

Signalmoleküle in der Mykorrhizasymbiose

Erika Kothe

Zusammenfassung

Die Symbiose zwischen Pilzen und Pflanzen ist weit verbreitet. Über 95 % der Landpflanzen leben in einer Mykorrhizasymbiose, und die Aufnahme von Mikronährstoffen, Phosphat und Stickstoff im Austausch gegen Photosyntheseprodukte bestimmt die Funktion der Wurzel. Für Waldbäume ist die Ektomykorrhiza, vorrangig mit Basidiomyceten, typisch. Die Signale, die dabei zwischen Wirt und Pilz ausgetauscht werden, sind immer besser verstanden. So können die Pilze – hier wurde der Bärtige Ritterling *Tricholoma vaccinum* in Symbiose mit der Fichte untersucht – Pflanzenhormone wie Indol-3-essigsäure produzieren und sie reagieren auch selbst auf diese Substanz. Gleichzeitig werden volatile Substanzen gebildet, die beide Partner beeinflussen.

Durch Genom-, Transkriptom-, Proteom-, Volatilom- und Sekretomstudien konnten unterschiedliche Substanzklassen mit Wirkung auf die Etablierung der Mykorrhiza identifiziert werden. Eine der Proteinfamilien, die an der Mykorrhizierung beteiligt ist, sind die Hydrophobine. Weiterhin werden Signalmoleküle von anderen Pilzen oder Bakterien in der Umgebung der Mykorrhiza beschrieben, die die Ausbildung der Symbiose beeinflussen können. So werden strigolactonähnliche Verbindungen aus der innerartlichen Kommunikation von Zygomyceten im Waldboden genutzt, um die Freisetzung des Pflanzenhormons Indolelessigsäure durch den Pilz zu regulieren. Ein größeres Bild der Mykorrhizasymbiose im Waldboden kann so zusammenfassend erstellt werden.

Summary

Signaling molecules in the mycorrhizal symbiosis

The mutually beneficial symbiosis of mycorrhiza between plant roots and fungi is ubiquitous and facilitates nutrient uptake of, e.g., phosphate and nitrogen, while the fungus receives photosynthesis products. In woodlands, the ectomycorrhizal symbiosis – here we used *Tricholoma vaccinum* in symbiosis with spruce – can influence mycorrhization by fungal production of plant hormones like indole-3-acetic acid. The fungus also reacts to that compound with enhanced branching, which facilitates the formation of the typical morphological features of ectomycorrhiza, the fungal mantle and the Hartig' net. The fungus also produces volatile organic compounds that affect both partners.

Genome, transcriptome, proteome, volatilome and secretome studies identified different classes of molecules that act on the formation of mycorrhiza. One of the protein families involved in mycorrhization is the family of hydrophobins. In addition, further signaling molecules are provided from other fungi or bacteria in the mycorrhizosphere, including strigolacton-like compounds that are formed during sexual reproduction in zygomycetes in forest soil. These molecules can regulate excretion of the plant hormone indole acetic acid by the fungus. Altogether, this allows a more comprehensive picture of mycorrhiza in forest soils.

✉ Prof. Dr. Erika Kothe, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Mikrobiologie, Neugasse 25, 07743 Jena; erika.kothe@uni-jena.de

Einführung

Der größte lebende Organismus auf der Erde ist weder ein Wal noch ein Mammutbaum, sondern ein Mikroorganismus: ein Pilz, der 2000 in Oregon als Hexenring entdeckt worden ist (Smith et al. 1992). Das Mycel von *Armillaria ostoyae* (Dunkler Hallimasch) erstreckt sich über eine Fläche von fast 9 km², sein Alter wird auf 2400 Jahre und sein Gewicht auf ca. 600 Tonnen geschätzt.

Die oberirdischen, sichtbaren Fruchtkörper von Pilzen dienen ausschließlich der sexuellen Vermehrung, in ihnen werden die Basidiosporen gebildet. Diese Basidiosporen keimen aus und wachsen saprotroph im Boden. Sie können ein Mycel ausbilden – die Mycelfäden (Hyphen) haben einen Durchmesser von 1–5 µm; daher gehören Pilze zu den Mikroorganismen. Nur wenn zwei solcher ausgekeimter haploider Mycelien ihren richtigen Kreuzungspartner finden und fusionieren, sind sie in der Lage, Fruchtkörper zu bilden. Die bis zu 23 000 verschiedenen »Geschlechter« innerhalb einer Art werden dabei durch Pheromone unterschieden. Nur durch die sexuellen Sporen aus den Fruchtkörpern ist eine Verbreitung vieler solcher Waldpilze über die Reichweite ihres Mycels hinaus möglich (Freihorst et al. 2016).

