen. Dieses Ergebnis erscheint auf den ersten Blick unerwartet.

Dennoch ist ein vergleichbares Verhalten bereits in Resyntheseexperimenten mit dem Mycobionten von *Cladonia cristatella* beschrieben worden (Ahmadjian & Jacobs 1981). Der Mycobiont von *Cladonia cristatella* wurde mit 17 verschiedenen Algen zusammengebracht. Mit dem eigenen Photobionten (*Trebouxia erici* UTEX 910) und fünf weiteren Photobionten aus dieser Gattung (*T. excentrica*, *T. glomerata*, *T. italiana*, *T. magna* und *T. pyriformis*) lichenisiert der Mycobiont und beide Bionten entwickeln sich innerhalb von zwei Monaten unter Kulturbedingungen zu tendenziell stratifizierten, also in Algenschicht und Medulla geschichteten Thallusschuppen. Mit allen anderen Algen (u. a. *T. anticipata*, *T. crenulata*, *T. gelatinosa* sowie verschiedenen *Pseudotrebourgia*-, *Pseudochlorella*-, *Chlorella*-, *Pleurastrum*-, *Chlorococcus*- und *Nautococcus*-Spezies) bildet der Mycobiont parasitische Interaktionen aus, bei denen die Algenzellen geschädigt werden.

Die einzige Ausnahme ist die freilebende nicht-lichenisierende terrestrische kokkale Grünalge *Friedmannia israeliensis* (Friedmann et al. 1967, Ishida et al. 1999, Ahmadjian 2002), mit der der Mycobiont einen intensiven nicht-parasitischen Kontakt eingeht, der bis

zur Bildung von Präthallusschuppen fortschreitet (Ahmadjian & Jacobs 1981). Interessanterweise konnte die Art *Friedmannia israeliensis* (S. Chantanachat & H. Bold) später der Gattung *Myrmecia* als *Myrmecia israeliensis* (S. Chantanachat & H. Bold) T. Friedl (nach <http://www.catalogueoflife.org> und www.algaebase.org) zugeordnet werden. Mit den hier vorgestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine weitere Art der Gattung, *Myrmecia bisecta*, eine ungewöhnlich starke morphogenetische Reaktion eines Mycobionten hervorruft. Arten aus der Gattung *Myrmecia* sind als Photobiont in einer Reihe von Flechtenarten bekannt (Ahmadjian 1993, Henssen & Jahns 1974, Feige 1978, Richardson et al. 1968, Richardson et al. 1967). Auf der Basis der Präkontakt-Interaktionsstudien und der Ergebnisse von Ahmadjian & Jacobs (1981) kann die Hypothese aufgestellt werden, dass möglicherweise auch den nicht-lichenisierenden Vertretern der Gattung *Myrmecia* eine gewisse Fähigkeit innewohnt, auf Mycobionten oder einzelne von ihnen ausgehende Signale zu reagieren. Geht man davon aus, dass die Arten der Gattung *Myrmecia* durch eine lang andauernde gemeinsame Phylogenie miteinander verbunden sind, so ist es denkbar, dass diese Fähigkeit auf ein gemeinsames genetisches Erbe zurückgeht. Solche Gene könnten in lichenisierenden Arten genutzt werden, in nicht-lichenisierenden Arten dagegen nicht oder nur teilweise. Artefakte dieser Fähigkeit können sich jedoch anscheinend unter den artifiziellen Bedingungen eines Experimentes zeigen, wie frühere Ergebnisse (Ahmadjian & Jacobs 1981) und die hier erzielten Ergebnisse zeigen.

In Resyntheseexperimenten wurde beobachtet, dass die Hyphen von Mycobionten in Kontakt mit inkompatiblen Algen unkontrolliert wachsen und dabei parasitisch in die Algenzellen eindringen können (Ahmadjian & Jacobs 1983). Die Hypothese zu diesen Beobachtungsergebnissen lautet, dass der Mycobiont lediglich ein unvollständiges Signal vermittelt bekommt oder wahrnimmt. Ein Signal, „dass ihm sagt zu wachsen, aber keine Stopp-Komponente beinhaltet“ (Ahmadjian 1992).

Einige Argumente sprechen dafür, dass das ungewöhnliche Wachstum unter Präkontakt-Einfluss von *Myrmecia bisecta* in dieser Arbeit ebenfalls auf ein stimulierendes aber unvollständiges und nicht-koordinierendes Signal zurückzuführen ist: 1) Die Alge übt einen deutlichen Präkontakt-Einfluss auf den Mycobionten von *Fulgensia bracteata* aus; die Existenz eines übertragenen Signals ist somit sehr wahrscheinlich. 2) Wie im Kapitel 3.2 gezeigt wird, unterscheiden sich die Exudationsmuster von *Trebouxia* sp. und *Myrmecia bisecta*; damit ist es wahrscheinlich, dass sich auch die Signale, die beide Algen auszusenden vermögen, unterscheiden. 3) Das Hyphenwachstum ist besonders ausgeprägt und führt zu einem atypischen Wachstumsmuster. 4) Obwohl längere Hyphen und mehr Mycelmasse gebildet werden, ist die Gallertbildung – die als erkenntungsspezifisch gelten kann – geringer und die Lufthyphenbildung höher als unter Einfluss der spezifischen Alge *Trebouxia* sp. (vgl. Kapitel 4.1.6.4 und 4.1.6.2) Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine erfolgreiche Erkennung bestenfalls teilweise erfolgt sein kann.

4.1.5 Spezifität, Selektivität und Kompatibilität im Präkontakt

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, zeigt der Mycobiont klare morphologische Unterschiede und statistisch signifikante Unterschiede in der erreichten Hyphenlänge als Reaktion auf die unterschiedlichen im Präkontakt angebotenen potenziellen Photobionten. Diese Unterschiede können in der Weise interpretiert werden, als dass unterschiedliche Grade an Spezifität, Selektivität und Kompatibilität mit der Erkennung im Präkontakt sichtbar werden. Somit stützen diese Ergebnisse die Ergebnisse aus früheren Arbeiten (Schaper & Ott 2003). Zudem verschieben sie den Zeitpunkt hin zu früheren Interaktionsphasen, bei denen diese Mechanismen zu wirken beginnen: vom direkten Biontenkontakt hin zum nicht physischen Präkontakt. Trotz dieser wichtigen Erkenntnis erlauben die Präkontakt-Interaktionsstudien keine abschließenden Aussagen über die Grade an Spezifität und Selektivität, die zwischen dem Mycobionten von *Fulgensia bracteata* und den drei angebotenen Algen erreicht werden können. Spezifität und Selektivität werden in der Literatur oft als hoch, moderat oder niedrig umschrieben (Galun & Bubrick 1984, Bubrick et al. 1985, Honegger 1992, Beck et al. 1998, Beck 1999, De Priest et al. 2000, Helms et al. 2001, Beck et al. 2002, Brinkmann 2002, Romeike et al. 2002, Schaper & Ott 2003, Yahr et al. 2004). Viele Mycobionten von morphologisch komplexeren Flechtenarten scheinen dabei moderat spezifisch zu sein (Ahmadjian & Jacobs 1981, Gärtner 1985, Friedel 1989). Hohe Spezifität beschreibt die „absolute Exklusivität“ der Lichenisierung zwischen einem Mycobionten und einem Photobionten (Galun 1988), niedrigere Spezifität ermöglicht auch eine Lichenisierung mit einer weiter gefassten Gruppe von Photobionten (Henssen & Jahns 1974) und gibt die taxonomische Bandbreite akzeptabler Partner an (Rambold et al. 1998). Da die Präkontakt-Interaktionsstudien auf einen kurzen Zeitraum der initialen Interaktion *in vitro* beschränkt sind, können keine Aussagen über den späteren Erfolg einer möglicherweise stattfindenden Lichenisierung getroffen werden. Vergleichbares gilt für die Selektivität, die beschreibt, mit welchem/welchen potenziellen Photobionten aus einer natürlichen (Yahr et al. 2004) oder artifiziellen Auswahl (Ahmadjian & Jacobs 1981, Galun 1988) sich ein Mycobiont vorzugsweise assoziiert. Darüber hinaus verhindert der trennende Membranfilter im Versuchsaufbau einen direkten Biontenkontakt und somit eine eventuelle Lichenisierung beider Bionten. Allerdings sind Resynthese-Experimente mit direktem Biontenkontakt nicht Gegenstand der hier bearbeiteten Fragestellungen.

Kontakt-Interaktionsstudien mit den Bionten aus *Cladonia grayi* führen zu dem Schluss, dass bei dieser Flechte nur mit dem kompatiblen Photobionten eine „distinkte morphologische Wachstumsreaktion“ erfolgt (Joneson & Lutzoni 2009). Die hier präsentierten Präkontakt-Interaktionsstudien zeigen hingegen deutlich, dass der Mycobiont von *Fulgensia bracteata* in der Lage ist, im Präkontakt auf unterschiedliche Algen mit unterschiedlichen Wachstumsstrategien zu reagieren (vgl. Kapitel 4.1.2, 4.1.3 und 4.1.4). Solche unterschiedlichen Wachstums- und Besiedlungsstrategien zeigen sich auch in Freilandexperimenten (Ott 1987b). Es gibt ebenfalls Hinweise darauf, dass Standorte mit geringer

Photobiontdichte und hoher Photobiontendiversität geringe Selektivität begünstigen können, während Standorte mit hoher Photobiontdichte und geringer Photobiontendiversität hohe Selektivität begünstigen können (Romeike et al. 2002, Schaper & Ott 2003). Diese unterschiedlichen Strategien könnten darauf zurück zu führen sein, dass der Mycobiont nach der Keimung den Standort behaupten und besiedeln muss, bis die Lichenisierung mit einem geeigneten Photobionten möglich ist. Im Hinblick auf diese Erkenntnisse kann geschlossen werden, dass die Selektivität, also die Auswahl geeigneter Photobionten, nicht nur als Anpassung an verschiedene Standorte unterschiedlich ausgeprägt sein kann, sondern auch in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. So kann eine Überlebensstrategie verwirklicht werden, die optimal an die am Keimungsort vorhandene Algenpopulation angepasst ist. Die frühe Entwicklung des Mycobionten, seine Ernährung und seine Persistenz können für eine ungewisse Zeitspanne auch ohne den geeigneten Photobionten erfolgen. Die in Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 diskutierten Wachstumsmuster können als Hinweis auf eine solche „situationsabhängige adaptive Selektivität“ interpretiert werden.

4.1.6 Morphologisch-anatomische Charakteristika des Präkontaktes

In den meisten Flechten dominiert der Mycobiont die Symbiose und bestimmt maßgeblich die Thallusorganisation; diese kann bemerkenswert hoch sein und Analogien zu Form und Funktion von Geweben höherer Pflanzen aufweisen (Henssen & Jahns 1974). Dabei bilden Flechten, wie Pilze generell, nie echte Gewebe vergleichbar denen in höheren Pflanzen (Lawrey 1984b). Die in Flechten klar umrissenen Strukturen unterscheiden sich in der Ausrichtung des Hyphenwachstums, dem Grad der Verzweigung, der Verflechtung von Hyphensträngen, der Septierungsfrequenz und der Dicke der Zellwand (Lawrey 1984b). Isolierte Mycobionten weisen in der Regel einen niedrigeren Organisationsgrad auf und bilden keinen flechtentypischen Thallus aus. Gewöhnlich wächst der Mycobiont in Kultur als undifferenzierter Mycelklumpen (Henssen & Jahns 1974) oder radialsymmetrisch zentrifugal von innen nach außen mit Lufthyphen und verdichteten Zellen im Zentrum (Honegger 1992). Diese Unterschiede zwischen lichenisiertem und nicht-lichenisiertem Zustand werden als Beleg für eine vom Photobionten ausgehende phänotypische Steuerung der Mycobionten angesehen (Jahns 1988, Honegger 1992).

In dieser Arbeit können verschiedene Charakteristika wie Hyphenform, Hyphenlänge, Verzweigungen, Anastomosen, Gallertbildung und *hyphal tip swellings* zur Unterscheidung von Mycelien und der auf sie einwirkenden Einflüssen verwendet werden. Die erwähnten morphologisch-anatomischen Grundelemente sollen im Folgenden ebenso diskutiert werden, wie ihre generelle Bedeutung für die Entwicklung des Mycobionten und ihre spezielle Bedeutung bei der differentiellen Reaktion des Mycobionten auf die drei Algen im Präkontakt.

4.1.6.1 Hyphenform und Hyphenlänge

Die Hyphe ist die morphologische Grundeinheit der Mycelien bzw. Thalli aller filamentösen Pilze. Die Hyphen bilden ein verzweigtes Röhrensystem mit einem Durchmesser von 0,5 - 100 μm (Dörfelt 1989). Das Wachstum filamentöser Pilze lässt sich in der Natur an der Ausbreitung der Hyphen im Substrat verfolgen (Carlile et al. 2001), wobei der eigentliche Wachstumsprozess eine apikale, also nur an der Spitze auftretende Verlängerung der Hyphen ist. Das Spitzenwachstum der Hyphen ist dabei potenziell unbegrenzt (Deacon 1997). Hyphen sind meist durch Septen in Hyphensegmente unterteilt, die junge oder aktive Segmente von alternden oder degenerierten abgrenzen. Diese Septen werden nach dem apikalen Wachstum von außen nach innen aufgebaut und lassen meist eine zentrale Öffnung, den Porus, frei. Die Hyphensegmente können einen, aber auch mehrere Zellkerne enthalten (Dörfelt 1989).

Der Mycobiont von *Fulgensia bracteata* ist aus Hyphen von ungefähr 5 μm Durchmesser sowie variabler Länge und Septierung aufgebaut. Die Hyphen zeigen in vielen Fällen ein beachtliches Potential zum Längenwachstum. Die Präkontakt-Interaktionsstudien belegen, dass die Hyphenlänge vom Einfluss potenzieller Photobionten am stärksten beeinflusst ist. Während in den Kontrollexperimenten nach 30 Tagen auf W-Agar das durchschnittliche Hyphenwachstum bei $62,5 \pm 3,8 \mu\text{m}$ liegt, erreicht es unter Einfluss von *Asterochloris* sp., *Trebouxia* sp. und *Myrmecia bisecta* jeweils $324,2 \pm 79,0 \mu\text{m}$, $769,2 \pm 123,8 \mu\text{m}$ und $1255,9 \pm 154,1 \mu\text{m}$. Dies bedeutet einen Hyphenlängenzuwachs gegenüber der Kontrolle um den Faktor 5 respektive 12 und 20. Es fällt schwer, solch ein massiv verstärktes Wachstum weit über das Maß der Kontrolle hinaus, mit den mobilisierten Nährstoffreserven der Spore zu erklären. Andererseits zeigen sich vergleichbare Wachstumsmuster und Hyphenlängen sowohl auf dem nährstoffarmen W-Agar als auch auf dem nährstoffreichen MYS1-Agar.

Eine mögliche Erklärung für das differenzielle, aber stets starke Hyphenwachstum unter Einfluss der potenziellen Photobionten könnte im Transfer von Nährstoffen vom Photobionten zum Mycobionten liegen. Es ist bekannt, dass in der Flechtensymbiose der photoautotrophe Photobiont den heterotrophen (biotrophen) Mycobionten durch den Transfer von Metaboliten ernährt. Dabei sind die von Grünalgen hauptsächlich übertragenen Photosyntheseprodukte Ribitol, Erythritol und Sorbitol, während Cyanobakterien Glukose transferieren (Übersicht bei Feige & Jenssen 1992). Es ist ferner bekannt, dass dieser Transfer nach dem Trennen der Bionten aus der Flechtensymbiose innerhalb kurzer Zeit stark nachlässt bzw. gänzlich zum Erliegen kommt (Richardson & Smith 1966, Drew & Smith 1967a, b, Smith 1980, Smith & Douglas 1987).

Ein derart starkes Hyphenwachstum wie oben beschrieben kann nicht oder nicht vollständig durch die Nährstoffe des Mediums erklärt werden, da das Hyphenwachstum der Kontrolle auf dem nährstoffreichen MYS1-Agar nach 30 Versuchstagen lediglich $67,0 \pm 2,0 \mu\text{m}$ beträgt und sich nicht signifikant von dem auf Wasser-Agar unterscheidet. Daher kann man postulieren, dass alle drei potenziellen Photobionten den Mycobionten mit Nährstoffen versorgen. Da der direkte Kontakt zwischen beiden Partnern unterbunden ist, würde dies ein vom Mycobionten

ausgesandtes Signal erfordern, welches die Algen zur Abgabe von Nährstoffen veranlasst. Dabei mag es von Bedeutung sein, dass in den drei Gattungen *Asterochloris*, *Trebouxia* und *Myrmecia* das in der Symbiose exkretierte Kohlenhydrat Ribitol ist (Feige 1978, Richardson et al. 1967, Richardson et al. 1968). Es kann angenommen werden, dass unter den artifiziellen Bedingungen der Präkontakt-Interaktionsstudien der Austausch von mycobiontischem Signal und photobiontischem Kohlenhydrat (sprich Diffusion) genauso möglich ist, wie der Austausch jener Signale, die die differenzielle Reaktion des Mycobionten auslösen. Sollte diese Hypothese korrekt sein, so würde es allerdings auch bedeuten, dass transferiertes Ribitol nicht wie von Ahmadjian (1993) behauptet, das eigentliche Erkennungssignal darstellen würde. Schließlich ist Ribitol das transferierte Kohlenhydrat aller drei untersuchten Algen, während der Mycobiont aber unterschiedlich auf jede von ihnen reagiert. Diese Aussage kann durch die Beobachtung differenzieller Exudationsmuster der drei Algen unterstützt werden (vgl. Kapitel 3.2), da sich hier verschiedenste exudierte Substanzen zeigen, die die differenzielle Reaktion des Mycobionten erklären könnten, nicht aber Ribitol. Diese Aussage kann auch durch die Ergebnisse anderer Arbeiten gestützt werden, in denen die Zugabe von Ribitol zum Kulturmedium keinen morphogenetischen Effekt auslöste (Meeßen 2005, Eppenstein 2008).

4.1.6.2 Lufthyphen

Bei Lufthyphen handelt es sich um Hyphen, die sich über das Niveau des Substrates erheben und in ihrem weiteren Wachstum keinen oder nur wenig Kontakt zum Substrat halten. Lufthyphen werden mit Abstand am häufigsten unter Einfluss von *Myrmecia bisecta* gebildet, wo sie entscheidend zur Morphologie der Mycelien beitragen, selten hingegen unter Einfluss von *Trebouxia* sp. oder *Asterochloris* sp. Diese Lufthyphen sind meist lang ausgewachsen und mehr oder minder gebogen. Durch den fehlenden Kontakt mit dem Medium müssen die Lufthyphen von dem Teil des Mycels mit ernährt werden, der den Kontakt zum Substrat hält. Das Vorkommen von Lufthyphen bei den Mycobionten von *Physcia tenella* und *Physconia distorta* wird als Reaktion auf das gleich bleibend hohe Angebot an Ribitol und die gleich bleibenden Kulturbedingungen, wie zum Beispiel hohe Luftfeuchtigkeit, gedeutet (Etges 2001, Wombacher 2003). Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, dass eine solche Abhängigkeit zwischen Kohlenhydratangebot und Lufthyphenbildung bei *Fulgensia bracteata* nicht existiert. Auf dem saccharose- und glukosehaltigen MYS1-Agar zeigen sich keine höheren Häufigkeiten von Lufthyphen, als auf W-Agar. Diese Beobachtung wird durch Ergebnisse früherer Arbeiten gestützt (Meeßen 2005). Vielmehr ist das Ausmaß der Lufthyphenbildung eindeutig vom potenziellen Photobionten abhängig.

Zusätzlich sollen Lufthyphen dazu dienen, das vormals flache Mycel in eine dreidimensionale Struktur umzuwandeln (Honegger 1992, Wombacher 2003). Auch hier zeigt sich bei *Fulgensia bracteata* ein differenziertes Bild: Unter Einfluss von *Myrmecia bisecta* bilden sich zwar sphärisch erhobene Mycelien, allerdings sind diese Lufthyphen weder durch

starke Gallertbildung noch durch den Kontakt untereinander stabilisiert. Die koordinierte Bildung einer dreidimensionalen Struktur ist nicht ersichtlich. Dagegen spricht ebenfalls, dass Lufthyphen unter Einfluss aller drei Algenarten erratisch an weit voneinander entfernt liegenden und wenig verdichteten Stellen der Mycelien auftreten.

Eine Bedeutung bei der Kolonisierung nicht direkt zugänglicher Substrate, wie es bei Zygomyceten vorkommt, ist ebenfalls denkbar. Dabei sind die Hyphen mit einer Schicht Hydrophobin ummantelt, die es ihnen ermöglicht die Oberflächenspannung des Flüssigkeitsfilmes zu durchbrechen (Carlile et al. 2001). Die Beschichtung von Hyphen mit einer hydrophoben Außenschicht bestätigt sich auch für die Markhyphen und Hyphen der Algenschicht von geschichteten Thalli höher entwickelter Flechten (Honegger 1990b). Diese hydrophoben Substanzen konnten später in Vertretern der Gattung *Xanthoria* als Hydrophobine identifiziert werden (Scherrer et al. 2000, Scherrer et al. 2002, Scherrer & Honegger 2003). Der große Gasraum in diesen Schichten macht eine Beschichtung der Hyphen zwecks verbesserter Wasser- und Nährstoffleitung nötig. Sie verhindert eine Benetzung mit eindringendem Wasser, kanalisiert apoplastisch transportierte Substanzen und verringert deren Verlust. Bei Resyntheseexperimenten mit den Bionten von *Baeomyces rufus*, scheint die Lufthyphenbildung eine Reaktion auf den Biontenkontakt zu sein und die Algenzellen an den Mycobionten zu binden (Trembley et al. 2002). Unter diesem Gesichtspunkt könnten die auftretenden Lufthyphen als Differenzierungsmerkmal von *Fulgensia bracteata* gesehen werden. In wie weit sie eine erfolgte Biontenerkennung widerspiegeln, bleibt jedoch fraglich, denn im Präkontakt bleibt die Lufthyphenbildung mit dem spezifischen Photobionten gering, ist allerdings unter Einfluss von *Myrmecia bisecta* massiv verstärkt.

4.1.6.3 Verzweigungen

Ohne Verzweigung der Hyphen wäre es Pilzen nicht möglich, komplexe Strukturen zu bilden und einen Thallus oder ein vernetztes Mycel zu formen. Das exponentielle Wachstum von Pilzen ist ebenfalls an die Fähigkeit zur Verzweigung gekoppelt (Carlile 1995). Generell lassen sich zwei Arten von Verzweigung unterscheiden. Erstens die dichotome Verzweigung, bei der sich eine Hyphenspitze – ein Apex – in zwei aufspaltet und zweitens die laterale Verzweigung (Carlile 1995). Bei ihr können die Verzweigungspunkte überall an den Hyphen entstehen, stets aber in einiger Distanz zum Apex und meist in Anschluss an ein Septum (Deacon 1997).

Unter experimentellen Bedingungen in dieser Arbeit bildet der Mycobiont von *Fulgensia bracteata* laterale Verzweigungen. Sie kommen nie in direkter Nähe zur Hyphenspitze vor und werden über die gesamte Länge der Hyphen gebildet. Die Verzweigung folgt dabei keinem charakteristischen Winkel. Bei *Fulgensia bracteata* sind sowohl sehr spitze Winkel möglich, die einen parallelen Verlauf von Ursprungshyphe und abgehender Hyphe erlauben, als auch weiter geöffnete bis rechtwinkelige Verzweigungen. Diese Variabilität könnte die

Entstehung von filamentösen oder stark vernetzten Strukturen in Mycel und Thallus begünstigen. Flexible Verzweigungswinkel finden sich auch bei anderen Mycobionten, wie zum Beispiel bei *Physconia distorta* (Wombacher 2003). Die Variabilität der Verzweigungswinkel als eine Voraussetzung für den Aufbau vielgestaltiger und differenzierter Flechtenstrukturen zu sehen, liegt nahe, bedürfte allerdings weiterer Untersuchungen.

Die Mechanismen, die der Verzweigung zu Grunde liegen, sind bisher nur unzureichend verstanden (Carlile 1995). Dennoch wird angenommen, dass Verzweigung durch die Synthese neuen Protoplasmas und die Verfügbarkeit von Grundstoffen zum Zellwandaufbau initiiert wird (Deacon 1997). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich allerdings keine Abhängigkeit von der Nährstoffversorgung oder von der Art des potenziellen Photobionten ableiten. Auf nährstoffarmem W-Agar unterscheidet sich die Verzweigungszahl nicht wesentlich von der auf nährstoffreichem MYS1-Agar. Vielmehr scheint die Anzahl an auftretenden Verzweigungen eine Funktion der Hyphenlänge zu sein. Die Anzahl an Verzweigungen steigt in gleichem Maße, indem die Hyphenlänge zunimmt. In allen Versuchsansätzen zeigen sich dabei Werte zwischen 0,5 und 3,1 Verzweigungen auf 100 µm Hyphenlänge und es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der angebotenen Alge, dem Medium und der Kulturdauer.

Obwohl die meisten der erhaltenen Ergebnisse in den verschiedenen Experimenten auf eine differenzierte Erkennungsreaktion des Mycobionten gegenüber den drei potenziellen Photobionten hinweisen, scheint dies auf das Merkmal der Verzweigungshäufigkeit nicht zuzutreffen. In Arbeiten, die die frühe Relichenisierung mit direktem Biontenkontakt untersucht haben, ist dies anders. Alle Autoren berichten übereinstimmend von einer starken Zunahme an Verzweigungen, die mit der erfolgreichen Biontenerkennung einhergeht und zum Einhüllen der Photobiontenzellen durch kürzere Hyphen führt (Ahmadjian & Jacobs 1981, Galun 1988, Ahmadjian 1992, Honegger 1992, Trembley et al. 2002, Schaper & Ott 2003, Bauten 2010). Das Merkmal der Verzweigung zeigt somit einen deutlichen Unterschied zwischen Präkontakt-Reaktionen und Kontakt-Reaktionen. Eine Zunahme an Verzweigungen scheint an einen thigmotropischen, also durch Berührung der Bionten vermittelten, Reiz gekoppelt zu sein und lässt sich nicht bereits im Präkontakt induzieren.

4.1.6.4 Gallertbildung

Die Bedeutung der Gallertbildung als Erkennungsreaktion wird bereits in Kapitel 4.1.3 (Präkontakt mit dem spezifischen kompatiblen Photobionten) diskutiert. Bei der spezifischen Bionterkennung zwischen den Mycobionten von *Fulgensia bracteata* und dem arteigenen Photobionten *Trebouxia* sp. scheint die Gallertbildung von besonderer Bedeutung zu sein. Darüber hinaus ist die Gallertbildung allerdings auch unter anderen Gesichtspunkten beachtenswert: Unter den experimentellen Bedingungen der durchgeführten Kulturversuche bildet sich bei *Fulgensia bracteata* besonders als Reaktion auf den eigenen Photobionten, *Trebouxia* sp. reichlich Gallerte, deutlich weniger bildet sich unter Einfluss von *Asterochloris* sp. und *Myrmecia bisecta*. Starke Gallertisierung kann nicht nur in Abhängigkeit vom Ernährungsstatus (Etges 2001, Wombacher 2003), sondern auch während verschiedener Regenerations-, Ansiedlungs- und Interaktionsprozesse auftreten. Solche Prozesse wurden bei der Flechte *Placynthium nigrum* detailliert untersucht (Schaper 2003). Bei axenischen Mycobiontenkulturen von *Fulgensia bracteata* unter Einfluss verschiedener Kohlenhydrate beschränkte sich die Gallertbildung auf die zentralen Bereiche ausgekeimter Sporencuster und variierte auch nicht bei verschiedenen Versuchsbedingungen (Meeßen 2005) während bei *Physconia distorta* die Menge an Gallerte durch die Zugabe von Glukose und Ribitol gefördert wird (Wombacher 2003).

Auch in anderer Hinsicht ist die Bildung von Gallerte für die Flechtensymbiose von großer Bedeutung. In Freilandexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Gallerte junge Mycelien mit dem Substrat verbindet (Schuster 1985, Ott 1987b). Eine solche Befestigungsfunktion kann für die Ergebnisse dieser Arbeit verneint werden, da sie in den Experimenten der Kontrolle wesentlich geringer ausfällt und unter Einfluss der verschiedenen Algen differenziell gebildet wird. Bei einer generellen Befestigungsfunktion mit dem stets identischen Substrat (Filter) sollte die Gallertbildung jedoch stets in gleicher Weise erfolgen.

Während der Lichenisierung bildet zumeist der Mycobiont eine Gallertmatrix, die die Hyphen einhüllt und eine Schutzschicht um junge Thallusloben bildet (Ahmadjian & Jacobs 1983). Diese Beobachtung konnte auch auf Kontakte des Mycobionten von *Xanthoria parietina* mit Fremdalgen ausgedehnt werden, wobei sie – wie auch in den Ergebnissen dieser Arbeit – deutlich geringer ausfällt als bei Kontakt mit der flechteneigenen Alge (Ott 1987b). Im Verlauf der Thallogenese verbindet Gallerte die Hyphen eines Thallus zu einer stabilen Struktur. Bei der Etablierung des Biontenkontaktes und danach sekretiert nicht nur der Mycobiont Gallerte, sondern auch die Photobionten scheiden unterschiedlich dicke Gallertmatrizes aus, die wiederum die Pilzhyphen binden (Schuster 1985). Auch zwischen dem Mycobionten der Flechte *Baeomyces rufus* und dem spezifischen Photobionten *Elliptochloris bilobata* wird nach Kontakt Gallerte sekretiert, dies ist bereits einen Tag nach dem Biontenkontakt zu beobachten (Trembley et al. 2002).

4.1.6.5 Anastomosen

Die prinzipielle Entwicklung eines Pilzmycels erfolgt durch radial auswachsende und sich sukzessiv durch Verzweigungen erster, zweiter und nachfolgender Ordnungen ausbreitende Hyphen. Die inneren Bereiche des Mycels verarmen somit an Nährstoffen und in diesen Zonen bilden sich vermehrt Anastomosen (Carlile 1995). Sie formen ein Netzwerk, das die einzelnen Teile des Protoplasmas verbindet und Austauschwege für Stoffwechselprodukte schafft. Anastomosen schaffen damit die Voraussetzung für größere, differenzierte Strukturen (Deacon 1997). Diese sekundären Verbindungen, die durch eine eng begrenzte Auflösung der Zellwand und ein Verschmelzen des Protoplasten entstehen (Dörfelt 1989) werden auch in den hier durchgeführten Experimenten mit *Fulgenisa bracteata* gefunden. Über ihre Häufigkeit lassen sich nur ungenaue Angaben machen. Die Kontaktstellen zwischen Hyphen bilden sich meistens, indem sie übereinander liegen, statt nebeneinander. Dass an diesen Stellen Anastomosen gebildet werden ist wahrscheinlich, kann aber nicht unter dem REM beobachtet werden. Weder positiver noch negativer Autotropismus konnte beobachtet werden und Kontakt wird sowohl mit mycelfremden als auch myceleigenen Hyphen hergestellt, wenn sich die Hyphen kreuzen. In einigen Fällen war eine Anastomosenbildung zu erkennen, in anderen blieb sie aus oben genannten Gründen fraglich. In der Literatur wird berichtet, dass sich Hyphen meiden, es also zu einem ausgeprägten negativen Autotropismus kommt. Selektiver positiver Autotropismus soll zu Anastomosen führen (Carlile 1995, Wombacher 2003). Weder das eine noch das andere konnte bei Versuchen mit *Fulgenisa bracteata* beobachtet werden, allerdings kann angenommen werden, dass die Anastomosen für das netzartige, einzelne Mycelien verbindende, Wachstumsmuster unter Einfluss von *Asterochloris* sp. besonders bedeutsam ist. So werden größere Bereiche des Substrates besiedelt und Ressourcen besser allokiert, also von einem Bereich des Mycels in einen anderen transferiert. In diesem Fall ist es möglich, dass die Versuchsdauer von 30 Tagen nicht ausreichend war, um eine vermehrte Anastomosenbildung beobachten zu können.

4.1.6.6 Hyphal Tip Swellings

Angeschwollene Hyphenspitzen können unter allen Versuchsbedingungen gefunden werden, in erhöhter Häufigkeit treten sie allerdings unter dem Einfluss des arteigenen und spezifischen Photobionten *Trebouxia* sp. auf. Ob *hyphal tip swellings* eine für die Biontenerkennung relevante Rolle spielen oder ob ihre Bildung durch andere Faktoren ausgelöst wird, kann aufgrund der hier gewonnenen Daten nicht geklärt werden. *Hyphal tip swellings* wurden bereits in einer Vielzahl von filamentösen Pilzen beschrieben. Sie zeigen sich dort allerdings meist unter experimentellen Bedingung in denen β -Lactam-Antibiotika (Gray et al. 1990) oder Enzyme wie Lysozym (Gray et al 1990), Chitinasen oder β -1,3-Glucanasen (Arlorio et al. 1992) zum Einsatz kommen. Darüber hinaus werden *hyphal tip swellings* bei Mutanten beobachtet, die mit der Aktinsynthese und dem apikalen Spitzenwachstum in der Hyphe assoziiert sind. Die Aktinsynthese kann auch durch die Zugabe von Cytochalasinen, einer

Gruppe von pilzlichen Metaboliten, beeinflusst werden, und ebenso zur Bildung von *hyphal tip swellings* führen (Übersicht bei Cooper 1987). Damit scheinen *hyphal tip swellings* vermehrt bei gestörter Hyphenmorphogenese und Zellpolarität aufzutreten (Cooper 1987, Srinivasam et al. 1996, Wendland & Philippsen 2001). In welcher Weise sich das Auftreten von *hyphal tip swellings* in den Präkontakt-Interaktionsstudien erklären lässt, ist unklar. Da keine der Substanzen verwendet wurde, die als Auslöser von *hyphal tip swellings* bekannt sind, kann davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit gefundenen Formen zwar phänomenologisch ähnlich sind, aber auf eine andere Ursache zurückgehen. Da sie auch in den nicht durch Algen beeinflussten Kontrollexperimenten auftreten, ist eine Bedeutung von *hyphal tip swellings* als Vorstufe von Appressorien unwahrscheinlich.

4.1.6.7 Tropismen

In den Präkontakt-Interaktionsstudien konnten keine Hinweise auf Tropismen des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* gegenüber den drei dargebotenen potenziellen Photobionten beobachtet werden. Obwohl positiver Autotropismus (aufeinander zuwachsende Hyphen zwecks Anastomosenbildung) und negativer Autotropismus (einander ausweichende Hyphen) in Kulturexperimenten mit dem Mycobionten von *Physconia distorta* beobachtet wurde (Wombacher 2003), finden sich bei den hier vorgestellten Experimenten keinerlei Hinweise darauf. Zum Vorkommen von Chemotropismus bei Flechtenpilzen gibt es abweichende Befunde. Bei *Xanthoria parietina*, *Physconia distorta* und *Anaptychia ciliaris* wurde positiver Chemotropismus von Mycelien auf glukose- und naphthalinessigsäurehaltigen Medien beobachtet, bei *Physcia tenella* nur auf Medien mit Naphthalinessigsäure (Etges, 2001). Die Hyphen dieser Arten wuchsen dabei verstärkt durch den Membranfilter in Richtung des Mediums ein. Ahmadjian et al. (1978) kommen zu anderen Ergebnissen. Bei ihren Untersuchungen an *Lecidea albocaerulescens* kamen sie zu dem Schluss, dass es keine Beweise gibt, die die Annahme einer chemotropischen Reaktion stützen. Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen zeigen sich keine Hinweise auf eine chemotropische Reaktion des Mycobionten von *F. bracteata*. Der spezielle Versuchsaufbau der Präkontakt-Interaktionsstudien verhinderte einen direkten Kontakt zwischen den Bionten. Daher können in dieser Arbeit keine verallgemeinernden Aussagen über das Vorkommen von thigmotropischen Reaktionen getätigt werden. Frühere Erkenntnisse sprechen dafür, dass die Initialreaktion des Mycobionten thigmotropisch an spezifischen Oberflächenstrukturen des potenziellen Photobionten ausgelöst wird (Ahmadjian et al. 1978, Ahmadjian & Jacobs 1983). Die weiter gehende Reaktion, die den Lichenisierungsprozess auslöst, wird als sekundäres Ereignis eingestuft und soll durch ein zwischen Photobiont und Mycobiont übertragenes Signal vermittelt werden (Ahmadjian 1992). Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen hingegen deutlich, dass schon im Präkontakt ein Signal des Photobionten bzw. ein Signalaustausch zwischen den Bionten in der Lage ist, die morphologische Reaktion des Mycobionten von *F. bracteata* zu beeinflussen.

4.1.7 Alternative Wachstumsstrategien des Mycobionten

Über die bisher diskutierten Aspekte hinaus, die direkt an die Beantwortung der eingangs formulierten Hypothesen gekoppelt sind, zeigen sich in der Auswertung noch weitere Ergebnisse. Diese zusätzlichen Beobachtungen lassen vermuten, dass es neben differenzierten und adaptiven Präkontakt-Reaktionen auf unterschiedlich kompatible Algen (im Besonderen auf *Asterochloris* sp und *Trebouxia* sp.) noch weitere Strategien gibt, mit denen der Mycobiont von *Fulgensia bracteata* auf die unvorhersehbaren Bedingungen am Keimungsort reagieren kann.

4.1.7.1 Growth Arrest

So zeigt sich, dass in den Kontrollexperimenten auf W-Agar zwischen dem 20. und 30. Versuchstag kein Hyphenwachstum mehr stattfindet, während es auf MYS1-Agar zwar bis zum 30. Versuchtag voranschreitet, dafür aber über den gegebenen Versuchszeitraum langsamer erfolgt. Auf den beiden Medien beträgt die durchschnittliche Hyphenlänge pro Spore bei $62,5 \pm 3,8 \mu\text{m}$ (W-Agar) bzw. bei $67,0 \pm 2,0 \mu\text{m}$ (MYS1-Agar). Beide Werte unterscheiden sich nicht signifikant und bei keiner der untersuchten Sporen wird eine Hyphenlängen von mehr als $200 \mu\text{m}$ ausgebildet.

Im Vergleich mit dem Hyphenwachstum unter Einfluss aller drei potenzieller Photobionten sind die oben genannten Werte äußerst gering. In vorangegangenen axenischen Kulturexperimenten zeigt sich ebenfalls nur ein geringes Wachstum des unbeeinflussten Mycobionten (Meeßen 2005). Obwohl für die vorangegangenen Arbeiten keine gemessenen Hyphenlängen bekannt sind, erscheint dieses Wachstum auch im Vergleich zu den axenisch kultivierten Mycobionten von *Xanthoria parietina*, *Physcia tenella*, *Anaptychia ciliaris* (Etges, 2001), *Physconia distorta* (Wombacher 2003), und *Xanthoria elegans* (Sill 2009) gering. Da dieses Wachstum sowohl auf dem nährstoffarmen W-Agar, als auch auf dem nährstoffreichen MYS1-Agar auftritt und der Versuchsaufbau eine Aufnahme gelöster Nährstoffe nicht verhindert, kann ein Ernährungseffekt ausgeschlossen werden.