Über 90 % aller Landpflanzen sind mit Mykorrhizapilzen assoziiert (Smith & Read 2008). Dies allein zeigt schon die Wichtigkeit der Symbiose im natürlichen Lebensraum. Eine weitere Funktion liegt in der Stabilisierung des Ökosystems: Durch das Pilzmycel werden verschiedene Pflanzen vernetzt und damit der Wasserbedarf und die Nährstoffversorgung ausgeglichen (Kothe et al. 2013). Fossile Befunde weisen für die Symbiose der arbuskulären Mykorrhiza mit krautigen Pflanzen auf ein Alter von über 460 Millionen Jahren hin, sodass diese schon beim Landgang der ersten Pflanzen eine Rolle gespielt hat (Simon et al. 1993).

Im Folgenden sollen insbesondere die Ektomykorrhizapilze betrachtet werden, die mit verholzenden Pflanzen assoziiert sind. Diese Gruppe zeigt eine hohe Wirtsspezifität, sodass sich molekulare Kommunikationsstrategien spezifisch in einer Co-Evolution entwickelt haben können.

Funktion der Mykorrhiza und Wirtsspezifität

Bei der Mykorrhiza handelt es sich um eine Interaktion zwischen einem Pilz und einer Pflanze. Ich hätte den Beitrag, passend zum Standort Jena, auch mit »Wahlverwandtschaften« überschreiben können: Ein Birkenpilz (*Leccinum scabrum*) wächst nur unter einer Birke, wie jeder Pilzsammler weiß, und der Bärtige Ritterling (*Tricholoma vaccinum*, Abb. 1a), mit dem wir arbeiten, wächst unter Fichten (*Picea abies*); nur ganz selten ist ein Fruchtkörper unter einer Kiefer (*Pinus sylvestris*) zu finden. Wir wissen, dass die Bäume relativ unselektiv sind und sozusagen jeden Mykorrhizapilz nehmen würden, aber die Pilze sind unterschiedlich wirtsspezifisch. Wir haben *T. vaccinum* als Untersuchungsobjekt ausgesucht, weil er eine hohe Wirtsspezifität besitzt und sehr gut zwischen unterschiedlichen Wirten unterscheiden kann.

In der Mykorrhiza kommunizieren der Pilz und der Baum und wie in den »Wahlverwandtschaften« können andere Partner dazwischenkommen oder ein Anderer stört die Kommunikation in der Beziehung und beeinflusst sie so – in unserem Fall wären dies die Pilze und Bakterien, die ebenfalls in der Mykorrhizosphäre vorkommen.

Im Folgenden betrachten wir Basidiomyceten (Ständerpilze), große, hutbildende Pilze, die eine Ektomykorrhiza mit Waldbäumen ausbilden. Die Kurzwurzeln der Bäume werden infiziert (Abb. 1b), es bildet sich ein Hyphenmantel (Abb. 1c), der auch Schutz vor Phytopathogenen in der Umgebung bieten kann, aber insbesondere wächst der Pilz zwischen die Zellen ein. Im Extrazellularraum bildet er das so genannte Hartig'sche Netz (Abb. 1c), an dem der Stoffaustausch stattfindet.

In der Mykorrhiza findet eine Übergabe statt – Nährstoffe werden vom Pilz an den Baum übergeben und umgekehrt. Die Aufnahme von Nährstoffen wie z. B. Stickstoff, Phosphor, Magnesium oder anderen Mikronährelementen, Aminosäuren, aber auch Wasser findet außerhalb der Mykorrhiza im Bodenmycel statt, die Weiterleitung erfolgt im Mycel (bei *Tricholoma* werden dazu so genannte Rhizomorphen ausgebildet, Abb. 1d) und die Abgabe im Hartig'schen Netz; die aufgenommenen Nährstoffe werden dann im Baum weitertransportiert. Der vom Baum assimilierte Kohlenstoff wird dagegen dem Pilz zur

Verfügung gestellt. In der Pflanze ist Saccharose die Transportform der Photosyntheseprodukte zur Wurzel, sie wird zusammen mit der Invertase ausgeschieden, sodass das Disaccharid in der Zellwand der Pflanze gespalten werden kann. Der Pilz ist dazu nicht in der Lage, sondern braucht die Aktivität vom Baum, um Saccharose verwerten zu können. Aus dem Apoplasten erfolgt dann die Aufnahme von Glucose und Fructose in den Pilz, der durch diese energiereichen Stoffe an einer anderen Stelle weiterwachsen kann.