Die Auswertung dieser Ergebnisse führt zu dem Schluss, dass der Mycobiont unter unbeeinflussten Kulturbedingungen nach der Auskeimphase in eine Phase des intern induzierten Wachstumsstopps (engl. *growth arrest*) eintritt. Solch ein intern ausgelöster *growth arrest*, der mit einer Phase relativer zellulärer Inaktivität einhergeht, ist bereits von den Symbionten der vesikulär-arbuskulären Mykorrhiza bekannt (VAM, Mosse 1959, Hepper & Smith 1976, Giovanetti 2002). Bei diesen Symbionten handelt es sich um Arten aus der Ordnung der Glomerales und dem Stamm der Glomeromycota (Schüßler et al. 2001), die eine Schwestergruppe der Dikarya (Asco- und Basidiomycota) darstellen. Die VAM-Symbionten zeigen in Bezug auf den *growth arrest* eine gewisse Analogie zu den hier erzielten Ergebnissen. Bei der Untersuchung von VAM-Symbionten kann gezeigt werden, dass die Bereitstellung von Nährstoffen keinen Einfluss auf den *growth arrest* hat (Daniels & Trappe 1980, Bécard & Fortin 1988). In ihrer weiteren Entwicklung sind VAM-Symbionten von der

Rezeption eines wirtsspezifischen Signals abhängig, das den *growth arrest* beendet und tiefgreifende Veränderungen in der Morphologie des Pilzes hervorruft (Siqueira et al. 1991, Giovanetti et al. 1993, 1994, 1996, Ishii et al. 1997). Neben den in dieser Arbeit erbrachten Hinweisen auf einen Wachstumsstopp – und eine ähnlich geartete signalabhängige Veränderung der Mycobiontenmorphologie – gibt es auch Freilanduntersuchungen, die belegen können, dass ein derartiger *growth arrest* erstens kein Artefakt der Kulturbedingungen ist und zweitens nicht nur beim Mycobionten von *Fulgensia bracteata* auftritt. Die Keimhyphen des Mycobionten von *Rhizocarpon lecanorinum* bleiben auf ihrem natürlichen Substrat und in Abwesenheit von Algen kurz (bis ca. 15 µm) und zeigen kein weitergehendes Wachstum bis der spezifische Kontakt zur kompatiblen *Trebouxia*-Alge das Wachstum reaktiviert (Clayden 1998). Bei Sporen von *Peltigera horizontalis* und *Peltigera praetextata* ist es nötig, wässrige Extrakte des Photobionten zuzusetzen, um „einen eindeutigen Beweis für die Keimung zu erhalten“ (Scott 1959, 1964 nach Bailey 1976) und auch andere Photobionten-Extrakte wirken sich stimulierend auf die Keimung und das frühe Mycelwachstum von Mycobionten von *Lobaria laetevirens* und *L. pulmonaria* aus (Lallemant & Bernard 1977).

Der Vorteil eines solchen *growth arrest* liegt bei den VAM-Symbionten darin, dass sie an einem einmal besiedelten Standort für längere Zeit überdauern können und so die Wahrscheinlichkeit auf den Kontakt zum obligat notwendigen Wirt erhöhen können (Giovanetti 2002). Auch für Flechten wird eine ähnliche Strategie diskutiert. So spekuliert Smith (1921), dass am Keimungsort „reine Mycelstadien lange Perioden ohne große Veränderung überdauern könnten.“ Für die hier präsentierten Ergebnisse bietet sich eine ähnliche Deutung an: Ein programmierter Wachstumsstopp in Abwesenheit eines stimulierenden Signals ist eine Anpassung an die unvorhersehbaren Standortbedingungen am Keimungsort, hilft den einmal besiedelten Standort zu behaupten und kann dadurch den Relichenisierungserfolg langfristig erhöhen. Die Tatsache, dass sich ein ähnliches Verhalten bei VAM-Symbionten und (einigen) Mycobionten entwickelt hat, kann als eine allgemeine Strategie interpretiert werden, die sich aus ähnlichen Anforderungen im Lebenszyklus der Pilze heraus konvergent entwickelt hat.

4.1.7.2 Keimung

Die Keimungsrate der Ascosporen von *Fulgensia bracteata* auf den Medien W-Agar und MYS1-Agar unterscheidet sich nach 10 Versuchstagen nicht signifikant und liegt zwischen 65-80%. Abgesehen von der Keimungsrate unter Einfluss der nicht-lichenisierenden Alge *Myrmecia bisecta*, die höher liegt, sind auf MYS1-Agar die Keimungsraten in allen Versuchsansätzen ähnlich und ändern sich im Verlauf der Versuchsdauer nicht wesentlich. Auf W-Agar steigt die Keimungsrate zwischen dem 10. und 20. und zwischen dem 20. und 30. Versuchstag hingegen stetig an. Zwischen den einzelnen Versuchsansätzen (Kontrolle, Einfluss von *Asterochloris* sp., *Trebouxia* sp. und *Myrmecia bisecta*) unterscheiden sich die Keimungsraten allerdings nicht. Auf W-Agar scheint eine Nachkeimung der Sporen zu

erfolgen, die nach 30 Versuchstagen die Keimungsraten auf 82-95 % ansteigen lässt. Die anfängliche Keimungsrate von 65-80 % stimmt mit den ermittelten Keimungsraten anderer Mycobionten überein, die zwischen 60-80 % liegen (Belandria et al. 1989). Die Nachkeimung auf W-Agar könnte dabei durch den keimungsstimulierenden Effekt von niedrigen Nährstoffkonzentrationen ausgelöst werden, wie es für die frühe Ascosporenkeimung anderer Mycobionten bereits untersucht wurde (Pyatt 1968). Die fehlende Nachkeimung auf MYS1-Agar könnte hingegen durch die hohen Zuckerkonzentrationen oder einen abweichenden pH-Wert bedingt sein. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Keimung (Ostrofsky & Denison 1980), aber auch der hemmende Effekt hoher Glukosekonzentrationen auf die Keimung von *Physconia distorta* (Belandria et al. 1989) konnten bereits bewiesen werden. Wie bereits erwähnt, hat die Art der angebotenen Alge keinen wesentlichen Einfluss auf die Keimung. Dies stimmt mit anderen Untersuchungen überein, die zeigen konnten, dass wirtsspezifische Signale von Mykorrhiza-Wirten nur selten einen Einfluss auf die Keimung der Symbiontensporen haben (Übersicht bei Deacon 1994). Die hier erzielten Ergebnisse sprechen ebenfalls dafür, dass der Einfluss potenzieller Algenpartner erst nach der Keimung wirksam wird, zum Beispiel bei der Aufhebung des *growth arrest* und der Beeinflussung der Wachstumsstrategie des Mycobionten (siehe vorangegangene Aspekte der Diskussion).

4.1.7.3 Unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten

Aus der statistischen Auswertung der Hyphenlängenverteilung im Quantil-Quantil-Plot (Kapitel 3.1.4.6, Abb. 3.22) geht ferner hervor, dass in allen ausgewerteten Ansätzen unter Einfluss der drei Algenarten kleine Hyphenlängen und sehr große Hyphenlängen überrepräsentiert sind. Es zeigt sich eine bimodale Verteilung der Hyphenlängen. Diese Ergebnisse könnten als Indiz dafür gewertet werden, dass die auskeimenden Sporen auf Grund von nicht näher zu bestimmenden internen (z. B. genetischen) oder externen (z. B. gegenseitige Beeinflussung) Faktoren verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten aufweisen. Dieses Verhalten könnte darauf hinweisen, dass selbst unter gleichen Standortbedingungen nicht alle auskeimenden Sporen von *Fulgensia bracteata* die gleiche Wachstumsstrategie verfolgen. Auch hier könnte es sich vorteilhaft auf den Relichenisierungs- und damit den Reproduktionserfolg auswirken, wenn die Sporen unterschiedliche Wachstumsstrategien verfolgen. Scheitert die eine Strategie (z. B. die des schnellen Auswachsens), so mag die andere Strategie (z. B. die des langsamen Auswachsens) an einem bestimmten Standort erfolgreicher sein. Da die im vorherigen Abschnitt (Kapitel 4.1.7.2) beschriebene Nachkeimung kontinuierlich und nur auf W-Agar erfolgt, erscheint es als wenig wahrscheinlich, dass sie der Grund für die bimodale Verteilung der Hyphenlängen in allen von Algen beeinflussten Versuchsansätzen ist.

4.1.7.4 Verbreitung der Ascosporen

Die vorherigen Kapitel der Diskussion erörtern die Wachstumsstrategien und Reaktionen, die der auskeimende Mycobiont am neu erschlossenen Standort anwenden kann, um aktiv seinen Relichenisierungserfolg zu erhöhen. Darüber hinaus kann auch der Vorgang des Ausstreuens einen Einfluss auf den Lichenisierungserfolg ausüben. Obwohl die Bedeutung von Ascosporen als Verbreitungseinheit nicht vollständig verstanden ist, da sie nur einen Partner der Symbiose verbreitet, ist sie eine häufige Verbreitungseinheit bei Flechten.

Viele Flechtenarten, besonders Krustenflechten produzieren keine Soredien, Isidien oder andere vegetative Diasporen, dafür aber häufig Ascosporen. Dies trifft auch auf *Fulgensia bracteata* zu. Die Resynthese von Flechten aus auskeimenden Ascosporen und frei vorkommenden Algen sollte daher in der Natur häufig vorkommen (Bailey 1976). Die Verbreitungsdistanz von Ascosporen ist eng an ihre Größe und die Anzahl von Ascosporen gekoppelt, die aus einem Ascus ausgeschleudert werden. Ascosporen von Mycobionten besitzen dabei Durchmesser zwischen 1 µm in der Gattung *Acarospora* und 510 µm in *Bacidia marginalis* (Bailey 1976). Mit Hilfe von Wind können Sporen über große Entfernungen hinweg transportiert werden. Unter experimentellen Bedingungen beträgt die maximale Distanz, die Ascosporen horizontal ausgestreut werden 4,5 cm bei *Rhizocarpon umbilicatum* (Bailey & Garrett 1968).

Diese geringen Distanzen können bei Windstille dazu führen, dass die Ascosporen in relativer Nähe zum Thallus auskeimen. Die Nähe zu einem etablierten Flechtenstandort, dem der Ursprungsflechte, könnte mehrere Konsequenzen haben. Man kann annehmen, dass in einem solchen Umfeld die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, kompatible Photobionten aus z. B. degenerierenden Thalli, Thallusfragmenten oder vegetativen Verbreitungseinheiten vorzufinden. Für *Fulgensia bracteata* ergeben sich in dieser Hinsicht mehrere Möglichkeiten auf kompatible oder inkompatible Photobionten zu treffen. Die Flechte kommt am natürlichen Standort in enger Assoziation mit einer Anzahl weiterer Flechtenarten vor, der „Bunten Erdflechtengesellschaft“ (Schaper 2003, Schaper & Ott 2003, de Vera 2000). In dieser Assoziation finden sich zahlreiche Thalli von *Fulgensia bracteata* und Thalli von *Toninia sedifolia*, die den identischen Photobionten besitzen (Schaper & Ott 2003). Auswachsene Mycelien von *F. bracteata* können in *Toninia sedifolia* einwachsen, und mit deren Photobionten lichenisieren (*algal stealing*, Ott et al. 1995). In der „Bunten Erdflechtengesellschaft“ (Toninio-Psoretum nach Poelt 1969) finden sich zudem weitere Flechten, auf deren Photobionten der Mycobiont von *F. bracteata* in Resynthese-Experimenten eine mäßige bis geringe Kompatibilität aufweist und eine graduelle, teils parasitisch geprägte Interaktionen zeigt (Schaper 2003, Schaper & Ott 2003). Darunter befindet sich auch die Flechte *Lecidea lurida*, auf deren Photobionten der Mycobiont von *F. bracteata* in den durchgeführten Experimenten mit einem netzartigen Mycelwachstum reagiert (siehe Kapitel 4.1.2). Auch auf diese potenziellen Interaktionspartner kann der Mycobiont an solch „ursprungsnahen Standorten“ mit erhöhter Wahrscheinlichkeit treffen.

Desweiteren sollte ein auswachsender Mycobiont von *F. bracteata* an einem solchen Standort mit einer stärker ausgeprägten Konkurrenz konfrontiert sein. An diesem Standort werden bereits überproportional häufig etablierte Flechtengemeinschaften anzutreffen sein, die genau jene Nische besetzen, die der Mycobiont erobern muss, um seinen eigenen Reproduktionserfolg sicherzustellen.

Aus diesen Gründen sollten Erkennungsmechanismen, die bereits während des Präkontaktes wirksam sind und eine Unterscheidung zwischen kompatiblen und inkompatiblen Algen erlauben, dem Mycobionten von *Fulgensia bracteata* einen adaptiven und evolutiven Vorteil gewähren.

4.1.8 Einfluss der Kulturmedien auf die Reaktion des Mycobionten

Im Folgenden sollen die Unterschiede diskutiert werden, die die Verwendung von zwei unterschiedlichen Medien hervorruft. Generell sind die Unterschiede zwischen nährstoffarmem Wasser-Agar und nährstoffreichem MYS1-Agar gering. Der Mycobiont zeigt auf beiden Medien ähnliche Reaktionen auf die drei angebotenen Algen. Obwohl die Mycelien in ihrer Größe variabel sind (vgl. Abb. 3.1a bis Abb. 3.16c) zeigen die Wachstumsmuster auf W-Agar ein homogeneres und auf MYS1-Agar ein heterogeneres aber dennoch charakteristisches Wachstumsmuster. Ein Vergleich der durchschnittlichen Hyphenlängen nach 30 Versuchstagen bestätigt diesen Eindruck. Die Hyphenlängen sind auf MYS1-Agar kürzer und ihre Variabilität ist höher, ein durch die Nährstoffkonzentration bedingter weitreichender Einfluss auf das Wachstumsmuster des Mycobionten zeigt sich jedoch nicht. Die Unterschiede der Wachstumsstärke und das heterogenere Wachstumsmuster könnten sich durch einen ähnlichen Effekt erklären lassen, wie bereits für die Keimung beschrieben: Nährstoffarme Medien scheinen sich positiv auf die Keimung auszuwirken (Pyatt 1974), während glukosereiche Medien die Keimung hemmen (Belandria et al. 1989).

Ein ähnlicher Effekt könnte auch auf das sich anschließende Hyphenwachstum wirken. Flechten sind in der Lage, extreme Habitate und unwirtliche Standorte wie Felsen zu besiedeln (Brodo et al. 2001). Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass auskeimende Flechtenmycobionten an hohe und leicht zugängliche Nährstoffkonzentrationen adaptiert sind, wie sie im experimentellen Aufbau auf MYS1-Agar vorherrschen. Die Reaktionen des Mycobionten auf beiden Medien ähneln sich auf nährstoffarmem W-Agar und auf nährstoffreichem MYS1-Agar, daher scheint ein nährstoffbedingter Effekt auf die morphologischen Reaktionen des Mycobionten unwahrscheinlich. Die Reaktionen scheinen durch den angebotenen Photobionten bzw. Alge bedingt zu sein. Das starke Hyphenwachstum unter Einfluss der drei eingesetzten Algen wäre in diesem Falle nicht von der umgebenden Nährstoffverfügbarkeit abhängig, sondern von jenen Nährstoffen, die spezifisch von den Photobionten bzw. Alge exudiert und vom Mycobionten verwertet würden.

Die von der Nährstoffverfügbarkeit abhängigen Strategien von Guerilla und Phalanx werden in der Literatur (Carlile 1995) diskutiert: Auf nährstoffarmen Medien sollten lange und wenig

verzweigte Hyphen auswachsen, um nährstoffarme Bereiche zu überbrücken und neue Nährstoffquellen zu erschließen (Guerilla-Strategie). Auf nährstoffreichen Medien sollte der Pilz eine kompakte, stark verzweigte, stationäre Form annehmen, um die lokalen Nährstoffe optimal auszuschöpfen (Phalanx-Strategie). Im Falle des Mycobionten von *Fulgensia bracteata*, zeigt sich auf keinem der beiden Medien ein vergleichbares Wachstumsmuster. Die Ausbildung des netzartigen, des planar-kompakten und des sphärisch-kompakten Wachstumsmusters unter Einfluss von *Asterochloris* sp., *Trebouxia* sp. und *Myrmecia bisecta* verläuft unabhängig vom Medium, aber spezifisch für die jeweils angebotene Alge. Die Wachstumsmuster des Mycobionten werden folglich nicht von der Verfügbarkeit an Nährstoffen, sondern von der Verfügbarkeit potenzieller Photobionten determiniert.

4.1.9 Modelle zur Interaktion im Präkontakt

Regulationsmechanismen zwischen den beiden Flechtenbionten werden als essenzielle Voraussetzung für Erkennung, Wachstum, Entwicklung und Differenzierung in der Flechtensymbiose angesehen (Honegger 1984, 1987, 1998, Hill 1985, 1989, 1992, Ott et al. 2000). Für die initiale und die andauernde Erkennung werden Erkennungsmechanismen zwischen den potenziellen Bionten als notwendig erachtet (Bubrick & Galun 1980, Galun 1988, Ahmadjian et al. 1987, Ahmadjian 1992, 1993, Honegger 1987, 1992, Ott 1987b, Vicente 1985). Die Aufgaben solcher Mechanismen und Signale sind einerseits, dass der Mycobiont die Entwicklung und Zellteilungsaktivität des Photobionten kontrolliert (Henssen & Jahns 1974, Hill 1989, 1992), und andererseits, dass der (potenzielle) Photobiont einen morphogenetischen Einfluss auf den Mycobionten ausübt und damit den entscheidenden Impuls für die Entwicklung eines Thallus gibt (Jahns 1988). Wenn die Bionten einzeln verbreitet werden, zum Beispiel durch sexuell produzierte Ascosporen, so müssen die Erkennungsmechanismen zusätzlich den Mycobionten in die Lage versetzen, einen obligat notwendigen und kompatiblen Photobionten zu finden, zu erkennen, an sich zu binden und mit ihm einen erfolgreichen Relichenisierungsprozess einzuleiten.

In dieser Arbeit wird der Präkontakt zwischen potenziellen Symbiosepartnern am Modellsystem *Fulgensia bracteata* detailliert untersucht und ein deutlicher Präkontakteinfluss auf den Mycobionten belegt. Ein solcher Präkontakt wird zwar als erste Stufe eines fünfstufigen Lichenisierungsschemas postuliert, aber bisher nicht experimentell bestätigt (Galun 1988). Nach diesem Schema sind die fünf Stufen: 1. Präkontakt, 2. Kontakt, 3. Umhüllung der Algenzellen durch Hyphen, 4. Bildung einer gemeinsamen Gelmatrix, 5. morphologische, physiologische und biochemische Anpassungen. Der Mycobiont zeigt unter standardisierten Kulturbedingungen differenzielle Präkontakt-Reaktionen auf den kompatiblen eigenen Photobionten (*Trebouxia* sp.), den als inkompatibel erkannten Photobionten aus *Lecidea lurida* (*Asterochloris* sp.) und auf die nicht-lichenisierende Alge *Myrmecia bisecta*. Die Reaktionen des Mycobionten auf *Trebouxia* sp. und *Asterochloris* sp. werden, im Kontext zu bereits geleisteten Arbeiten (Ott 1987b, Schaper & Ott 2003), als unterschiedliche

Wachstumsstrategien interpretiert. Die Reaktion auf *Myrmecia bisecta* wird als ein starkes aber ungerichtetes Wachstum interpretiert, da zwar ein morphogenetischer Reiz auf den Mycobionten ausgeübt wird, dieser aber unkontrolliert und nicht in der Art bereits bekannter Wachstumsreaktionen umgesetzt werden kann. Diese Erkenntnisse, die in den vorangegangenen Kapiteln intensiv diskutiert werden, ermöglichen es, die am Modellsystem *Fulgensia bracteata* bereits erarbeitete Kaskade des Erkennungsprozesses (Schaper 2003) zu erweitern. Vor den Erkennungsreaktionen und Interaktionsformen, die im direkten Kontakt stattfinden, ereignen sich die Interaktionen des Präkontaktes, in dem differenzierte Wachstumsmuster ausgebildet werden können.

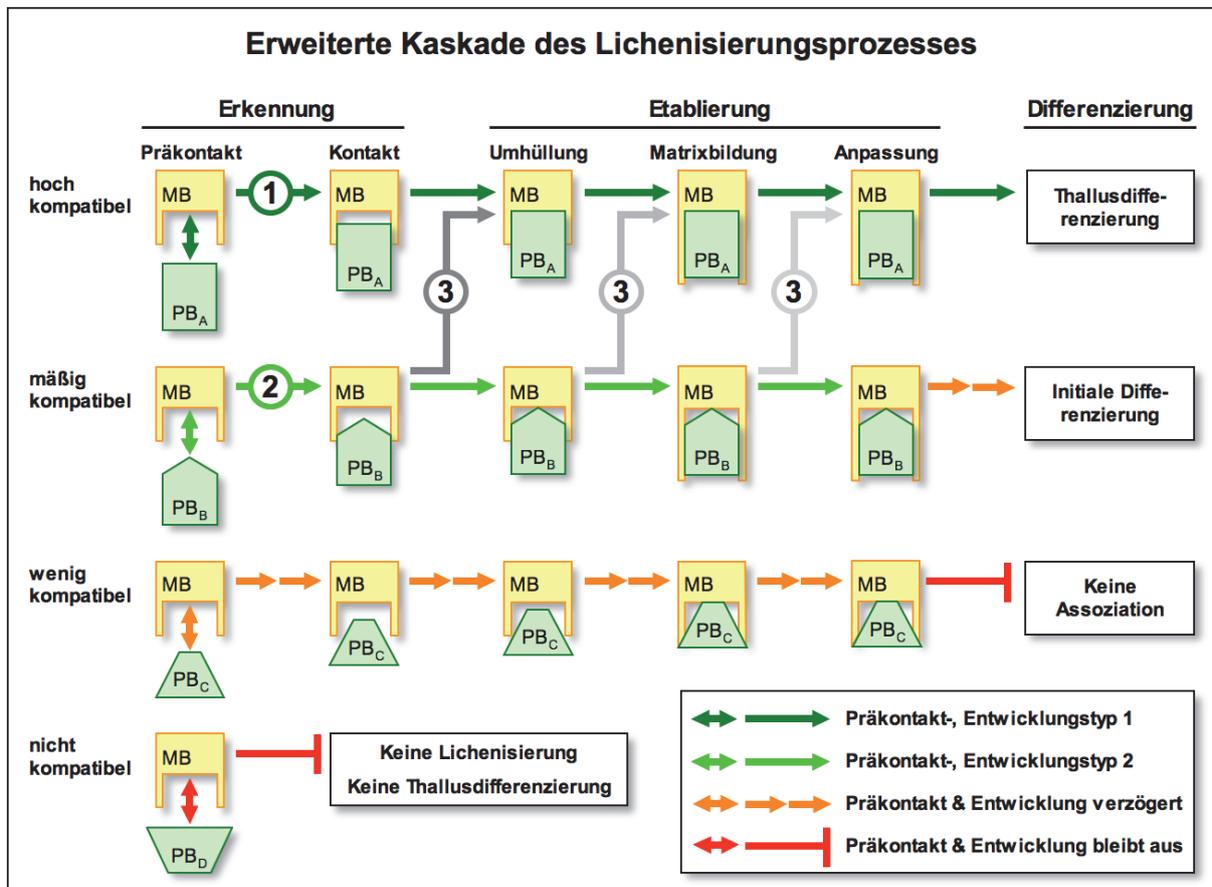


Abb. 4.1: Erweiterte Kaskade des Lichenisierungsprozesses am Modellsystem *Fulgensia bracteata*, modifiziert nach Ergebnissen von Schaper (2003) und den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen. ① und ②: algenspezifische Entwicklungsstrategien, ③: Wechsel des Partners hin zum spezifischen Photobionten. Ausführliche Erläuterungen im Text.

Die Abbildung 4.1 zeigt die erweiterte Kaskade des Lichenisierungsprozesses, wie es für die modellhafte Flechte *Fulgensia bracteata* erarbeitet wurde. Die Einteilung des Lichenisierungsprozesses erfolgt nach dem fünfstufigen Schema von Galun (1988), wobei angenommen wird, dass die initiale Biontenerkennung der potenziellen Symbiosepartner in der ersten Stufe („Präkontakt“) beginnt und nach der zweiten Stufe („Kontakt“) erfolgt ist. Dies berücksichtigt sowohl die Ergebnisse aus dieser Arbeit, die eine differenzielle Reaktion des Mycobionten und die Ausbildung verschiedener Wachstumsmuster im Präkontakt zeigen, als

auch die Ergebnisse anderer Arbeiten, die die Bedeutung des direkten Biontenkontaktes für eine erfolgreiche Erkennungsreaktionen hervorheben (unter anderem Ahmadjian & Jacobs 1981, Ott 1987b, Schaper & Ott 2003). In den drei folgenden Stufen („Umhüllung“ bis „Anpassung“) erfolgt eine Etablierung des Biontenkontaktes. Die morphologischen Reaktionen bestehen aus der Umhüllung der Algenzellen durch Pilzhypen und der Bildung einer gemeinsamen Matrix. In dieser Etablierungsphase kommt es zur Ausbildung von physiologischen und biochemischen Wechselbeziehungen und zum Aufbau entsprechender Regulationsmechanismen (nach Galun 1988). Daran schließt sich die Differenzierungsphase an, in der je nach Kompatibilität der beteiligten Partner ausdifferenzierte Thalli, Präthallus-Strukturen oder keine differenzierten Strukturen gebildet werden können.

Die Interaktion hoch kompatibler Bionten beginnt mit der Aufhebung des *growth arrest* durch exudierte Substanzen der Alge und einer frühen morphologischen Reaktion des Mycobionten auf die hoch kompatible Alge. Nach den hier präsentierten Ergebnissen eines *in vitro*-Interaktionsassays, kann diese Reaktion die Regulation des Hyphenwachstums, die Bildung von Gallerte, die auch in den folgenden Stufen von großer Bedeutung ist, und die Ausbildung eines speziellen Wachstumsmusters umfassen. Dieses angepasste Wachstumsmuster, das die eine differenzielle Interaktion mit dem kompatiblen Photobionten darstellt, wird als Entwicklungstyp ① gekennzeichnet.

Bei Kontakt mit mäßig kompatiblen Algen wird der *growth arrest* aufgehoben, danach aber eine andere morphologische Reaktion des Mycobionten gezeigt und ein anderes Wachstumsmuster ausgebildet (vgl. Kapitel 4.1.2). Dieses Wachstumsmuster ähnelt bereits im Präkontakt dem losen netzartigen Wachstumsmuster, das bei unspezifischen Kontakten zwischen Mycobionten von *Xanthoria parietina* und *Pleurococcus*-Algen beobachtet wurde (Ott 1987b). Dieses angepasste Wachstumsmuster von Entwicklungstyp ② nutzt den Kontakt zu einer unspezifischen Alge, um das Substrat zu kolonisieren, den Standort zu behaupten und die Wahrscheinlichkeit auf Kontakt zum spezifischen Photobionten zu erhöhen. Nach dem Kontakt zwischen Mycobiont und mäßig kompatiblen Photobiont bildet sich eine Kontaktform aus, die durch geringere Intensität der Gallertbildung und geringere Stabilität der entstehenden Aggregate gekennzeichnet ist (Schaper & Ott 2003). Die Entwicklung von (großflächigen) Präthallus-Strukturen erscheint möglich (Ahmadjian & Jacobs 1981, Honegger 1992). Wie in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Ott 1987b), ist der Mycobiont in der Lage bei Kontakt mit der spezifischen Alge aus Entwicklungstyp ② in Entwicklungstyp ① zu wechseln („*algal switching*“, dargestellt durch ③). Es ist anzunehmen, dass dieser Wechsel in unterschiedlichen Stadien von Entwicklungstyp ② stattfinden kann. Wahrscheinlich auch zu einem späteren Zeitpunkt als den angegebenen, da der Mycobiont zu jedem Zeitpunkt einen Vorteil von einer Symbiose mit dem spezifischen Photobionten hat. Nur mit dem spezifischen Photobionten können ein differenzierter Thallus und eigene Fortpflanzungsstrukturen (Apothecien) gebildet werden, die die Fortpflanzung des Mycobionten ermöglichen.

Mit wenig kompatiblen Algen kann es zur Aufhebung des *growth arrests* und einer morphologischen Reaktion des Mycobionten kommen, wie die Reaktion auf die nicht-lichenisierende Alge *Myrmecia bisecta* zeigt. Dabei können die weiteren Entwicklungsschritte einerseits von fehlender Koordination und unkontrolliertem Wachstum geprägt sein, andererseits im direkten Kontakt stark verzögert, weniger intensiv und von teilweise parasitischen Interaktionen geprägt sein (Schaper 2003, Schaper & Ott 2003).

Desweiteren soll ein Schema zum Signalaustausch zwischen den potenziellen Symbiosepartnern im Präkontakt vorgestellt werden, das die erzielten Ergebnisse aufgreift und diese in einem umfassenden Ansatz erklären könnte. Es kann dabei behilflich sein, die differenzielle Reaktion des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* als Ergebnis einer bidirektionalen Biontenkommunikation zu erklären. Der Signalaustausch ist Teil der Biontenerkennung und die Art des Signalaustausches kann starken Einfluss auf ihren Verlauf ausüben. Diese Kommunikation setzt sich aus verschiedenen Signalen zusammen. Die meisten der postulierten Signale sollten von der Alge ausgehen und eine der dokumentierten Reaktionen des Mycobionten auslösen. Andererseits sollten nach diesem vorläufigen Modell auch Signale vom Mycobionten auf die Alge wirken. Im Folgenden werden die angenommenen Signale vorgestellt und die Ergebnisse benannt, die es nötig erscheinen lassen, das entsprechende Signal zu postulieren. Da diese Modellvorstellung auf der Beobachtung der morphologischen Reaktion des Mycobionten beruhen, können keine Aussagen über die chemische Natur der einzelnen Signale getroffen werden. Es ist durchaus denkbar, dass nicht jedes postulierte Signal durch eine eigene Substanz vermittelt wird, sondern dass eine Substanz mehrere Reaktionen in Abhängigkeit von der Stärke oder dem zeitlichem Muster ihrer Freisetzung auszulösen vermag.

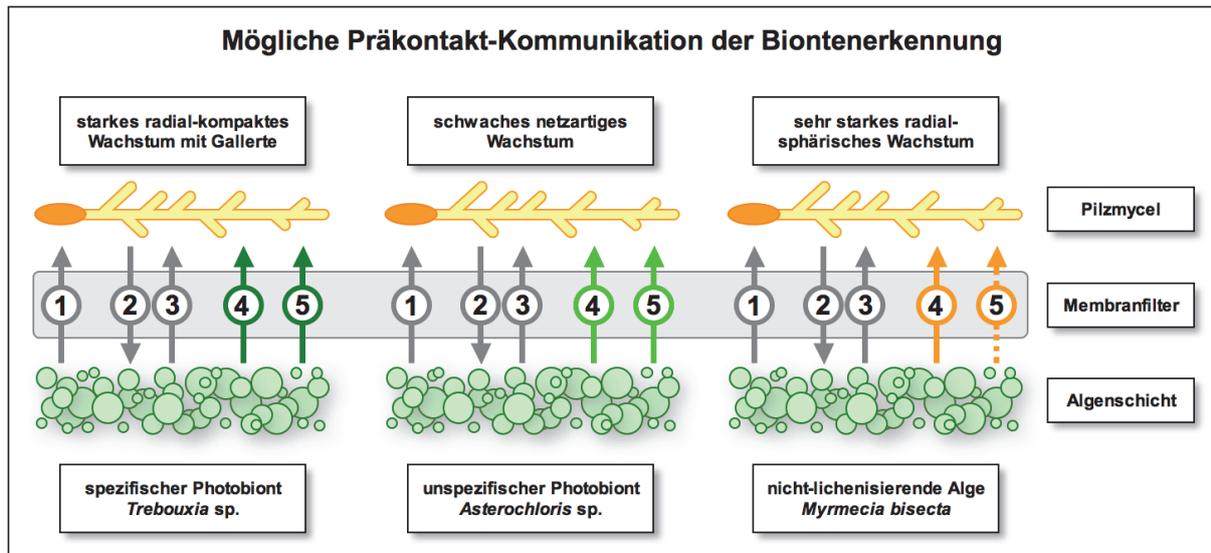


Abb. 4.2: Postulierte Präkontakt-Kommunikation der Biontenerkennung am Modellsystem *Fulgensia bracteata*. Beruhend auf Ergebnissen der Präkontakt-Interaktionsassay. Ausführliche Erläuterungen im Text.

Die Abbildung 4.2 illustriert diese Signale und ihre Abhängigkeit vom potenziellen Photobionten. Da alle drei angebotenen Algenarten in der Lage sind, den in der Kontrolle auftretenden *growth arrest* aufzuheben, sollte es ein von allen Algen freigesetztes Signal geben, dass diese Aufhebung bewirkt (1). Dieses Signal sollte in allen Algen gleich oder zumindest ähnlich sein.

In Folge dessen wird im Mycobionten der *growth arrest* aufgehoben und der Mycobiont setzt seinerseits ein Signal frei, dass auf die Alge zurückwirkt (2). Dieses Signal bewirkt die Freisetzung von Nährstoffen (3). Eine solche Freisetzung muss gefordert werden, da das starke Hyphenwachstum weder durch die Reservestoffe der Spore noch durch die im Medium enthaltenen Nährstoffen erklärt werden kann. Wie in Kapitel 4.1.6.1 bereits beschrieben, könnte es sich bei dem freigesetzten Nährstoff bei allen drei Algen um Ribitol handeln. Ribitol ist das Transfer-Kohlenhydrat der Gattungen *Trebouxia*, *Asterochloris* und *Myrmecia* (Feige 1978, Richardson et al. 1967, Richardson et al. 1968), wird aber außerhalb der Flechtensymbiose nicht oder nur in sehr geringen Mengen ausgeschiedenen (Richardson & Smith 1966, Smith 1980, Smith & Douglas 1987). Dies bestätigt sich auch in den nachfolgenden diskutierten Exudationsstudien, die keine Exudation von Ribitol in axenisch kultivierten Algenkulturen nachweisen können. Dass alle drei Algengattungen das den *growth arrest* aufhebende Signal senden und auf das Signal des Mycobionten mit der Freisetzung von Ribitol antworten, könnte ein Hinweis auf eine ursprüngliche und stark konservierte initiale Biontenerkennung sein. Dies würde auch erklären, dass die nicht-lichenisierende *Myrmecia bisecta* – als Mitglied einer Gattung mit mehreren lichenisierenden Arten – sowohl das den *growth arrest* aufhebende Signal aussendet, als auch auf das Signal des Mycobionten mit der Freisetzung von Nährstoffen reagiert.

Sollte Ribitol transferiert werden, kann es allerdings kein spezifisches Erkennungssignal sein, wie von Ahmadjian (1993) gefordert. Ribitol könnte potenziell von allen drei Algen ausgeschieden werden, wohingegen der Mycobiont differenziell auf die Algen reagiert. Dies setzt ein weiteres Signal voraus (4), das in unterschiedlicher Ausprägung und/oder Menge von den Algen ausgesandt wird und so die beobachtete differenzielle Reaktion des Mycobionten auslöst. Dieses Signal könnte die einzelnen Wachstumsmuster des Mycobionten bewirken. Darüber hinaus kann auch die Existenz eines Signals postuliert werden, welches die Reaktion des Mycobionten regelt beziehungsweise kontrolliert (5). Unter dem Einfluss der nicht-lichenisierenden Alge kommt es zu einem sehr starken Hyphenwachstum und extrem starker Lufthyphenbildung, die Bildung von Gallerte ist weniger stark ausgeprägt. Diese starken Unterschiede zum Mycobiontenwachstum unter dem Einfluss des spezifischen Photobionten lassen vermuten, dass ein Signal ausbleibt oder nicht erkannt werden könnte, welches das Hyphenwachstum mäßigt und das Wachstum kontrolliert.

Über die Zeitspanne, die für die Ausbildung und Etablierung der anscheinend komplexen Bionteninteraktion benötigt wird, lassen sich keine eindeutigen Angaben machen. Allerdings fällt auf, dass unter dem Einfluss von *Asterochloris* sp. und *Trebouxia* sp. auf Wasser-Agar die Hyphenlänge bis zum 20. Versuchstag deutlich langsamer steigt, als zwischen dem 20. und 30. Versuchstag (vgl. Abb. 3.19a). Es ist möglich, dass diese Zunahme des Hyphenwachstums den ungefähren Zeitpunkt widerspiegelt, an dem eine adäquate Biontenkommunikation etabliert ist.

Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit und die zitierten Befunde aus anderen Arbeiten starke Hinweise und Belege für einzelne Aspekte der hier vorgestellten Modelle darstellen, bleiben viele Aspekte dieser Modellvorstellungen spekulativ. Die hier präsentierten Modellvorstellungen finden allerdings Parallelen in den Untersuchungen anderer Symbiosen, zum Beispiel von Mykorrhizapilzen mit pflanzlichen Wirten. Dass die Biontenerkennung bereits in der Präkontaktphase beginnen bzw. stattfinden kann und dass der Wirt einen morphogenetischen Einfluss auf die Wachstumsmuster des pilzlichen Symbionten ausüben kann, ist für andere Pilz-Pflanze-Symbiosen bestätigt worden: Die Wurzel der zukünftigen Wirtspflanze exudiert in diesem Fall Flavonoide und Cytokinine in die Rhizosphäre, die die Morphologie spezifischer Ektomykorrhiza-Pilze im näheren Umfeld der Wurzel verändern und eine extrem starke Verzweigung induzieren können. Im Gegenzug setzen die Hyphen des Symbionten Auxine und Alkaloide frei, die wiederum die Morphologie der Wirtswurzel verändern können. Auf diese Weise wird der symbiotische Kontakt zwischen Pilz und Wirt in einer als Präinfektionsphase bezeichneten bidirektionalen Kommunikationsphase eingeleitet (Duplessis et al. 2003).

Eine ähnliche Präkontakt-Interaktion findet sich auch in der vesikulär-arbuskulären Mykorrhiza (VAM). Diese Symbiose ist wie die Flechtensymbiose, eine obligate Symbiose von einem biotrophen Glomeromyceten (Schüßler et al. 2001) mit einer großen Vielzahl an Landpflanzen. Detaillierte Untersuchungen über die Interaktion zwischen VAM-Pilzen und

verschiedenen Wirtspflanzen sowie Wurzelexudaten während der Präinfektionsphase der Symbiogenese belegen, dass Wurzelexudate die Wirtserkennung steuern und die Wirtsspezifität sicherstellen können, bevor es zum direkten Kontakt der Symbionten kommt (Giovanetti et al. 1993, Giovanetti et al. 1994). Diese Wurzelexudate heben auch den bereits diskutierten *growth arrest* des Pilzmycels auf (vgl. Kapitel 4.1.7.1). Als Signalstoffe werden phenolische Bestandteile und Flavonoide diskutiert (Siqueira et al. 1991, Ishii 1997), aber auch flüchtige Substanzen (Carr et al. 1985). Der Einfluss solcher Substanzen führt im VAM-Pilz ebenfalls zu morphologischen Veränderungen (Giovanetti et al. 1994, Giovanetti 2002). Auch in der Rhizobium-Fabaceae-Symbiose scheidet der Wirt Flavonoide ins Medium aus und eröffnet damit einen „molekularen Dialog“ (Skorpil & Broughton 2006). Während die Wirtswurzeln Flavonoide ausscheiden, die Rhizobien chemotaktisch anlocken und an spezifische Lektine binden, aktivieren diese Flavonoide zusätzlich die Expression der nod-Gene. Die so gebildeten nod-Faktoren wiederum beeinflussen die Wurzelhaarzellen und die Teilung der Zellen im Wurzelrindenparenchym (Long 1996). In Mykorrhiza-bildenden Fabaceae, wie zum Beispiel in *Medicago truncatula*, scheinen sich die Signalwege zur erfolgreichen Etablierung der Mykorrhiza und der Rhizobium-Symbiose teilweise zu überschneiden (Saarschmidt et al. 2009).

4.2 Exudationsstudien

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Photobiontenexudate und deren Wirkung auf die Keimung des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* diskutiert. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 3.2 dargestellt und sollen dazu dienen, verschiedene Hypothesen bezüglich der Identität eines möglichen Erkennungssignals zu testen. Wie die Ergebnisse aus Kapitel 3.1 und deren Diskussion im vorangegangenen Kapitel 4.1 nahelegen, können solche Erkennungssignale für die initiale Biontenerkennung von Bedeutung sein. Die vier eingangs dazu aufgestellten Fragestellungen sind:

- 1) Ist der Einfluss der potenziellen Photobionten auf den Mycobionten von *Fulgensia bracteata* chemischer Natur?
- 2) Welche chemischen Substanzen werden von den Bionten ausgeschieden, die als Erkennungssignal dienen könnten und somit den initialen Biontenkontakt zwischen Photobiont und Mycobiont vermitteln könnten?
- 3) Scheiden verschiedene potenzielle Photobionten unterschiedliche Substanzen aus, die als mögliche Signalstoffe dienen könnten?
- 4) Rufen solche Substanzen unterschiedliche Reaktionen des Mycobionten hervor und lässt sich ein etwaiger Einfluss der identifizierten Substanzen auf die Entwicklung und Morphologie des Mycobionten in *in vitro* Experimenten nachweisen?