In allen drei Gruppen der Gattung *Tricholoma*, die sich durch ihre Hutkappenfarbe (braun, gelb oder grau) gut voneinander unterscheiden lassen, gibt es kompatible, d. h. voll funktionsfähige Assoziationen, vor allem mit Nadelbäumen. Über phylogenetische Analysen, verknüpft mit Angaben zur Wirtsspezifität, konnten wir jedoch zeigen, dass der ursprüngliche Wirt ein Laubbaum war, die Buche (*Fagus*). Der Wechsel auf einen Nadelbaum als Wirt hat somit mehrfach unabhängig stattgefunden. Im Fall von *T. vaccinum* ist der Hauptwirt die Fichte, während seltener auch die Kiefer als schwach kompatibler Wirt dienen kann, d. h., eine Assoziation kann auch mit der Kiefer erfolgen. In diesem Fall ist aber das Hartig'sche Netz nur schwach ausgeprägt und es werden nur selten Fruchtkörper gebildet.

Vom Genom über das Proteom zum Sekretom

Als wir begonnen haben, an *T. vaccinum* zu arbeiten, standen für den Vergleich und die Genomannotation, d. h. die funktionelle Zuordnung der Gene, nur drei Genome von Ektomykorrhizapilzen zur Verfügung: von den beiden Basidiomyceten *Laccaria bicolor* (Zweifarbiger Lacktrichterling) und *Paxillus involutus* (Kahler Krempling) und von dem Ascomyceten *Tuber melanosporum* (Schwarze Trüffel). Das war nicht sehr ermutigend, da es sich bei allen drei um sehr große Genome handelte. *T. melanosporum* hat mit 125 Mb (7500 Gene) ein sehr großes Genom mit unglaublich vielen Transposons, mobilen genetischen Elementen, und Verdopplungen, was eine Genomannotation extrem schwierig macht. Das Genom von *L. bicolor* ist mit 19 000 Genen relativ groß für einen Basidiomyceten, aber mit 65 Mb etwas besser zu handhaben. *P. involutus* schließlich hat mit 23 Mb und 7700 Genen das kleinste Genom der drei Pilze. Die Sequenzierung



Abb. 1. *Tricholoma vaccinum* (Bärtiger Ritterling): **a**, Fruchtkörper, **b**, mykorrhizierte Kurzwurzel, **c**, Querschnitt durch eine Wurzel mit Hyphenmantel (M) und Hartig'schem Netz (H), **d**, Co-Kultur mit Fichte und mykorrhizierten Kurzwurzeln sowie Rhizomorphen (R); das Insert zeigt Rhizomorphen in einer Reinkultur ohne Baumpartner. – Fotos: a, H. Krisp, CC-BY 3.0; b–d, Katrin Krause.

von *T. vaccinum* ergab 44 192 576 bp (44 Mb) und 11 981 annotierte Gene. Wenn wir die Kommunikation untersuchen wollen, interessieren uns einerseits volatile Substanzen, die vom Pilz produziert werden, andererseits die von ihm sekretierten Proteine. Als sekretiert wurden 1714 Proteine vorhergesagt, d. h. ca. 10 % der

Tab. 1. Anzahl der im Sekretom identifizierten Proteine aus *Tricholoma vaccinum* und ihre funktionelle Zuordnung.

Anzahl der Proteine	Funktionelle Zuordnung bzw. Struktur
8	Saprophytische Lebensweise, Energiestoffwechsel
5	Zellwandabbau
2	Detoxifizierung
1	Funktion noch unbekannt
3	Keine bekannten Proteindomänen vorhanden
6	Keine vorhergesagte extrazelluläre Lokalisierung

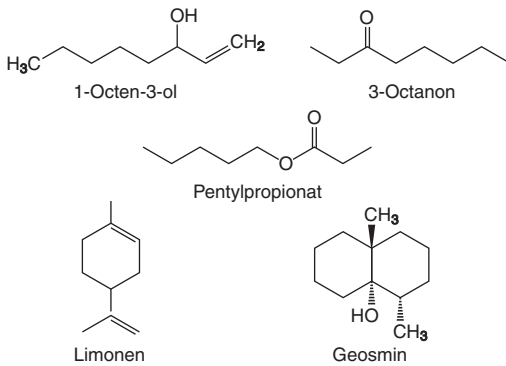


Abb. 2. Komponenten des Volatiloms von *Tricholoma vaccinum*.

genomischen Proteine (Wagner et al. 2015). Darunter sind jedoch nur 297 Proteine (1,7 % der genomischen Proteine) mit einer extrazellulären Lokalisierung.

Darauf aufbauend haben wir Proteomuntersuchungen durchgeführt. Mithilfe einer 2D-Gelelektrophorese haben wir 26 dieser sekretierten Proteine identifizieren können, wobei eines mit zwei unterschiedlichen Proteinmodifizierungen auftrat (Tab. 1). Sieben dieser 25 Proteine sind durch Fichtenwurzelexsudate induzierbar, d. h., die Interaktion in der Mykorrhiza hat einen großen Einfluss auf die Genregulierung innerhalb des Pilzes. Induziert werden z. B. eine Zinkpeptidase und die Malatdehydrogenase, reprimiert werden zellwandabbauende Enzyme wie eine exo- β -1,3-Glucanase und die Glykosid-Dehydratase. Zusätzlich gab es neun Hydrophobingene (s. u.), die offensichtlich ebenfalls differenziell reguliert werden.

Wir haben auch das Volatilom von *T. vaccinum* in Reinkultur untersucht, also das, was als »Pilzduft« wahrnehmbar ist (Abb. 2). Darunter finden sich Substanzen, die für Pilze unüblich sind, z. B. Geosmin, das eigentlich aus dem Geruch von Erde bekannt ist und das von Bakterien der Gattung *Streptomyces* produziert wird.

Hydrophobinexpression im Pilz

Dass Hydrophobine von Pilzen gebildet und exkretiert werden, ist schon länger bekannt (Wessels et al. 1991). Es handelt sich um amphipathische Proteine, die zunächst als exkretiertes Monomer löslich sind, sich aber, sobald sie an eine Grenzfläche zwischen hydrophob und

hydrophil kommen, in eine aggregierte Monolayer umformen, welche die Hyphen umkleidet und es ihnen z. B. ermöglicht, in einer Petrischale aus dem Wasser heraus in die Luft zu wachsen. Es ist auch bekannt, dass Hydrophobine z. B. für die Anheftung eines pathogenen Pilzes auf einer Kutikula einer Wirtspflanze notwendig sind.

Was haben Hydrophobine mit Mykorrhiza zu tun? Eigentlich sollte die Ausbildung einer solchen Lage den Nährstoffaustausch behindern, d. h., die Hydrophobine haben vermutlich in der Mykorrhiza noch eine andere wichtige Funktion. Um dieser Frage nachzugehen, hatten wir die Möglichkeit, Antikörper gegen das Hydrophobin eines anderen Pilzes zu benutzen. Es zeigte sich, dass Hydrophobin bei der Mykorrhizierung von *T. terreum* (Gemeiner Erd-Ritterling) mit Kiefer als seinem Hauptwirt tatsächlich im Hyphenmantel rund um die Wurzel gebildet wird, aber auch im Hartig'schen Netz, wo der Stoffaustausch stattfindet (Abb. 3a; Mankel et al. 2002). In einer Interaktion mit Fichte, die bei *T. terreum* nur als schwach kompatibler Wirt auftritt, finden wir die Expression dagegen nur im Hyphenmantel (Abb. 3b). Das heißt, dass die Hydrophobinexpression eher positiv für die Mykorrhizierung wirkt. In der Tat können Hydrophobine Hyphen verkleben. Wenn ein so dichtes Netzwerk von Hyphen benötigt wird, damit die Interaktionsfläche zwischen dem Baum und dem Pilz ausgebildet werden kann, so müssen die Hyphen aneinanderkleben. Dies kann auch dadurch vermittelt werden, dass sich zwei hydrophobe Seiten aneinanderlagern und die hydrophilen Seiten jeweils zu den beiden Pilzzellen hin orientiert sind.

Die Überlegung wird unterstützt durch Modellierung. Es gibt verschiedene Möglichkeiten für die Strukturen, die Hydrophobine ausbilden können. Die am besten bekannte ist die Form kleiner Nano-Röhrchen, Rodlet-Layer genannt, die die Hyphenoberfläche wasserabweisend macht und, wie oben beschrieben, das Einwachsen in Luft ermöglicht. Im Falle der Mykorrhiza werden aber zwei andere Formen vorhergesagt, die Hydrophobinmoleküle ebenfalls ausbilden können (Sammer 2016). Diese beiden vorhergesagten Strukturen sind bisher nicht experimentell gezeigt worden. Da aber für die Hyphenaggregation in der Mykorrhiza eine leicht abgewandelte Funktion notwendig wäre, sind diese beiden anderen Formen in ihrer Funktion sicher interessant.