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen ermöglichen es, die ersten drei Fragestellungen positiv zu beantworten. Es konnte eine Vielzahl von chemischen Substanzen gefunden werden, die von den untersuchten Photobionten ausgeschieden werden. Damit ist prinzipiell die Möglichkeit gegeben – auch wenn andere Faktoren nicht vollständig auszuschließen sind – dass ein solcher Einfluss chemischer Natur ist. Aus der Vielzahl der entdeckten Substanzen konnten vier sicher identifiziert werden, darunter ein Indolderivat, zwei zyklische Dipeptide und ein Monosaccharid. Die ausgeschiedenen Substanzen sind sowohl abhängig von der Identität des Photobionten, als auch von der Art des Kulturmediums. Diese differenzielle Exudation könnte damit prinzipiell auch die Basis der Biontenerkennung darstellen. Die vierte Fragestellung kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig beantwortet werden. Einige der identifizierten Substanzen beeinflussen zwar die Keimung und die Ausbildung der Keimhülle, eine weitergehende morphologische Reaktion kann allerdings nur in sehr geringer Ausprägung beobachtet werden. Der zuvor beschriebene *growth arrest* wird durch keine der applizierten Substanzen aufgehoben.

4.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Exudatstudien

In dieser Arbeit werden zum ersten Mal einige der von fünf Photobionten und einer nicht-lichenisierenden Alge *in vitro* ausgeschiedenen Substanzen identifiziert und in ihrer Wirkung auf den Mycobionten von *Fulgensia bracteata* untersucht. Die Wirkungen, die die Substanzen auf die Mycobionten ausüben, sind unterschiedlich und lassen sich nur teilweise in bereits erarbeitete Schemata der Bionterkennung einfügen. Sowohl die Ethylacetat- als auch die Wasser-Extrakte der Photobionten aus *Fulgensia bracteata*, *Fulgensia fulgens*, *Toninia sedifolia*, *Lecidea lurida*, *Xanthoria parietina* und der nicht-lichenisierenden Alge *Myrmecia bisecta* zeigen eine Vielzahl von unterschiedlichen Signalen in der HPLC- und der LCMS-Analyse. Fast alle dieser Signale werden differenziell exudiert, in Abhängigkeit von der Art der untersuchten Algen und der Art des Kulturmediums. Die Spezifität im Präkontakt kann sich prinzipiell durch diese differenzielle Exudation erklären lassen.

Viele der Signale können im Rahmen dieser Arbeit keiner Substanz zugeordnet werden. Dies liegt an unspezifischen UV/VIS-Spektren in der HPLC, als auch an der unzureichenden Ionisation in der LCMS. Andere Substanzen hingegen können nur mit der HPLC identifiziert, nicht aber mit der LCMS verifiziert werden. Während sich einige Substanzen in allen Extrakten finden, treten andere nur in einem oder wenigen Algenextrakten auf. In unpolaren Ethylacetat-Extrakten finden sich im Durchschnitt mehr Substanzen, als in Wasser-Extrakten. Mit HPLC/LCMS können zwei Substanzen identifiziert werden, mit HPLC/LCMS/EIMS und TLC jeweils eine Substanz. Die Substanzen sind das Indolderivat Indol-3-carbaldehyd, die zyklischen Dipeptide Cyclo-(trp-trp) und Cyclo-(leu-tyr), sowie der Desoxy-Zucker Rhamnose. Andere Substanzen können nur mit gewisser Unsicherheit identifiziert werden, da deren Identifikation nur über HPLC, nicht aber über LCMS möglich ist. Diese Substanzen sind zwei weitere zyklische Dipeptide (Cyclo-(ala-trp) und Cyclo-(pro-tyr)), sowie zwei Desoxynucleoside (2'-Desoxyadenosin und 2'-Desoxythymidin). Obwohl die Identität der vier letztgenannten Substanzen unsicher ist, fällt auf, dass die Stoffklasse der zyklischen Dipeptide stark vertreten ist. Jede der vier sicher identifizierten Substanzen wird zum ersten Mal als Exudat von Photobionten der Flechtensymbiose beschrieben. Nur Cyclo-(trp-trp) wird auch von der Alge *M. bisecta* exudiert.

Der Zusatz der vier sicher identifizierten Substanzen zu W-Agar zeigt, dass zwei Substanzen (Indol-3-carbaldehyd und Rhamnose) die Keimungsrate des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* herabsetzen können, während Cyclo-(trp-trp) die Keimungsrate heraufsetzt und Cyclo-(leu-tyr) keinen Einfluss auf die Keimungsrate zeigt. Die beiden keimungshemmenden Substanzen können ebenfalls auf das frühe Hyphenwachstum wirken. Sie führen in vielen Fällen zu nur kurz auswachsenden gekrümmten Hyphen. Keine der vier identifizierten Substanzen ist in den durchgeführten Experimenten in der Lage, den bereits diskutierten *growth arrest* aufzuheben. Weitere Ergebnisse, die diskutiert werden können, ist die von Alge zu Alge stark unterschiedlich ausgeprägte Interphase, sowie die Ergebnisse der Untersuchung der Mycobionten-Exudate.

4.2.2 Chemotropischer Präkontakt versus thigmotropischer Kontakt

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Vielzahl von ausgeschiedenen Substanzen der Photobionten generell als Signalstoff in der Präkontaktphase dienen könnte, während der Einfluss dieser Substanzen auf den Mycobionten als Hinweis auf ihre Bedeutung in der initialen Bionterkennung aufgefasst werden kann. Untersuchungen an der Flechte *Lecidea albocaerulescens* führen zu der Annahme, dass die primäre Erkennungsreaktion thigmotropisch an Oberflächenstrukturen der Alge erfolgt und die sekundäre, spezifische Reaktion chemotropisch nach dem Biontenkontakt erfolgt (Ahmadjian et al. 1978). Die differenzielle Exudation von Substanzen aus Photobionten und die Reaktion eines auskeimenden Mycobionten auf diese eröffnet hingegen die Möglichkeit, dass der initiale Präkontakt statt dessen über chemische Signalstoffe erfolgt. Auch die Ergebnisse der Präkontaktstudien (Kapitel 3.1) sprechen für diese Interpretation.

4.2.3 Identifizierte Substanzen

4.2.3.1 Indol-3-carbaldehyd

Indol-3-carbaldehyd (ICA) ist eine Substanz, die in einer Vielzahl von unterschiedlichen Organismen gefunden wird. Darunter befinden sich Bakterien (Wu et al. 2007), aber auch marine Schwämme (Mc Kay et al. 2002). Bromierte Indol-3-carbaldehyde können auch in marinen Moostierchen (Bryozoa) gefunden werden (Ortega et al. 1993). Indol-3-carbaldehyd kann auch in Zellwand-Extrakten der Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden (Tan et al. 2004). Dort steigt seine Konzentration bei Infektion mit dem pflanzenpathogenen Pilz *Pythium sylvaticum* und bei Infektionen des Blattes mit dem pathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* pv tomato. Die apoplastische Lokalisation der Substanz könnte in diesen Fällen darauf hinweisen, dass ICA eine bisher unbekannte Rolle bei Wirt-Parasit-Interaktionen zukommt (Tan et al. 2004). Indol-3-carbaldehyd kann zudem das für die Melanin-Synthese essenzielle Enzym Tyrosinase (EC 1.14.18.1) und somit die Oxidation von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) zu Dopachinon in Pilzen hemmen (Shimizu et al. 2003).

Darüber hinaus kann ICA in Pflanzen sowohl ein Zwischenprodukt der Synthese des Phytohormons Indol-3-essigsäure sein (IAA, Bandurski et al. 1995), als auch eines seiner Abbauprodukte (Gazarin et al. 1998). Diese Doppelfunktion könnte in der Tatsache begründet liegen, dass Pflanzen Indol-3-essigsäure über eine Vielzahl von Biosynthesewegen herzustellen vermögen, wobei verschiedene Synthesewege in unterschiedlichen Geweben oder in unterschiedlichen Entwicklungsstadien aktiv sind (Glawischnig et al. 2000). Diese Synthese vermag sowohl von der Aminosäure Tryptophan auszugehen, als auch von Vorläufern des Tryptophans, wie zum Beispiel Indol oder Indol-3-glycerolphosphat (für eine Übersicht siehe Bartel 1997 oder Normanly & Bartel 1999).

Indol-3-essigsäure kann in einer großen Anzahl von Pro- und Eukaryoten nachgewiesen werden. In Pflanzen ist es der häufigste Vertreter der Auxine, einer multifunktionalen Phytohormongruppe. Auxine dienen in Pflanzen als Regulatoren des Entwicklungsprozesses und als interzelluläres Signal zur Verschaltung von Umwelteinflüssen mit Wachstumsreaktionen wie Photo- und Gravitropismus (Review u. a. bei Cooke et al. 2002).

Weder ICA noch IAA sind als Exudate von Algenzellen bekannt, jedoch kann IAA aus der marinen Grünalge *Caulerpa paspaloides* isoliert werden (Jacobs et al. 1985). IAA kann auch in der strauchförmigen Flechte *Ramalina duriaei* in Konzentrationen von ca. 2,9 µg/g FG (Epstein et al. 1986) nachgewiesen werden. Dabei ist unbekannt, ob die IAA-Synthese durch den Mycobionten oder den Photobionten geschieht, aber IAA ist in der Lage, in bestimmten Konzentrationen das Wachstum des Photobionten *Trebouxia erici* zu fördern (Remmer et al. 1986). Indol-3-essigsäure wurde ebenfalls in den Flechten *Peltigera hymenina*, *Cladonia rangiferina*, *Cladonia arbuscular* und *Cetraria islandica* nachgewiesen (Ott et al. 2000). Die Konzentration von IAA zeigt in diesen Flechten Unterschiede in Abhängigkeit von der Art, dem Standort und in Hinblick auf die Menge an frei und konjugiert vorliegendem IAA. Die gemessene Gesamt-Konzentration an IAA liegen zwischen 0,041 und 0,074 nmol*g⁻¹ FG.

In den hier durchgeführten Keimungsexperimenten mit den Sporen von *Fulgensia bracteata* zeigt sich ein hemmender Effekt von 10⁻⁴ und 10⁻⁶ M ICA auf die Keimung und das frühe Hyphenwachstum. Der spezifische Photobiont scheidet also u. a. eine Substanz aus, die *in vitro* einen hemmenden Einfluss auf den Mycobionten ausübt. Im Hinblick auf diese Ergebnisse ist besonders der Befund von Tan et al. (2004) interessant. Auch in diesem Fall scheint apoplastisches, also sich außerhalb der lebenden Zelle befindendes ICA mit der Interaktion von Wirt (Pflanze) und Parasit (Pilz bzw. Bakterium) in Verbindung zu stehen. Ob ICA eventuell von der freilebenden Alge exudiert werden könnte, um parasitische Pilze abzuwehren, ist eine Hypothese, die weiterer Untersuchungen bedarf.

Eine alternative Deutung wäre die Ausscheidung von ICA als Abbauprodukt des Phytohormons IAA, dass in Flechten nachgewiesen werden konnte (Epstein et al. 1986, Ott et al. 2000) und das Wachstum von *Trebouxia erici* zu beeinflussen vermag (Remmer et al. 1986). Diese Hypothese würde eine noch unverstandene Funktion von IAA für das Wachstum der Photobionten postulieren und die keimungs- sowie wachstumshemmende Wirkung von ICA wäre wahrscheinlich ein sekundärer Effekt. Ob diese Hemmung *in natura* eine Funktion erfüllt, also ob der Mycobiont im Laufe seiner Evolution eine Reaktion auf das *per se* ausgeschiedene ICA entwickelt hat und es damit eine wie auch immer geartete Steuerungsfunktion im Erkennungs- und Lichenisierungsprozess erfüllen kann, ist mit den hier präsentierten Ergebnissen nicht zu beantworten. In Anbetracht des hemmenden Einflusses von ICA könnte es eine wachstumsregulierende bzw. -kontrollierende Funktion erfüllen, wie bereits in Kapitel 4.3 postuliert.

4.2.3.2 L-Rhamnose

Das Desoxy-Monosaccharid L-Rhamnose, auch 6-Desoxy-L-Mannose genannt, wird nach den hier durchgeführten TLC-Experimenten nur vom Photobionten von *Fulgensia bracteata* in einer Konzentration von ungefähr 0.01 mg/ml ausgeschieden.

Rhamnose, die in der Natur nur in ihrer L-Form vorkommt, kann in einer Vielzahl von Algen und Landpflanzen als Bestandteil der Polysaccharide der Zellwand bzw. als Monomer der verzweigten Rhamnogalacturonsäure nachgewiesen werden (Pektin, Darvill et al. 1978, Richter 1996). Rhamnose ist, wie andere Desoxy-Zucker, Bestandteil von Sekundärmetaboliten und auch ein essenzieller Bestandteil bakterieller Zellwände (Saigí et al. 1999). Es kommt in Lipopolysacchariden, Glykoproteinen und Glykolipiden vor und als Monomer solcher Oberflächenstrukturen spielt Rhamnose eine wichtige Rolle bei Erkennungs- und Infektionsprozessen zwischen pathogenen Bakterien und ihren Wirten (Naismith 2004). Solche erkenntnisrelevanten Funktionen von Rhamnose zeigen sich auch in anderen Organismengruppen als Bakterien: Verschiedene Lektine, die aus Knochenfischen (Tateno et al. 2002, Okamoto et al. 2005, Jimbo et al. 2007) und Nesseltieren (Schwarz et al. 2007) isoliert werden können und eine Bedeutung in der Pathogenabwehr besitzen, binden Rhamnose. Auch in menschlichen Pathogenen ist Rhamnose teil eines "co-aggregation receptor polysaccharides" (Yoshida et al. 2006) und exudierte Rhamnolipide scheinen eine Rolle im Pathogenität steuernden *quorum sensing* von verschiedenen Bakterien zu spielen (Olvera et al. 1999, Bredenbruch 2006). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Rhamnose oder die Substanzen in denen sie gebunden ist, bei der Wirt-Pathogen-Erkennung bzw. der Pathogenabwehr von Bedeutung ist.

Im Kontext der Flechtensymbiose zeigt sich, dass Xylorhamnogalaktofuranan, eine Rhamnose enthaltende Substanz, aus dem Photobionten *Asterochloris* sp. von *Cladonia confusa* spezifisch isoliert werden kann (Cordeiro et al. 2007). Es wird als möglicher Ansatzpunkt für die Bionterkennung diskutiert. Während diese Literaturstelle also eine Bedeutung intrazellulärer Rhamnose-enthaltender Xylorhamnogalaktofuranan in *Asterochloris* sp. für die Bionterkennung postuliert, zeigt sich in der hier diskutierten Arbeit, dass für differenziell exudierte Rhamnose aus *Trebouxia* sp. eine ähnliche Funktion vorgeschlagen werden kann.

Die Biosynthese von Rhamnose und Rhamnolipiden erfolgt durch den dTDP-Rhamnose-Stoffwechselweg. Rhamnose wird dabei über vier enzymkatalysierte Reaktionen aus Glukose-1-phosphat und Desoxythymidintriphosphat (dTTP) synthetisiert, deren Bedeutung zu einem späteren Zeitpunkt ausführlicher diskutiert werden soll (Naismith 2004). Es scheint aber an diesem Punkt bemerkenswert, dass auch das Nucleosid von dTTP, 2'-Desoxythymidin in den Wasser-Extrakten der Algen nachgewiesen werden kann. Diese Identifikation ist allerdings unsicher, da sie nur in der HPLC-UV/VIS-Analyse, nicht aber in der LCMS-Analyse nachgewiesen werden kann. Warum der Zucker nur vom spezifischen Photobionten *Trebouxia* sp. ausgeschieden wird, andererseits aber einen keimungs- und wachstumshemmenden Effekt auf eben diesen Mycobionten zeigt, kann mit den hier

vorgestellten Experimenten nicht erklärt werden. Wie schon für Indol-3-carbaldehyd diskutiert, erscheint es möglich, dass der Ausscheidung von Rhamnose eher eine Funktion bei der Abwehr potenzieller Pathogene bzw. Parasiten zukommt, als eine Erkennungsfunktion in der Flechtensymbiose. Da die Algen in axenischer Flüssigkultur angezogen wurden, ist es nicht zwingend vorrauszusetzen, dass die exudierten Substanzen eine Funktion in der Bionterkennung erfüllen müssen.

Zuckeralkohole werden von Photobionten außerhalb des symbiotischen Zustandes nicht ausgeschieden (Richardson & Smith 1966, Smith 1980, Smith & Douglas 1987). Mit den Methoden der Dünnschichtchromatographie können in Übereinstimmung dazu keine Hinweise auf Zuckeralkohole gefunden werden, die in axenischen Algenkulturen exudiert werden könnten. Ohne einen wie auch immer gearteten symbiotischen Kontakt werden folglich auch von den in dieser Arbeit untersuchten Photobionten keine Zuckeralkohole ausgeschieden.

4.2.3.3 Cyclo-(L-leucyl-L-tyrosyl) and Cyclo-(L-tryptophanyl-L-tryptophanyl)

Cyclo-(L-leucyl-L-tyrosyl) [abgekürzt Cyclo-(leu-tyr)] ist ein zyklisch gebundenes Dipeptid aus einer Aminosäure L-Leucin und einer Aminosäure L-Tyrosin. Es wird nur in Kulturmedien von *Asterochloris* sp. gefunden, nicht aber in den Kulturmedien der vier *Trebouxia*-Photobionten oder der Alge *Myrmecea bisecta*. Cyclo-(L-tryptophanyl-L-tryptophanyl) [abgekürzt Cyclo-(trp-trp)] ist ebenfalls ein zyklisch gebundenes Dipeptid aus zwei Aminosäuren Tryptophan. Es wird in den Wasser-Extrakten aller fünf untersuchten Photobionten und in denen der Alge *M. bisecta* gefunden. Beide Substanzen gehören zur Klasse der zyklischen Dipeptide oder auch der Diketopiperazine (DKPs), die in der Regel in vielen Organismen durch den Ringschluss aus zwei Peptidbindungen gebildet werden. DKPs werden als eine vielfältige und allgemein verbreitete Klasse von biogenen Substanzen aufgefasst, die erst in jüngerer Zeit vermehrt erforscht werden (Martins & Carvalho 2007).

In Gram-negativen Bakterien sind DKPs eine erst kürzlich entdeckte Familie von Signalsubstanzen, denen eine bedeutende Rolle im N-Acyl-Homoserinlacton (AHL) *quorum sensing* System zuzukommen scheint (Klose 2006). So aktivieren Cyclo-(Δ ala-val), Cyclo-(pro-tyr) und Cyclo-(phe-pro) den AHL-Biosensor vieler Gram-negativer Bakterien und das durch N-Butanoyl-Homoserinlacton vermittelte Schwarmverhalten in *Serratia liquefaciens* in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (Holden et al. 1999). In Kulturen von verschiedenen Spezies der Gattung *Vibrio* wird Cyclo-(phe-pro) exudiert. Dieses scheint indirekt die Expression des Cholera-toxins in *Vibrio cholerae* zu beeinflussen (Klose 2006). Generell ermöglichen exudierte DKPs, wie auch die besser erforschten AHLs, die inter- und intraspezifische Kommunikation und erlauben die koordinierte Genexpression im *quorum sensing* von Bakterien (Holden et al. 1999). Darüber hinaus werden bei DKPs (u. a. auch bei Cyclo-(trp-trp)) eine Vielzahl von verschiedenen Funktionen beobachtet, wie zum Beispiel antivirale, antibakterielle, antifungizide und cytostatische Wirkungen (Milne et al. 1998).

Viele dieser Funktionen sind von biologischem oder medizinischem Interesse (Martins & Carvalho 2007).

Wenigstens ein DKP wurde bereits in Flechten identifiziert. Dabei handelt es sich um Picroroccellin, einem kristallinen sekundären Flechteninhaltsstoff aus *Roccella fuciformis* (L.) DC. (Marcuccio & Elix 1983, Huneck & Yoshimura 1996). Diese Substanz scheint in der Flechte durch die direkte Kondensation von zwei Phenylalaninen und ihre anschließende Modifikation gebildet zu werden (Mosbach 1973). Ein zyklisches Tetrapeptid, Roccain, wurde aus den Flechten *R. fuciformis* (L) DC., *R. canarensis* Darb., und *R. vicentina* Vain isoliert (Bohman-Lindgren & Ragnarsson 1972, Huneck & Yoshimura 1996). Es kann also angenommen werden, dass zumindest einige Flechten die Fähigkeit besitzen, zyklische Peptide und Diketopiperazine zu bilden.

Die Bildung von sekundären Flechteninhaltsstoffen wird durch die Lichenisierung der beiden Bionten ermöglicht, und obwohl der Photobiont daran offensichtlich Anteil zu haben scheint, ist der genaue Mechanismus unbekannt (Lawrey 1984). Die Beobachtung, dass einige Photobionten (zumindest die Algen der Gattungen *Trebouxia* und *Asterochloris* aus dieser Arbeit) zyklische Dipeptide synthetisieren und exudieren, während einige Flechten (zumindest aus der Gattung *Roccella*) Diketopiperazine und zyklische Tetrapeptide als sekundäre Flechteninhaltsstoffe anreichern, könnte ein neues Licht auf unser Verständnis von der Bildung sekundärer Flechteninhaltsstoffe werfen und auf den Anteil des Photobionten an dieser Bildung. In Experimenten von Arakawa-Kobayashi & Kanaseki (2004) kann die Zugabe von filtriertem Photobionten-Medium die Bildung extrazellulärer Atranorin-Kristalle durch den isolierten Mycobionten von *Myelochroa leucotylica* auslösen. Es wird davon ausgegangen, dass ein von der Alge ausgeschiedenes Signal diese Reaktion auslöst. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit eröffnen hingegen auch die Möglichkeit, dass der Photobiont die Substanzen selbst oder die Edukte einer solchen Synthese bildet und an den Mycobionten überführt. Erst danach könnten die Modifikationen und Nutzung dieser Substanzen durch den Mycobionten stattfinden. Die Hinweise auf weitere zyklische Dipeptide wie Cyclo-(ala-trp) und Cyclo-(pro-tyr) unterstreichen die Bedeutung dieser Stoffklasse für die Biologie der untersuchten Algen und auch für die Möglichkeiten der Biontenkommunikation in der Flechtensymbiose.

Obwohl Cyclo-(trp-trp) ein von jeder untersuchten Alge exudiertes DKP ist und daher nicht auf einen differenziellen Einfluss hinweisen kann, so ist es doch die einzige der vier untersuchten Substanzen, die einen zeit- und konzentrationsabhängigen positiven Einfluss auf die Keimung und auf das Hyphenwachstum des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* ausübt. Bemerkenswert ist dabei, dass der keimungsfördernde Effekt sich erst nach 30 Tagen Versuchsdauer zeigt, nicht aber nach 10 Tagen. Dies könnte darauf hinweisen, dass Cyclo-(trp-trp) eine Rolle in der Dormanz der Sporen des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* spielt und für die auf Wasser-Agar stattfindende Nachkeimung verantwortlich sein könnte. Dafür

spricht sowohl, dass es von den Algen *Trebouxia* sp., *Asterochloris* sp. und *Myrmecia bisecta* exudiert wird, als auch dass es vermehrt im nährstoffärmeren TOM ohne Glukose ausgeschieden wird (vgl. Tab. 3.11). Dies stimmt mit dem Befund überein, dass auch im Präkontakt-Interaktionsassay die Nachkeimung der Sporen von *F. bracteata* auf nährstoffarmem Wasser-Agar stattfindet, nicht aber auf nährstoffreichem MYS1-Agar (vgl. Abb. 3.19c mit Abb. 3.20c). Da Cyclo-(trp-trp) zusätzlich das Hyphenwachstum leicht fördert, ist es ebenfalls denkbar, dass Cyclo-(trp-trp) eines der Signale ist, dass im Präkontakt-Interaktionsassay unter dem Einfluss aller drei Algen das Wachstum fördert. Allerdings kann auch Cyclo-(trp-trp) nicht den *growth arrest* aufheben. Daher kann der wachstumsfördernde Einfluss der Algen nicht allein auf diese Substanz zurückgeführt werden.

Der keimungs- und wachstumsfördernde Effekt von Cyclo-(trp-trp) stützt die Annahme, dass potenzielle Photobionten in der Nähe befindliche Ascosporen beeinflussen können und Einfluss auf den Zeitpunkt ihrer Keimung ausüben können. Ein ähnliches Verhalten, bei dem Exudate der Wirtswurzel die Keimung und das frühe Mycelwachstum des Symbionten beeinflussen können, ist aus der Ektomykorrhiza-Symbiose (Duplessis et al. 2002) und der vesikulär-arbuskulären Mykorrhizasymbiose (Giovanetti 2002) bekannt. Dass Photobiontenextrakte und auch das Kulturmedium von Photobionten prinzipiell in der Lage sind, die frühe Mycelienentwicklung von Mycobionten zu beeinflussen konnte bereits früher gezeigt werden (Scott 1959, 1964 nach Bailey 1976, Lallemand & Bernard 1977) obgleich in diesen Fällen die Identität der betreffenden Substanzen nicht aufgeklärt wurde.

Die von allen untersuchten Algen ausgeschiedene Substanz Cyclo-(trp-trp) scheint in nährstoffarmen Medien verstärkt ausgeschieden zu werden und ermöglicht die Nachkeimung der Ascosporen. Diese Ergebnisse zeigen Übereinstimmungen mit den Ergebnissen des Präkontakt-Interaktionsassays. Es kann daher vermutet werden, dass Cyclo-(trp-trp) ein Teil des in Abb. 4.2 postulierten initialen Signals ist, dass von den untersuchten potenziellen Photobionten ausgeschieden wird (①).

Die Substanz Cyclo-(leu-tyr) wird nur von *Asterochloris* sp., dem Photobionten aus *Lecidea lurida* ausgeschieden. Diese Substanz eröffnet damit prinzipiell die Möglichkeit einer differenziellen Biontenerkennung. Dennoch zeigt sie keinen Einfluss (10^{-4} M) oder nur einen sehr schwach hemmenden Einfluss (10^{-6} M) auf die Keimung des Mycobionten von *F. bracteata*. Das Hyphenwachstum wird nicht beeinflusst. Da diese Substanz nur als Exudat der unspezifischen *Asterochloris*-Photobionten nachgewiesen werden kann, ergibt sich in diesem Fall die Möglichkeit, Exudat-vermittelte Biontenspezifität genauer zu untersuchen. Dazu sollte die Wirkung von Cyclo-(leu-tyr) im Kontext einer differenziellen Biontenerkennung und -reaktion am Mycobionten von *Lecidea lurida* getestet werden. Der fehlende bzw. schwache und sich mit zunehmender Kulturdauer auswachsende Effekt auf den Mycobionten von *F. bracteata* könnte ein erstes Indiz für eine artspezifische Wirkung darstellen.

4.2.4 Hemmwirkung von Indol-3-carbaldehyd und Rhamnose

Zwei der vier identifizierten Substanzen (Indol-3-carbaldehyd und Rhamnose) zeigen *in vitro* einen deutlich hemmenden Effekt auf die Keimung und das frühe Hyphenwachstum des Mycobionten. Das Hyphenwachstum ist bei beiden Konzentrationen (10^{-4} M und 10^{-6} M) sehr begrenzt - ca. 5-20 μ m nach 30 Tagen Versuchsdauer – und die Hyphen sind meist bogenförmig gekrümmt (vgl. Abb. 3.35).

Der hemmende Effekt von Indol-3-carbaldehyd und Rhamnose könnte darauf hindeuten, dass die Algen fähig sind, Stoffe zu exudieren, die eine Art Abwehrstrategie gegen parasitische Pilze darstellen. Es ist davon auszugehen, dass sich Algen generell und damit auch nicht-lichenisierte Photobionten am natürlichen Standort gegen parasitische Pilze und inkompatible Mycobionten behaupten müssen. Dass andererseits auch Mycobionten parasitisches Verhalten zeigen, wurde bereits beschrieben (Ahmadjian & Jacobs 1981, 1983, Meyer et al. 1995, Gaßmann & Ott 2000, Schaper 2003, Schaper & Ott 2003). In diesem Kontext werden für nicht-lichenisierende Pilze verschiedene Ansätze diskutiert. So sollen einerseits flüchtige Stoffe der umgebenden microbiotischen Flora die Sporen parasitischer Pilze in eine exogen induzierte Dormanz versetzen können (Deacon 1997, 164). Andererseits sollen hohe Konzentrationen an phenolischen Pflanzeninhaltsstoffen (Phytoanticipine) die Keimung phytopathogener Pilzsporen verhindern können (Deacon 1997, 236).

Geht man davon aus, dass die Flechtensymbiose mutualistisch, also zum Nutzen beider Bionten ist, so wäre es für den Photobionten nachteilig, einen potenziellen Partner in Keimung und Wachstum zu hemmen. Geht man allerdings davon aus, dass die Flechtensymbiose eine Form des kontrollierten Parasitismus ist (Ahmadjian & Jacobs 1983, Ahmadjian 2002), so könnte es sich bei diesem Verhalten um das Relikt eines ursprünglichen Abwehrmechanismus handeln. Träfe dies zu, dann könnte die Spezifität der Symbiose nicht durch hochgradig adaptierte Biontenkommunikation erfolgen, sondern von der spezifisch ausgeprägten Fähigkeit des Mycobionten, die Abwehrmechanismen einer Alge zu überwinden. Trotz der beobachteten Hemmwirkung von Indol-3-carbaldehyd und Rhamnose sprechen die Ergebnisse aus den Präkontaktstudien (Kapitel 3.1) und den Exudationsstudien (Kapitel 3.2) jedoch eher für eine vielschichtige Biontenkommunikation (vgl. Kapitel 4.3). Für letztere Hypothese spricht, dass Rhamnose nur vom kompatiblen Photobionten *Trebouxia* sp. ausgeschieden wird, aber dennoch einen hemmenden Effekt zeigt. In Anbetracht der wenigen bisher verfügbaren Ergebnisse erscheint es allerdings wahrscheinlicher, dass die Konzentrationen an Indol-3-carbaldehyd und Rhamnose im Experiment zwar eine Hemmwirkung entfalten, diese Konzentrationen aber nicht zwangsläufig den *in natura* vorgefundenen ähneln müssen. So könnte es stark von der natürlich vorgefundenen Konzentration der beiden Substanzen abhängen, ob sie eine Hemmwirkung gegenüber parasitischen Pilzen entfalten oder einen potenziellen Bionten in einer wie auch immer gearteten Weise beeinflussen. Eine weitere Deutungsmöglichkeit besteht darin, in den beiden Substanzen jene Signale zu sehen, die durch ihre hemmende Wirkung für die notwendige,

zumindest teilweise, Kontrolle des Mycobiontenwachstums bei erfolgreicher Erkennung verantwortlich zeichnen. Um weitergehende Aussagen zu diesen Aspekten treffen zu können, sind vergleichende und detailliertere Untersuchungen zur Wirkung der identifizierten Substanzen auf lichenisierende und nicht-lichenisierende Pilze notwendig.

4.2.5 Weitere Aspekte der Exudationsstudien

Die Konzentration der vier identifizierten Substanzen in den Kulturmedien konnte nicht erfasst werden. Daher können die im Bioassay eingesetzten Konzentrationen von 10^{-4} M und 10^{-6} M die Reaktion des Mycobionten in einer Weise beeinflusst haben, wie sie *in natura* nicht vorkommt. Die in verschiedenen Flechten nachgewiesenen Werte von ca. 0,07 nmol IAA pro g FG (Ott et al. 2000) weisen darauf hin. Es muss bedacht werden, dass auf Grund technisch gegebener Bedingungen nur einige der in der HPLC- und LCMS detektierten Substanzen identifiziert werden konnten. Die nicht identifizierten Substanzen können ebenso einen bedeutenden Einfluss auf die Präkontakt-Interaktion entfalten, wie die identifizierten. Ferner ist es möglich, dass nicht eine einzige Substanz eine Erkennungsreaktion auslöst, sondern ein Gemisch von Substanzen, wobei die Zusammensetzung, die Konzentration und die zeitliche Abfolge einen wichtigen Einfluss besitzen können. Diese Bedingungen können im hier durchgeführten Biosassay nicht hinreichend simuliert werden. Darüber hinaus wurden bei der Präparation der Medienextrakte unterschiedliche Mengen an Interphase beobachtet, in der sich die im Medium enthaltenen Proteine sammeln. Obwohl diese Proteine nicht bearbeitet werden konnten, muss in Betracht gezogen werden, dass exudierte Proteine für eine Bionterkennung im Präkontakt von Bedeutung sein können. Die Tatsache, dass keine der vier Substanzen in der Lage ist, den *growth arrest* des Mycobionten aufzuheben, bestätigt die Annahme, dass entweder mehrere bzw. bisher unbekannte Substanzen an dessen Beendigung beteiligt sind, oder dass andere Konzentrationen als die verwendeten notwendig sind.

Es bleibt weiterhin zu bedenken, dass die Ergebnisse der Präkontakt-Interaktionsstudien leichter interpretiert werden können, wenn man statt einer einseitigen, vom Photobionten ausgehenden Kommunikation, von einer wechselseitigen Kommunikation ausgeht. Das Ergebnis, dass auch der Mycobiont eine Anzahl von Substanzen in das Kulturmedium ausscheidet (vgl. Kapitel 3.2.5), kann diese Hypothese unterstützen. Geht man von einer wechselseitigen Beeinflussung der Exudation aus, so ist es nicht sicher, dass die exudierten Substanzen in axenischen Photobiontenkulturen identisch mit jenen sind, die der potenzielle Photobiont in der Nähe eines Pilzes (Parasit oder Symbiosepartner) ausscheidet.

Die Keimungsraten sind in den Exudationsstudien niedriger als in den Präkontaktstudien. Lediglich unter Einfluss von 10^{-4} M Cyclo-(trp-trp) auf W-Agar gleichen sich die niedrigeren Werte im Verlauf von 30 Versuchstagen an die Werte der Präkontaktstudien an. Der Wert der Kontrollexperimente (ca. 49 % nach 10 d, Kapitel 3.2.4.1) ist zwar niedriger, als der Wert der vergleichbaren Kontrollprobe (ca. 63 % nach 10 d, Kapitel 3.1.6), allerdings wurden die hier verwendeten Apothecien zu einem anderen Zeitpunkt gesammelt (2004 anstatt 2006).

jahrgangs- und jahreszeitabhängige Unterschiede der Sporenzahlen und Keimungsraten sind bei Flechtenarten, insbesondere bei *Fulgensia bracteata*, nicht ungewöhnlich (vgl. Schaper 2003, Meeßen 2005).

Die Abhängigkeit des Exudationsmusters von der Art des verwendeten Mediums (TOM mit oder ohne Glukose), mag darauf hindeuten, dass die Exudation bestimmter Stoffe auch durch physiologische oder umwelt- bzw. substratspezifische Faktoren gesteuert werden könnte. Eine hinreichende Beantwortung dieser Fragestellung kann allerdings nur durch weitere Experimente erreicht werden.

4.3 Suppressive Subtraktive Hybridisierung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der SSH und die identifizierten, differenziell exprimierten Gene des initialen Biontenkontaktes diskutiert. Eine detaillierte Darstellung findet sich in Kapitel 3.3. Die dort beschriebenen Experimente sollen dazu dienen, verschiedene Hypothesen bezüglich der differenziellen Genexpression bei Biontenkontakt am Beispiel des Modellsystems *Fulgensia bracteata* zu überprüfen. Die eingangs aufgestellten Fragestellungen sind:

- 1) Verändert sich die Genexpression bzw. die Genregulation während des initialen Biontenkontaktes und der Biontenerkennung?
- 2) Welche Gene werden im Zuge der Erkennung der Symbionten und des initialen Biontenkontaktes hochreguliert bzw. herunterreguliert?
- 3) Welche Bedeutung können diese Gene für die Mechanismen der Biontenerkennung besitzen?

Die erste Fragestellung kann mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen eindeutig bejaht werden. Der Kontakt zwischen Mycobiont und Photobiont der Flechte *Fulgensia bracteata* verändert die Genexpression zumindest des Mycobionten. Die beiden folgenden Fragestellungen nach der Art der differenziell exprimierten Gene und ihrer möglichen Funktion im Erkennungsprozess der Lichenisierung werden in den folgenden Kapiteln aufgegriffen und mithilfe der zu diesem Thema vorhandenen Literatur diskutiert.

4.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsstudien

Die Ergebnisse der SSH, das heißt die anschließende Auswertung und Identifikation kontaktspezifisch differenziell exprimierter Gene belegen eindeutig, dass der Biontenkontakt zwischen dem Mycobionten und dem Photobionten der Flechte *Fulgensia bracteata* die Genexpression zumindest des Mycobionten verändert. Dieses Ergebnis bestätigt die Erkenntnisse aus der Erforschung anderer Symbiosen, wie der Ektomykorrhiza (Duplessis et al. 2002), der vesikulär-arbuskulären Mykorrhiza (Saarschmidt et al. 2009) oder der Leguminosen-Rhizobium-Symbiose (Skorpil & Broughton 2006), in denen der Biontenkontakt, teilweise sogar der Biontenpräkontakt, die Genexpression wechselseitig verändern kann. Mithilfe der durchgeführten und in Kapitel 3.3 beschriebenen Experimente sind 35 kontaktspezifisch hochregulierte cDNA-Fragmente und 17 kontaktspezifisch herunterregulierte cDNA-Fragmente identifiziert worden. Von den 35 hochregulierten cDNA-Fragmenten können 25 Fragmente einmal und 10 Fragmente zwischen zwei- und elfmal identifiziert werden. Die jeweiligen Faktoren des Expressionsunterschiedes liegen

zwischen 2,0 und 15,6 und die Längen der cDNA-Fragmente sind mit 41 bis 196 bp durchweg kurz. Von den 17 herunterregulierten Fragmenten werden neun einmal, fünf zweimal und drei dreimal identifiziert. Die Faktoren des Expressionsunterschiedes können Werte zwischen 2,0 und 39,9 annehmen und die Längen der cDNA-Fragmente liegen zwischen 41 und 137 bp. Von den 35 kontaktspezifisch hochregulierten cDNAs können sechs Fragmente sechs verschiedenen Genen zuordnet werden, die alle aus dem Mycobionten zu stammen scheinen. Von den 17 kontaktspezifisch herunterregulierten Genen zeigt keines hinreichende Übereinstimmungen zu den in den Datenbanken vorgehaltenen Genen. Die sechs identifizierten Gene kodieren für ein GTP-bindendes EsdC, das für die frühe Sexualentwicklung von Pilzen verantwortlich ist, eine dTDP-bindende 4,6-Glucose-Dehydratase, die essenziell für die Synthese des Desoxy-Zuckers Rhamnose ist, und eine ATP-Sulfurylase. Die drei weiteren Gene sind eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase vom FKBP-C-Typ, ein 60S Ribosomales Protein L29 und ein Protein aus der Domänenfamilie Aha 1. Diese drei Gene spielen eine wesentliche Rolle in der Proteinbiosynthese und der anschließenden Proteinprozessierung. Sie sind entweder Bestandteil des Ribosoms selber, oder dienen als Chaperon bzw. Cochaperon bei der korrekten Faltung neu synthetisierter Proteine.

Die in diesen Kapitel diskutierten Ergebnisse zeichnen noch kein konsistentes Bild für den Erkennungsmechanismus, welcher die Spezifität der beiden Bionten von *Fulgensia bracteata* bestimmt. Mit der Methode der SSH wurden durchgehend kurze cDNA-Fragmente generiert, die eine anschließende Identifizierung erschweren. Obwohl die differenzielle Expression der cDNA-Fragmente mit den Hybridisierungsexperimenten verifiziert und auch quantifiziert werden konnte, ist eine weitere Bearbeitung dieses Themas wünschenswert. Dennoch zeigen sich interessante Ergebnisse, die in nachfolgenden Arbeiten aufgegriffen werden können. Sowohl die frühe Induzierung der mycobiontischen Sexualentwicklung, als auch die sehr wahrscheinliche Bedeutung des Desoxy-Zuckers Rhamnose für die hier untersuchte Flechtensymbiose stellen vielversprechende Ansätze für weitere Arbeiten dar. Diese sollten dazu dienen, die bestehenden Ergebnisse zu unterstützen und die vollständigen Sequenzen der identifizierten Gene aus *Fulgensia bracteata* zu gewinnen. Derartige Studien können zusätzlich qPCR-Techniken nutzen, um ein detaillierteres räumliches und zeitliches Expressionsprofil der betreffenden Gene zu erarbeiten. Auch die Bearbeitung der cDNA-Bibliotheken der SSH-Experimente von Festkultur kann dazu beitragen, die initiale Bionteninteraktion besser zu verstehen, bzw. die Abhängigkeit einer solchen Interaktion vom Kulturmedium detaillierter zu untersuchen.

4.3.2 Generelle Aspekte zur genetischen Konstitution von Flechten

Das Wissen über Flechten und ihre Bionten ist in den Bereichen von Molekularbiologie und Genetik sehr begrenzt, daher fehlt ein tieferes Verständnis der Flechtensymbiose auf molekularer Ebene bis heute (Armaleo & May 2009). So sind bereits viele Genome von pathogenen oder parasitischen Pilzen und von Modellorganismen der Mykologie sequenziert.

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit sind 19 Pilz-Genome sequenziert und vollständig assembliert, 121 Pilz-Genome befinden sich in der Assemblierungsphase und weitere 108 Pilz-Genome befinden sich in der Sequenzierungsphase (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi). Keines dieser Genome ist das eines Mycobionten, obwohl lichenisierte Pilze ungefähr 20% aller bekannten Taxa der Pilze ausmachen (Smith & Douglas 1987). Für die Grünalgen zeigt sich ein ähnliches Bild: drei Genome sind komplett sequenziert und assembliert, drei weitere in der Assemblierungsphase und acht befinden sich in der Sequenzierungsphase. Darunter ist auch *Coccomyxa* sp. C-169, eine freilebende einzellige Alge, die nahe mit lichenisierenden Vertretern der Gattung *Coccomyxa* verwandt ist. Kein Genom eines Flechtensymbionten, also eines Mycobionten oder eines Photobionten steht somit bis dato sequenziert, assembliert und annotiert zur Verfügung. Einzig für den Mycobionten der Flechte *Cladonia grayi* und deren Photobionten *Asterochloris* sp. (Armaleo, mündl. Mitteilung) und für den Mycobionten von *Xanthoria elegans* (Dyer, mündl. Mitteilung) ist ein solches Vorhaben für die nähere Zukunft projektiert. Die Genome der Bionten von *Cladonia grayi* sind als einzige bis jetzt genauer charakterisiert (Armaleo & May 2009). Mit Hilfe einer quantitativen PCR-Methodik (qPCR) konnten die Genomgrößen und die Anzahl der darin enthaltenen Gene abgeschätzt werden. Die Größe des Mycobiontengenoms liegt bei ungefähr 28,6 Mb und die des Photobionten *Asterochloris* sp. bei ca. 106,7 Mb. Damit liegt die Genomgröße des Mycobionten im mittleren Bereich dessen, was für verwandte nicht-lichenisierende Pilze aus der Unterabteilung der Pezizomycotina (Echte Schlauchpilze) beobachtet werden kann. Die Genomgröße des Photobionten hingegen bewegt sich im unteren Bereich der Genomgröße verwandter Algenarten (Armaleo & May 2009).

Darüber hinaus scheint auch die Art und der Grad der DNA-Methylierung für die Flechtensymbiose von Bedeutung zu sein (Armaleo & Miao 1999). Der Grad der DNA-Methylierung ist bedeutsam für die Entwicklung von und die Genexpression in Pilzen. Im isolierten Mycobionten von *Cladonia grayi* ist die DNA-Methylierung durchgehend gering, in der Flechte hingegen hoch. Der Einfluss der Alge auf den Grad der DNA-Methylierung zeigt sich auch in den verschiedenen Thallusteilen. In algenfreien Thallusteilen, wie dem Ascocarp, ist der Grad der Methylierung wiederum gering, in algenhaltigen Thallusteilen, wie Podetien und Soredien, ist der Grad der Methylierung jedoch hoch. Die Bedeutung der DNA-Methylierung konnte in jüngeren Arbeiten (Manoharan et al., unpublizierte Daten) auch in der Flechte *Peltigera membranacea* nachgewiesen werden. Auch dort ist das Mycel der Thalli stärker methyliert als das der Apothecien. Zusätzlich kann gezeigt werden, dass in den beiden Gewebetypen Gene differenziell exprimiert werden.

Sequenzinformationen über Myco- und Photobionten von Flechten sind bis dato hauptsächlich für solche Gene verfügbar, die für molekularbiologisch-phylogenetische Untersuchungen von Bedeutung sind. Dies sind vor allem die Gene ITS1 und ITS2 nrDNA (*internal transcribed spacer nuclear ribosomal DNA*), RPB1 und RPB2 (*DNA-directed RNA polymerase II subunit*) mtSSU rDNA (*mitochondrial small subunit of ribosomal DNA*), sowie

LSU nrDNA und SSU nrDNA (*large/small subunit of nuclear ribosomal DNA*) (Helms et al. 2001, Romeike et al. 2002, Wedin et al. 2002, Gaya et al. 2008, Gueidan et al. 2008, Ertz et al. 2009, Arnold et al. 2009). Diese Gene bzw. Spacer-Regionen sind jedoch nach heutigem Wissensstand nicht am Erkennungsprozess beteiligt, sie konnten auch in den hier diskutierten Ergebnissen nicht als differenziell exprimiert nachgewiesen werden.

Genetische Informationen über die Physiologie der beiden Bionten, aber auch Gene der gegenseitigen Erkennung und Regulation, sind bisher für keine Flechtenart bekannt. Die Regulation einiger Gene des Kohlenhydratstoffwechsels im frühen Biontenkontakt konnte in jüngerer Zeit zwischen den Bionten von *Cladonia grayi* aufgeklärt werden (Joneson et al., unpublizierte Daten). Dabei zeigt sich, dass die Gene, die für den Kohlenhydrattransfer vom Photo- zum Mycobionten verantwortlich sind, bereits wenige Tage nach Biontenkontakt differenziell reguliert werden. Gene, die den eigentlichen Erkennungsmechanismus steuern, scheinen nicht nachgewiesen zu werden. Der Ansatz der hier präsentierten Arbeit fokussiert hingegen nicht auf den Nachweis der differenziellen Expression bereits bekannter Gene, sondern auf die nicht-selektive und damit ergebnisoffene Identifikation von kontaktspezifisch differenziell exprimierten Genen.

Ein weiteres Feld, das für das Verständnis von Bionteninteraktionen auf genetischer Ebene interessant ist, ist die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers zwischen den Bionten einer Flechtensymbiose. Da die Bionteninteraktionen der Flechtensymbiose als erdgeschichtlich sehr alt und hochgradig koevolutiv angesehen werden, sind Flechten gute Modellorganismen zur Untersuchung von horizontalem Gentransfer (Ahmadjian 1993). Horizontaler Gentransfer konnte bereits in einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen werden und kann als Ausgangspunkt neuer evolutionärer Entwicklungen angesehen werden (Syvanen 1985, Jain et al. 1999). Besonders in Verlauf der sehr alten Endosymbiosen von α -Proteobakterien (zu Mitochondrien) und Cyanobakterien (zu Plastiden) mit frühen Eukaryoten ist es zu einem anhaltenden Transfer genetischen Materials vom Symbionten zum Wirt gekommen (Blanchard & Lynch 2000). Dieses Phänomen zeigt sich auch bei sekundären Endosymbiosen, bei dem der Zellkern des aufgenommenen eukaryotischen Symbionten zu einem reduzierten Nukleomorph umgewandelt ist. Horizontaler Gentransfer kann ebenso von Prokaryoten auf Hefen (Hall et al. 2005) und in Wirt-Parasit-Beziehungen (Davies & Wurdack 2004) nachgewiesen werden, wie in der Symbiose der Seeschnecke *Elysia chlorotica* mit der Grünalge *Vaucheria litorea* (Rumpho et al. 2008).

In der Flechtensymbiose sind ebenfalls Hinweise auf die Existenz eines solchen horizontalen Gentransfers bekannt. Mycobionten von *Cladonia rangiferina* und *Cetraria islandica* (beide Lecanorales) besitzen die Fähigkeit, das Phytohormon Ethylen über seine Vorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) zu synthetisieren. Dieser Syntheseweg ist bisher nur aus Grünalgen und höheren Pflanzen bekannt, nicht aber aus nicht-lichenisierenden Ascomyceten. Dies kann als Indiz für einen Gentransfer vom Photobionten auf den Mycobionten angesehen werden (Schieleit 1997). Auch die in lichenisierten und

nicht-lichenisierten Pilzen vorkommende Methylammoniumpermease zeichnet sich durch eine Phylogenie mehrfacher horizontaler Gentransfers aus (McDonald, mündl. Mitteilung). Die Ergebnisse der hier präsentierten Arbeit zeigen keine Hinweise auf horizontalen Gentransfer. Dies wäre aufgrund des Versuchsaufbaus auch schwierig zu zeigen. Im *tester*-Ansatz ist cDNA aus beiden Bionten enthalten und die differenziell exprimierten Gene beider Bionten können nur durch die anschließende BLAST-Suche identifiziert werden. Ein Gen, das von einem Bionten auf den anderen übertragen würde, ohne sich dabei in seiner Sequenz zu ändern, würde mit der BLAST-Suche als Gen des Ursprungsbionten identifiziert werden.

Gemeinsam kultivierte Bionten von *Baeomyces rufus* zeigen mit Hilfe von cDNA-AFLP-Analysen, dass nur wenige Gene durch Biontenkontakt differenziell induziert werden, während viele Gene aus Myco- und Photobiont in den frühen Lichenisierungsstadien unterdrückt werden (Trembley et al. 2002). In den hier durchgeführten Arbeiten können keine absoluten Aussagen über die Anzahl an Genen gemacht werden, die durch den Biontenkontakt induziert oder reprimiert werden. Dennoch fällt auf, dass sich im hochregulierten Versuchsansatz von 576 blau/weiß selektionierten Klonen 67 Kandidaten (11,6 %) als differenziell hochreguliert erwiesen haben und dies letztendlich zur Identifikation von 35 verschiedenen differenziell hochregulierten Sequenzen (6,1 %) führte. Im Gegensatz dazu wurden von 480 blau/weiß selektierten Klonen 28 Fragmente (5,8 %) und 17 verschiedene differenziell herunterregulierte Sequenzen (3,5 %) identifiziert. Da die Menge an erhaltenen Klonen nach der Klonierung von vielen Faktoren abhängig ist, besitzen diese Werte nur eine geringe Aussagekraft. Daher zeigen sich keine konkreten Hinweise darauf, dass durch den Biontenkontakt mehr Gene herunter- als hochreguliert würden. Tendenziell scheinen die Methodik der SSH und die nachfolgende Klonierung beim Kontakt der Bionten von *Fulgensia bracteata* allerdings einen größeren Anteil an differenziell hochregulierten cDNA-Fragmenten zu detektieren.

In diesem Zusammenhang ist es auch von Bedeutung, dass ein Großteil der hochregulierten Fragmente (29 von 35) und alle herunterregulierten Fragmente (17) nicht mit den verwendeten Algorithmen der BLAST-Suche identifiziert werden können. Dies könnte bedeuten, dass eine Anzahl von kontaktspezifisch regulierten Genen für Flechtenbionten spezifisch sind und daher nicht mit Hilfe von Datenbanken identifiziert werden können, die so gut wie keine genetischen Informationen aus Flechtenpilzen und ihren Photobionten enthalten. Zum einen wird davon ausgegangen, dass Flechten evolutionsgeschichtlich sehr alt sind. Sie sollen sich bereits vor den ersten Landpflanzen entwickelt haben (Heckman et al. 2001, Eriksson 2005) und bis zu 600 Millionen Jahre alt sein (Yuan et al. 2005). Zum anderen wird für Flechten, die sich eher durch eine spezialisierte biotrophe Ernährungsweise auszeichnen, als durch nahe Verwandtschaft von einem polyphyletischen Ursprung ausgegangen (Liu & Hall 2004, Schoch et al. 2009). Damit eröffnet sich zumindest die prinzipielle Möglichkeit, dass auf Grund der langen koevolutiven Zeiträume seit dem Erscheinen der ersten Flechtensymbiosen und ihrer mehrfachen Entstehung Erkennungs-

mechanismen und die damit verbundenen Gene entwickelt worden sind, die nicht in anderen, nicht-lichenisierenden Organismen gefunden werden können.

Ein weiterer Aspekt ist die Tatsache, dass lediglich Gene des Mycobionten identifiziert werden können. Dies trifft nicht nur auf die sechs identifizierten Gene zu, sondern auch auf die restlichen 52 Sequenzen. Deren Ergebnisse in der BLAST-Suche lassen zwar keine eindeutige Identifizierung zu, weisen aber in fast allen Fällen größere Ähnlichkeit mit Genen aus Pilzen auf, als mit Genen aus Pflanzen. Diese Ergebnisse können einen ersten Hinweis darauf geben, dass eine Änderung der Genexpression den Mycobionten stärker betrifft als den Photobionten.

In diesem Kontext ist es bemerkenswert, dass Hill (2009) das Konzept einer gemeinsamen Koevolution in Frage stellt. Dies wird aus mehreren Beobachtungen abgeleitet: Zum einen vermehren sich viele Mycobionten durch sexuelle Reproduktion und erreichen damit eine genetische Rekombination ihrer Erbanlagen. Im Gegensatz dazu vermehren sich Photobionten in einer Flechtensymbiose nicht sexuell; eine Rekombination der Anlagen zwischen den Algenzellen einer Population bleibt (größtenteils) aus. Desweiteren findet keine fortlaufende Weitergabe des Photobionten auf die nachfolgenden Flechtengenerationen statt. Die beiden letzten Punkte werden als Vorbedingungen für eine Selektion im Darwin'schen Sinne angesehen, da genetische Anpassungen der Photobionten an den symbiotischen Zustand nur dann evolvieren sollen, wenn die Kontinuität dieses Zustandes über einen Zeitraum gewährleistet ist, der Anpassungsreaktionen des Photobionten an seinen spezifischen Mycobionten auch ohne sexuelle Fortpflanzung erlaubt. Daraus schließt Hill (2009), dass Evolution im Darwin'schen Sinne für den Photobionten erschwert wird und dass die Entwicklung von Adaptionen, die der Symbiose förderlich sind, beim Mycobionten stark ausgeprägt sein sollte, während sie beim Photobionten signifikant geringer bleibt.

Sollten sich die hier erzielten Ergebnisse bestätigen, dass durch den Biontenkontakt hauptsächlich im Mycobionten differenziell exprimierte Gene reguliert werden, so könnten sie als erster Hinweis auf die Richtigkeit der beschriebenen Hypothese gewertet werden.

4.3.3 Die sechs identifizierten Gene

Im folgenden Kapitel werden die sechs identifizierten differenziell hochregulierten Gene in ihrer bekannten Funktion beschrieben und ihre mögliche Bedeutung für die Flechtensymbiose bzw. die einzelnen Bionten diskutiert. Mit den identifizierten Genen lässt sich weder der Erkennungsmechanismus der Flechtenbionten vollständig aufklären noch alle daran beteiligten Elemente am Modellsystem *Fulgensia bracteata* identifizieren. Die identifizierten Gene können jedoch als Startpunkt für weitere Forschungen dienen und wichtige Hinweise auf den Mechanismus der Biontenerkennung liefern. Zudem können sie einen Einblick in die mit dem spezifischen Biontenkontakt einsetzende Umorientierung bzw. Anpassung des Mycobionten geben. Keines der sechs identifizierten Gene wurde bisher in seiner Art und Funktion für die Flechtensymbionten bzw. für die Flechtensymbiose beschrieben.

4.3.3.1 GTP-bindendes EsdC

In der Literatur wird *esdC* als notwendiges Gen für die frühe Sexualentwicklung von Ascomyceten beschrieben. In *Aspergillus nidulans* wurde es detailliert charakterisiert und in *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa*, *Gibberella zeae* und *Magnaporthe grisea* ist es stark konserviert (Han et al. 2008). Homologe von *esdC* finden sich ebenfalls in *Aspergillus oryzae*, *A. niger* und *A. terreus* (Chang et al. 2007). In filamentösen Pilzen scheint es in der ersten der drei ESD-Phasen (*early sexual development*) exprimiert zu werden, in der vegetatives Mycel aggregiert und teilweise zu Hüllzellen sowie Kleistothecienprimordien differenziert (Kim et al. 2002). *EsdC* wird in starkem Maße über das velvet-Gen *veA* kontrolliert, das als zentrales Element in der Sexualsteuerung von Ascomyceten gilt (Calvo 2008, Jeong et al 2000, Han et al. 2008). *VeA* fördert einerseits die sexuelle Entwicklung des Pilzes und aktiviert andererseits *esdC* (Han et al. 2008), das wiederum die Bildung von Konidiophoren unterdrückt und so zugunsten der meiotischen, also generativen Verbreitung, die mitotische, also vegetative Vermehrung hemmt (Champe et al. 1981, Yager 1992). In *veA*⁺/*esdC*⁰-Mutanten bilden sich keine sexuellen Strukturen aus, in *veA*⁰-Mutanten kann auch eine *esdC*-Überexpression keine sexuelle Entwicklung induzieren. Daraus lässt sich folgern, dass *esdC* zwar essenziell für die sexuelle Entwicklung der Ascomyceten ist, nicht aber alleinig ausreichend (Calvo 2008). Darüber hinaus wird *esdC* durch den *mating-type* Transkriptionsfaktor MAT1-2-1 in *Fusarium verticillioides* hochreguliert, der als wichtiges Element der sexuellen Kommunikation und der Paarung bei Pilzen angesehen wird (Keszthelvi et al. 2007). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression von *esdC* durch *fadA* in *A. nidulans* (in Morphogenese und Konidienbildung involviertes Element im G-Protein Signalweg, Han et al. 2008, Shimizu & Keller 2000), *sec* in *Aspergillus parasiticus* und *afl* in *Aspergillus flavus* (Gene der Aflatoxinsynthese, Chang et al. 2007) hochreguliert wird. Dies legt weitere Funktionen des Gens *esdC* nahe.

Die Tatsache, dass ein Gen für die Sexualentwicklung des Mycobionten bereits vier Wochen nach dem initialen Biontenkontakt und ohne die Ausbildung eines Thallus oder thallusähnlicher Strukturen erfolgt, erscheint einerseits ungewöhnlich. Auf der anderen Seite zeichnet sich die Flechte *Fulgensia bracteata* dadurch aus, dass sie keine vegetativen Fortpflanzungsorgane wie Soredien oder Isidien ausbildet und statt dessen bereits in frühen Entwicklungsstadien Apothecien in großer Zahl bildet (vgl. auch Abb. 2.1). Schizidien werden von *F. bracteata* ebenfalls nicht gebildet, obwohl sie bei anderen Arten der Gattung anzutreffen sind (Brodo et al. 2001). Für die Flechte *Fulgensia bracteata* kann eine möglichst frühe sexuelle Reproduktion durchaus von Vorteil sein. Zum einen ist der Mycobiont obligat auf die Flechtensymbiose mit dem Photobionten angewiesen, um dauerhaft zu überleben und seinen eigenen Generationenzyklus abschließen zu können. Zum anderen muss die Flechte *Fulgensia bracteata* ihren Standort in einer besonders komplexen und dynamischen Flechtengesellschaft (Osenberg 1993, Schaper 2003), der „Bunten Erdflechtengesellschaft“ (Toninio-Psoretum, Poelt 1969) behaupten. Die starke und frühe Bildung von Apothecien

kann dazu einen wichtigen Beitrag leisten. Die Hochregulation eines Gens der Fortpflanzungskontrolle scheint nicht viel mit den eigentlichen Mechanismen von Bionterkennung und initialem Biontenkontakt zu tun zu haben. Die vermehrte Expression von *esdC* scheint daher eher eine nachgeschaltete Reaktion auf eine bereits erfolgte positive Erkennung zu sein, da andererseits bei einer nicht erfolgten Erkennung keine Sexualentwicklung induziert würde. In dieser Hinsicht wäre die erhöhte Expression von *esdC* eher der Anpassungsphase zuzurechnen (Phase 5, Aufbau gemeinsamer Regulationsmechanismen auf physiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Ebene, Galun 1988).

Die Identifikation von *esdC* eröffnet nicht nur die Möglichkeit seine Wirkung und seine räumlichen sowie zeitlichen Expressionsmuster genauer zu studieren. Sollte *esdC* auch in der Flechte *F. bracteata* über das Gen *veA* aktiviert werden, dann wären *veA* selbst und auch jene Gene die ihrerseits *veA* aktivieren, gute Kandidaten für eine weitere Erforschung der Mechanismen der Bionterkennung. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, wie bereits von Chang et al. (2007) für *Aspergillus flavus* untersucht, dass die *esdC*-Expression kausal mit der Expression anderer Gene verknüpft ist und sich auf diese Weise wichtige Erkenntnisse über die initiale Bionterkennung gewinnen lassen.

4.3.3.2 dTDP-bindende 4,6-Glucose-Dehydratase

Das Enzym dTDP-Glukose-4,6-Dehydratase ist Teil der Biosynthese des 6-Desoxy-Zuckers L-Rhamnose. Dieser Biosyntheseweg nutzt zur Herstellung des Produktes dTDP-L-Rhamnose aus den Edukten Glukose-1-phosphat und Desoxythymidintriphosphat (dTTP) die katalytischen Eigenschaften von vier nacheinander wirkenden Enzymen (Naismith 2004). Diese Enzyme sind die α -D-Glukose-1-Thymidyltransferase (RmlA, 2.7.7.24), die dTDP-Glukose-4,6-Dehydratase (RmlB, 4.2.1.46), die dTDP-6-Desoxy-D-Xylo-4-Hexulose-3,5-Epimerase (RmlC, 5.1.3.13) und die dTDP-6-Desoxy-L-Lyxose-4-Hexulose-4-Reduktase (RmlD, 1.1.1.113). Wie für das gram-negative *Escherichia coli* gezeigt wurde, katalysiert die dTDP-Glukose-4,6-Dehydratase den Reaktionsschritt von dTDP-Glukose zu dTDP-4-Keto-6-Desoxyglukose in den drei Schritten Dehydrierung, Dehydratisierung und Rereduktion (Gross et al. 2001). Die C6-Desoxygenierung der dTDP-Glukose-4,6-Dehydratase und anderer NDP-Hexose-4,6-Dehydratasen stellt den ersten Reaktionsschritt in allen Desoxyhexose-Synthesewegen dar (Hegemann et al. 2002). Der Desoxy-Zucker Rhamnose, auch 6-Desoxy-Mannose genannt, wird nach den in dieser Arbeit durchgeführten TLC-Experimenten auch vom Photobionten von *Fulgensia bracteata* in das Kulturmedium exudiert (vgl. Kapitel 4.2.4.2). Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass auch 2'-Desoxythymidin, das Nucleosid von dTDP, von Photobionten exudiert wird. Wie in Kapitel 4.2.4.2. bereits ausführlich diskutiert spielt Rhamnose eine besondere Bedeutung als Baustein der Zellwände von Algen (Richter 1996) und Bakterien (Saigí et al. 1999). In Pflanzen ist Rhamnogalacturonan I aus alternierend verknüpften Rhamnose- und Galakturonsäuremonomeren mit verschiedenen Seitenketten gewöhnlich das häufigste und das strukturgebende Pektin in Pflanzen, während

Rhamnogalacturonan II seltener auftritt (Vincken et al. 2003, Vorwerk et al. 2004). L-Rhamnose ist, wie andere Desoxy-Zucker, ebenso Bestandteil von Sekundärmetaboliten und eine essenzielle Komponente bakterieller Zellwände. Es kommt dort in Lipopolysacchariden, Glycoproteinen und -lipiden vor, wobei erstere ein struktureller und immunrelevanter Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien sind (Saigí et al. 1999). Lipopolysaccharide bestehen aus drei funktionellen Teilen: dem Lipid, dem Kern-Oligosaccharid und dem O-spezifischen Antigen, welches sich durch hohe strukturelle Variabilität auszeichnet und z. B. beim O4-Antigen von *Serratia marcescens* aus L-Rhamnose besteht, das α -1,4-glykosidisch an D-Glukose gebunden ist. Auch die Gene *rmlA* - *rmlD* sind an der Synthese des O4-Antigens beteiligt (Saigí et al. 1999). Als Monomer solcher Oberflächenstrukturen spielt L-Rhamnose eine wichtige Rolle bei Erkennungs- und Infektionsprozessen zwischen pathogenen Bakterien und ihren Wirten (Naismith 2004): Die Unterbindung des dTDP-L-Rhamnose-Syntheseweges wirkt lethal auf *Pseudomonas aeruginosa*, löst Kolonisationsdefekte in *Vibrio cholerae* aus, mildert die Pathogenität von *Enterococcus faecalis* ab und verhindert die Virulenz von *Streptococcus mutans* durch die unterbleibende Zellwandsynthese. In *Mycobacterium tuberculosis* führt das Fehlen von L-Rhamnose zu einer sinkenden Lebensfähigkeit, da L-Rhamnose eine wichtige Ankerfunktion an der Peptidoglycanschicht erfüllt. Darüber hinaus scheint die Hochregulation von *rmlB* in Gräsern der Gattung *Agrostis* eine unbekannte Rolle bei der Stressantwort darzustellen (Xu & Huang 2008, Xu et al 2010).

Darüber hinaus ist Rhamnose ein Bestandteil von pilzlichen Polysacchariden (Griffin 1994) bzw. ein gelegentlich auftretender Bestandteil der pilzlichen Zellwand, mit bisher unzureichend erforschter Funktion (Bartnicki-Garcia, 1968). In der Wechselwirkung des humanen Pathogens *Sporothrix schenckii* mit seinem Wirt spielt das, in der Pilz-Zellwand eingelagerte, Peptidorhamnomannan (Lloyd & Bitoon 1971, San-Blas 1982, Lima et al. 2001) eine wesentliche Rolle. Aus serologischen Untersuchungen geht hervor, dass Patienten mit Sporothricose Antikörper gegen dieses Peptidorhamnomannan bilden, Patienten mit anderen Pilzinfekten nicht (San-Blas, 1982), daraus wird geschlossen, dass das in Pilz-Zellwänden eher selten auftretende Rhamnosemannan als spezifisches Antigen dienen kann. Damit wären Rhamnomannane in der Lage, eine immunologische Erkennungsreaktion auszulösen.

Die wesentliche Rolle, die Rhamnose bei der Bildung von erkenntnisrelevanten Stoffklassen wie Lipopolysacchariden, Glykoproteinen und Glykolipiden spielt, impliziert, dass bei der Bionterkennung von *Fulgensia bracteata* auch Rhamnose oder die mit Rhamnose gebildeten Stoffklassen eine Funktion im Erkennungsprozess erfüllen. Verschiedene antipathogene Lektine aus verschiedenen Organismengruppen (Tateno et al. 2002, Okamoto et al. 2005, Jimbo et al. 2007, Schwarz et al. 2007, Shirai et al. 2009) binden Rhamnose. Die Möglichkeit, dass Rhamnose auch in Lektin-artigen Erkennungsreaktionen eine Rolle spielen könnte ist insofern interessant, da in einer Vielzahl von Flechten bereits Lektine entdeckt worden sind, die eine Bindung zwischen den beiden Bionten in einem

Thallus vermitteln können (Berheimer & Farkas 1953, Howe & Barrett 1970, Lockhart et al. 1978, Kardish et al. 1991, Andrews et al. 1992, Lehr et al. 1995, Lehr et al. 2000). Ebenso kann Rhamnose auch Bestandteil von extrazellulären Polysacchariden (EPS) sein. In 8 von 25 Stämmen des Bakteriums *Rhizobium japonicum*, das ein Symbiont in der Leguminosen-Rhizobium-Symbiose ist, wurde Rhamnose als EPS-Bestandteil identifiziert. Interessanterweise zeigen jene Stämme eine hohe Nitrogenase-Aktivität *ex planta* und es wird vermutet, dass die Art des gebildeten EPS einen Einfluss auf die Erkennung durch die Leguminose ausüben könnte (Huber et al. 1984). Auch in diesem Fall scheint eine Verbindung zwischen dem Vorkommen von Rhamnose und einer erfolgreichen Symbionten-Interaktion zu bestehen.

Diese vielfältigen Funktionen, die Rhamnose oder Rhamnose-enhaltende Substanzen bei den Interaktionen zwischen verschiedenen Lebewesen erfüllen können, beweisen nicht, dass dies auch in der hier untersuchten Biontenerkennung zwischen den Bionten von *Fulgensia bracteata* der Fall sein muss. Allerdings weisen die hier präsentierten Ergebnisse – Hochregulation eines Gens der Rhamnose-Synthese im Mycobionten nach Biontenkontakt, sowie Rhamnose als Exudat des Photobionten (Kapitel 4.2.4.2) und die erkenntnis-spezifische Bildung von Gallerte, also EPS, bei spezifischem Biontenkontakt (Kapitel 4.1.3) – darauf hin, dass diesem Zucker eine wesentliche Bedeutung in der Biontenerkennung zukommen könnte. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um herauszufinden, ob Rhamnose ein Ligand oder Bestandteil von Lektinen sein könnte, oder ob sie als Bestandteil von extrazellulären Polysacchariden eine erkenntnisrelevante Funktion in der durch spezifischen Biontenkontakt sekretierten Gallerte erfüllen könnte. Sollte Rhamnose eine derartige Funktion bei der Biontenerkennung erfüllen, dann würde das hier identifizierte Gen einen Beitrag zur Aufklärung dieses Erkennungsmechanismus leisten. Ferner erscheint es möglich, dass die Rhamnose-Exudation des Photobionten und die kontaktspezifische Bildung von dTDP-Glukose-4,6-Dehydratase durch den Mycobionten auch ein erster Hinweis auf eine Verzahnung bzw. Verknüpfung des Stoffwechsels beider Bionten sein könnte. Damit könnten diese Resultate ein Beispiel für die starke gegenseitige Anpassung der Bionten von *Fulgensia bracteata* auf stoffwechsel-physiologischer Ebene sein.

4.3.3.3 ATP-Sulfurylase

ATP-Sulfurylasen spielen im Schwefel-Stoffwechsel eine zentrale Rolle bei der assimilatorischen Sulfatreduktion. Die ATP-Sulfurylase (ATPS, 2.7.7.4) ist ein ubiquitäres Enzym. Es bewirkt die intrazelluläre Sulfataktivierung und katalysiert die Reaktion von Sulfat mit ATP zu Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Pyrophosphat (Marzluf 1997, Beynon et al. 2001) als erstes in einer Kaskade von Enzymen, die Sulfat zu einer Vielzahl teilweise essenzieller Schwefelverbindungen umsetzen. In filamentösen Pilzen sind Sulfataufnahme und -assimilation hochgradig reguliert. Das Produkt der Umsetzung durch ATP-Sulfurylase, APS, dient wiederum zur Synthese von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) durch

die APS-Kinase. PAPS kann einerseits mit O-Acetylserin zu Cystein kondensiert werden, welches wiederum zur Synthese von Methionin und S-Adenosylmethionin dient und andererseits zur Bildung von Cholin-O-Sulfat. Letzteres ist ein spezifischer Schwefelspeicher filamentöser Pilze, nicht aber von Hefen und anderen Organismen. Cholin-O-Sulfat kann auch in Flechten gefunden werden (Lindberg 1955, aus Bellenger et al. 1968). Die Verwendung von PAPS in zwei so unterschiedlichen Stoffwechselwegen vermag teilweise die allosterische Hemmung der ATPS durch PAPS in filamentösen Pilzen erklären (Renosto et al. 1990, Marzluf 1997). In anaeroben, chemolithotrophen Bakterien kann APS allerdings auch als terminaler Elektronenakzeptor dienen. Diese Umsetzung von APS und Pyrophosphat zu ATP und Sulfat stellt den letzten Schritt in der Oxidation von H_2 , H_2S und (schwefelhaltigen) organischen Substanzen dar (Beynon et al. 2001). Über den Schwefelstoffwechsel in Flechtenbionten und besonders über die wechselseitige Abhängigkeit, den Austausch schwefelhaltiger Verbindungen und dessen Regulation ist bisher wenig bekannt. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann allerdings geschlossen werden, dass auch der Schwefelstoffwechsel zumindest des Mycobionten durch den Biontenkontakt beeinflusst wird. Ob die erhöhte Expression von ATP-Sulfurylase und damit die erhöhte Sulfat-Aktivierung mit einer verstärkten Stoffwechselaktivität seitens des Pilzes oder einer Veränderung bzw. Anpassung des gemeinsamen Schwefelstoffwechsels bewirkt wird, bedarf weiterer Untersuchungen. Eine veränderte Regulation des Schwefelstoffwechsels nach erfolgtem und erfolgreichem Biontenkontakt zu Beginn der Flechtensymbiose erscheint jedoch möglich.

4.3.3.4 60S Ribosomales Protein L29

Das Gen *rpl29* ist ein *single copy gene*, das für das ca. 6,6 kDa große ribosomale Protein L29 (Rpl29) codiert (De Labre et al. 2002). Ein eukaryotisches Ribosom besteht aus vier rRNA-Spezies und ca. 80 Proteinen, die teilweise bereits im Nukleolus zu präribosomalen Vorläufern der beiden Untereinheiten 60S und 40S zusammengefügt werden. Die Untereinheit 60S besteht im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* aus 46 Proteinen und den drei rRNA-Spezies 5S, 5,8S und 25S, während die Untereinheit 40S aus 32 Proteinen und der 18S-rRNA besteht (Planta & Mager 1998, Kruiswijk et al. 1978). In *S. cerevisiae* stellt Rpl29 ein nicht-essenzielles Protein der ribosomalen Untereinheit 60S dar, das an der Kopplung der beiden Untereinheiten beteiligt ist (De Labre et al. 2002). Experimentelle Befunde zeigen, dass die 60S-40S-Ankopplung bei Mutanten mit nicht-funktionellem Rpl29 verzögert abläuft. Rpl29 interagiert zudem mit dem Protein Rsa1, das ebenfalls an der Bildung von Ribosomen beteiligt ist, und mit Rpl10, wobei die Überexpression von Rpl10 nicht den durch Rpl29-Mangel verursachten Wachstumsdefekt auszugleichen vermag (De Labre et al. 2002). Die Bedeutung von ribosomalen Proteinen scheint allerdings über die direkten Aufgaben in der Proteinbiosynthese hinauszugehen. Ihre Bedeutung für die Regulation von Wachstumsprozessen zeigt sich auch an Untersuchungen mit dem Schleimpilz

Dictyostelium discoideum, der polymorphen Hefe *Candida albicans* und dem filamentösen Schlauchpilz *Aspergillus nidulans*. In *D. discoideum* unterliegt die Expression ribosomaler Proteine im Verlauf des Zellzyklus und der Entwicklung gewissen Schwankungen (Ramagopal & Ennis 1984, Steel & Jacobson 1987, Tapparo et al. 1998), während bei *C. albicans* die Bildung von Rp10 während des Wachstums und während des Übergangs vom Hefemorphotyp zum Hyphenmorphotyp differenziell reguliert wird (Swoboda et al. 1995). In *A. nidulans* hingegen wird auch das Gen *rpl16a*, das für das ribosomale Protein Rpl16A kodiert, während der Sexualentwicklung differenziell exprimiert (Jeong et al. 2000).

4.3.3.5 Peptidyl-Prolyl-Isomerase vom FKBP-C-Typ

Die Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPI) sind eine Superfamilie von Proteinen, die in allen bisher untersuchten Eukaryoten, Prokaryoten und Archaeen vorkommen (Pemperton 2006). Diese Superfamilie besteht aus drei Klassen, den Cyclophilinen, den FK506-bindenden Proteinen (FKBP) und den Parvulinen (Göthel & Marahiel 1999). Allen Klassen ist gemeinsam, dass sie die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung am Prolin katalysieren (Pemperton 2006). Diese Isomerisierung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteinfaltung und damit können PPI zu den Chaperonen gezählt werden (Göthel & Marahiel 1999). In Bakterien sind PPI essenziell und können eine Rolle bei Pathogenität und Virulenz spielen, während sie unter normalen Umweltbedingungen in Hefen meist nicht essenziell sind. Eine Beteiligung an pathogenen und virulenten Prozessen ist bislang unklar (Review bei Pemperton 2006). Allerdings kann ihr Fehlen in Kombination mit dem Fehlen anderer zellulärer Faktoren lethale Auswirkungen haben. In 16 Pilzen wurde das Repertoire an PPI untersucht und eine Korrelation zwischen Proteomgröße und Anzahl an PPI erkannt; diese Pilze besitzen 2-16 Cyclophiline, 0-5 FKBP und 1-2 Parvuline (Pemperton 2006). Die in dieser Arbeit gefundene PPI gehört zur Klasse der FKBP, die einzelne oder mehrfache Domänen enthalten können. Im Gegensatz zu den anderen Klassen, die hochgradig konserviert sind, können FKBP verschiedene Rollen im Stoffwechsel von Pilzen übernehmen (Pemperton 2006). Hauptsächlich umfasst dies die Proteinfaltung, aber auch die frühe Sexualentwicklung von *Schizosaccharomyces pombe* (Weisman et al. 2001), die Homoserinsynthese (Arevalo-Rodriguez et al. 2004), die Wachstumssteuerung (Magherini et al. 2004) oder die Chromatinveränderungen als potenzielles Histon-Chaperon (Kuzuhara & Horikoshi 2004).

4.3.3.6 Protein aus der Domänenfamilie Aha 1

Proteine der Aha1-Domänenfamilie werden in der Literatur unter anderem als Hsp-bindende Cochaperone beschrieben. Das *heat shock protein 90* (Hsp90) ist als essenzielles Chaperon für die korrekte Faltung und damit für die Stabilität und Aktivität seiner Klientenproteine nach deren Synthese zuständig (Zuehlke & Johnson 2009). Es wird geschätzt, dass ca. 10 %

aller Proteine für ihr bestimmungsgemäßes Funktionieren direkt oder indirekt von Hsp90 abhängig sind. Es kommt in allen bisher untersuchten Eu- und Prokaryoten in verschiedenen Isoformen vor, konnte bisher allerdings nicht in Archaeen nachgewiesen werden (Zuehlke & Johnson 2009). Hsp90 weist einen komplexen Mechanismus von Konformationsänderungen auf, die an die Hsp90-eigene ATPase-Aktivität gekoppelt sind und die Interaktion mit Klientenproteinen und Cochaperonen beeinflussen (Pearl & Prodromou 2006). Das hier identifizierte Gen aus der Aha1-Domänenfamilie ist ein solches Hsp90-Cochaperon, das dessen ATPase-Aktivität stimuliert und somit zur schnelleren Aktivierung, aber auch zur schnelleren Dissoziation des Klientenproteins führt (Zuehlke & Johnson 2009). Ferner ist es an der Kontrolle prozessierter und am Abbau falsch gefalteter Klientenproteine beteiligt. Aha1 zeigt keine Homologie zu anderen bekannten Proteinfamilien (Pearl & Prodromou 2006). Pathogene Pilze, die bei einem Wechsel auf ihren Wirt oft starken Veränderungen der Umweltbedingungen unterworfen sind, zeigen mit der Veränderung solcher Parameter auch die veränderte Genexpression bestimmter Gene. In *Aspergillus fumigatus* wird ein Gen aus der Aha1-Domänenfamilie, interessanterweise zusammen mit einer Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase, ca. 30 min nach einem Stressorenreiz verstärkt exprimiert (Guthke et al. 2007). Die Expression von *hsp90*, wie auch der meisten Hsp und der Chaperone, erhöht sich ebenfalls unter dem Einfluss von einer Vielzahl von Stressoren (Zuehlke & Johnson 2009).

Während die Bedeutung des Genes für die dTDP-Glukose-4,6-Dehydratase im Rhamose-Syntheseweg und damit auch in der Synthese von potenziell erkenntnisrelevanten, extrazellulären Glykoproteiden liegt und die des Genes für *esdC* in der Steuerung der frühen Sexualentwicklung des Pilzes liegt, ist die Bedeutung der letzten drei identifizierten Gene schwieriger einzuschätzen. Die Produkte der drei Gene sind als Teil des Ribosoms und als Teil der auf die Proteinbiosynthese folgenden Faltungsmaschinerie für die Herstellung und die korrekte Funktion neu synthetisierter Genprodukte (z. B. Proteine, Enzyme) verantwortlich. Darüber hinaus ist von zwei Produkten der identifizierten Gene (Rpl29 und PPI) bekannt, dass sie in Pilzen weitere Funktionen übernehmen oder daran beteiligt sind. Diese Funktionen umfassen sowohl die Regulation von Wachstums- als auch von Differenzierungsprozessen. Zusätzlich können zumindest ein ribosomales Proteine als auch einige PPI eine Funktion in der Sexualentwicklung von Pilzen haben. Welche dieser potenziellen Aufgaben durch die erhöhte Expression im Mycobionten erfüllt wird, geht aus den hier erarbeiteten Ergebnissen nicht hervor. Mehrere Möglichkeiten kommen allerdings in Betracht: Zum einen könnte der Biontenkontakt ein verstärktes Wachstum des Mycobionten hervorrufen, welches eine verstärkte Proteinbiosynthese erfordert. Dieses Wachstum könnte nur indirekt durch den Biontenkontakt ausgelöst werden, also durch eine Reaktion des Pilzes auf eine erfolgte Erkennung, nicht als Reaktion auf die Erkennung selber. Dennoch könnte dies zur verstärkten Expression von Genen der Proteinbiosynthese und der Proteinfaltung führen.