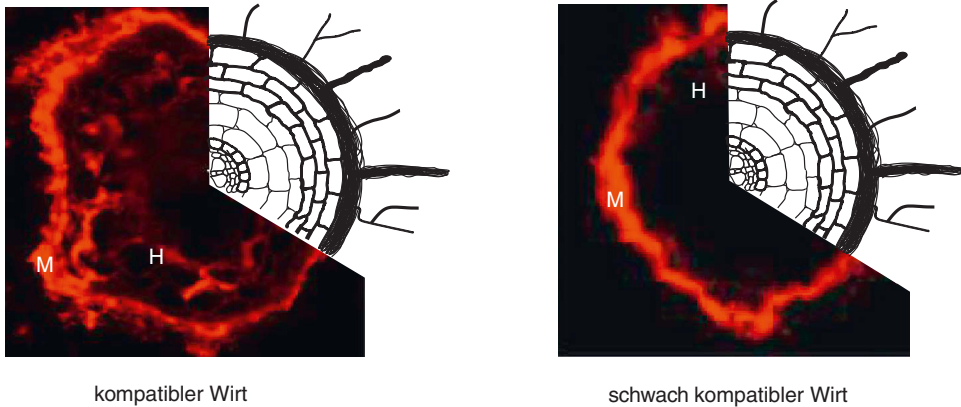


Abb. 3. Hydrophobine im Wurzelquerschnitt der Mykorrhiza von *Pinus sylvestris* (kompatibler Wirt, **a**) und *Picea abies* (schwach kompatibler Wirt, **b**) mit *Tricholoma terreum* nach Immunfluoreszenzfärbung mit rhodaminmarkierten anti-Hydrophobin-Antikörpern. Die Expression im Mantel (M) und Hartig'schen Netz (H) ist in den beiden Bäumen unterschiedlich. – Nach Mankel et al. (2002).

Die Antwort auf den kompatiblen Baum, die durch die Expression gezeigt wurde, ist ein erster Hinweis auf eine solche mögliche, neue Funktion, die dazu beiträgt, die verklebten Hyphen im Hartig'schen Netz auszubilden.

Hydrophobine als Reaktion auf Signale vom Baum zum Pilz

Welche Signale des Baumes induzieren nun die Bildung der verschiedenen Hydrophobine? Der Pilz in Reinkultur bildet einige der neun Hydrophobine, andere nicht. In der Mykorrhiza ist ein bestimmtes Hydrophobin hochreguliert; wird der allein lebende Pilz jedoch mit dem Volatilom des Baumes stimuliert, wird ein neues Hydrophobin deutlich früher gebildet. Bei der Zugabe von Wurzelexsudaten, also löslichen, nicht volatilen Stoffen, werden wieder andere Hydrophobine induziert. Und im Fruchtkörper sind wieder andere Hydrophobine nachweisbar. Eine Übersicht über die verschiedenen Hydrophobine, die durch *T. vaccinum* gebildet werden, lässt sich damit unterschiedlichen Signalen des Baumes zuordnen (Abb. 4). Volatile oder Wurzelexsudate induzieren also unterschiedliche Hydrophobine im Pilz. Um ihre unterschiedliche Funktion aufzuklären, müssten wir eines der wirtsspezifischen Hydrophobine – z.B. Hydrophobin-5, das durch Zugabe von Wurzelexsudat induziert wird – ektopisch, d.h. außerhalb seines normalen Expressionsortes im Genom, überexprimieren. Dazu brauchen

wir ein Transformationssystem, was bei den Ektomykorrhizapilzen aufgrund ihres langsamen Wachstums relativ schwierig zu etablieren ist. Mittlerweile können wir jedoch *T. vaccinum* mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* transformieren (Asiimwe et al. 2012).

Sehr viele essbare Pilze wachsen wirtsspezifisch unter bestimmten Bäumen; nur dann können sie Fruchtkörper bilden und sich geschlechtlich fortpflanzen. Andererseits können wir Ektomykorrhiza-Speisepilze nicht kultivieren, weil wir die Wirtssignale nicht kennen. Würden wir das Wirtssignal kennen, könnten wir z.B. Steinpilze wie Champignons in Kultur produzieren. Immerhin können wir nun nach Stoffen suchen, die die Genexpression von Hydrophobinen induzieren.