Zum anderen könnte auch die beginnende Sexualentwicklung, die bereits durch die Identifikation von differenziell hochregulierten *esdC* belegt wird (Kapitel 4.3.3.1), die Induzierung der Genexpression von Rpl29 und PPI bewirken. Würde sich eine solche Funktion in nachfolgenden Experimenten bestätigen, dann würde dies die Bedeutung des Biontenkontaktes, neben allen anderen damit einhergehenden Differenzierungsreaktionen, für die frühe Sexualentwicklung des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* unterstreichen.

Bedenkt man allerdings genau jene vielfältigen und für den Erfolg der Flechtensymbiose notwendigen Differenzierungsprozesse, die auf den erfolgreichen Biontenkontakt folgen müssen, dann erscheint eine dritte Deutung wahrscheinlicher. Mit dem erfolgreichen Kontakt zwischen Myco- und Photobiont beginnt für den Pilz eine Phase intensiver Anpassung und Umorientierung. Diese Anpassung an den symbiotischen Status könnte zum einen einen Stressor darstellen und zum anderen weitreichender Veränderung hinsichtlich der Genexpression, der Proteinbiosynthese und der damit verbundenen Stoffwechselleistungen bedürfen. Im Verlauf dieser Veränderungen ändert sich auch die Genexpression der drei erwähnten Gene, die zwar erkenntnisunspezifisch sind, aber eine bedeutende Rolle bei den zentralen Prozessen von Proteinbiosynthese und Proteinfaltung spielen. Somit könnten mit dem Biontenkontakt einsetzende Wachstums- und Differenzierungsprozesse für die erhöhte Expression dieser Gene verantwortlich sein.

5 Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

5.1.1 Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den Präkontaktstudien

Die Ergebnisse von *in vitro* Präkontakt-Interaktionsassays mit dem Mycobionten von *Fulgensia bracteata* und verschiedenen Algen bestätigen mehrere Annahmen: a) Die initiale Bionteninteraktion beginnt mit einer für Flechten postulierten und für andere Symbiosen bereits nachgewiesenen Präkontaktphase. b) Sie ist durch signifikante morphologische Veränderungen des Mycobionten charakterisiert, die von der Art der im Präkontakt angebotenen Algen abhängen. c) Diese Veränderungen des Mycobionten von *F. bracteata* lassen sich im Kontext mit anderen Forschungsergebnissen als das Ergebnis unterschiedlich stark ausgeprägter Erkennungsreaktionen interpretieren und zeigen, dass die Mechanismen von Spezifität und Selektivität für die Lichenisierung bereits im Präkontakt wirken.

Unter Kontrollbedingungen zeigt sich ein geringes, stagnierendes und undifferenziertes Wachstum der Mycelien. Dies wird als *growth arrest*-Strategie interpretiert, die die Persistenz des Pilzes am Keimungsort sichert und so die Wahrscheinlichkeit auf den spezifischen Biontenkontakt erhöht. In allen Proben unter Einfluss von Algen ist dieser *growth arrest* aufgehoben. Unterschiedliche Keimungs- und Wachstumsraten scheinen weitere Strategien zu sein, die die Überlebenschancen unlichenisierter Mycelien erhöhen.

Die drei experimentell angebotenen Algen beeinflussen sehr stark die Entwicklung des Mycobionten nach der Keimung. Alle Einflüsse sind unabhängig von der Nährstoffverfügbarkeit des Mediums. Unter dem Einfluss des unspezifischen Photobionten *Asterochloris* sp. (aus *Lecidea lurida*) zeigt sich das signifikant schwächste Hyphenwachstum. Die Mycelien zeigen ein loses, netzartig verbundenes Wachstumsmuster mit wenig Gallertbildung. Unter dem Einfluss des spezifischen arteigenen Photobionten (*Trebouxia* sp.) zeigt sich ein weit darüber hinausgehendes Hyphenwachstum mit einer verstärkten Gallertbildung und einem radialen, kompakt-flachen Wachstumsmuster. Der Präkontakt mit der nicht-lichenisierenden Alge *Myrmecia bisecta* fördert das Hyphenwachstum am stärksten. Die Gallertbildung bleibt hinter der mit dem arteigenen Photobionten zurück. Die große Anzahl auswachsender Luft-hyphen, die unter allen anderen Bedingungen nur vereinzelt gebildet werden, führt zu einem radialen, aber sphärisch-kompakten Wachstumsmuster. Hyphenlänge, Gallertisierung und Wuchsform, aber auch Lufthyphenbildung und *hyphal tip swellings* werden von der Identität der experimentell angebotenen Alge beeinflusst. Während der Gallertbildung eine erkenntnisspezifische Bedeutung zuzukommen scheint, ist das Hyphenlängenwachstum der am stärksten beeinflusste Faktor. Die Verzweigungshäufigkeit hängt direkt von der Hyphenlänge ab; sie wird im Präkontakt durch keine der angebotenen Algen beeinflusst.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Mycobiont von *F. bracteata* auf den arteigenen Photobionten mit spezifischen, koordinierten Präkontaktreaktionen antwortet, auf den unspezifischen Photobionten hingegen mit anderen, angepassten, aber anders ausdifferenzierten Präkontaktreaktionen. Dies deutet auf eine „situationsabhängige adaptive Selektivität“ hin, die es dem Mycobionten erlaubt, mit unspezifischen Photobionten mittelfristige Assoziationen einzugehen und sich an die am Keimungsort vorhandene Algenpopulation anzupassen. Dies sichert sein Überleben und erhöht die Wahrscheinlichkeit auf den spezifischen Biontenkontakt. Die Reaktion des Mycobionten auf die nicht-lichenisierende Alge lässt sich als eine starke, aber unkoordinierte Reaktion auf eine unspezifische und inkompatible Alge deuten.

Die unterschiedlichen Präkontaktreaktionen des Mycobionten auf die drei Algen deuten darauf hin, dass zur erfolgreichen Erkennung wechselseitige, sorgsam koordinierte Signale zwischen den Bionten ausgetauscht werden müssen. Dies umfasst Signale zur Aufhebung des *growth arrest*, zur Freisetzung von Nährstoffen durch die Alge, die transferierten Nährstoffe selbst, sowie Signale, die die entsprechende Erkennungsreaktion bewirken und die darauf folgende Reaktion kontrollieren. Neben den eindeutigen Beweisen für differenzielle Reaktionen des Mycobionten von *F. bracteata* im Präkontakt, geben die Ergebnisse zusätzlich klare Hinweise auf einen komplexen, mehrstufigen und von der Art der Interaktionspartner abhängigen Erkennungsmechanismus. Solche Mechanismen sind bereits detailliert aus anderen Symbiosen bekannt, nicht aber für die Flechtensymbiose.

5.1.2 Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den Exudationsstudien

Die Analyse der Algen-Exudate bringt weitere Ergebnisse, die helfen können, die initiale Biontenerkennung aufzuklären: a) Unter Versuchsbedingungen werden von dem Photobionten von *F. bracteata*, weiteren Photobionten und der Alge *M. bisecta* eine Vielzahl von chemischen Substanzen in das Kulturmedium ausgeschieden. b) Einige dieser Substanzen werden differenziell in Abhängigkeit von der Art der Alge und des Kulturmediums exudiert, womit sie als potenzielle Signalsubstanzen fungieren können. c) Mit den verwendeten chromatographischen Methoden können vier Exudate identifiziert werden: Indol-3-carbaldehyd, die zyklischen Dipeptide Cyclo-(trp-trp) und Cyclo-(leu-tyr), sowie der Zucker Rhamnose. Andere Substanzen können zwar mit HPLC identifiziert, nicht aber über LCMS etc. verifiziert werden. Dies sind zwei weitere zyklische Dipeptide, Cyclo-(ala-trp) und Cyclo-(pro-tyr), sowie die Desoxynucleoside 2'-Desoxyadenosin und 2'-Desoxythymidin. Jede dieser Substanzen wird zum ersten Mal als Exudat der untersuchten Algen beschrieben.

Ob diese Substanzen einen erkenntnisrelevanten Einfluss auf den Mycobionten von *F. bracteata* ausüben, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig beantwortet werden. Einige der identifizierten und in weiteren Versuchen dem Medium zugesetzten Substanzen beeinflussen Keimung und Keimhyphenbildung. Eine weitere, morphologische Reaktion wird jedoch nicht beobachtet, da keine Substanz in den gewählten Konzentrationen den *growth arrest* aufhebt. Keine der vier Substanzen kann allein für die im Präkontakt-

Interaktionsassay beobachteten Reaktionen verantwortlich sein. Einige Befunde eröffnen jedoch die Möglichkeit, dass Cyclo-(trp-trp) Teil des oben beschriebenen Signalaustausches sein könnte, während der hemmende Effekt von Indol-3-carbaldehyd und Rhamnose auf eine regulierende Funktion im Biontenkontakt hindeuten könnte. Eine abschließende Bewertung der Bedeutung dieser Substanzen für die Biontenerkennung ist nicht möglich. Es zeigt sich jedoch, dass die Erkennungsmechanismen durch eine hohe Komplexität gekennzeichnet sind.

Zyklische Peptide wurden bereits als sekundäre Inhaltsstoffe in anderen Flechten nachgewiesen. Die Tatsache, dass solche Substanzen auch durch den Photobionten alleine gebildet werden können, zeigt, dass der jeweilige Beitrag der Flechtenbionten zur Synthese bestimmter Inhaltsstoffe detaillierter erforscht werden sollte.

5.1.3 Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus den Expressionsstudien

Die Ergebnisse der SSH-basierten Expressionsstudien zeigen eindeutig, dass sich mit dem spezifischen Biontenkontakt auch die Genexpression – zumindest – des Mycobionten von *Fulgensia bracteata* ändert. Es können 35 kontaktspezifisch hochregulierte cDNA-Fragmente und 17 herunterregulierte cDNA-Fragmente identifiziert werden. Von den 35 hochregulierten cDNA-Fragmenten können 25 Fragmente einmal und 10 Fragmente zwei- bis elfmal identifiziert werden. Die Faktoren des Expressionsunterschiedes liegen zwischen 2,0 und 15,6 und die Längen der cDNA-Fragmente sind mit 41 bis 196 bp durchweg kurz. Von 17 herunterregulierten Fragmenten werden neun einmal, fünf zweimal und drei dreimal identifiziert. Die Faktoren des Expressionsunterschiedes liegen zwischen 2,0 und 39,9 und die Längen der cDNA-Fragmente zwischen 41 und 137 bp. Von den 35 kontaktspezifisch hochregulierten cDNAs können sechs Fragmente mittels BLAST-Suche sechs verschiedenen Genen zugeordnet werden, die alle aus dem Mycobionten stammen. 29 der kontaktspezifisch hoch- und alle 17 herunterregulierten Gene zeigen keine hinreichenden Übereinstimmungen zu den, in den Datenbanken eingetragenen, Genen. Somit könnten viele der kontaktspezifisch regulierten Gene für Flechtenbionten spezifisch sein. Da kaum genetische Informationen aus Flechtenbionten in den Datenbanken enthalten sind, können solche Gene damit nicht identifiziert werden. Dies eröffnet die prinzipielle Möglichkeit, dass sich in der Flechtensymbiose Erkennungsmechanismen und damit verbunden Gene entwickelt haben, die nicht in nicht-lichenisierenden Organismen vorkommen.

Keine Sequenz zeigt eine höhere Ähnlichkeit zu Pflanzen-Genen als zu Pilz-Genen. Dies impliziert, dass die kontaktspezifische Änderung der Genexpression den Mycobionten stärker betrifft als den Photobionten. Manche Autoren vertreten die Hypothese einer asymmetrischen Evolution beider Bionten, wobei der sich sexuell reproduzierende Mycobiont zu einer weitergehenden Anpassung fähig sein soll, als der sich nur asexuell reproduzierende Photobiont (Hill 2009). Sollte sich bestätigen, dass durch den Biontenkontakt hauptsächlich im Mycobionten differenziell exprimierte Gene reguliert werden, so könnte dies als erster Hinweis auf die Richtigkeit der Hypothese gelten.

Drei der sechs identifizierten Gene kodieren für ein GTP-bindendes EsdC, das die frühe Sexualentwicklung von Pilzen steuert, für eine dTDP-bindende 4,6-Glucose-Dehydratase und für eine ATP-Sulfurylase. Das EsdC unterdrückt die vegetative zugunsten der generativen Vermehrung. Auch wenn das Einleiten der Sexualentwicklung ein der Erkennung nachgeschalteter Prozess sein sollte, ist die Entdeckung dieses Gens für *F. bracteata* aufschlussreich, da diese Flechte sehr früh in ihrer Entwicklung Apothecien bildet, aber keine vegetativen Vermehrungseinheiten. Die Glucose-Dehydratase ist ein Enzym zur Synthese von Rhamnose, welche wiederum in vielen Organismen erkenntnisrelevant ist. Die Funktion von Rhamnose in der Erkennungsfunktion von EPS, also Gallerte, und Lektinen erscheint für die Bionterkennung in Flechten besonders interessant. Besonders, da Rhamnose auch als Exudate des Photobionten detektiert werden konnte. Die ATP-Sulfurylase aktiviert Sulfat zu Adenosin-5'-phosphosulfat. Damit erscheint es wahrscheinlich, dass mit dem erfolgten und erfolgreichen Biontenkontakt der Schwefelstoffwechsel im Mycobionten oder auch zwischen beiden Bionten eine Reorganisation erfährt.

Die drei weiteren Gene sind eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase, das 60S Ribosomale Protein L29 und ein Protein aus der Domänenfamilie Aha 1. Diese drei Gene spielen entweder als Bestandteil des Ribosoms selber oder als Chaperon bzw. Cochaperon eine Rolle in der Proteinbiosynthese und bei der korrekten Faltung neu synthetisierter Proteine. Das Ribosomale Protein L29 ist ein nicht-essenzieller Bestandteil des Ribosoms und scheint in Pilzen auch eine Bedeutung für die Regulation von Wachstumsprozessen und in einzelnen Entwicklungsstadien zu besitzen. Die Peptidyl-Prolyl-Isomerase ist ein wichtiges Chaperon, das in Pilzen ebenfalls eine Rolle in der Wachstumssteuerung und auch in der Sexualentwicklung spielen kann. Das Protein aus der Domänenfamilie Aha 1 ist als Cochaperon des *heat shock protein* 90 bekannt. Bedenkt man die vielfältigen Differenzierungsprozesse, die mit der Lichenisierung einhergehen, dann lässt sich die erhöhte Expression dieser Gene mit der Notwendigkeit für intensive Anpassungs- und Reorganisationsprozesse des Mycobionten bei erfolgtem Biontenkontakt erklären. Diese Anpassung an den symbiotischen Status bedarf wahrscheinlich weitreichender Veränderungen hinsichtlich der Proteinbiosynthese und der damit verbundenen StoffwechsellLeistungen, die auch auf die Genexpression der drei Gene zurückwirken. Diese Gene sind zwar erkenntnisunspezifisch, spielen aber eine bedeutende Rolle bei den zentralen Prozessen der Proteinbiosynthese und Proteinfaltung. Somit können mit dem Biontenkontakt einsetzende Differenzierungs- und Wachstumsprozesse für ihre erhöhte Expression verantwortlich sein.

Die hier vorgestellten Ergebnisse, die durch Untersuchungen der Flechte *Fulgensia bracteata* und ihrer Bionten erarbeitet wurden, repräsentieren einen guten Ausgangspunkt für weitere Forschungen bezüglich der molekularbiologischen Basis der initialen Erkennungsmechanismen in Flechten, der übertragenen Signalmoleküle und der morphogenetischen Reaktionen des Mycobionten.

5.2 Summary

5.2.1 Results and Conclusions of the Pre-Contact Studies

The results of *in vitro* pre-contact interaction assays with the mycobiont of *Fulgensia bracteata* and different algae confirm several assumptions: a) The initial biont interaction starts with a pre-contact phase, that was yet postulated for lichens and verified for other symbioses. b) It is characterized by substantial changes of the mycobiont's morphology which depend on the identity of the subjected algae. c) In context with other studies, these variations could be interpreted as differential recognition reactions and show that the lichenization-relevant mechanisms of specificity and selectivity are already initialized during pre-contact.

The mycelia show low, stagnant, and undifferentiated growth under control conditions when not exposed to any alga. This is interpreted as a strategy for growth arrest to insure the mycobiont's persistence at the germination site, and to increase the probability of specific contact with the photobiont. The growth arrest is omitted in all samples influenced by algae. Different germination and growth rates seem to be additional general strategies to increase the chances of survival of unlichenized mycelia.

The three algae to which the mycobiont is experimentally subjected strongly influence its development after germination independent of the nutrient composition in the respective culture medium. The significantly weakest hyphal growth is observed under the influence of the unspecific photobiont *Asterochloris* sp. (of *Lecidea lurida*). The mycelia show a loose, reticulate and interconnected growth pattern with low mucilage production. The influence of the specific photobiont (*Trebouxia* sp.) leads to strongly enhanced hyphal growth, increased mucilage production, and a radial, plain, and dense growth pattern. The strongest increase in hyphal growth is shown in pre-contact with the non-lichenizing alga *Myrmecia bisecta*. Compared to the influence of *Trebouxia* sp., mucilage production is decreased, while the number of aerial hyphae is much higher leading to a radial and dense but spheric growth pattern. Hence, hyphal length, mucilage production, growth pattern, aerial hyphae formation and number of hyphal tip swellings are influenced by the algal species subjected to the mycobiont. Mucilage production seems to be specific for recognition whereas hyphal length is most strongly affected by the algal identity. The branching rate is not influenced by the algae but directly depending on hyphal length.

In conclusion, the response of the mycobiont of *F. bracteata* to *Trebouxia* sp. is characterized by a specific co-ordinated pre-contact reaction. Its response to the unspecific *Asterochloris* sp. resembles an adapted but less intense and differentiated pre-contact reaction. This points to an "situation-triggered adaptive selectivity" which enables the mycobiont to temporarily associate with unspecific photobionts and adjust to local algal populations at the germination site. This ensures its survival and enlarges the probability of specific photobiont contact. The mycobiont's response to the non-lichenized alga suggests a strong but non co-ordinated reaction to an unspecific and incompatible alga.

Differential pre-contact reactions of the mycobiont in response to the three algal species indicate that interspecific, well co-ordinated signals are transmitted between potential bionts for successful recognition. That includes signals for omission of growth arrest, for algal nutrient release, nutrient transfer, as well as recognition-specific and -controlling signals. Besides the clear evidence for differential reactions of the mycobiont in the pre-contact phase, the results also stress the existence of a complex, multi-stepped recognition mechanism which is modified by the respective interaction partner. Although such mechanisms are not known for lichens, they are already reported in detail for various symbiont-plant-symbioses.

5.2.2 Results and Conclusions of the Exudation Studies

The analysis of algal exudates provides further results to shed light on initial biont recognition. a) Multiple and various chemical substances are exuded by the photobiont of *F. bracteata*, other photobionts, and the non-lichenizing alga *M. bisecta* under culture conditions. b) Some of these substances are differentially exuded depending on algal identity and the type of medium. Hence, it might be possible that such exudates act as signaling substances. c) By different chromatographic methods it is possible to identify four exudates: Indol-3-carbaldehyde, the cyclic dipeptides cyclo-(trp-trp) and cyclo-(leu-tyr), and the sugar rhamnose. Other substances are only identified by HPLC but not verified by LCMS. These substances represent the two additional cyclic dipeptides cyclo-(ala-trp) and cyclo-(pro-tyr) as well as the two deoxynucleosides 2'-deoxyadenosine and 2'-deoxythymidine. Each of these substances is reported as photobiont/algal exudate for the first time.

According to the obtained results it cannot be clearly concluded if these substances have an influence on the recognition mechanisms of the *F. bracteata* mycobiont in the lichenization process. In additional culture experiments with the application of the identified substances some of them influence mycobiont germination and germ tube formation. Due to the fact that none of the substances is able to omit the growth arrest in the applied concentrations, no further morphological response can be observed. Therefore, none of the four substances can cause the morphological reactions on its own, which are observed in the pre-contact interaction assays. However, some findings indicate that cyclo-(trp-trp) plays a role in the signal transmission scheme mentioned above, while the inhibitory effect of indol-3-carbaldehyde and rhamnose points to a regulatory function in symbiotic contact. Considering the relevance of these substances for biont recognition no conclusions can be drawn yet. Nevertheless it becomes clear that recognition mechanisms are characterized by a high degree of complexity.

It is already published that cyclic peptides are secondary metabolites in other lichen species. The fact that such components can be formed by the photobiont on its own suggests that the contribution of each lichen biont to the synthesis of secondary metabolites needs to be examined to more detail.

5.2.3 Results and Conclusions of the Expression Studies

The results of the expression studies by SSH demonstrate that gene expression changes during specific biont contact – at least in the mycobiont of *F. bracteata*. Thirty-five contact-specific up-regulated and 17 down-regulated cDNA-fragments can be identified. Out of 35 25 fragments are found one times while 10 fragments are found two to eleven times. The factors of expressional up-regulation at biont contact range from 2.0 to 15.6 while the size of the cDNA-fragments is between 41 and 196 bp. Nine out of 17 fragments are covered once five fragments twice and three thrice. The factors of expressional down-regulation at biont contact range from 2.0 to 39.9 while the size of the cDNA-fragments is between 41 and 137 bp. From the 35 contact-specifically up-regulated cDNA-fragments only six fungal genes can be identified by BLAST search whereas 29 up-regulated and none of the 17 down-regulated cDNA-fragments shows any similarity to known database entries. Consequently, some contact-specifically regulated genes could be unique in lichen bionts. Since there is only few genetic database information available on lichen bionts, such genes have to remain unidentified yet. This implies the possibility, that in the course of evolution lichen recognition mechanisms and their constituting genes have evolved, but are not found in non-lichenizing organisms.

None of the obtained sequences exhibits a higher similarity to plant-genes than to fungal genes. This might indicate that the mycobiont is stronger affected by contact-triggered changes in gene expression than the photobiont. Some authors hypothesize asymmetrical evolution of both bionts in which the sexually reproducing mycobiont has greater capabilities to adapt to the symbiotic state than the vegetatively reproducing photobiont (Hill 2009). If it could be verified that the mycobiont's genes are more submitted to differential expression, these results could be regarded as a first hint on the correctness of this hypothesis.

Three out of the six identified genes code for a GTP-binding EsdC which regulates the early sexual development of fungi, for a dTDP-binding 4,6-glucose-dehydratase and for an ATP-sulfurylase. EsdC suppresses vegetative in favor of sexual reproduction. Since the lichen *F. bracteata* forms apothecia early in its development but no vegetative propagules the identification of this gene is very instructive even if the sexual development initiation is a subsequent process to biont recognition. The enzyme glucose-dehydratase is essential for the synthesis of rhamnose, which in turn plays an important role in recognition mechanisms of many organisms. Rhamnose contributes to extracellular polysaccharide (i. e. mucilage) mediated recognition as well as to lectins. This might also indicate a crucial role of rhamnose in lichen recognition processes. Especially because it is also detected as a photobiont exudate. Since ATP-sulfurylase activates sulfate to adenosine-5'-phosphosulfate can be concluded that sulfur metabolism must be re-organized after successful biont contact in one or both partners.

The three remaining genes encode a FKBP-C-type peptidyl-prolyl-isomerase, the 60S ribosomal protein L29 and an Aha1 domain family protein. These three genes are important for protein biosynthesis and protein folding as part of the ribosome as well as a chaperone or a

co-chaperone. The ribosomal protein represents a non-essential part of ribosomes but also seems to be involved in the regulation of fungal growth and developmental processes. The peptidyl-prolyl-isomerase is a key chaperone and can be part of fungal growth regulation and sexual development. The Aha1 domain family protein is known as a co-chaperone of heat shock protein 90. Considering the manifold differentiation processes during lichenization, the up-regulation of these three genes can be explained by the need for intensive adaptation and re-orientation of the mycobiont after specific contact. The adaptation to the symbiotic state might require intense changes in protein biosynthesis and metabolic processes affecting the respective gene expression. Although the three identified genes do not seem to be connected to biont recognition they play vital roles in protein biosynthesis and folding. Hence, the differentiation and growth processes initiated by biont contact could cause their elevated expression.

The results presented in this study and obtained by investigations of the lichen *Fulgensia bracteata* and its bionts provide a crucial starting point for further research on the molecular basis of initial lichen recognition mechanisms as well as on transmitted signal molecules and mycobiont morphogenesis.

6 Abkürzungsverzeichnis

[M+H] ⁺	positiv geladenes Pseudomolekül-Ion
[M+Na] ⁺	positiv geladenes Addukt-Ion
[M-H] ⁻	negativ geladenes Pseudomolekül-Ion
[M-H+HCOOH] ⁻	negativ geladenes Addukt-Ion
[Signal]*min	Maßeinheit der Signalstärke in der HPLC
°C	Grad Celsius, Maßeinheit der Temperatur
A	1 Ampere $\approx 6,24 \times 10^{18}$ Elektronen/s, SI-Einheit der Stromstärke
ABP	algal binding protein
Amp	Ampicillin, Antibiotikum
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
ATPS	ATP-Sulfurylase
bar	1 Bar = 10^5 Pascal, Maßeinheit des Drucks
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pairs, Basenpaare einer Nukleinsäure
C	Kohlenstoff
C18	Octadecylsilan-Silicagel, stationäre Phase der RP-HPLC
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute, Einheit der Aktivität radioaktiver Stoffe
d	1 Tag (day) = 24 h, Maßeinheit der Zeit
Da	1 Dalton = 1 u, SI-Einheit der atomaren Masse
ddH ₂ O	double distilled water, siehe Aqua bidest.
DEPC	Diethylpyrocarbonat, ein RNase-Inhibitor
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease, DNA-abbauendes Enzym
ds-cDNA	double-stranded cDNA, doppelsträngige cDNA
dTDP	Desoxy-Thymidindiphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, ein Komplexbildner
EIMS	electron impact-mass spectrometry
EPS	Extrazelluläre Polysaccharide
ESI	electrospray injection, Elektrospray-Injektion
EtBr	Ethidiumbromid
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
eV	1 Elektronenvolt $\approx 1,602 \times 10^{-19}$ J, Maßeinheit der Energie
FG	Frischgewicht
FK506	Immunsuppressivum, auch Tacrolimus oder Fujimycin
FKBP	FK506-bindendes Protein
g	1 Gramm = 0,001 kg, Maßeinheit der Masse
G3PDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (auch GAPDH)
Glc	Glucose, Traubenzucker
GTP	Guanosintriphosphat
h	1 Stunde (hour) = 60 min = 3600 s, Maßeinheit der Zeit
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser

6 Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Puffer
HIF	hormogonia inducing factor
HPLC	high performance liquid chromatography
HPLC-MS	siehe LCMS
IAA	indole-3-acetic acid, Indol-3-essigsäure, ein Auxin
ICA	indole-3-carbaldehyde, Indol-3-carbaldehyd
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITS1	internal transcribed spacer region 1
ITS2	internal transcribed spacer region 2
kb	1 Kilobase = 1000 Basenpaare (bp)
kDa	1 Kilodalton = 1000 Dalton (Da)
kg	1 Kilogramm, SI-Einheit der Masse
λ	Marker aus HindIII-verdauter Lambda-Phagen-DNA
l	1 Liter = 10 cm ³ = 0,001 m ³ , Maßeinheit des Volumens
LB	Luria-broth, Medium
LC/MS	siehe LCMS
LCMS	liquid chromatography-mass spectrometry
m	1 Meter, SI-Einheit der Länge
M	1 Molar = 1 mol/l = Angabe der molaren Konzentration
m/z	Verhältnis aus Masse (m) zu Ladung (z)
mA	1 Milliampere = 0,001 Ampere
Mb	1 Megabasenpaar = 1.000.000 bp
MB	Mycobiont
MeOH	Methanol
mg	1 Milligramm = 0,000.001 kg
min	Minute = 60 Sekunden
ml	1 Milliliter = 1cm ³ = 0,001 l
ml/min	Maßeinheit der Durchflussrate in der HPLC
mM	1 Millimolar = 0,001 mol/l
mm	Millimeter = 0,001 Meter
Mol	1 Mol ≈ 6,022 x 10 ²³ Teilchen, SI-Einheit der Stoffmenge
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MY	malt-yeast-extract-medium
MYS1	malt-yeast-extract-medium, mit 1% Sucrose
N ₂	Luftstickstoff, molekularer Stickstoff
NaAc	Natriumacetat
n. D.	no data, keine Daten vorhanden
ng	1 Nanogramm = 0,000.000.001 Gramm
nm	1 Nanometer = 0,000.000.001 Meter
nod-Faktoren	Produkte der nod-Gene
nod-Gene	Nodulations-Gene der Rhizobium-Leguminosen-Symbiose
oligo(dT)	Oligonukleotid aus Desoxythymidinmonophosphat
PAA1	<i>Peltigera aphthosa</i> agglutinin 1
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat
PB	Photobiont
PCR	polymerase chain reaction
pH	potentia Hydrogenii, pH = -log ₁₀ (a _H)
PPFD	photosynthetic photon flux density
PPI	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase

6 Abkürzungsverzeichnis

QQ-Plot	Quantil-Quantil-Plot, statistische Darstellung
RBS	Universal- und Dekontaminationsreiniger
rDNA	ribosomal DNA, kodiert ribosomale RNA
REM	Rasterelektronenmikroskopie
R _r -Wert	Retentionsfaktor in der TLC
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease, RNA-abbauendes Enzym
RP-HPLC	reversed phase HPLC
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
Rsa I	Restriktionsenzym aus <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
RT	Raumtemperatur (meist 21-25°C)
RT	retention time, Retentionszeit
s	1 Sekunde, SI-Einheit der Zeit
S	1 Svedberg = 10 ⁻¹³ s, Maßeinheit des Sedimentationskoeffizienten
SAG	Algensammlung der Universität Göttingen
SD	standard deviation, Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate, Detergens und Denaturierungsmittel
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SOC	super optimal broth plus carbon, Medium
sp.	species, Suffix für eine konkrete Art mit unbestimmtem Artepithet
ss-cDNA	single-stranded cDNA, einzelsträngige cDNA
SSH	suppressive subtractive hybridisation
sym-Plasmid	Plasmid als Träger der nod-Gene
TBE	Tris-Borat-EDTA-Lösung, Pufferlösung zur Gelelektrophorese
TE	Tris/EDTA-Puffer
TLC	thin layer chromatography, Dünnschichtchromatographie
TOM	<i>Trebouxia</i> Organic Medium
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Puffersubstanz
u	1 unit = 1 Dalton, SI-Einheit der atomaren Masse
u	1 unit = 1 µmol/min, Maß für die Enzymaktivität
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett, Wellenlängenspektrum von ≈ 100-380 nm
V	1 Volt, SI-Einheit der elektrischen Spannung
VIS	visible light, sichtbares Wellenlängenspektrum von ≈ 380-780 nm
W-Agar	Wasser-Agar, Medium
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
µg	1 Mikrogramm = 0,000.000.001 kg
µl	1 Mikroliter = 1mm ³ = 0,000.001 l
µm	1 Mikrometer = 0,000.001 Meter
µmol*m ⁻² *s ⁻¹	Maßeinheit der PPFD

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Postulierte Kaskade des Lichenisierungsprozesses	Seite 10
Abb. 2.1	Habitus von <i>Fulgensia bracteata</i> auf Moos	Seite 17
Abb. 2.2	Experimentelle Anordnung zur generativen MB-Isolation	Seite 19
Abb. 2.3	Experimentelle Anordnung zur vegetativen MB-Isolation	Seite 19
Abb. 2.4	Experimentelle Anordnung des Präkontakt-Interaktionsassays	Seite 23
Abb. 2.5	Probenaufbereitung für HPLC- und LCMS-Analyse	Seite 26
Abb. 2.6	Kulturdauer der Bionten von <i>F. bracteata</i> für die SSH	Seite 32
Abb. 2.7	Herstellung von <i>driver</i> - und <i>tester</i> -cDNA für die SSH	Seite 37
Abb. 2.8	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der SSH	Seite 39
Abb. 3.1a	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, Kontrolle, 10 d	Seite 57
Abb. 3.1b	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, Kontrolle, 20 d	Seite 57
Abb. 3.1c	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, Kontrolle, 30 d	Seite 57
Abb. 3.2a	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 10 d	Seite 58
Abb. 3.2b	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 20 d	Seite 58
Abb. 3.2c	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 30 d	Seite 58
Abb. 3.3a	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 10 d	Seite 59
Abb. 3.3b	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 20 d	Seite 59
Abb. 3.3c	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 30 d	Seite 59
Abb. 3.4a	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, <i>M.bi.-Alge</i> , 10 d	Seite 60
Abb. 3.4b	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, <i>M.bi.-Alge</i> , 20 d	Seite 60
Abb. 3.4c	Hyphenlängen-Verteilung, W-Agar, <i>M.bi.-Alge</i> , 30 d	Seite 60
Abb. 3.5a	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, Kontrolle, 10 d	Seite 61
Abb. 3.5b	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, Kontrolle, 20 d	Seite 61
Abb. 3.5c	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, Kontrolle, 30 d	Seite 61
Abb. 3.6a	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 10 d	Seite 62
Abb. 3.6b	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 20 d	Seite 62
Abb. 3.6c	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 30 d	Seite 62
Abb. 3.7a	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 10 d	Seite 63
Abb. 3.7b	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 20 d	Seite 63
Abb. 3.7c	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 30 d	Seite 63
Abb. 3.8a	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, <i>M.bi.-Alge</i> , 10 d	Seite 64
Abb. 3.8b	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, <i>M.bi.-Alge</i> , 20 d	Seite 64
Abb. 3.8c	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , W-Agar, <i>M.bi.-Alge</i> , 30 d	Seite 64
Abb. 3.9a	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, Kontrolle, 10 d	Seite 71
Abb. 3.9b	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, Kontrolle, 20 d	Seite 71
Abb. 3.9c	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, Kontrolle, 30 d	Seite 71
Abb. 3.10a	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 10 d	Seite 72
Abb. 3.10b	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 20 d	Seite 72
Abb. 3.10c	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 30 d	Seite 72
Abb. 3.11a	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 10 d	Seite 73
Abb. 3.11b	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 20 d	Seite 73
Abb. 3.11c	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 30 d	Seite 73
Abb. 3.12a	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, <i>M.bi.-Alge</i> , 10 d	Seite 74
Abb. 3.12b	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, <i>M.bi.-Alge</i> , 20 d	Seite 74
Abb. 3.12c	Hyphenlängen-Verteilung, MYS1-Agar, <i>M.bi.-Alge</i> , 30 d	Seite 74

Abb. 3.13a	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, Kontrolle, 10 d	Seite 75
Abb. 3.13b	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, Kontrolle, 20 d	Seite 75
Abb. 3.13c	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, Kontrolle, 30 d	Seite 75
Abb. 3.14a	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 10 d	Seite 76
Abb. 3.14b	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 20 d	Seite 76
Abb. 3.14c	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>L.lu.</i> -PB, 30 d	Seite 76
Abb. 3.15a	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 10 d	Seite 77
Abb. 3.15b	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 20 d	Seite 77
Abb. 3.15c	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 30 d	Seite 77
Abb. 3.16a	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>M.bi.</i> -Alge, 10 d	Seite 78
Abb. 3.16b	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>M.bi.</i> -Alge, 20 d	Seite 78
Abb. 3.16c	Wachstumsmuster, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>M.bi.</i> -Alge, 30 d	Seite 78
Abb. 3.17a	Gallertbildung, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 20 d	Seite 79
Abb. 3.17b	Parallele Hyphen, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>F.br.</i> -PB, 20 d	Seite 79
Abb. 3.17c	Gallertbildung, <i>F.br.</i> , MYS1-Agar, <i>M.bi.</i> -Alge, 30 d	Seite 79
Abb. 3.18a	Bildung von <i>hyphal tip swellings</i> bei <i>F. bracteata</i>	Seite 80
Abb. 3.18b	Bildung von Anastomosen bei <i>F. bracteata</i>	Seite 80
Abb. 3.18c	Maximalwachstum, <i>F.br.</i> , W-Agar, <i>M.bi.</i> -Alge, 30 d	Seite 80
Abb. 3.19a	Durchschnittl. Hyphenlänge in μm pro Spore, W-Agar	Seite 89
Abb. 3.19b	Durchschnittl. Anzahl Verzweigungen pro Spore, W-Agar	Seite 89
Abb. 3.19c	Durchschnittl. Keimungsrate in %, W-Agar	Seite 89
Abb. 3.20a	Durchschnittl. Hyphenlänge in μm pro Spore, MYS1-Agar	Seite 90
Abb. 3.20b	Durchschnittl. Anzahl Verzweigungen pro Spore, MYS1-Agar	Seite 90
Abb. 3.20c	Durchschnittl. Keimungsrate in %, MYS1-Agar	Seite 90
Abb. 3.21a	Boxplot durchschnittlicher Hyphenlängen, W-Agar	Seite 91
Abb. 3.21b	Boxplot durchschnittlicher Hyphenlängen, MYS1-Agar	Seite 91
Abb. 3.22	QQ-Plot, bimodale Verteilung der Hyphenlängen	Seite 92
Abb. 3.23	UV/VIS-Spektren, Indol-3-carbaldehyd	Seite 100
Abb. 3.24	ESI-MS, neg. Ionisierung, Indol-3-carbaldehyd	Seite 100
Abb. 3.25	TLC-Nachweis, Rhamnose	Seite 102
Abb. 3.26	UV/VIS-Spektren, Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl)	Seite 104
Abb. 3.27	ESI-MS, pos. Ionisierung, Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl)	Seite 104
Abb. 3.28	ESI-MS, neg. Ionisierung, Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl)	Seite 104
Abb. 3.29	UV/VIS-Spektren von Cyclo-(leucyl-tyrosyl)	Seite 106
Abb. 3.30	ESI-MS, neg. Ionisierung, Cyclo-(leucyl-tyrosyl)	Seite 106
Abb. 3.31	EIMS-Fragmentierungsmuster, Cyclo-(leucyl-tyrosyl)	Seite 107
Abb. 3.32	UV/VIS-Spektrum, 2'-Desoxyadenosin	Seite 110
Abb. 3.33	UV/VIS-Spektrum, 2'-Desoxythymidin	Seite 110
Abb. 3.34	Keimungsrate von <i>F. br.</i> unter Einfluss applizierter Substanzen	Seite 113
Abb. 3.35	Wachstum von <i>F. br.</i> unter Einfluss applizierter Substanzen	Seite 114
Abb. 3.36	Überprüfung der Qualität isolierter Gesamt-RNA	Seite 120
Abb. 3.37	Überprüfung einer mRNA-Isolation	Seite 121
Abb. 3.38	Rsa I-Verdau der cDNA vor der SSH, Flüssigkultur	Seite 122
Abb. 3.39	Kontrolle der Ligationseffizienz der Adaptoren	Seite 123
Abb. 3.40	PCR 1 und PCR 2 der SSH von Bionten in Flüssigkultur	Seite 124
Abb. 3.41	Gelläufe der <i>colony</i> -PCRs der Platten 1-1 und 1-3, Ansatz 1f	Seite 125
Abb. 3.42	Gelläufe der <i>colony</i> -PCRs der Platten 2-2 und 2-4, Ansatz 2r	Seite 126
Abb. 3.43	Makroarrays im Hybridisierungsexperiment	Seite 130