Aldehyddehydrogenasen bilden Signale vom Pilz zum Baum

Die Signale vom Pilz zum Baum haben wir mithilfe differenzieller Genexpression getestet.

In der Mykorrhiza werden im Pilz verschiedene Aldehyddehydrogenasen induziert. Das klingt zunächst wenig spektakulär, man denke an den Abbau des toxischen Acetaldehyds zu Acetat im Zuge des Ethanolabbaus als »normale« Aktivität der ALDH. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass transformierte Pilzstämmen eine erhöhte Ethanoltoleranz besitzen gegenüber dem nicht transformierten Pilz (Asiimwe et al. 2012).

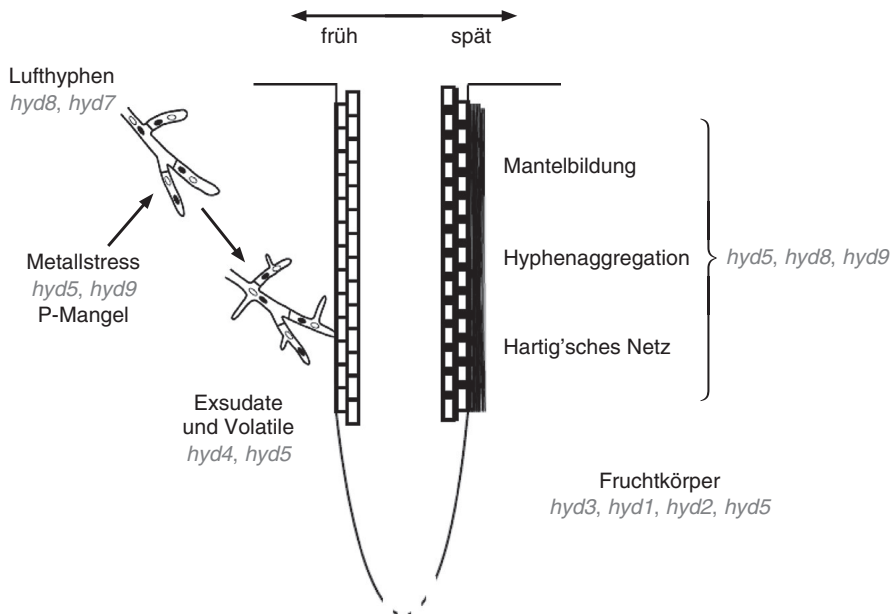


Abb. 4. Schematischer Überblick der neun Hydrophobine von *Tricholoma vaccinum*, die durch unterschiedliche Signale von außen oder vom Wirtsbaum induziert werden. – Nach Sammer (2016).

Dieselbe Enzymklasse ist aber auch für den Abbau toxischer Stoffwechselprodukte zuständig, die sich z.B. unter Wasserstress bilden. Wenn in dem gesamten Areal, das durch das Hyphenmycel vernetzt ist, ein Baum trocken und ein anderer, entfernter stehender Baum nass steht, kann der Wasserstress durch das Mycel ausgeglichen werden, ebenso wie beispielsweise Nährstoffmangel. Im Fall von Wasserstress führt dies dazu, dass das Waldökosystem deutlich stabiler ist, solange Mykorrhizapilze vorhanden

sind. Als vor etlichen Jahren Kalkungen gegen die Auswirkungen des sauren Regens durchgeführt worden waren, gab es negative Effekte, da das Kalken, d. h. das Ändern des Boden-pH-Wertes, zuallererst die Mykorrhizapilze betroffen hatte. Der Waldschaden war dadurch erst einmal 30 % größer als vorher (Lundström et al. 2003, Qian et al. 1998).

Wir haben nun nach weiteren Funktionen für Aldehyddehydrogenasen gesucht. Tatsächlich haben wir gefunden, dass eines dieser Enzyme an der Produktion des Pflanzenhormons Indol-3-essigsäure beteiligt ist. Der Biosyntheseweg von Indol-3-essigsäure im Pilz konnte aufgeklärt werden und wir konnten zeigen, dass diese aus der Aminosäure Tryptophan über verschiedene Intermediate mit einem Schritt, der eine Aldehyddehydrogenase benötigt (Abb. 5), gebildet wird (Krause et al. 2015).