Abb. 4.1	Erweiterte Kaskade des Lichenisierungsprozesses	Seite 166
Abb. 4.2	Postulierte Präkontakt-Kommunikation	Seite 169
Abb. A1	Monospores Mycel, <i>F. br.</i> unter Einfluss von <i>M. bi.</i> , 10 d	Seite 236
Abb. A2	Monospores Mycel, <i>F. br.</i> unter Einfluss von <i>M. bi.</i> , 20 d	Seite 236
Abb. A3	Strukturformel, Indol-3-carbaldehyd	Seite 237
Abb. A4	Strukturformel, L(+)-Rhamnose	Seite 237
Abb. A5	Strukturformel, Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl)	Seite 237
Abb. A6	Strukturformel, Cyclo-(leucyl-tyrosyl)	Seite 237
Abb. A7	Strukturformel, Cyclo-(alanyl-tryptophanyl)	Seite 237
Abb. A8	Strukturformel, Cyclo-(prolyl-tyrosyl)	Seite 237
Abb. A9	Strukturformel, 2'-Desoxyadenosin	Seite 237
Abb. A10	Strukturformel, 2'-Desoxythymidin	Seite 237

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Angewendete Methoden und verwendete Organismen	Seite 15
Tab. 2.1	Thermocycler-Programme für die PCR-Reaktionen der SSH	Seite 38
Tab. 2.2	Master-Mix für die <i>colony</i> -PCR	Seite 41
Tab. 2.3	Thermocycler-Programm für die <i>colony</i> -PCR	Seite 42
Tab. 2.4	Ansatz für die Reverse Transkription	Seite 43
Tab. 2.5	Master-Mix für die Herstellung von Hybridisierungssonden	Seite 44
Tab. 2.6	Ansatz für die Herstellung von Hybridisierungssonden	Seite 44
Tab. 2.7	Verwendete Algorithmen der BLAST-Suche	Seite 47
Tab. 3.1	Wachstumscharakteristika, <i>F. br.</i> , W-Agar	Seite 56
Tab. 3.2	Wachstumscharakteristika, <i>F. br.</i> , MYS1-Agar	Seite 70
Tab. 3.3	Kennwerte, Hyphenlänge, Verzweigungszahl, Keimungsrate	Seite 93
Tab. 3.4	Signifikante Unterschiede, Hyphenlängen, t-Test nach Tagen	Seite 93
Tab. 3.5	Signifikante Unterschiede, Hyphenlängen, t-Test nach Ansätzen	Seite 94
Tab. 3.6	Signifikante Unterschiede, Hyphenlängen, t-Test nach Medien	Seite 94
Tab. 3.7	HPLC-Signale der Ethylacetat-Phasen	Seite 96
Tab. 3.8	HPLC-Signale der Wasser-Phasen	Seite 98
Tab. 3.9	Indol-3-carbaldehyd in der Ethylacetat-Phase	Seite 99
Tab. 3.10	Rhamnose im TLC-Wasser-Extrakt	Seite 101
Tab. 3.11	Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl) in der Wasser-Phase	Seite 103
Tab. 3.12	Cyclo-(leucyl-tyrosyl) in der Ethylacetat-Phase	Seite 105
Tab. 3.13	Cyclo-(alanyl-tryptophanyl) in der Ethylacetat-Phase	Seite 109
Tab. 3.14	Cyclo-(prolyl-tyrosyl) in der Ethylacetat-Phase	Seite 109
Tab. 3.15	2'-Desoxyadenosin in der Ethylacetat-Phase	Seite 109
Tab. 3.16	2'-Desoxythymidin in der Wasser-Phase	Seite 109
Tab. 3.17	HPLC-Signale der Ethylacetat-Phasen, Mycobiont, <i>F. br.</i>	Seite 115
Tab. 3.18	Kulturen und RNA-Ausbeuten für die SSH, Agar	Seite 118
Tab. 3.19	Kulturen und RNA-Ausbeuten für die SSH, Flüssigmedium	Seite 119
Tab. 3.20	Hochregulierte cDNAs im Hybridisierungsexperiment	Seite 128
Tab. 3.21	Herunterregulierte cDNAs im Hybridisierungsexperiment	Seite 129
Tab. 3.22	Längen der hochregulierten cDNA-Fragmente	Seite 131
Tab. 3.23	Längen der herunterregulierten cDNA-Fragmente	Seite 132
Tab. 3.24	Liste der identifizierten Gene	Seite 132
Tab. 3.25	Peptidyl-Prolyl-Isomerase, Treffer in blastn und blastx	Seite 134
Tab. 3.26	GTP-bindende EsdC, Treffer in tblastx und blastp	Seite 136
Tab. 3.27	60S ribosomales Protein L29, Treffer in blastp und blastn	Seite 138
Tab. 3.28	Aha1-Familie, Treffer in tblastx und blastp	Seite 140
Tab. 3.29	4,6-Glucose-Dehydratase, Treffer in blastp und tblastx	Seite 143
Tab. 3.30	ATP-Sulfurylase, Treffer in blastp	Seite 143
Tab. A.1	<i>Trebouxia</i> Organic Medium ohne Glucose	Seite 230
Tab. A.2	<i>Trebouxia</i> Organic Medium	Seite 230
Tab. A.3	<i>Trebouxia</i> Organic Medium-Agar	Seite 230
Tab. A.4	Wasser-Agar	Seite 230
Tab. A.5	Malt-Yeast-Extract-Agar mit 1% Sucrose	Seite 230

Tab. A.6	Malt-Yeast-Extract-Medium	Seite 230
Tab. A.7	Malt-Yeast-Extract-Medium mit 1% Sucrose	Seite 230
Tab. A.8	Luria-Broth-Medium mit Ampicillin	Seite 231
Tab. A.9	Luria-Broth-Agar mit Ampicillin	Seite 231
Tab. A.10	Luria-Broth-Agar mit Ampicillin, IPTG, X-Gal	Seite 231
Tab. A.11	SOC-Medium	Seite 231
Tab. A.12	dYT / HMNF-Medium	Seite 231
Tab. A.13	DEPC-ddH ₂ O	Seite 232
Tab. A.14	Ethanol-Lösung	Seite 232
Tab. A.15	EDTA-Lösung (100 mM)	Seite 232
Tab. A.16	Tris-HCl-Lösung (pH 7,6)	Seite 232
Tab. A.17	Magnesiumdichlorid-Lösung	Seite 232
Tab. A.18	Natriumacetat-Lösung	Seite 232
Tab. A.19	Wasserstoffperoxid-Lösung	Seite 232
Tab. A.20	EDTA-Lösung (500 mM)	Seite 232
Tab. A.21	Tris-HCl-Lösung (pH 8,3)	Seite 232
Tab. A.22	Kaliumchlorid-Lösung	Seite 233
Tab. A.23	Deionisiertes Formamid	Seite 233
Tab. A.24	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat-Lösung	Seite 233
Tab. A.25	Phenol/Chloroform-Lösung	Seite 233
Tab. A.26	Phenol/TE-Lösung	Seite 233
Tab. A.27	Natriumacetat-SDS-Puffer	Seite 234
Tab. A.28	TBE-Gelelektrophoresepuffer	Seite 234
Tab. A.29	Denaturierungspuffer	Seite 234
Tab. A.30	Waschpuffer 1	Seite 234
Tab. A.31	Tris/EDTA-Puffer	Seite 234
Tab. A.32	MOPS-Puffer	Seite 234
Tab. A.33	Neutralisierungspuffer	Seite 234
Tab. A.34	Waschpuffer 2	Seite 234
Tab. A.35	RNA-Gelladepuffer	Seite 235
Tab. A.36	SSC-Puffer	Seite 235
Tab. A.37	Hybridisierungspuffer	Seite 235
Tab. A.38	PCR-Puffer	Seite 235
Tab. A.39a	Hochregulierte Sequenzen (I)	Seite 238
Tab. A.39b	Hochregulierte Sequenzen (II)	Seite 239
Tab. A.39c	Hochregulierte Sequenzen (III)	Seite 240
Tab. A.39d	Herunterregulierte Sequenzen	Seite 241
Tab. A.40	Peptidyl-Prolyl-Isomerase, Treffer in blastp und Domäne	Seite 243
Tab. A.41	GTP-bindendes EsdC, Treffer in blastn	Seite 245
Tab. A.42	60S ribosomales Protein L29, Treffer in tblastx und blastp	Seite 247
Tab. A.43	4,6-Glucose-Dehydratase, Treffer in blastn und Domäne	Seite 250

9 Literaturverzeichnis

Ahmadjian V, 1967: A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologica* 6: 127-160

Ahmadjian V, 1987: Co-evolution in lichens. *Annals of the New York Academy of Science* 503: 307-315

Ahmadjian V, 1992: Basic mechanisms of signal exchange, recognition, and regulation in lichens. In: *Algae & Symbiosis*. Reisser W (Ed.), Biopress Limited, Bristol: 675-697

Ahmadjian V, 1993: *The Lichen Symbiosis*. John Wiley & Sons, New York

Ahmadjian V, 2002: *Trebouxia*: Reflections on a perplexing and controversial lichen photobiont. In: *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*. Seckbach J (Ed.), Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, Boston: 373-384

Ahmadjian V, Brink JJ, Shebata AI, 1990: Molecular biology of lichens search for plasmid DNA and the question of gene movement between bionts. *Proceedings of International Symposium on lichenology*. Kyoto University, Nippon Paint Co: 2-21

Ahmadjian V, Chadeganipour M, Koriem AM, Paracer S, 1987: DNA and protoplast isolations from lichens and lichen symbionts. *Lichen Physiology and Biochemistry* 2: 1-11

Ahmadjian V, Jacobs JB, 1981: Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck. *Nature* 289 (5794): 169-172

Ahmadjian V, Jacobs JB, 1983: Algal-fungal relationships in lichens: recognition, synthesis and development. In: *Algal Symbiosis*. Goff LJ (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge: 147-172

Ahmadjian V, Jacobs JB, Russell LA, 1978: Scanning electron microscopy study of early lichen synthesis. *Science*: 1062-1064

Ahmadjian V, Russell LA, Hilldreth KC, 1980: Artificial re-establishment of lichens. I. Morphological interactions between the phycobionts of different lichens and the mycobionts of *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*. *Mycologia* 72: 73-89

Andrews GA, Chavey PS, Smith JE, 1992: Reactivity of lichen lectins with blood typed canine erythrocytes. *Research in Veterinary Science* 53: 315-319

Arakawa-Kobiyashi S, Kanaseki T, 2004: A study of lipid secretion from the lichen symbionts, ascomycetous fungus *Myelochroa leucotyliza* and green alga *Trebouxia* sp. *Journal of Structural Biology* 146: 401-415

Arevalo-Rodriguez M, Pan X, Boeke JD, Heitmann J, 2004: FKBP12 controls aspartate pathway flux in *Saccharomyces cerevisiae* to prevent toxic intermediate accumulation. *Eukaryotic Cell* 3 (5): 1287-1296

Arlorio M, Ludwig A, Boller T, Bonfante P, 1992: Inhibition of fungal growth by plant chitinases and β -1,3-glucanases – a morphological study. *Protoplasma* 171: 34-43

Armaleo D, May S, 2009: Sizing the fungal and algal genomes of the lichen *Cladonia grayi* through quantitative PCR. *Symbiosis* 49: 43-51

Armaleo D, Miao V, 1999: Symbiosis and DNA methylation in the *Cladonia* lichen fungus. *Symbiosis* 26: 143-163

- Arnold AE, Miadlikowska J, Higgins KL, Sarvate SD, Gugger P, Way A, Hofstetter V, Kauff F, Lutzoni F, 2009:** A phylogenetic estimation of trophic transition networks for ascomycetous fungi: are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification? *Systematic Biology* 58 (3): 283-297
- Bailey RH, 1976:** Ecological aspects of dispersal and establishment in lichens. In: *Lichenology: Progress and Problems*. Brown DH, Hawksworth DL, Bailey RH (Eds.), Academic Press, London, New York: 215-247
- Bailey RH, Garrett RM, 1968:** Studies on the discharge of ascospores from lichen apothecia. *Lichenologist* 4: 57-65
- Bandurski RS, Cohen JD, Slovin JP, Reinecke DM, 1995:** Auxin biosynthesis and metabolism. In: *Plant hormones - physiology, biochemistry & molecular biology*. 2nd edition, Davies P (Ed), Kluwer Academic Publishers: 44
- Bartel B, 1997:** Auxin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 51-66
- Bartnicki-Garcia S, 1968:** Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Reviews in Microbiology* 22: 87-108
- Bauten C, 2010:** Qualitative Analyse initialer Lichenisierungsprozesse von *Xanthoria elegans* unter artifiziellen Bedingungen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Bécard G, Fortin JA, 1988:** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108: 211-218
- Beck A, 1999:** Photobiont inventory of a lichen community growing on heavy-metal rich rock. *Lichenologist* 31: 501-510
- Beck A, Friedl T, Rambold G, 1998:** Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytologist* 139: 709-720
- Beck A, Kasalicky G, Rambold G, 2002:** Myco-photobiontal selection in a mediterranean cryptogram community with *Fulgensia fulgens*. *New Phytologist* 153: 317-326
- Belandria G, Asta J, Nurit F, 1989:** Effects of sulphur dioxide and fluoride on ascospore germination of several lichens. *Lichenologist* 21: 79-86
- Bellenger N, Nissen P, Wodd TC, Segel IH, 1968:** Specificity and control of choline-O-sulfate transport in filamentous fungi. *Journal of Bacteriology* 96 (5): 1574-1585
- Berheimer AM, Farkas ME, 1953:** Hemagglutinins among higher fungi. *Journal of Immunology* 70: 197-198
- Beynon JD, MacRae IJ, Huston SL, Nelson DC, Segel IH, Fisher AJ, 2001:** Crystal structure of ATP sulfurylase from the bacterial symbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Biochemistry* 40: 14509-14517
- Bistis GN, 1983:** Evidence for diffusible, mating-type specific trichogyne attractants in *Neurospora crassa*. *Experimental Mycology* 7: 292-295
- Blanchard JL, Lynch M, 2000:** Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics* 16 (7): 315-320

- Bohman-Lindgren G, Ragnarsson U, 1972:** Chemical studies on lichens – XXXIV. The synthesis of cyclo-(R- β -phenyl- β -alanyl-prolyl)₂, a peptide isolated from *Roccella canariensis*. Tetrahedron 28: 4631-4634
- Bredenbruch F, 2006:** Einfluss des *Pseudomonas* Quinolon Signals auf die interbakterielle Kommunikation von *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation. Technische Universität Carolo-Wilhelma, Braunschweig: 14
- Brinkmann M, 2002:** Genetische Diversität von Bionten in der Flechtensymbiose. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Brodo IM, Sharnoff SD, Sharnoff S, 2001:** Lichens of North America. Yale University Press, New Haven, London: 45
- Bubrick P & Galun M, 1980:** Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Correlation between binding patterns and cell-wall cytochemistry. Protoplasma 104: 167-173
- Bubrick P, Galun M, Frensdorff A, 1980:** Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Localization in the intact lichen and cultured mycobiont. Protoplasma 105: 207-211
- Bubrick P, Galun M, Frensdorff A, 1985:** Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Isolation and partial purification of an algal-binding protein. Symbiosis 1: 85-92
- Calvo AM, 2008:** The veA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. Fungal Genetics and Biology 45: 1053-1061
- Carlile MJ, 1995:** The success of the hypha and mycelium. In: The Growing Fungus. Gow NAR, Gadd GM (Eds.), Chapman and Hall, London: 1-20
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW, 2001:** The Fungi. Academic Press, London
- Carr GR, Hinkley MA, Le Tacon F, Hepper CM, Jones MGK, Thomas E, 1985:** Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension-cultured plant cells. New Phytologist 101: 417-426
- Champe SP, Kurtz MB, Yager Butnick NJ, Axelrod DE, 1981:** Spore formation in *Aspergillus nidulans*: competence and other developmental processes. In: The Fungal Spores: Morphogenic controls. Hohl HR, Turian G (Eds.), Academic Press, New York: 255-276
- Chang PK, Wilkinson JR, Horn BW, Yu J, Bhatnagar D, Cleveland TE, 2007:** Genes differentially expressed by *Aspergillus flavus* strains after loss of aflatoxin production in serial transfer. Applied Microbiological Biotechnology 77: 917-925
- Clayden SR, 1998:** Thallus initiation and development in the lichen *Rhizocarpon lecanorinum*. New Phytologist 139: 685-695
- Cooke TJ, Poli DB, Szein AE, Cohen JD, 2002:** Evolutionary patterns in auxin action. Plant Molecular Biology 49: 319-338
- Cooper JA, 1987:** Effects of cytochalasins and phalloidin on actin. Journal of Cell biology 105: 1473-1478

- Cordeiro LMC, Sasaki GL, Iacomini M, 2007:** First report on polysaccharides of *Asterochloris* and their potential role in the lichen symbiosis. *International Journal of Biological Macromolecules* 41: 193-197
- Daniels BA, Trappe JM, 1980:** Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeus*. *Mycologia* 72: 457-471
- Darvill AG, McNeil M, Albersheim P, 1978:** Structure of plant cell walls. VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiology* 62: 418-422
- Davies CC, Wurdrack KJ, 2004:** Host-to-parasite gene transfer in flowering plants: phylogenetic evidence from Malpighiales. *Science* 305 (5684): 676-678
- De Bary HA, 1879:** Die Erscheinung der Symbiose. Verlag von Karl J. Trübner, Straßburg
- De Labre ML, Kessl J, Karamanou S, Trumppower BL, 2002:** *Rpl29* codes for a non-essential protein of the 60S ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae* and exhibits synthetic lethality with mutations in genes required for subunit coupling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1574: 255-261
- De Priest PR, Piercey-Normore M, Sikaroodi M, Kärkäinen K, Oksanen I, Yahr R, Ahti T, 2000:** Phylogenetic relationships among sections of *Cladonia* and *Cladina*. In: Book of Abstracts, 14. The Fourth IAL Symposium, Progress and Problems in Lichenology at the Turn of the Millenium, Barcelona
- De Vera JP, 2000:** Interaktionen und Besiedlungsprozesse von Flechten der "Bunten Erdflechtengesellschaft" auf Gotland. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- De Vera JP, Horneck G, Rettberg P, Ott S, 2003:** The potential of lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space. – I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *International Journal of Astrobiology* 1 (4): 285-293
- Deacon JW, 1997:** *Modern Mycology* (3rd edition). Blackwell Science Ltd., Oxford
- Diatchenko L, Yun-Fai CL, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanow S, Lukyanow K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD, 1996:** Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93: 6025-6030
- Dictionary of Natural Products, 2007:** Dictionary of Natural Products on CD-ROM, Version 15.1, Chapman & Hall, CRC Press
- Dörfelt H, 1989:** Lexikon der Mykologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Drew EA, Smith DC, 1967a:** Studies in the physiology of lichens. VII. The physiology of the *Nostoc* symbiont of *Peltigera polydactyla* compared with cultured free-living forms. *New Phytologist* 66: 379-388
- Drew EA, Smith DC, 1967b:** Studies in the physiology of lichens. VIII. Movement of glucose from alga to fungus during photosynthesis in the thallus of *Peltigera polydactyla*. *New Phytologist* 66: 389-400
- Duplessis S, Tagu D, Martin F, 2002:** Living together underground – a molecular glimpse of the ectomycorrhizal symbiosis. In: *Molecular Biology of Fungal Development*. Osiewasz HD (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, Basel: 302-303
- Dyer BD, 1989:** Symbiosis and organismal boundaries. *American Zoologist* 29: 1085-1093

- Engelen A, Buschbom J, Convey P, Ott S, 2011:** Specificity and selectivity of algal partners in lichen symbioses at coastal and inland sites in Antarctica. *New Phytologist* (subm.)
- Eppenstein S, 2008:** Wachstumsverhalten und Reaktionsmuster des isolierten Mycobionten von *Fulgensia bracteata* (Hoffm.) Räsänen var. *bracteata* unter artifiziellen Bedingungen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Epstein E, Sagee O, Cohen JD, Garty J, 1986:** Endogenous auxin and ethylene in the lichen *Ramalina duriaei*. *Plant Physiology* 82: 1122-1125
- Eriksson OE, 2005:** Ascomyceternas ursprung och evolution Protolichenes-hypotesen. *Svensk Mykologisk Tidskrift* 26: 22–29
- Ertz D, Miadlikowska J, Lutzoni F, Dessein S, Raspé O, Vigneron N, Hofstetter V, Diederich P, 2009:** Towards a new classification of the Arthoniales (Ascomycota) based on a three-gene phylogeny focussing on the genus *Opegrapha*. *Mycological Research* 113: 141-152
- Etges S, 2001:** Reaktionsmuster und morphogenetisches Potenzial isolierter Mycobionten (Flechtenpilze) und die Bedeutung für den Symbioseorganismus Flechte. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Ettl H, Gärtner G, 1995:** Syllabus der Boden- Luft- und Flechtenalgen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York: 375
- Fahselt D, Maycock PF, Wong PY, 1989:** Reproductive modes of lichens in stressful environments in Central Ellesmere Island, Canadian high Arctic. *Lichenologist* 21: 343-353
- Feige GB, 1978:** Probleme der Flechtenphysiologie. *Nova Hedwigia* 30: 725-774
- Feige GB, Jenssen M, 1992:** Basic carbon and nitrogen metabolism of lichens. In: *Algae & Symbiosis*. Reisser W (Ed.), Biopress Limited, Bristol: 277-299
- Friedl T, Bhattacharya D, 2002:** Origin and evolution of green lichen algae. In: *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*. Seckbach J (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 341-357
- Friedl T, 1989:** Systematik und Biologie von *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta) als Phycobiont der Parmeliaceae (lichenisierte Ascomyceten). Inaugural-Dissertation der Biologischen Fakultät, Universität Bayreuth
- Friedl T, 1995:** Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.). *Journal of Phycology* 31: 632–639
- Friedmann EI, Lipkin Y, Ocampo-Paus R, 1967:** Desert Algae of the Negev (Israel). *Phycologica* 6: 185-196
- Fries TM, 1886:** Beiträge zur Kenntnis der sogenannten Cephalodien bei den Flechten. *Flora* 2: 2-25
- Galun M, Bubrick P, 1984:** Physiological interactions between the partners of the lichen symbiosis. In: *Encyclopedia of Plant Physiology* 17. Cellular interactions. Liskens HF & Heslop-Harrison J (Eds.), Springer-Verlag, Berlin: 362-401
- Galun M, 1988:** Lichenization. In: *Handbook of Lichenology*. Volume II, Galun M (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida: 153-169

- Galun M, Bubrick P, Frensdorff A, 1984:** Initial stages in fungus-alga interactions. *Lichenologist* 16: 103-110
- Gärtner G, 1985:** Die Gattung *Trebouxia* Pulmaly (Chlorellales, Chlorophyceae). *Archiv für Hydrobiologie Suppl.* 71: 495-548
- Gaßmann A, Ott S, 2000:** Growth strategy and the gradual symbiotic interactions of the lichen *Ochrolechia frigida*. *Plant Biology* 2 (3): 368-378
- Gaya E, Navarro-Rosines P, Llimona X, Hladun N, Lutzoni F, 2008:** Phylogenetic reassessment of the Teloschistaceae (lichen-forming Ascomycota, Lecanoromycetes). *Mycological Research* 112: 528-546
- Gazarin IG, Lagrimini LM, Mellon FA, Naldrett MJ, Ashby GA, Thorneley RN, 1998:** Identification of skatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase-catalysed oxidation of indol-3-yl acetic acid. *Biochemical Journal* 333 (1): 223-232
- Gehrig H, Schüssler A, Kluge M, 1996:** *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales; evidence by SSU rRNA analysis. *Journal of Molecular Evolution* 43 (1): 71-81
- Giovanetti M, 2002:** Survival strategies in arbuscular mycorrhizal symbionts. In: *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*. Seckbach J (Ed.), Kluwer Academic Press, Dordrecht: 293-321
- Giovanetti M, Sbrana C, Avio L, Citernesi AS, Logi C, 1993:** Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist* 125: 587-593
- Giovanetti M, Sbrana C, Citernesi AS, Avio L, 1996:** Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 133: 65-71
- Giovanetti M, Sbrana C, Logi C, 1994:** Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 127: 703-709
- Glawischnig E, Tomas A, Eisenreich W, Spiteller P, Bacher A, Gierl A, 2000:** Auxin biosynthesis in maize kernels. *Plant Physiology* 123: 1109-1119
- Göthel SF, Marahiel MA, 1999:** Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 423-436
- Gray PI, Gooday GW, Prosser JI, 1990:** Apical hyphal extensions in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology* 136: 1077-1084
- Griffin DH, 1994:** *Fungal Physiology, Chemistry of the fungal cell* (2nd chapter, 2nd edition). Wiley-Liss, New York, Chichester: 54
- Gross JW, Hegemann AD, Gerratana B, Frey PA, 2001:** Dehydration is catalyzed by glutamate-136 and aspartic acid-135 active side residues in *Escherichia coli* dTDP-glucose 4,6-dehydratase. *Biochemistry* 40 (42): 12497-12504
- Gueidan C, Ruibal Villasenor C, de Hoog GS, Gorbushina AA, Untereiner WA, Lutzoni F, 2008:** A rock-inhabiting ancestor for mutualistic and pathogen-rich fungal lineages. *Studies in Mycology* 61: 111-119
- Guthke R, Kniemeyer O, Albrecht A, Brakhage AA, Möller U, 2007:** Discovery of gene regulatory networks in *Aspergillus fumigatus*. KDEC B 2006, LNBI 4366, Tulys K et al. (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 22-41

- Hall C, Brachat S, Dietrich FS, 2005:** Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 4 (6): 1102-1115
- Han KH, Kim JH, Moon H, Kim S, Lee SS, Han DM, Jahng KW, Chae KS, 2008:** The *Aspergillus nidulans* *esdC* (early sexual development) gene is necessary for sexual development and is controlled by *veA* and a heteromeric G protein. *Fungal Genetics and Biology* 45: 310-318
- Hansen SA, 1975:** Thin-layer chromatographic method for the identification of mono-, di-, and trisaccharides. *Journal of Chromatography* 107: 224-226
- Hawksworth DL, 1988:** The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society* 96: 3-20
- Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB, 2001:** Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293: 1129–1133
- Hegemann AD, Gross JW, Frey PA, 2002:** Concerted and stepwise dehydration mechanisms observed in wildtype and mutated *Escherichia coli* dTDP-glucose 4,6-dehydratase. *Biochemistry* 41 (8): 2797-2804
- Helms G, Friedl T, Rambold G, Mayrhofer H, 2001:** Identification of photobionts from lichen family Physciaceae using algal-specific IST rDNA sequencing. *Lichenologist* 33 (1): 73-86
- Henssen A, Jahns HM, 1974:** Lichenes. Eine Einführung in die Flechtenkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Hepper CM, Smith GA, 1976:** Observations on the germination of *Endogone* spores. *Transactions of the British Mycological Society* 66: 189-94
- Hill DJ, 1985:** Changes in photobiont dimensions and numbers during co-development of lichen symbionts. In: *Lichen Physiology and Cell Biology*, Brown DH (Ed.), Plenum Press, New York, London: 303-317
- Hill DJ, 1989:** The control of the cell cycle in microbial symbionts. *New Phytologist* 112: 175-184
- Hill DJ, 1992:** The co-ordination of development in symbionts mutualistic symbiosis with reference to the cell cycle of the photobiont in lichens. *Symbiosis* 14: 325-333
- Hill DJ, 2009:** Asymmetric co-evolution in the lichen symbiosis caused by a limited capacity for adaptation in the photobiont. *The Botanical Review* 75 (3): 326-338
- Holden MTG, Chhabra SR, de Nys R, Stead P, Bainton NJ, Hill PJ, Manefield M, Kumar N, Labatte M, England D, Rice S, Givskov M, Salmond GPC, Stewart GSAB, Bycroft BW, Kjelleberg S, Williams P, 1999:** Quorum sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* 33: 1254-1266
- Honegger R, 1984:** Cytological aspects of the mycobiont-photobiont relationship in lichens. *Lichenologist* 16: 111-127
- Honegger R, 1985:** Fine structure of different types of symbiotic relationships in lichens. In: *Lichen Physiology and Cell Biology*. Brown DH (Ed.), Plenum Press, New York: 287-302
- Honegger R, 1986a:** Ultrastructural studies in lichens. I. Haustorial types and their frequencies in a range of lichens with trebouxoid photobionts. *New Phytologist* 103: 785-795

- Honegger R, 1986b:** Ultrastructural studies in lichens. II. Mycobiont and photobiont cell wall surface layers and adhering crystalline lichen products in four Parmeliaceae. *New Phytologist* 103: 797-808
- Honegger R, 1987:** Questions about pattern formation in the algal layer of lichens with stratified (heteromerous) thalli. In: *Progress and Problems in Lichenology in the Eighties*. Peveling E (Ed.), *Bibliotheca Lichenologica* 25, Verlag J. Cramer: 59-71
- Honegger R, 1991:** Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 553-578
- Honegger R, 1992:** Lichens: mycobiont-photobiont relationships. In: *Algae and Symbioses*. Reisser W (Ed.), Biopress Limited, Bristol: 255-276
- Honegger R, 1996:** Morphogenesis. In: *Lichen biology*. Nash TH III (ed.), Cambridge University Press, Cambridge: 65-87
- Honegger R, 1998:** The lichen symbiosis - What is so spectacular about it? *Lichenologist* 30 (3): 193-212
- Howe MC, Barrett JT, 1970:** Studies on hemagglutinin from the lichen *Xanthoria michauxiana*. *Biochem. Biophys. Acta* 215: 97-104
- Huber TA, Agarwal AK, Keister DL, 1984:** Extracellular polysaccharide composition, ex planta nitrogenase activity, and DNA Homology in *Rhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 158 (3): 1168-1171
- Huneck S, Yoshimura I, 1996:** Identification of Lichen Substances. 3.2 N-Containing Substances. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 129
- Ishida K, Green BR, Cavalier-Smith T, 1999:** Diversification of a Chimaeric Algal Group, the Chlorarachniophytes: Phylogeny of Nuclear and Nucleomorph Small-Subunit rRNA Genes. *Molecular Biology and Evolution* 16 (3), 321-331
- Ishii T, Narutaki A, Sawada K, Aikawa J, Matsumoto I, Kadoya K, 1997:** Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Bahia grass (*Paspalum notatum* Flügg.) roots. *Plant and Soil* 106: 301-307
- Jacobs WP, Falkenstein K, Hamilton RH, 1985:** Nature and amount of auxin in algae. *Plant Physiology* 78: 844-848
- Jahns HM, Ott S, 1994:** Thallic mycelia and cytological characters in ascomycete systematics. In: *Ascomycete systematics: Problems and Perspectives in the Nineties*. Hawksworth DL (Ed.), Plenum Press, New York: 57-62
- Jahns HM, 1988:** The lichen thallus. In: *CRC Handbook of Lichenology, Volume 1*, Galun M (Ed.), CRC Press, Boca Ranton, Florida: 95-143
- Jain R, Rivera MC, Lake JA, 1999:** Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 3801-3806
- James PW, Henssen A, 1976:** The morphological and taxonomic significance of cephalodia. In: *Lichenology: Progress and Problems*. Brown DH, Hawksworth DL, Bailey RH (Eds.), Academic Press, London: 27-77
- Janning W, Knust E, 2008:** *Genetik*, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York: 161

- Jeong HY, Han DM, Jahng KY, Chae KS, 2000:** The *rpl16a* gene for ribosomal protein L16A identified from expressed sequence tags is differentially expressed during sexual development of *Aspergillus nidulans*. Fungal Genetics and Biology 31: 69-78
- Jimbo M, Usui R, Sakai R, Muramoto K, Kamiya H, 2007:** Purification, cloning and characterization of egg lectins from the teleost *Tribolodon brandti*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 147 (2): 164-177
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC, 2007:** How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium/Medicago* model. Nature Reviews Microbiology 5: 619-633
- Joneson S, Lutzoni F, 2009:** Compatibility and thigmotropism in the lichen symbiosis: a reappraisal. Symbiosis 47: 109-115
- Jordan WP, 1970:** The internal cephalodia of the genus *Lobaria*. Bryologist 73: 669-681
- Juhas M, Eberl L, Tümmler B, 2005:** Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environmental Microbiology 7 (4): 459-471
- Kardish N, Silberstein L, Fleminger G, Galun M, 1991:** Lectin from the lichen *Nephroma laevigatum* Ach. Localisation and function. Symbiosis 11: 47-62
- Keszthelvi A, Jenev A, Kerényi Z, Mendes O, Waalwijk C, Hornok L, 2007:** Tagging target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikoro* MP-A). Antonie van Leeuwenhoek 91: 373-391
- Khakhina LN, 1992:** Evolutionary significance of symbiosis: development of the symbiogenesis concept. Symbiosis 14: 217-228
- Kim HS, Han KY, Kim KJ, Han DM, Jahng KY, Chae KS, 2002:** The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genetics and Biology 37: 72-80
- Klose KE, 2006:** Increased chatter: cyclic dipeptides as molecules of chemical communication in *Vibrio ssp.* Journal of Bacteriology. 188 (6): 2025-2026
- Koivistoinen O, 2008:** L-rhamnose-1-dehydrogenase gene and L-rhamnose catabolism in the yeast *Pichia stipitis*. Master Thesis, Department of Microbiology, University of Helsinki
- Kopple KD, Ghazarian HG, 1968:** A Convenient Synthesis of 2,5-Piperazinediones. Journal of Organic Chemistry 33: 862-864
- Kruiswijk T, Planta RJ, Krop JM, 1978:** The course of the assembly of ribosomal subunits in yeast. Biochimica et Biophysica Acta 517: 378-389
- Kuschak J, 2006:** Standardabweichung und Standardfehler: der kleine, aber feine Unterschied. Zeitschrift für Allgemeine Medizin 84: 258-260
- Kutschera U, 2006:** Constantin S. Merezhkowsky (1855-1921) und die Endosymbiontentheorie der Zellevolution. Biologie heute 1: 12-15
- Kuzuhara T, Horikoshi M, 2004:** A nuclear FK506-binding protein is a histone chaperone regulating rDNA silencing. Nature Structural and Molecular Biology 11 (3): 275-283
- Lallemant R, Bernard T, 1977:** Obtention de cultures pure des mycosymbiotes du *Lobaria laetevirens* (Light.) Zahlbr. et du *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.: le role des gonides. Revue Bryologique et Lichéniologique 43: 303-308

- Larson DW, 1987:** The absorption and release of water by lichens. *Bibliotheca Lichenologica* 25: 351-360
- Lawrey JD, 1984a:** Biotic interactions in lichen community development: A review. *Lichenologist* 23 (3): 205-214
- Lawrey JD, 1984b:** *Biology of Lichenized Fungi*. Praeger Scientific, New York: 193
- Legaz ME, Fontaniella B, Millanes AM, Vicente C, 2004:** Secreted arginases from phylogenetically farrelated lichen species act as cross-recognition factors for two different algal cells. *European Journal of Cell Biology* 83: 1-12
- Lehr H, Fleminger G, Galun M, 1995:** Lectin from the lichen *Peltigera membranacea* (Ach.) Nyl.: characterization and function. *Symbiosis* 18: 1-13
- Lehr H, Galun M, Ott S, Jahns HM, Fleminger G, 2000:** Cephalodia of the lichen *Peltigera aphthosa* (L.) Wild. Specific recognition of the compatible photobiont. *Symbiosis* 29: 357-365
- Li YX, Chen L, Juan L, Li YF, Chen F, 2002:** Suppression subtractive hybridization cloning of cDNAs of differentially expressed genes in dovetree (*Davidia involucrata*) bracts. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 231-238
- Lima OC, Figueiredo CC, Previato JO, Mendonca-Previato L, Morandi V, Lopes Bezerra LM, 2001:** Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infection and Immunity* 69 (11): 6874-6880
- Lindberg B, 1955:** Studies on the chemistry of lichens. VIII. Investigation of a *Dermatocarpon* and some *Roccella* species. *Acta Chemica Scandinavia* 9: 917-919
- Liu YJ, Hall BD, 2004:** Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proceedings of the Natural Academy of Science, USA* 101: 4507-4512
- Lloyd KO, Bitoon MA, 1971:** Isolation and purification of a peptidorhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*: structural and immunochemical studies. *Journal of Immunology* 107: 663-671
- Lockhart CM, Rowell P, Stewart WDP, 1978:** Phytohemagglutinins from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. *FEMS Microbiological Letters* 3: 127-130
- Long SR, 1996:** *Rhizobium* Symbiosis: Nod Factors in Perspective. *The Plant Cell* 8: 1885-1898
- Long SR, 2001:** Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiology* 125 (1): 69-72
- Lurie S, Garty J, 1991:** Ethylene production in the lichen *Ramalina duriaei*. *Annales of Botany* 68: 317-319
- Lyon GJ, Novick RP, 2004:** Peptide signalling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* 25 (9): 1389-1403
- Magherini F, Gamberi T, Paoli P, Marchetta M, Biagini M, Raugei G, Camici G, Ramponi G, Modesti A, 2004:** The in vivo tyrosine phosphorylation level of yeast immunophilin Fpr3 is influenced by the LMW-PTP Ltp1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321 (2): 424-431
- Marcuccio SM, Elix JA, 1983:** A structural revision of picroroccellin. *Tetrahedron Letters* 24: 1445-1448

- Margulis L, Bermudes D, 1985:** Symbiosis as a mechanism of evolution: Status of cell symbiosis theory. *Symbiosis* 1: 101-124
- Martin W, Müller M, 1998:** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 393: 37-41
- Martins MB, Carvalho I, 2007:** Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron* 63: 9923-9932
- Marzluf GA, 1997:** Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annual Reviews in Microbiology* 51: 73-96
- Mc Kay MJ, Carroll AR, Quinn RJ, Hooper JN, 2002:** 1,2-bis(1H-indol-3-yl)ethane-1,2-dione, an indole alkaloid from the marine sponge *Smenospongia* sp. *Journal of natural Products* 65 (4): 595-597
- Meeßen J, 2005:** Erkennungsmechanismen der Bionten in der Flechtensymbiose. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Mereschkowsky KS, 1910:** Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenese, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biologische Zentralbibliothek* 30: 278-367
- Milne PJ, Hunt AL, Rostoll K, Van der Walt JJ, Graz CJ, 1998:** The biological activity of selected cyclic dipeptides. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50 (12): 1331-1337
- Molina MC, Muñoz E, Vicente C, 1993:** Enzymatic activities of algal-binding protein and its algal cell wall receptor in the lichen *Xanthoria parietina*. An approach to the parasitic basis of mutualism. *Plant Physiology and Biochemistry* 31: 131-142
- Molina MC, Stocker-Wörgötter E, Türk R, Bajon C, Vicente C, 1998:** Secreted glycolysated arginase from *Xanthoria parietina* thallus induces loss of cytoplasmic material from *Xanthoria* photobionts. *Cellular Adhesion and Communication* 6: 481-490
- Molina MC, Stocker-Wörgötter E, Türk R, Vicente C, 1997a:** Axenic culture of the mycobiont of *Xanthoria parietina* in different nutritive media, effect of carbon source in spore germination. *Endocytobiosis and Cell Research* 12: 103-109
- Molina MC, Vicente C, 1995:** Correlations between enzymatic activity of lectins, putrescine content and chloroplast damage in *Xanthoria parietina* phycobionts. *Cellular Adhesion and Communication* 3: 1-12
- Molina MC, Vicente C, 2000:** Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xanthoria parietina*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 33: 300-307
- Mosbach K, 1973:** Biosynthesis of lichen substances. In: *The Lichens*. Ahmadjian V, Hale ME (Eds.). Academic Press. New York & London: 540-568
- Mosse B, 1959:** The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Transactions of the British Mycological Society* 42: 273-286
- Mülhardt C, 2009:** *Molekularbiologie/Genomics*, 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 125
- Naismith JW, 2004:** Chemical insight from structural studies of enzymes. *Biochemical Society Transactions* 32: 647-654