Warum bildet *T. vaccinum* in Reinkultur ein Pflanzenhormon? Hat Indol-3-essigsäure einen Einfluss auf den Pilz selbst? Tatsächlich reagiert *T. vaccinum* mit der Expression von Ald1 auf Indol-3-pyruvat und Indol-3-acetaldehyd, die Zwischenprodukte in der Indol-3-essigsäure-Produktion. Dies bestätigt, dass es sich um ein in der Biosynthese beteiligtes und durch die Zwi-

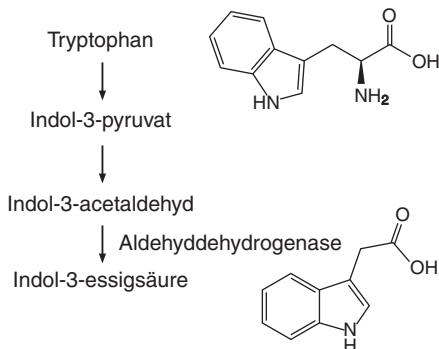


Abb. 5. Indol-3-essigsäure: Strukturformel und Biosyntheseweg in *Tricholoma vaccinum*.

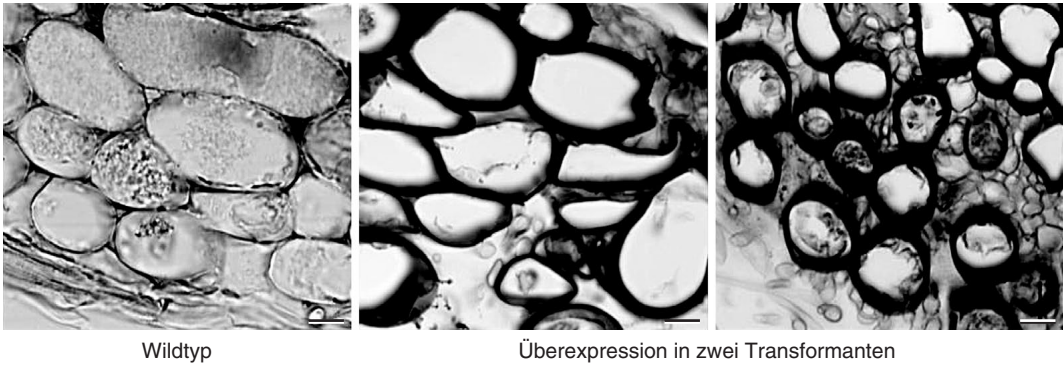


Abb. 6. Effekt der Überexpression einer Aldehyddehydrogenase auf die Mykorrhiza bei *Tricholoma vaccinum*; Größenbalken: 10 µm. – Nach Henke (2015).

schenprodukte induziertes Gen in *T. vaccinum* handelt. Noch interessanter ist jedoch, dass bei externer Zugabe von Indol-3-essigsäure oder ihrer Biosynthese-Zwischenprodukte die Zelllänge im Pilz steigt und mehr Verzweigungen gebildet werden (Krause et al. 2015). Um ein möglichst enges Hartig'sches Netz zu bilden, müssen sich die Hyphen des Mykorrhizapilzes stark verzweigen und miteinander verklebt werden (s.o.: Hydrophobine). Der Pilz reagiert in der Tat auf ein Pflanzenhormon mit einem veränderten Verzweigungsmuster. Als Kontrollexperiment haben wir saprophytische Pilze getestet. Sie zeigen im Gegensatz zum Mykorrhizapilz *T. vaccinum* keine Reaktion auf extern zugegebene Indol-3-essigsäure.

An Transformanten von *T. vaccinum* konnten wir darüber hinaus zeigen, dass eine Überexpression einer Aldehyddehydrogenase zu einem dickerem Hyphenmantel und einem deutlich breiteren Hartig'schen Netz in der Mykorrhiza führt (Abb. 6). Die überexprimierenden Mutanten sind ein Overkill, d. h., die Pflanzenzellen werden durch die dazwischen wachsenden Pilzzellen weit voneinander weggedrückt, was sicher nicht sehr funktionell ist. Es bestätigt aber die verbesserte Verzweigung und das stärkere Wachstum im Apoplasen, die als Funktion in der Mykorrhiza gefordert werden müssen.

Wenn Indol-3-essigsäure auf den Baum wirken soll, muss sie auch ausgeschieden werden, d. h., sie muss über einen Transporter aus dem Pilz heraus transportiert werden. Tatsächlich konnten wir einen entsprechenden Transporter finden, Mte1, aus der großen Familie der MATE-Transporter (multidrug and toxic compound

extrusion) (Schlunk et al. 2015). Wird Mte1 in Hefe exprimiert, wächst diese deutlich besser auf Indol-3-essigsäure als die untransformierte Hefe bzw. eine mit dem leeren Vektor transformierte Hefe.