- Nash TE III, 1996:** In: Lichen biology. Nash III TE (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge: 1-45
- Nelsen MP, Gargas A, 2006:** Actin type I introns offer potential for increasing phylogenetic resolution in *Asterochloris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Lichenologist* 38: 435-440
- Nicholson RL, Epstein L, 1991:** Adhesion of fungi to the plant surface: Prerequisite for pathogenesis. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Cole GT & Hoch HC (Eds.), Plenum Press, New York: 3-23
- Normanly J, Bartel B, 1999:** Redundancy as a way of life: IAA metabolism. *Current Opinions in Plant Biology* 2: 207-213
- Oestreich M, Romberg O, 2009:** Keine Panik vor Statistik! 2.Auflage. Vieweg + Teubner, GWV Fachverlag, Wiesbaden: 230-235
- Okamoto M, Tsutsui S, Tasumi S, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y, 2005:** Tandem repeat L-rhamnose-binding lectin from the skin mucus of ponyfish, *Leiognathus nuchalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 29, 333 (2): 463-469
- Olvera C, Goldberg JB, Sanchez R, Soberon-Chavez G, 1999:** The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiological Letters* 179 (1): 85-90
- Ortega MJ, Zubía E, Salvá J, 1993:** A new brominated indole-3-carbaldehyde from the marine bryozoan *Zoobotryon verticillatum*. *Journal of Natural Products* 56 (4): 633-636
- Osenberg E, 1993:** Die Besiedlung trockener Kalksteinplatten durch Flechten. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Ostrofsky A, Denison WC, 1980:** Ascospore discharge and germination in *Xanthoria polycarpa*. *Mycologia* 72: 1171-1179
- Ott S, 1987b:** Sexual reproduction and developmental adaptations in *Xanthoria parietina*. *Nordic Journal of Botany* 7: 219-228
- Ott S, 1988:** Photosymbiodemes and their development in *Peltigera venosa*. *Lichenologist* 20 (4): 361-368
- Ott S, Krieg T, Spanier U, Schieleit P, 2000:** Phytohormones in lichens with emphasis on ethylene biosynthesis and functional aspects on lichen symbiosis. *Phyton* 40: 83-94
- Ott S, Meier T, Jahns HM, 1995:** Development, regeneration, and parasitic interactions between the lichens *Fulgensia bracteata* and *Toninia caeruleonigricans*. *Canadian Journal of Botany* 73 (Suppl. 1): 595-602
- Ott S, Zwoch I, 1992:** Ethylene production by lichens. *Lichenologist* 24 (1): 73-80
- Papin JP, Udiman M, 1975:** Chromatographie sur couche mince des polyols. *Journal of Chromatography* 115: 267-272
- Paracer S, Ahamdjian V, 2000:** Fungal associations of fungi, algae, and plants. In: Symbiosis. An Introduction to Biological Associations. Paracer S & Ahamdjian V (Eds.), Oxford University Press, Oxford: 109-129
- Pearl LH, Prodromou C, 2006:** Structure and mechanism of the Hsp90 chaperone machinery. *Annual Reviews of Biochemistry* 75: 271-294

- Pemperton TJ, 2006:** Identification and comparative analysis of sixteen fungal peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase repertoires. *BMC Genomics* 7: 244-274
- Pérez-Urria E & Vicente C, 1989:** Production and secretion of urease by *Evernia prunastri* thallus and its symbionts. *Endocytological Cell Research* 6: 87-97
- Planta RJ, Mager WH, 1998:** The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 471-477
- Poelt J, 1969:** Bestimmungsschlüssel europäischer Flechten. Verlag von J. Cramer, Lehrte
- Pyatt FB, 1968:** An investigation on conditions influencing ascospore discharge and germination in lichens. *Revue Bryologique et Lichénologique* 36: 323-329
- Pyatt FB, 1973:** A note on the discharge of ascospores with accompanying algae cells in *Pertusaria pertusa*. *Revue Bryologique et Lichénologique* 39: 345-347
- Pyatt FB, 1974:** Lichen propagules. In: *The Lichens*. Ahmadjian V, Hale ME (Eds.), Academic Press, London, New York: 117-145
- Rai AN, Söderbäck E, Bergman B, 2000:** Tansley Review No. 116. Cyanobacterium-plant symbioses. *New Phytologist* 147: 449-481
- Ramagopal S, Ennis HL, 1984:** Conservation and variation of ribosomal proteins in several species of the slime molds *Dictyostelium* and *Polysphondylum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 805: 300-305
- Rambold G, Friedl T, Beck A, 1998:** Photobionts in lichens: possible indicators of phylogenetic relationships? *Bryologist* 101: 392-397
- Rasch M, Friese M, Hofmann W, Naumann E, 2006:** *Quantitative Methoden 1, Einführung in die Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler* (2. Auflage). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 44-52
- Reisser W, 1992:** Endosymbiotic associations of algae with freshwater protozoa and invertebrates. In: *Algae & Symbiosis*. Reisser W (Ed.), Biopress Limited, Bristol: 1-19
- Remmer SB, Ahmadjian V, Livdahl TP, 1986:** Effects of IAA (indol-3-acetic acid) and kinetin (6-furfuryl-amino-purine) on the synthetic lichen *Cladonia cristatella* and its isolated symbionts. *Lichen Physiology and Biochemistry* 1: 1-25
- Renner B, Galloway DJ, 1982:** Phycosymbiodemes in *Pseudocyphellaria* in New Zealand. *Mycotaxon* 16 (1): 197-231
- Renosto F, Martin RL, Wailes LM, Daley LA, Segel IH, 1990:** Regulation of inorganic sulfate activation in filamentous fungi. *Journal of Biological Chemistry* 265 (18): 10300-10308
- Richardson DHS, Hill DJ, Smith DC, 1968:** Lichen physiology. XI. The role of the alga determining the pattern of carbohydrate movement between the symbionts. *New Phytologist* 67: 469-486
- Richardson DHS, Smith DC, 1966:** The physiology of the symbiosis in *Xanthoria aureola* (Ach.) Erichs. *Lichenologist* 3: 202-208
- Richardson DHS, Smith DC, Lewis DH, 1967:** Carbohydrate movement between the symbionts of lichens. *Nature* 214: 879-882
- Richter G, 2002:** *Biochemie der Pflanzen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York: 22

- Romeike J, Friedl T, Helms G, Ott S, 2002:** Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (lichenized Ascomycetes) along a transect of the Antarctic Peninsula. *Molecular Biology of Evolution* 19 (8): 1209-1217
- Rumpho ME, Worful JM, Lee J, Kannan K, Tyler MS, Bhattacharya D, Moustafa A, Manhart JR, 2008:** Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene *psbO* to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 105: 17867-17871
- Saarschmidt S, Hause B, Strack D, 2009:** Einladung ans Buffet – Wege zur Mykorrhiza. *Biologie in Unserer Zeit* 2 (39): 102-113
- Saigí F, Climent N, Piqué N, Sanchez C, Merino S, Rubirés X, Aguilar A, Tomás JM, Regué M, 1999:** Genetic analysis of the *Serratia marcescens* N28b O4 antigen gene cluster. *Journal of Bacteriology* 181 (6): 1883-1891
- San-Blas S, 1982:** The cell wall of fungal human pathogens: Its possible role in host-parasite relationships, *A review*. *Mycopathologia* 79 (3): 159-184
- Sapp J, 1994a:** Symbiosis and disciplinary demarcations; the boundaries of the organism. *Symbiosis* 17: 91-115
- Sapp J, 1994b:** *Evolution by Associations: A history of symbiosis*, Oxford University Press, Oxford.
- Schaper GM, Ott S, 2003:** Photobiont selectivity and interspecific interactions in lichen communities. I Culture experiments with the mycobiont *Fulgensia bracteata*. *Plant Biology* 5: 441-450
- Schaper GM, 2003:** Komplexe Interaktionsmuster und die Dynamik von Entwicklungsprozessen in Flechtenökosystemen. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Scherrer S, de Vries OMH, Dudler S, Wessels JGH, Honegger R, 2000:** Interfacial selfassembly of fungal hydrophobins of the lichen-forming ascomycetes *Xanthoria parietina* and *X. ectaneoides*. *Fungal Genetics and Biology* 30: 81-93
- Scherrer S, Haisch A, Honegger R, 2002:** Characterization and expression of XPH1, the hydrophobin gene of the lichen-forming ascomycete *Xanthoria parietina*. *New Phytologist* 154: 175-184
- Scherrer S, Honegger R, 2003:** Inter- and intraspecific variation of homologous hydrophobin (H1) gene sequences among *Xanthoria* spp. (lichen-forming ascomycetes). *New Phytologist* 158: 375-389
- Schoch CL, Sung G-H, López-Giráldez F, Townsend JP, Miadlikowska J, Hofstetter V, Robbertse B, Matheny PB, Kauff F, Wang Z, Gueidan C, Andrie RM, Trippe K, Ciuffetti LM, Wynns A, Fraker E, Hodkinson BP, Bonito G, Yahr R, Groenewald JZ, Arzanlou M, de Hoog GS, Crous PW, Hewitt D, Pfister DH, Peterson K, Gryzenhout M, Wingfield MJ, Aptroot A, Suh S-O, Blackwell M, Hillis DM, Griffith GW, Castlebury LA, Rossman AY, Lumbsch HT, Lücking R, Büdel B, Rauhut A, Diederich P, Ertz D, Geiser DM, Hosaka K, Inderbitzin P, Kohlmeyer J, Volkman-Kohlmeyer B, Mostert L, O'Donnell K, Sipman H, Rogers JD, Shoemaker RA, Sugiyama J, Summerbell RC, Untereiner W, Johnston P, Stenroos S, Zuccaro A, Dyer P, Crittenden P, Cole MS, Hansen K, Trappe JM, Lutzoni F, Spatafora JW, 2009:** The ascomycota tree of life: a phylum wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology* 58: 224-239
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C, 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. 105: 1413-1421

- Schuster G, 1985:** Die Jugendentwicklung von Flechten. Bibliotheca Lichenologica, Band 20, Verlag von J. Cramer, Vaduz
- Schwarz RA, Hodes-Villamar L, Fitzpatrick K, Fain MG, Hughes AL, Cadavid LF, 2007:** A gene family of putative immune recognition molecules in the hydroid *Hydractinia*. Immunogenetics 59 (3): 233-246
- Scott GD, 1959:** Observations of spore discharge and germination in *Peltigera praetextata* (Flk.) Vain. Lichenologist 1: 109-111
- Scott GD, 1964:** Studies of the lichen symbiosis: 2. Ascospore germination in the genus *Peltigera*. Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie 4: 326-336
- Shimizu K, Keller NP, 2001:** Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. Genetics 157: 591-600
- Shimizu K, Geng X, Hashiguchi M, Suhara H, Fukunaga S, Yasutake S, Kondo R, Tsutsui M, Sato I, 2003:** Indole-3-carbaldehyde: a tyrosinase inhibitor from fungus YL185. Journal of Wood Science 49: 349-354
- Shirai T, Watanabe Y, Lee M, Ogawa T, Muramoto K, 2009:** Structure of rhamnose-binding lectin CSL3: unique pseudo-tetrameric architecture of a pattern recognition protein. Journal of Molecular Biology 391 (2): 390-403
- Sill F, 2009:** Reaktionen verschiedener Mycobionten auf nicht-lichenisierende Algen im Vergleich zu arteigenen Photobionten. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Siqueira JO, Safir GR, Nair MG, 1991:** Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. New Phytologist 118, 87-93
- Sitte P, 2001:** Symbiogenese in der Zell- und Lebensentwicklung. In: Evolutionsbiologie. Storch V, Welsch U, Wink M (Eds.), Springer Verlag, Berlin: 196-208
- Sitte P, Weiler EW, Kadereit JW, Bresinsky A, Korner C, 2002:** Strasburger, Lehrbuch der Botanik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg: 493-499
- Skorpil P, Broughton WJ, 2006:** Molecular interactions between *Rhizobium* and Legumes. In: Molecular Basis of Symbiosis. Overmann J (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 143-156
- Smith AL, 1921:** Lichens. Cambridge University Press, Cambridge
- Smith DC, 1980:** Mechanisms of nutrient movement between the lichen symbionts. In: Cellular Interactions in Symbiosis and Parasitism. Cook CB, Pappas PW, Rudolph ED (Eds.), Ohio State University Press: 197-222
- Smith DC, Douglas AE, 1987:** Fungi in symbiosis I. As hosts: Lichens. In: The Biology of Symbiosis. Smith DC & Douglas AE (Eds.), Edward Arnold Publishers Ltd, London: 113-145
- Srinivasam S, Vargas MM, Roberson RW, 1996:** Functional, organizational, and biochemical analysis of actin in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. Mycologica 88 (1): 57-70
- Stahl E, 1877:** Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Flechten. II. Über Hymenialgonidien. Band I, Felix, Leipzig
- Steel LF, Jacobson A, 1987:** Translational control of ribosomal protein synthesis during early *Dictyostelium discoideum* development. Molecular and Cellular Biology 7: 965-972

- Stricker D, 2008:** BrightStat.com: free statistics online. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 92: 135-143
- Swoboda RK, Broadbent ID, Bertram G, Budge S, Gooday GW, Gow NAR, Brown AJP, 1995:** Structure and regulation of *Candida albicans rp10* gene which encodes an immunogenic protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein 10. *Journal of Bacteriology* 177: 1239-1246
- Syvanen M, 1985:** Cross-species gene transfer; implications for a new theory of evolution. *Journal of theoretical Biology* 112: 333-343
- Tan J, Bednarek P, Liu J, Schneider B, Svatos A, Hahlbrock K, 2004:** Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry* 65 (6): 691-699
- Tapparo A, Satre M, Klein G, 1998:** Cloning, sequencing and the developmental expression of the genes encoding S4 and S10 ribosomal proteins in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Current Genetics* 34: 410-418
- Tateno H, Ogawa T, Muramoto K, Kamiya H, Saneyoshi M, 2002:** Distribution and molecular evolution of rhamnose-binding lectins in Salmonidae: isolation and characterization of two lectins from white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) eggs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66 (6): 1356-1365
- Trembley ML, Ringli C, Honegger R, 2002:** Morphological and molecular analysis of early stages in the resynthesis of the lichen *Baeomyces rufus*. *Mycological Research* 106: 768-776
- Vicente C, Legaz ME, 1988:** Lichen Enzymology. In: *Handbook of Lichenology*. Volume I, Galun M (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida: 239-284
- Vicente C, 1985:** Surface physiology of lichens: facts and concepts. In: *Surface Physiology of Lichens*. Vicente C, Brown DH, Legaz ME (Eds.), Universidad Complutense de Madrid, Madrid: 11-24
- Vorwerk S, Somerville S, Somerville C, 2004:** The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science* 9 (4): 203-209
- Wedin M, Baloch E, Grube M, 2002:** Parsimony analysis of mtSSU and nITS rDNA sequences reveal the natural relationship of the lichen families Physciaceae and Caliciaceae. *Taxon* 51: 655-660
- Weisman R, Finkelstein S, Choder M, 2001:** Rapamycin blocks sexual development in fission yeast through inhibition of the cellular function of an FKBP12 homolog. *Journal of Biological Chemistry* 276 (27): 24736-24742
- Wendland J, Philippsen P, 2001:** Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple rho-protein modules in the filamentous ascomycete *Achlya gossypii*. *Genetics* 157: 601-610
- Wombacher V, 2003:** Reaktionsmuster isolierter Mycobionten unter artifiziellen Bedingungen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Wu SJ, Fotso S, Li F, Qin S, Laatsch H, 2007:** Amorphe sesquiterpene von einer marinen *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products* 70 (2): 304-306
- Xu C & Huang B, 2008:** Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. *Journal of Experimental Botany* 59 (15): 4183-4194

- Xu Y, Gianfagna T, Huang B, 2010:** Proteomic changes associated with expression of a gene (*ipt*) controlling cytokinin synthesis for improving heat tolerance in a perennial grass species. Online-publication of Journal of Experimental Botany: DOI:10.1093/jxb/erq149
- Yager LN, 1992:** Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. In: Aspergillus: Biology and Industrial Applications. Bennett JW, Klich MA (Eds.), Butterworth-Heinemann, Boston 19-44
- Yahr R, Vilgalys R, De Priest PT, 2004:** Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. Molecular Ecology 13: 3367-3378
- Yoshida Y, Ganguly S, Bush CA, Cisar JO, 2006:** Molecular basis of l-rhamnose branch formation in streptococcal coaggregation polysaccharides. Journal of Bacteriology 188 (11): 4125-4130
- Yoshimura I, Yamamoto Y, Nakano T, Finnie J, 2002:** Isolation and culture of lichen photobionts and mycobionts. In: Protocols in Lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring. Krammer I, Beckett R, Varma A (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 3-33
- Yuan X, Xiao S, Taylor TN, 2005:** Lichen-like symbiosis 600 million years ago. Science. 308: 1017-1020
- Zook D, 1999:** Organisms living inside others. The symbiotic wonders. In: Seckbach J (Ed.), Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments, Vol. 1: 575-584
- Zook D, 2009:** Keynote speech at the 6th Congress of the International Symbiosis Society, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin
- Zuehlke A, Johnson JL, 2009:** Review: Hsp90 and co-chaperones twist the function of diverse client proteins. Biopolymers 93 (3): 211-217

10 Anhang

10.1 Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien

Trebouxia Organic Medium ohne Glucose	
NaCl	25,00 mg
CaCl ₂ x 2H ₂ O	25,00 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	75,00 mg
KNO ₃	500,00 mg
(NH ₄) ₂ HPO ₄	250,00 mg
H ₃ BO ₃	11,42 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,44 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,82 mg
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	0,84 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,57 mg
Co(NO ₃) ₂ x H ₂ O	0,49 mg
FeSO ₄ x H ₂ O	4,98 mg
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	6,66 mg
Thiamin	10,00 mg
Biotin	1,00 mg
Cobalamin	0,20 mg
Nikotinsäure	0,10 mg
HEPES	715,00 mg
Proteosepepton	10,00 g

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen
auf pH 5,5 einstellen
für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren

Tab. A.1: *Trebouxia* Organic Medium ohne Glucose

Trebouxia Organic Medium	
TOM ohne Glucose, wie in Tabelle A.1	
Glucose	10,00 g

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen
auf pH 5,5 einstellen
für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren

Tab. A.2: *Trebouxia* Organic Medium

Trebouxia Organic Medium-Agar	
TOM ohne Glucose, wie in Tabelle A.1	
Glucose	10,00 g
Agar	20,00 g

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen
auf pH 5,5 einstellen
für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren

Tab. A.3: *Trebouxia* Organic Medium-Agar

Wasser-Agar	
Agar	20,00 g

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen
für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren

Tab. A.4: Wasser-Agar

Malt-Yeast-Extract-Agar mit 1% Sucrose	
Malz-Extract	20,00 g
Hefe-Extract	2,00 g
Sucrose	10,00 g
Agar	20,00 g

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen
auf pH 5,6 einstellen
für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren

Tab. A.5: Malt-Yeast-Extract-Agar mit 1% Sucrose

Malt-Yeast-Extract-Medium	
Malz-Extract	20,00 g
Hefe-Extract	2,00 g

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen
auf pH 5,6 einstellen
für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren

Tab. A.6: Malt-Yeast-Extract-Medium

Malt-Yeast-Extract-Medium mit 1% Sucrose	
Malz-Extract	20,00 g
Hefe-Extract	2,00 g
Sucrose	10,00 g

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen
auf pH 5,6 einstellen
für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren

Tab. A.7: Malt-Yeast-Extract-Medium mit 1% Sucrose

Luria-Broth-Medium mit Ampicillin	
Soja-Trypton	10,00 g
Hefe-Extract	5,00 g
NaCl	5,00 g
mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen auf pH 7,0 mit NaOH einstellen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren auf ca. 60 °C abkühlen lassen 2 ml Ampicillin-Lsg (50 mg/ml, sterilfiltriert) zugeben	

Tab. A.8: Luria-Broth-Medium mit Ampicillin

Luria-Broth-Agar mit Ampicillin	
Soja-Trypton	10,00 g
Hefe-Extract	5,00 g
NaCl	5,00 g
Agar	15,00 g
mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen auf pH 7,0 mit NaOH einstellen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren auf ca. 60 °C abkühlen lassen 2 ml Ampicillin-Lsg (50 mg/ml, sterilfiltriert) zugeben	

Tab. A.9: Luria-Broth-Medium mit Ampicillin

Luria-Broth-Agar mit Amp, IPTG, X-Gal	
Soja-Trypton	10,00 g
Hefe-Extract	5,00 g
NaCl	5,00 g
Agar	15,00 g
mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen auf pH 7,0 mit NaOH einstellen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren auf ca. 60 °C abkühlen lassen 2 ml Ampicillin-Lsg (50 mg/ml, sterilfiltriert) zugeben 0,5 mM IPTG zugeben 80 µg/ml X-Gal zugeben	

Tab. A.10: Luria-Broth-Medium mit Ampicillin

SOC-Medium	
Soja-Trypton	2,00 g
Hefe-Extract	0,50 g
NaCl (1M)	1,00 ml
KCl (1M)	0,25 ml
mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren auf RT abkühlen lassen 1 ml Mg ²⁺ -Lösung* (2M, sterilfiltriert) zugeben 1 ml Glucose-Lösung (2M, sterilfiltriert) zugeben	
* Mg ²⁺ -Lösung:	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	20,33 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	24,65 g
mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen	

Tab. A.11: SOC-Medium

dYT / HMNF-Medium	
Soja-Trypton	16,00 g
Hefe-Extract	10,00 g
NaCl	5,00 g
mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen auf pH 7,5 einstellen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren auf RT abkühlen lassen 2 ml Ampicillin-Lsg (50 mg/ml, sterilfiltriert) zugeben HMNF-Einfrierpuffer* (Endkonz. 1x) zugeben	
* HMNF-Einfrierpuffer (10x):	
Teil 1:	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,76 g
tri-Natriumcitrat	4,50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	9,00 g
Glycerin	440,00 g
mit Aqua bidest. auf 800 ml auffüllen	
Teil 2:	
KH ₂ PO ₄	18,00 g
K ₂ HPO ₄	47,00 g
mit Aqua bidest. auf 200 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren danach zusammengeben	

Tab. A.12: dYT / HMNF-Medium

10.2 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

DEPC-ddH ₂ O	
Aqua bidest.	1000,00 ml
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	0,01 ml
schütteln und über Nacht bei RT inkubieren für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.13: DEPC-ddH₂O

Natriumacetat-Lösung (3 M)	
Natriumacetat	61,525 g
mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen mit DEPC-ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.18: Natriumacetat-Lösung

Ethanol-Lösung (80 %)	
Ethanol, p. a.	80,00 ml
mit DEPC-ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen	

Tab. A.14: Ethanol-Lösung

H ₂ O ₂ -Lösung (3 %)	
H ₂ O ₂ , 30 % in H ₂ O, konzentriert	100,00 ml
mit DEPC-ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen	

Tab. A.19: Wasserstoffperoxid-Lösung

Na ₂ EDTA-Lösung (100 mM)	
Na ₂ EDTA	9,305 g
mit NaOH auf pH 8,0 einstellen mit DEPC-ddH ₂ O auf 250 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.15: EDTA-Lösung (100 mM)

Na ₂ EDTA-Lösung (500 mM)	
Na ₂ EDTA	9,305 g
mit NaOH auf pH 8,0 einstellen mit DEPC-ddH ₂ O auf 50 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.20: EDTA-Lösung (500 mM)

Tris-HCl-Lösung (1 M, pH 7,6)	
Tris	30,30 g
mit HCl auf pH 7,6 einstellen mit DEPC-ddH ₂ O auf 250 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.16: Tris-HCl-Lösung (pH 7,6)

Tris-HCl-Lösung (1 M, pH 8,3)	
Tris	12,120 g
mit HCl auf pH 8,3 einstellen mit DEPC-ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.21: Tris-HCl-Lösung (pH 8,3)

MgCl ₂ -Lösung (100 mM)	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,033 g
mit DEPC-ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.17: Magnesiumdichlorid-Lösung

KCl-Lösung (1 M)	
KCl	7,455 g
mit DEPC-ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.22: Kaliumchlorid-Lösung

Phenol/Chloroform-Lösung	
Phenol/TE-Lösung	250,00 ml
Chloroform	250,00 ml
zu gleichen Volumenteilen mischen	

Tab. A.25: Phenol/Chloroform-Lösung

Formamid (deionisiert)	
Formamid, p. a., 37 %	100,00 ml
mit 2 g Amberlite Ionenaustauscher-Harz versetzen für 1 h rühren und abfiltrieren	

Tab. A.23: Deionisiertes Formamid

Phenol/TE-Lösung	
Phenol, p. a., krist., ≥99,5 %	1000,00 g
durch Zugabe von TE-Puffer sättigen	

Tab. A.26: Phenol/TE-Lösung

Na₂HPO₄-Lösung (2 M)	
Na ₂ HPO ₄	248,00 g
mit warmen DEPC-ddH ₂ O auf 900 ml auffüllen bei RT mit 85 % H ₃ PO ₄ auf pH 7,2 einstellen mit DEPC-ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.24: *di*-Natriumhydrogenphosphat-Lösung

10.3 Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Natriumacetat-SDS-Puffer	
Natriumacetat-Lsg, 3 M, pH 5,0	8,33 ml
Na ₂ EDTA-Lsg, 100 mM	50,00 ml
SDS	5,00 g
mit DEPC-ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.27: Natriumacetat-SDS-Puffer

TE-Puffer	
Tris-HCl-Lsg, 1 M, pH 7,6	5,00 ml
Na ₂ EDTA-Lsg, 100 mM	5,00 ml
mit NaOH auf pH 8,0 einstellen mit DEPC-ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.31: Tris/EDTA-Puffer

TBE-Gelelektrophoresepuffer (10x)	
Tris	108,00 g
Borsäure (H ₃ BO ₃)	55,00 g
Na ₂ EDTA	9,30 g
mit NaOH auf pH 8,0 einstellen mit DEPC-ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.28: TBE-Gelelektrophoresepuffer

MOPS-Puffer (10x)	
MOPS	41,80 g
Natriumacetat	4,10 g
Na ₂ EDTA	3,72 g
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen mit DEPC-ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.32: MOPS-Puffer

Denaturierungspuffer	
NaOH (0,5 M)	20,00 g
NaCl (1,5 M)	87,66 g
mit DEPC-ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.29: Denaturierungspuffer

Neutralisierungspuffer	
Tris-HCl (0,5 M)	60,57 g
NaCl (1,5 M)	87,66 g
mit DEPC-ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.33: Neutralisierungspuffer

Waschpuffer 1	
SSC-Puffer, 20x	25,00 ml
SDS (w/v)	10,00 g
mit DEPC-ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen filtrieren für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.30: Waschpuffer 1

Waschpuffer 2	
SSC-Puffer, 20x	25,00 ml
SDS (w/v)	5,00 g
mit DEPC-ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen filtrieren für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.34: Waschpuffer 2

RNA-Gelladepuffer	
Formamid, deionisiert	3,10 ml
MOPS-Puffer, 10x	4,00 ml
Formaldehyd, 37 %	0,72 ml
Glycerin	2,00 ml
Na ₂ EDTA-Lsg, 500 mM, pH 8,0	0,82 ml
Bromphenolblau-Lsg, gesättigt	0,02 ml
mit DEPC-ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen	

Tab. A.35: RNA-Gelladepuffer

SSC-Puffer (20x)	
NaCl (3,0 M)	175,32 g
tri-Natriumcitrat (0,3 M)	88,23 g
mit DEPC-ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.36: SSC-Puffer

Hybridisierungspuffer	
Na ₂ HPO ₄ -Lsg, 2 M, pH 7,2	
SDS (w/v)	
Na ₂ EDTA	
mit DEPC-ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen filtrieren für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.37: Hybridisierungspuffer

PCR-Puffer (10x)	
KCl-Lsg, 1 M	5,00 ml
MgCl ₂ -Lsg, 100 mM	1,50 ml
Tris-HCl-Lsg, 1 M, pH 8,3	1,00 ml
mit DEPC-ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren	

Tab. A.38: PCR-Puffer

10.4 Dokumentation der Präkontakt-Interaktion

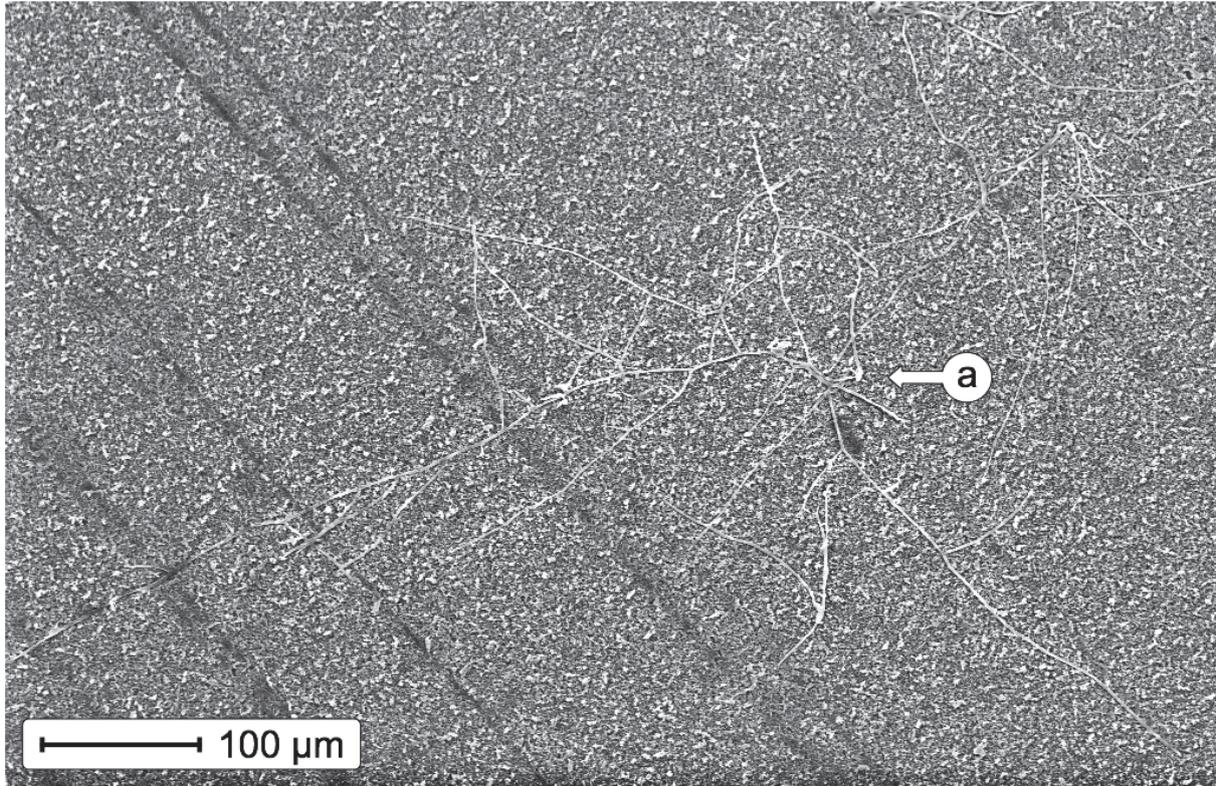


Abb. A1: Monospores Mycel von *F. bracteata* nach 10 Tagen unter Einfluss der nicht-lichenisierenden Alge *Myrmecia bisecta*. Marke a zeigt die Position der Spore.

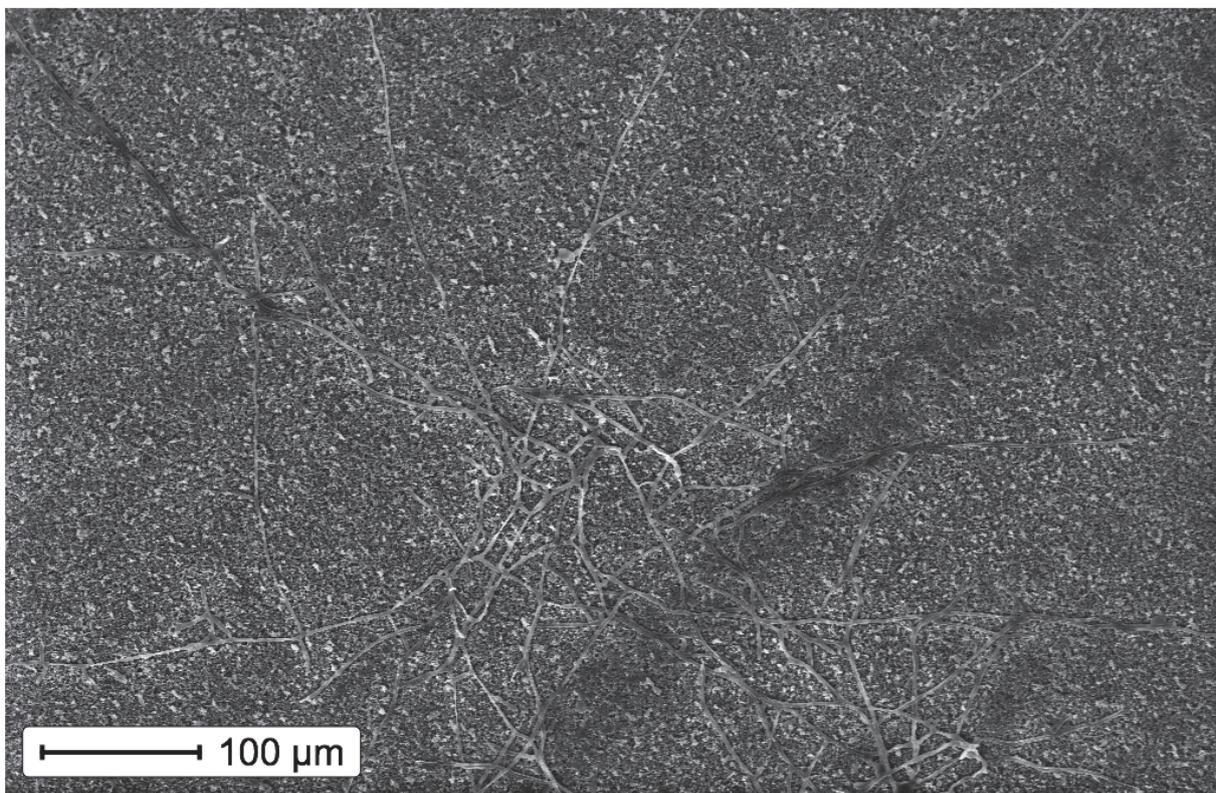
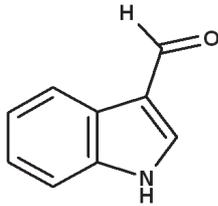


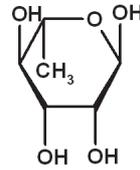
Abb. A2: Monospores Mycel von *F. bracteata* nach 10 Tagen unter Einfluss der nicht-lichenisierenden Alge *Myrmecia bisecta*

10.5 Strukturformeln identifizierter Photobionten-Exudate



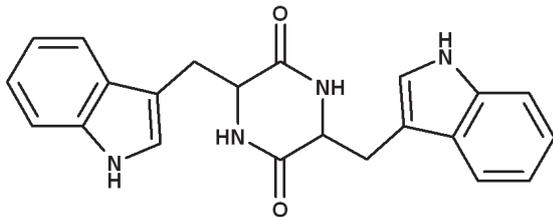
Indol-3-carbaldehyd

Abb. A3: Strukturformel,
Indol-3-carbaldehyd



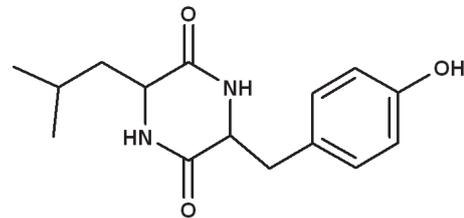
L-Rhamnose

Abb. A4: Strukturformel,
L(+)-Rhamnose



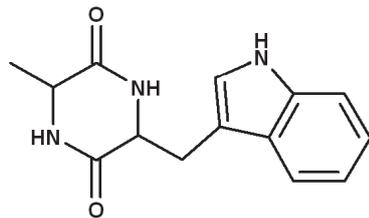
Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl)

Abb. A5: Strukturformel,
Cyclo-(tryptophanyl-tryptophanyl)



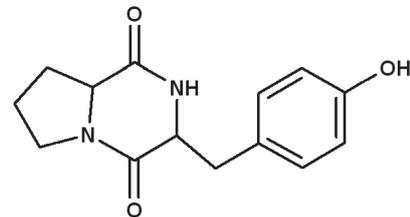
Cyclo-(leucyl-tyrosyl)

Abb. A6: Strukturformel,
Cyclo-(leucyl-tyrosyl)



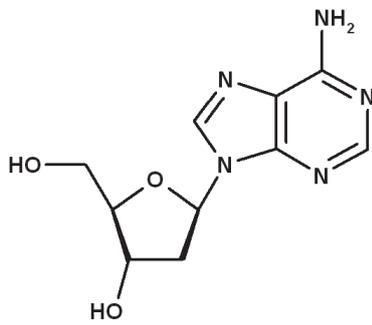
Cyclo-(alanyl-tryptophanyl)

Abb. A7: Strukturformel,
Cyclo-(alanyl-tryptophanyl)



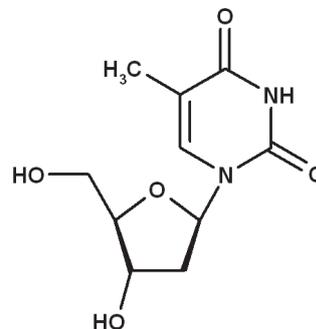
Cyclo-(prolyl-tyrosyl)

Abb. A8: Strukturformel,
Cyclo-(prolyl-tyrosyl)



2'-Desoxyadenosin

Abb. A9: Strukturformel,
2'-Desoxyadenosin



2'-Desoxythymidin

Abb. A10: Strukturformel,
2'-Desoxythymidin

10.6 Sequenzen differenziell exprimierter cDNA-Fragmente

#	Klon(e)	Hochregulierte Sequenzen (I) in 5'-3'-Orientierung	Länge
1	1-la A9	GTACAGTGAC GACAGTCTGT CAGGATGCTC CAGTCATGAT TCAGAGAGCG ATACGGAGCC GAAC TACCGA GAGATTCCGAC	167 bp
	1-lb A9	CCCGACAACG CGCCGAAAGTC CGAAGGAGAT GAACGAGGCG GAAGTTTACT TTGGGTTTTCC TTGAGTGAAG TCGTTTTCAATT	
	1-lb G8	TGAGTAC	
	1-1 E7		
	1-2 H1		
2	1-1a B9	GTACATTGAG AAAGGATTGC TCGGGTTGGC GATCCTCTGA TGGAGGAATA TTCTCTCTTG TAC	73 bp
	1-2 C12		
	1-3 E3		
3	1-3 F6		147 bp
	1-lb E8	GTACGGGTGA AGTGATCAAG GGCTGGGACA TTGGTGTGGT CGGCATGTCG ATTGGCGGCG AGCGTCGCAT TGAAGTACAT	
	1-4 F8	TGAGAAAAGGA TTGCTGCGGT GGACTCGGGT TCGGATCCT CTGATGGAGG AATATTCCTC CTTGTAC	
	1-4 F9		
	1-4 F10		
4	1-1 F5	GTACATTGGG GAGGCAATA AATGATAACA GCTTCCCGAT CCGAGTCAAT AGGCTTÄGG GCTAGGGTGA ATACTCGCCA	112 bp
	1-la B2	AGCCTTCAGA GTAAGCTAAG CCATAATAGT AC	
5	1-la G9	GTACAGGAAAT GTCAGCCCTC CATCGTCCGT TGGATCCAGC CTTTCCAGCC GAAGTTCAAA CCGGAGTTCC CCGTCATCAC	196 bp
	1-lb G9	TTTTCTTCCCT CAGCGATCCA TCTAGTGGG GCGCAGCTG TAGATGCAAC CGCTATGGCG TCACCAGGAG AGGTGACAGG	
6	1-la E2	GTCAAAGCTTG ATTGCGGAGG CAGCCGATGC GGGTAC	111 bp
	1-4 D7	GTGCCCTGTT CAATCCCGGA CGTGCAATTA ATTACCCAGG CGACAGGGCA GACTGCAGCA TACCAGTCA CGCCCCGAAAG	
7	1-la A3	GCTCAAAGCC ATACGACGAC CATCCAAACA C	122 bp
	1-1 A10	GTGAAAACG TCGTCACGAT GGCCAAATCA AAAAATTCCT CCCAGCACAA TCAAAGCAAG AAGGCGCAC GCAACGGCAT	
8	1-la A10	TAAAAACCC AAAACCCACC GTTACCCGTC CCTCAAGGT AC	115 bp
	1-1 B11	GTTTTATTAAG CAACGTGACA GCATAGAACG AGACTAGATA GAGGCTCATA TGCTCCAATG AATCATTCCT GACTAAAAA	
		GTGGGATGCT TAACAGCTAA AGCTCAAGGG ACTAC	

Tab. A.39a: Hochregulierte Sequenzen (I) in 5'-3'-Orientierung mit Angabe der Klone in denen die Sequenzen gefunden wurden und ihrer Länge in bp.

#	Klon(e)	Hochregulierte Sequenzen (II) in 5'-3'-Orientierung	Länge
9	1-la C1	GTACGAGCAA GATCAAACTG ATTCCCATAG AGATCGAGAA ATTCAATTAG AATCTCCCCA AGATTCTGTT CTGGAGCCAT CTCCCACTT TGTAC	95 bp
10	1-la E3	GTACCTGAAC GGTGTGGGCA ACGTAACGC TCGTAGCGAT ATACTCCCTG TTCATGCATT CACACTCGAT TCTTATCTCG TGCTGTGCCA CCTTCCCTCC AATCCGGCTC GAACCTGAGG TCAGAGACTA GCAAGGTCAA CTTACGAAGC CTGTAC	156 bp
11	1-la E10	GTACTTTAGC AGCTATCCAT AAGCTTCGCA TACTTGGTGA ATTCTTCATC CGTTTCAAC ATCTCCAAC CTCTGGGGAG TGTAC	85 bp
12	1-1 A6	GTACGTTTAT CTGATTCGT GAGTAGGAAG TCGTTTTAGG TGTCTACT TATCTATGAC TTGTGTAC	68 bp
13	1-1 C11	GTACGCAATC ATGTATTTT CATCGCTAAG CTGTGCTAGG GAACAGGTTT CGGCAGGAT ATGTATGCCA GCACGAGTAA GGAGCATGG ATACAGCGTG CCTTGACTCC ATGGTTGCCA TGGCTTCTC GTTCATCGGT GTTGAACCC CTTTGTAC	158 bp
14	1-1 C12	GTACATACAG CTATCCAAGT TATCGAAGCA AGCCACCATA CGCCTTCTCG ATGCCCAATG CTCATGCTCG AC	72 bp
15	1-1 F2	GTACCTAAT CAACATAGCA CCACAGCATG ATATCAGAT AGCTTTAAA ACAIGCCATG GCGATTGATC CACAACGATG ATTGCTAGAA GCCATTAGCG TAC	103 bp
16	1-1 G12	GTGAGAAAG CCCCAATGAC CATGCTTAGG GTCCTGAATC AGCTTAGAG CTGCTAACTG TAC	63 bp
17	1-1 H10	GTACCAACG AATGACTATT CAGCTCCACC ATAACTTCT CATCCTTCTC CTACTTCGCC ATTCCTGTTG TCTTCTTTGT GTGTTGATTT CCGTGGGGAG GTAGAAGAAG CCGGTTTCTAG TGACCCGAGG TGGCCATCC GCAGGTAC	148 bp
18	1-1 H12	GTACAGATAC AGCTGGAACG CTCAAACTCC CCCCATCAT GCTTGTGCTT TATACATGGC AAC	73 bp
19	1-2 D2	GTACTCATT CTATATCCGT GCCCCTAAT ATGTGCTAG TAGTCCGGC CTTTCCAGCA TCAGTATTAT CTGATGTAC	79 bp
20	1-2 D5	GTACATCAGA TAATACTGAT GCTGGAAGC GCCGGACTAC TAGACACATA TTAGGGGCCA CGCATATAGA AATGAGTAC	79 bp
21	1-2 D6	GTACCACAGT TTCGGGGGCA AGACCAAGT GAGCACAGC AGGGCGACAT CCTCGATGCT GATAAGATCT GATTGCTGTT GAGGCTGA TTACTTGGTG ATTCTTTTTC GCGAAGAC	119 bp
22	1-2 D9	GTACCTCTGC TCTCAATAA TTGTTCCGAA ACCAAATGT GTTTTAATAC TCCGGACGTA GTAC	64 bp
23	1-2 D12	GTACACTGG CCATTGCTGG CAGATTTCTA GCATGAACGG ATTGTCACTA GGCTCAGGCC ATGCAACGCC TACCGTATTC CGAGTAGTAG TTGTAC	96 bp

Tab. A.39b: Hochregulierte Sequenzen (II) in 5'-3'-Orientierung mit Angabe der Klone in denen die Sequenzen gefunden wurden und ihrer Länge in bp.

#	Klon(e)	Hochregulierte Sequenzen (III) in 5'-3'-Orientierung	Länge
24	1-2 E10	GTCCTTGCCT TTCACATGTC ATCTTCAGAT CATGGGAGG TAATCATGCC TTAGATTGG TAC	63 bp
25	1-2 H3	GTACCCGCAT CCGCTGCCTC CGCAATCAAG CTTGACCCCTG TCACCTCTCC TGGTGACGCC AFAGCGGTTG CATCTACAGC TGCCGCTCCC ACTAGATGGA TCGCTGAGGG AAGAAAGTGA TGAAGGGGAA CTCGCGTTTG AACTTCGGCT GGAAGGCTG GATCCAGCGG ACGATGGAGG GCTGACATTC CTGTAC	196 bp
26	1-2 H9	GTACCAATCT ATCTTCAATC TAGAGGATGA AAAGCCTTCA TGCTGGGAAG TAC	53 bp
27	1-3 B1	GTACATCCAT CCTCCGAGTA GCATCATTC CAGCAGATTA C	41 bp
28	1-3 D11	GTACCCCAT GGTTCGAGCTT TTTCTTTAG ATGTTGGTTT GCCATGATAA GCCCACCACCT AGGAAAAGCA GCTTCTTTGTT CGGACGATCG GGAGCTCCAC GCGAGCGCGG TAC	113 bp
29	1-3 E6	GTACACAGAC AACCGAATGC AAATGCTGA TCATCTGTCT GACGCCAAG AGTATTTTCT CTCGAGTAGC CCGTTGTCTC TAAACCAC	88 bp
30	1-3 E10	GTACCCATCA CCGTTCTCTA TCCCTTTCTT CTCGTTTACA TCCATAGCTC GGTAC	55 bp
31	1-3 G8	GTACTCGATA GTCTATTAAC TGGTGCAAAG CTTGAACCTTA CAAAGAAGCT CATGAGAAAA GGTTTAGGAC AGGATCGGT TGGATGAGAA AGTAC	95 bp
32	1-4 F2	GTACATGTAG GATTTGCATG AAAAGATGAT GGAGAAGGAT TGTTCGGGGT GATTGGATTA TTGTAC	66 bp
33	1-5 D4	GTACATGCAC CATCTGCACC TCCCGGCCA TCGCTATCAT GACCATGACA ACTCCATACA GTGGTATACG CAAGACCGTG AAGATCGCCG GAAGAAAA GGTATCATG CTCCGACAC TCTATGAGGA TGCCGAAC	138 bp
34	1-5 E9	GTACCATAGA CGTTCGTAGC CGTGAAGCCA TAGGAGTTCC CAAAACCTAA ATCAACGTGC GACTGCGCTG CAAAAGTGGAA AACGGTATCG ACCTTGTAC	99 bp
35	1-6 A2	GTGGATACG AAGGATGGC AAAAGCAAAA GGAGAGATA TTGTGCCAAA CAATCAACC AAATAATAGA GTAC	74 bp
36	1-6 B3	GTACCGAAT ACTCAAGCC ATGGCCGAGA ACGATCCGAG TAC	43 bp
37	1-6 E5	GTACAGGCCG TGGATAACTC GTGACGCCGC GATACATCGG TGGATGTCAT GAACTCGGTC AAGGATAAAC GTGCGCGCCT TCCTTATGGA TGAGAGGAT GGAGCGCTTG CATAGGCAAC GATGAAGCGA TGAATAATGT AC	142 bp

Tab. A.39c: Hochregulierte Sequenzen (III) in 5'-3'-Orientierung mit Angabe der Klone in denen die Sequenzen gefunden wurden und ihrer Länge in bp.

#	Klon(e)	Herunterregulierte Sequenzen in 5'-3'-Orientierung	Länge
1	2-la A9	GTACAGAGTA GTGATTCCAG ATATGTTGGC AATGGTGGG GTTGTGCATA GCAGGCTGAT AGCATAGGC CCTCTTTGGC TGTAC	85 bp
2	2-la C4	GTACATGTAT ACAACACTAT GTGAGGAGCA TGTGCCGCA CTGTGCAATG TCTATTTGTA GCTGGCAGTG AAGATGTAC	79 bp
3	2-la F3	GTACTGCAGG TTTTGTTACA AGTATAGGTA TGGCCTTTTG CTTTGCACAG TAGGATTTGA TCAGATACGG TGCTCTGATT GTTACAGACT AGTCCAGTAC	100 bp
4	2-la B3	GTACATGCAC ACAGGACAGC TGCAGCAGCA ATGAAATGTT TATATATAAG TGCACACATC ACCCATGTAT GCAGGCTAGT AC	82 bp
5	2-la B6	GTACTTTACT AGGTTGGTGT ATGCGTGTGA TGCTGTGCA CGTATATGGT GTGCCCAAGG GAGGTGTGA AGTTGCTAGC ATTAGGAGTA C	91 bp
6	2-la F2	GTACCCCATCA TTCACAGTGT AGACATCAAG AAAGTATGCG AGCAGCACAT ACGGGCTACA TTTGTAAAATG TCATGTAC	78 bp
7	2-la G8	GTACAGCTGT GCGTGTCCAG CAGTGCAGC CAAGTTGGCT GATGGTTAC TTTATATATGG CAGTTACAT CCAAAATGTAC	80 bp
8	2-lb B9	GTACCCGATAC CTTTCCACAGC CCACATGTCA TATACAGAGC CGGGTCCAGA ATAAATCCAG AAAGTGTCT TTGCACATCA GCTATCAAAG CAAGCATTCC GCTTGTGTAG GCTCCTGCAT GCGCAAACCA AATGTAC	137 bp
9	2-la C8	GTACTAGGTT ATCATGCACT GTGGATATTG TTTCCACATAT CTGCATGTCC TAGTTTCAAG TCTGTAC	67 bp
10	2-la F6	GTACTTCTGG TCCCTGAGA GCATCGGCAT TGCATGCTTT TGGTGTCTAG GAAACTTATC AGCAATTTCA ACACATAGTG GCCAAATAAA CCCATCAGCA CCAAGGTAC	109 bp
11	2-la G2	GTACTAGCCT GCATACATGG GTGATGTGT CACTTATATA TAAACATTTT AATGCTGCTG CACGTGTCTT GTGTGCATGT AC	82 bp
12	2-la G9	GTAGGTCATG GCCCTTTTAA CAAACGTGCC CATCCTCAAG CAGTTGGTC ACATGCGAGT CACAACGGT CGACATCAAT ACCCATTAAT ATTGACAGAA ATGCATAACA TCCCATTTGAG TATGGGTGTA C	131 bp
13	2-la H7	GTACAAGTTC ACTCAATGCT GCCCGTATAC TGTGCACCTT GACAGCAAGT GACTGCAGGG CTGGGAATTTG AGATCAATTAT GATGCTTTTA CCAGGACTGT ATTCTTGGCA GTTGGCTGTA C	121 bp
14	2-lb E8	GTACTTGAGG TCACAATCAA ATGAAGTGAG CCACATCAA AGGTTGGAGC GCCCTGCAAC TAGAATCACA GCTGTATATA TACAAAATGG TAC	93 bp
15	2-1 B2	GTACCTTCAA GGAGCTGGCA CCTATGACC CAGACTGGTA C	41 bp
16	2-1 E11	GTAGGCATAC GTTTCTCTAT CTCTCATCGG CCTGTGCC CTTGTGGTG CCGGGGTTGG TGTGGGTAGT GGTGTGCGTA TGATGTAC	88 bp
17	2-2 D7	GTACCTACAT GATATCATAG CTACAAGCCT AGCTATAGCA AAGCCTGCTC AGCAACAGCA ATCTAGTCCA AACACAATGT AC	82 bp

Tab. A.39d: Herunterregulierte Sequenzen in 5'-3'-Orientierung mit Angabe der Klone in denen die Sequenzen gefunden wurden und ihrer Länge in bp.

10.6.1 Prolyl-Peptidyl-Isomerase

Klone: 1-4 A2, 1-4 F8, 1-4 F9, 1-4 F10, 1-4 F11, 1-1a E8, 1-1b-E8
 Fragmentlänge: 147 bp
 Nachweis mit: blastn (nr/nt), blastx, tblastx, blastp (frame 3)

Beste identifizierbare Treffer der einzelnen Such-Algorithmen:

blastn (nr/nt) Identität: FPR3 = FKBP-70; Fpr3p
 Organismus: *Saccharomyces cerevisiae*, Genomic, 2943 nt
 Referenz: gb|S73876.1|
 Länge: 2943
 Score: 68.0 bits (74)
 E-Value: 1,00E-08
 Identities: 51/60 (85%)
 Gaps: 0/60 (0%)
 Strand: Plus/Plus

```
Query 6 GGTGAAGTGATCAAGGGCTGGGACATTGGTGTGGTCGGCATGTCGATTGGCGGCGAGCGT 65
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2581 GGTGAAGTTATCAAAGGCTGGGACATTGGTGTGGTCGGCATGTCGATTGGCGGCGAACGT 2640
```

blastx Identität: FK506-binding nuclear protein; Fpr3p
 Organismus: *Saccharomyces cerevisiae* RM11-1a
 Referenz: gb|EDV11435.1|
 Länge: 408
 Score: 47.0 bits (110)
 E-Value: 7,00E-04
 Identities: 20/22 (90%)
 Positives: 21/22 (95%)
 Gaps: 0/22 (0%)

```
Query 6 GEVIKGWDIGVVGMSIGGERRI 71
      GEVIKGWDIGV GMS+GGERRI
Sbjct 354 GEVIKGWDIGVAGMSVGGERRI 375
```

tblastx Identität: FKBP-type peptidyl-prolyl isomerase, putative, mRNA
 Organismus: *Aspergillus flavus* NRRL3357
 Referenz: ref|XM_002381972.1|
 Länge: 1413
 Score: 53.3 bits (110)
 E-Value: 1,00E-05
 Identities: 19/24 (79%)
 Positives: 22/24 (91%)
 Gaps: 0/24 (0%)

```
Query 6 GEVIKGWDIGVVGMSIGGERRIEV 77
      GEVIKGWDIGV GM++GGERRI +
Sbjct 1249 GEVIKGWDIGVAGMAVGGERRISI 1320
```

blastp (frame 3) Identität: proline rotamase
 Organismus: *Saccharomyces cerevisiae*
 Referenz: gb|AAB04165.1|
 Länge: 413
 Score: 49.3 bits (116)
 E-Value: 1,00E-04
 Identities: 20/22 (90%)
 Positives: 21/22 (95%)
 Gaps: 0/22 (0%)

Query 2 GEVIKGDIGVVGMSIGGERRI 23
 GEVIKGDIGV GMS+GGERRI
 Sbjct 359 GEVIKGDIGVAGMSVGGERRI 380

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
2	proline rotamase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,00E-04	49.3	AAB04165.1
3	peptidyl-prolyl isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,00E-04	49.3	EDN64321.1
5	Fpr3p peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,00E-04	49.3	NP_013637.1
6	FK506-binding nuclear protein with FKBP_C domain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,00E-04	48.5	EDV11435.1
7	Fpr4p peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,00E-04	48.1	EEU06193.1
8	KLTH0D16764p	<i>Lachancea thermotolerans</i>	3,00E-04	48.1	XP_002553435.1
9	FKBP proline rotamase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,00E-04	48.1	EDN59346.1
12	Fpr4p peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,00E-04	48.1	NP_013554.1
13	Pc12g11330	<i>Penicillium chrysogenum</i>	3,00E-04	48.1	XP_002557951.1
15	hypothet. protein NECHADRAFT_74694 with FKBP_C domain	<i>Nectria haematococca</i>	3,00E-04	47.8	EEU47780.1

#	Konservierte Domäne eines Proteins	E-Value	Multi-Dom.	Pssmid
1	pfam00254, FKBP_C, FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1,00E-04	nein	144003

Tab. A.40a,b: Ergebnisse der BLAST-Suche mit den Algorithmen blastp (Leseraster 3, a, oben) und der Suche nach konservierten Domänen (b, unten): Die besten Treffer (ohne „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“) werden u. a. mit ihrem Herkunftsorganismus, ihrem E-Value, als Maß für die Zufälligkeit dieser Übereinstimmung, und ihrer Referenznummer dargestellt. Treffer, die die als am wahrscheinlichsten erachtete Identifikation unterstützen, sind grau unterlegt. Alle konkret bezeichneten Treffer sprechen für eine Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase mit einer funktionalen Domäne vom Typ FKBP_C. Diese Domäne wird auch als konservierte Domäne in dem cDNA-Fragment identifiziert.

10.6.2 GTP-bindendes EsdC

Klone: 1-la G9, 1-lb G9, 1-la H12 (1-2 H3)
 Fragmentlänge: 196 bp
 Nachweis mit: blastn (nr/nt), tblastx (nr/nt rc), blastx

Beste identifizierbare Treffer der einzelnen Such-Algorithmen:

blastn (nr/nt) Identität: sexual development protein EsdC
 Organismus: *Aspergillus clavatus* NRRL 1, putative, partial mRNA
 Referenz: ref|XM_001272353.1|
 Länge: 786
 Score: 60.8 bits (66)
 E-Value: 2,00E-06
 Identities: 53/66 (80%),
 Gaps: 0/66 (0%)
 Strand: Plus/Plus

```
Query 131 CGCTATGGCGTCACCAGGAGAGGTGACAGGGTCAAGCTTGATTGCGGAGGCAGCCGATGC 190
          ||| ||| ||| | | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 616 CGCTATGGCATCACTCGCAAGGGTGACCGCGTCAAGCTCGACTGCGGCGGTAGCCGATGC 675

Query 191 GGTAC 196
          || |||
Sbjct 676 GGCTAC 681
```

tblastx (nr/nt) Identität: GTP-binding protein EsdC, mRNA
 Organismus: *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500
 Referenz: ref|XM_002488266.1|
 Länge: 1932
 Score: 68.9 bits (144)
 E-Value: 4,00E-10
 Identities: 23/26 (88%)
 Positives: 25/26 (96%)
 Gaps: 0/26 (0%)

```
Query 119 CRCNRYGVTRRGDRVKLDCGGSRCGY 196
          CRC RYG+TR+GDRVKLDCGGSRCGY
Sbjct 972 CRCERYGITRKGDRVKLDCGGSRCGY 1049
```

blastp (frame 2) Identität: esdC
 Organismus: *Aspergillus parasiticus*
 Referenz: gb|ACN41349.1|
 Länge: 265
 Score: 58.9 bits (141)
 E-Value: 2,00E-07
 Identities: 26/34 (76%)
 Positives: 29/34 (85%)
 Gaps: 3/34 (8%)

```
Query 32 DPSSGSGSCRCNRYGVTRRGDRVKLDCGGSRCGY 65
          DP+S CRC RYG+TR+GDRVKLDCGGSRCGY
Sbjct 201 DPAS---VRCERYGITRKGDRVKLDCGGSRCGY 231
```

Identität: GTP-binding protein EsdC

Organismus: *Aspergillus fumigatus* Af293
Referenz: ref|XP_746739.1|
Länge: 261
Score: 57.8 bits (138),
E-Value: 4,00E-07
Identities: 23/26 (88%),
Positives: 25/26 (96%),
Gaps: 0/26 (0%)

Query 40 CRCNRYGVTRRGDRVKLDCGGSRCGY 65
CRC RYG+TR+GDRVKLDCGGSRCGY
Sbjct 202 CRCERYGITRKGDRVKLDCGGSRCGY 227

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Maximum Identity	Query Coverage	Referenznummer
1	sexual development protein EsdC, putative, partial mRNA	<i>Aspergillus clavatus</i>	2,00E-06	80%	33%	XM_001272353.1
7	GTP-binding protein EsdC, mRNA	<i>Aspergillus flavus</i>	1,00E-03	68%	65%	XM_002380627.1
9	contig An12c0030, complete genome	<i>Aspergillus niger</i>	1,00E-03	76%	36%	AM270260.1
10	esdC gene, complete cds	<i>Aspergillus parasiticus</i>	4,00E-03	67%	65%	FJ666347.1
12	cDNA, contig sequence: AoEST2557	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,00E-03	67%	65%	AB225702.1
13	RIB40 DNA, SC038	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,00E-03	67%	65%	AP007169.1
14	GTP-binding protein EsdC, partial mRNA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,00E-03	76%	33%	XM_741646.1
16	GTP-binding protein EsdC, mRNA	<i>Penicillium mameffeii</i>	0.015	75%	33%	XM_002153106.1
18	GTP-binding protein EsdC, mRNA	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	0.053	72%	40%	XM_001934852.1
19	sexual development protein EsdC, putative, partial mRNA	<i>Neosartorya fischeri</i>	0.053	75%	33%	XM_001262829.1

Tab. A.41: Ergebnisse der BLAST-Suche mit den Algorithmen blastn (nr/nt): Die besten Treffer (ohne „hypothetical“, „predicted“ und „unknown“) werden u. a. mit ihrem Herkunftsorganismus, ihrem E-Value, als Maß für die Zufälligkeit dieser Übereinstimmung, und ihrer Referenznummer dargestellt. Treffer, die die als am wahrscheinlichsten erachtete Identifikation unterstützen, sind grau unterlegt. Alle konkret bezeichneten Treffer sprechen für eine EsdC, als Gen der frühen ascomycetischen Sexualentwicklung.

10.6.3 60S Ribosomales Protein L29, Rpl29

Klone: 1-la A3, 1-1 A10
 Fragmentlänge: 122 bp
 Nachweis mit: blastn (nr/nt), blastx, tblastx, blastp (frame 1)

Beste identifizierbare Treffer der einzelnen Such-Algorithmen:

blastn (nr/nt) Identität: 60S ribosomal protein L29, putative, mRNA
 Organismus: *Penicillium marneffei* ATCC 18224
 Referenz: ref|XM_002149865.1|
 Länge: 1572
 Score: 105 bits (116)
 E-Value: 4,00E-20
 Identities: 90/111 (81%)
 Gaps: 0/111 (0%)
 Strand: Plus/Plus

```
Query 12  CGTCACGATGGCCAAATCAAAAAATTCCTCCCAGCACAATCAAAGCAAGAAGGCGCACCG 71
          ||||| ||||| || || || || || ||||| || ||||| ||||| |||||
Sbjct 68  CGTCAAGATGGCCAAGTCCAAGAACTCGTCTCAGCACAACCAGAGCAAGAAGGCTCACCG 127

Query 72  CAACGGCATTAAAAACCCAAAACCCACCGTTACCCGTCCCTCAAGGGTAC 122
          ||||| || || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||
Sbjct 128 TAACGGTATCAAGAAGCCCAAGACCTACCGTTACCCCTTCCTTGAAGGGAAC 178
```

blastx (nr/nt) Identität: 60S ribosomal protein L29, putative
 Organismus: *Aspergillus flavus* NRRL3357
 Referenz: ref|XP_002372940.1|
 Länge: 280
 Score: 45.4 bits (106)
 E-Value: 2,00E-03
 Identities: 19/19 (100%)
 Positives: 19/19 (100%)
 Gaps: 0/19 (0%)

```
Query 64  AHRNGIKKPKTHRYPSLKG 120
          AHRNGIKKPKTHRYPSLKG
Sbjct 16  AHRNGIKKPKTHRYPSLKG 34
```

tblastx Identität: 60S ribosomal protein L29, putative, mRNA
 Organismus: *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500
 Referenz: ref|XM_002484316.1|
 Länge: 404
 Score: 59.7 bits (124)
 E-Value: 2,00E-07
 Identities: 27/37 (72%)
 Positives: 31/37 (83%)
 Gaps: 0/37 (0%)

```
Query 122  VPLRDG*RWVLGFLMPLRCAFL*LCWEEFFDLAIVT 12
          VP +DG*R VLGFL+PLR AFLL LC +EF DLAI+T
Sbjct 148  VPFKDG*R*VLGFLIPLR*AFLLWLC*DEFLLDLAILT 38
```

blastp (frame 1) Identität: 60S ribosomal protein L29, putative
 Organismus: *Coccidioides posadasii* C735 delta SOWgp
 Referenz: gb|EER29360.1|
 Länge: 65

blastp (frame 1) Score: 107 bits (246)
 E-Value: 2,00E-22
 Identities: 33/34 (97%)
 Positives: 34/34 (100%)
 Gaps: 0/34 (0%)

Query 7 MAKSKNSSQHNQSKKAHRNGIKKPKTHRYPSLKG 40
 MAKSKNSSQHNQ+KKAHRNGIKKPKTHRYPSLKG
 Sbjct 1 MAKSKNSSQHNQNKKAHRNGIKKPKTHRYPSLKG 34

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
2	60S ribosomal protein L29, putative, mRNA	<i>Talaromyces stipitatus</i>	2,00E-07	59,7	XM_002484316.1
3	60S ribosomal protein L29, putative, mRNA	<i>Penicillium marseffei</i>	2,00E-07	59,7	XM_002149865.1
5	60S ribosomal protein L29, putative, mRNA	<i>Chaetomium globosum</i>	1,00E-06	57,0	XM_001229505.1
6	60S ribosomal protein L29, mRNA, complete cds	<i>Anopheles darlingi</i>	1,00E-06	36,0	EU934311.1
9	60S ribosomal protein L29, partial mRNA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,00E-05	53,3	XM_744968.1
10	60S ribosomal protein L29, partial mRNA	<i>Neurospora crassa</i>	5,00E-05	51,5	XM_952693.2
11	60S ribosomal protein L29, partial mRNA	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	7,00E-05	51,0	XM_001549969.1
13	60S ribosomal protein L29, putative, mRNA	<i>Aspergillus flavus</i>	8,00E-05	51,0	XM_002372899.1
14	60S ribosomal protein L29, putative, partial mRNA	<i>Neosartorya fischeri</i>	8,00E-05	51,0	XM_001265335.1
17	60S ribosomal protein L29, putative, partial mRNA	<i>Globodera rostochiensis</i>	5,00E-04	34,7	AJ133113.1

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Score	Referenznummer
4	60S ribosomal protein L29, putative	<i>Aspergillus flavus</i>	2,00E-03	45,4	XP_002372940.1
7	predicted protein Ribosomal L29e protein family; pfam01779	<i>Coccidioides immitis</i>	2,00E-03	45,4	XP_001245359.1
8	60S ribosomal protein L29,	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,00E-03	45,4	XP_750061.1
12	60S ribosomal protein L29, putative	<i>Talaromyces stipitatus</i>	1,00E-02	43,1	XP_002484361.1
13	60S ribosomal protein L29, putative	<i>Penicillium marseffei</i>	1,00E-02	43,1	XP_002149901.1
14	TPA: 60S ribosomal protein L29, putative	<i>Aspergillus nidulans</i>	1,30E-02	42,7	CBF89826.1
15	60S ribosomal protein L29, putative	<i>Aspergillus nidulans</i>	1,30E-02	42,7	XP_001269822.1
17	60S ribosomal protein L29	<i>Chaetomium globosum</i>	1,70E-02	42,4	XP_001229506.1
18	Rpl29p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,30E-02	42,0	EEU04188.1
21	60S ribosomal protein L29	<i>Candida albicans</i>	2,30E-02	42,0	EEQ42132.1

Tab. A.42a,b: Ergebnisse der BLAST-Suche mit den Algorithmen tblastx (a, oben) und blastx (b, unten): Die besten Treffer (ohne „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“) werden u. a. mit ihrem Herkunftsorganismus, ihrem E-Value, als Maß für die Zufälligkeit dieser Übereinstimmung, und ihrer Referenznummer dargestellt. Treffer, die die als am wahrscheinlichsten erachtete Identifikation unterstützen, sind grau unterlegt. Alle konkret bezeichneten Treffer sprechen für das 60S Ribosomale Protein L29.

#	Beschreibung	Herkunfts-Organismus	E-Value	Maximum Identity	Query Coverage	Referenznummer
1	70-15 hypothetical protein, (MGG_06324) partial mRNA	<i>Magnaporthe oryzae</i>	4,00E-18	81%	100%	XM_369809.2
2	PH-1 hypothetical protein, partial mRNA	<i>Gibberella zeae</i>	9,00E-14	78%	100%	XM_385643.1
3	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, Pt-1C-BFP, mRNA	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	1,00E-12	78%	97%	XM_001938007.1
4	hypothetical protein (GSTUM00002048001), mRNA, complete	<i>Tuber melanosporum</i>	4,00E-12	77%	98%	XM_002839508.1
5	CBS 148.51 hypothetical protein, (CHGG_03270) partial mRNA	<i>Chaetomium globosum</i>	4,00E-11	76%	100%	XM_001229785.1
6	DSM 980 hypothetical protein, (PODANSg5230) partial mRNA	<i>Podospora anserina</i>	2,00E-10	80%	78%	XM_001908160.1
7	genomic DNA chromosome 7, supercontig 1	<i>Podospora anserina</i>	2,00E-10	80%	78%	CU633900.1
8	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, putative, mRNA	<i>Ricinus communis</i>	2,60E-01	70%	91%	XM_002515314.1
9	CBS 6054 hypothetical protein, partial mRNA	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	3,40E+00	100%	21%	XM_001385887.1
10	CBS 6054 chromosome 6, complete sequence	<i>Pichia stipitis</i>	3,40E+00	100%	21%	CP000500.1

#	Konservierte Domäne eines Proteins	E-Value	Multi-Dom.	Pssmid
1	TIGR01181, dTdp_gluc_dehyt, dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	2,00E-05	ja	130249
2	COG1088, RfbB, dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	3,00E-05	ja	31285
3	PRK10084, dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, provisional	4,00E-03	ja	137677
4	PRK10217, dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase, provisional	5,00E-03	ja	137757

Tab. A.43a,b: Ergebnisse der BLAST-Suche mit den Algorithmen blastn (3, a, oben) und der Suche nach konservierten Domänen (b, unten): Die besten Treffer (auch inklusive „*hypothetical*“, „*predicted*“ und „*unknown*“) werden u. a. mit ihrem Herkunftsorganismus, ihrem E-Value, als Maß für die Zufälligkeit dieser Übereinstimmung, und ihrer Referenznummer dargestellt. Treffer, die die als am wahrscheinlichsten erachtete Identifikation unterstützen, sind grau unterlegt. Alle konkret bezeichneten Treffer sprechen für eine dDTP-4,6-D-Glucose-Dehydratase mit einer funktionalen Domäne. Diese Domäne wird auch als konservierte Domäne in dem cDNA-Fragment identifiziert (b).

10.6.6 ATP-Sulfurylase

Klone: 1-2 D2, 1-2 D5
 Fragmentlänge: 79 bp
 Nachweis mit: blastp (frame 1rc)

Beste identifizierbare Treffer der einzelnen Such-Algorithmen:

blastp (frame 1) Identität: ATP sulfurylase
 Organismus: *Sclerotinia sclerotiorum* 1980
 Referenz: ref|XP_001594508.1|
 Länge: 573
 Score: 45.6 bits (100)
 E-Value: 6,00E-04
 Identities: 14/15 (93%)
 Positives: 14/15 (93%)
 Gaps: 0/15 (0%)

```
Query 1  VHQIILMLESAGLLD 15
          VH IILMLESAGLLD
Sbjct 557 VHSIILMLESAGLLD 571
```

Identität: sulfate adenylyltransferase
 Organismus: *Verticillium albo-atrum* VaMs.102
 Referenz: gb|EEY15889.1|
 Länge: 536
 Score: 43.5 bits (95)
 E-Value: 3,00E-03
 Identities: 15/22 (68%)
 Positives: 16/22 (72%)
 Gaps: 5/22 (22%)

```
Query 1  VHQIILMLESAGLLDITYXGPRI 22
          VHQIIL+LES GLLD RI
Sbjct 520 VHQIILLLESQGLLD-----RI 536
```

11 Veröffentlichungen

Ergebnisse aus dieser Promotionsarbeit sind bis jetzt veröffentlicht worden:

Substances exuded by lichen photobionts – are they important in the recognition process?

Joachim Meeßen, Sieglinde Ott & Rainer Ebel

Vortrag

Deutsche Botanikertagung

Hamburg, Deutschland

3. bis 7. September 2007

Sekretierte Substanzen aus Flechten-Photobionten – Sind sie für die Partnererkennung von Bedeutung?

Joachim Meeßen & Sieglinde Ott

Vortrag

Symposium der Düsseldorf Entrepreneur Foundation

Düsseldorf, Deutschland

22. Februar 2008

Pre-Contact Interactions of the Mycobiont of *Fulgensia bracteata* with Specific and Unspecific Photobionts and a Non-Lichenising Alga

Joachim Meeßen & Sieglinde Ott

Vortrag

6th Congress of the International Symbiosis Society

Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten

9. bis 15. August 2009

Identification of six up-regulated genes by initial biont interaction studies of the lichen *Fulgensia bracteata*

Joachim Meeßen & Sieglinde Ott

Poster

9th International Mycological Congress

Edinburgh, Vereinigtes Königreich

1. bis 6. August 2010

Substances exuded by lichen photobionts – are they important in the recognition process?

Joachim Meeßen, Sieglinde Ott & Rainer Ebel

paper (in prep.)

Pre-Contact Interactions of the Mycobiont of *Fulgensia bracteata* with Specific and Unspecific Photobionts and a Non-Lichenising Alga

Joachim Meeßen & Sieglinde Ott

paper (in prep.)

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Zitate aus der Literatur habe ich durch Angabe der entsprechenden Quelle kenntlich gemacht.

Joachim Meeßen

Wuppertal, im Oktober 2010

13 Danksagung

Ich möchte die hauseigenen Juristen der Heinrich-Heine-Universität nur ungerne verwirren und daher die obige Erklärung auch in keinster Weise anzweifeln. Allerdings ist es natürlich ausgemachter Humbug, anzunehmen, dass ich die Fragestellungen dieser Arbeit ganz auf mich allein gestellt auch nur ansatzweise hätte bearbeiten können. Viele Menschen haben mir in den letzten Jahren geholfen und erfreulich oft hat es Spaß gemacht, mit diesen freundlichen Zeitgenossen zu arbeiten. Ihnen allen möchte ich herzlich danken, als da wären:

Frau Prof. Ott, die mir als Doktormutter dieses spannende, unkonventionelle und daher leider ebenso komplizierte Thema zur Bearbeitung gegeben hat, und die mir so manches mal mit gutem Rat und vor allem viel Zuspruch zur Seite stand. So hatte sie zum Beispiel genug Zutrauen, mich in fremde Städte und ferne Länder zu schicken, und mich zu zwingen, unsere Forschungsergebnisse einer vermeintlich allzu kritischen Horde von Fachkollegen vorzuwerfen. Nun ja, zu meiner großen Überraschung erwiesen sich diese aber nicht nur als sehr interessiert, sondern auch als überaus freundlich und aufgeschlossen. Lektion gelernt! Neben diesen und anderen, anfangs nicht ganz offensichtlichen „Nettigkeiten“ hatte Frau Ott allerdings von langer Hand geplant, ein weiteres Projekt mit mir zu verwirklichen. Dabei handelte es sich nur oberflächlich betrachtet um die tiefergehende Erforschung der Flechtensymbiose, sondern viel mehr um die signifikante Erhöhung der Frustrationstoleranz eines armen Kandidaten. Mit der Vergabe und der Bearbeitung genau dieses Themas ist ihr das auch vollends gelungen. Jetzt hoffe ich nur inständig, dass sich diese neuerworbene Fähigkeit auch möglichst bald auszahlt.

Herrn Prof. Jahns, der mein Interesse an Flechten auf der Norwegenexkursion 2002 geweckt hat. Ohne ihn wären Flechten für mich immer noch diese schmutzig-grünen Kaugummiflecken auf Gehwegplatten und auch darüber hinaus hat er mich so manches Mal freundlich unterstützt.

Herrn Dr. Uwe J. Santoré, der mir in meiner Zeit an der Uni zu einem guten Freund geworden ist und mir bis zu seinem viel zu frühen Ableben immer mit Rat, Tat und viel Humor zur Seite gestanden hat.

Allen jetzigen und früheren Mitarbeitern der AG Ott und der AG Baier, deren vollständige und namentliche Aufzählung diesen Rahmen sprengen würde, oder mich zu einer Auswahl zwingen würde, die wahrscheinlich vielen netten Menschen Unrecht täte. Sie haben mir während der letzten Jahre oft und hoffentlich auch gerne geholfen. Sei es nur, indem sie das von mir heillos verstellte REM richteten, geduldig alle meine Fragen zum weiten Feld der

Molekularbiologie beantworteten, oder indem sie mir die – nicht nur für angehende Wissenschaftler unvermeidliche – Wartezeit zwischen den Experimenten durch ihre Gesellschaft verübt haben.

Den Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, besonders Julia Kjer, Annika Putz, PD Dr. Rainer Ebel und Prof. Dr. Peter Proksch, die mir die Nutzung ihrer HPLC und LCMS für die Analyse der Photobiontenexudate ermöglicht haben und stetig versucht haben, mir auch das geistige Rüstzeug zu deren Verständnis an die Hand zu geben.

Den Mitarbeitern des Alfred Wegner Institutes Bremerhaven, ganz besonders Katrin Deigweiher und Dr. Magnus Lucassen, die mir geduldig die praktischen Aspekte der SSH am Beispiel der CO₂-konzentrationsabhängigen Genexpression arktischer und temperater Aalmuttern beigebracht haben und mir eine schöne und lehrreiche Zeit im herbstlich-stürmischen Bremerhaven ermöglichten.

Den Mitarbeitern des Institutes für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, und dabei ganz besonders Dr. Karin Ernst und Monika Streubel, ohne deren Hilfe ich jetzt wahrscheinlich immer noch wie der sprichwörtliche Ochs' vorm Berge vor meinen Hybridisierungsexperimenten säße.

Der Düsseldorf Entrepreneur Foundation und ganz besonders Herrn Prof. Riesner, der FAZIT-Stiftung und auch dem Forschungsförderungsfond der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle drei Institutionen haben sich von mir beziehungsweise meiner Doktormutter dazu überreden lassen, die Forschungen für diese Arbeit zu finanzieren. Sei es entweder direkt durch großzügige Sachmittel oder eher abstrakt über den Umweg meiner Miete und meines Kühlschranksinhaltes.

Meinem Freund Marc, der sich auch noch lange nach Feierabend meinen Ärger und meinen Frust an so manchen Tagen geduldig anhörte und der es bestens verstanden hat, mich immer wieder aufzubauen. Sein vor vielen Jahren begonnenes Projekt, mich in die Mysterien des Computerzeitalters und der elektronischen Datenverarbeitung einzuführen, hat zwar bis heute noch nicht zu einem nenneswerten Erfolg geführt. Allerdings bin ich zuversichtlich, dass uns noch viele Jahre bleiben, um gemeinsam daran zu arbeiten.

Meiner Familie und meinen Freunden, die immer an meiner Seite standen, viel weniger Zweifel hegten als ich, dass diese Arbeit irgendwann einmal fertig werden würde, und es sich nie nehmen ließen, mich auf die vielfältigen Vorzüge eines Lebens jenseits der Uni hinzuweisen. So sehr mich diese Arbeit auch beschäftigt hat, es gibt Dinge, die wichtiger sind.

Und zu guter Letzt möchte ich den beiden unfreundlichen Bullen danken, die mich in irgendeiner Herbstnacht 2003 friedlich schlummernd auf einer nassen Parkbank weckten, und auch Martin Brooks danken. Letzterer ist der Autor des wirklich lesenswerten Buches „Drosophila – Die Erfolgsgeschichte der Fruchtfliege“ (für Interessierte: ISBN 3 489 00622 3), das mir durch einige schwere Stunden geholfen hat. Es hat mich sehr aufgebaut, zu erfahren, dass man durchaus erfolgreich promovieren kann (und anschließend nicht als Taxifahrer endet), wenn man in seiner Dissertation belegt, dass die Männchen einer südwalisischen Strandmottenart bei der nächtlichen Partnersuche zwischen zwei und fünf Meter weit fliegen. Ohne zynisch klingen zu wollen: diese kleine Anekdote, die der Autor selber mit einem Augenzwinkern erzählt, hat mir oft genug geholfen, auftretende Probleme wesentlich lockerer zu sehen, als es mir ansonsten entsprochen hätte. Motivation findet sich oft an den unwahrscheinlichsten Orten.