Einfluss der Rhizosphären-Gemeinschaft

Welche anderen Organismen aus der Umgebung der mykorrhizierten Wurzel haben einen Einfluss auf die Mykorrhiza mit *T. vaccinum*? Um diese Frage zu beantworten, haben wir eine Biodiversitätsanalyse des Bodens in der Mykorrhizosphäre durchgeführt und dazu den Fundort genutzt, an dem wir in der Nähe von Jena *T. vaccinum* gefunden hatten. Erwartungs-

Tab. 2. In der Mykorrhizosphäre (Waldboden bei Jena) nachgewiesene Bakteriengruppen (OTUs: operational taxonomic units).

Bakteriengruppe	OTUs	relativer Anteil (%)
Firmicutes	102	7
Actinobacteria	668	44
α-Proteobacteria	454	30
β-Proteobacteria	135	9
γ-Proteobacteria	57	4
δ-Proteobacteria	17	1
Bacteroidetes	75	5
Nitrospirae	1	0
Andere	8	1
	1517	100

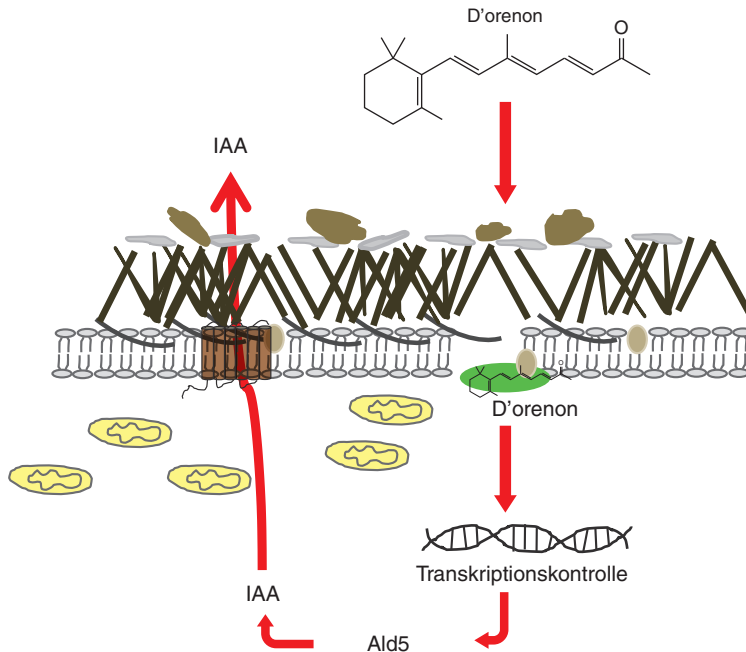


Abb. 7. Strukturformel von D'orenon und schematisches Modell zum Einfluss von D'orenon auf *Tricholoma vaccinum*. Erläuterungen siehe Text. – Nach Wagner (2016).

gemäß wird die Mykorrhizosphäre von Bakterien dominiert (1517 OTUs, operational taxonomic units), daneben kommen wenige Archaeen (10 OTUs) und einige Pilze (53 OTUs) vor. Bei den Bakterien sind die Actinobakterien (Tab. 2) die dominante Gruppe, was bei einem Waldboden nicht erstaunlich ist.

Um den Einfluss von *T. vaccinum* auf diese bakterielle Gemeinschaft zu untersuchen, haben wir Boden mit dem Pilz inkubiert. Stammt der Boden aus der Mykorrhizosphäre mit toten Bäumen, so enthält er durch den toten Baumsämling etwas mehr Nährstoffe und dann auch etwas mehr Bakterien als ein Boden unter lebenden Bäumen. Dagegen zeigte das Beimpfen mit dem Zygomyceten *Mucor mucedo*, der kein Lignin abbauen kann, keine Wirkung. Mit *T. vaccinum* dagegen steigt die Bakterienzahl in der Mykorrhizosphäre mit toten Bäumen stark an. Das bedeutet, dass der tote Baum von dem auch saprophytisch lebensfähigen Pilz *T. vaccinum* abgebaut werden kann und damit der mikrobiellen Gemeinschaft viel mehr Nährstoffe im Lebensraum zur Verfügung stehen. Dies führt zu einer deutlichen Vermehrung der Bakterien im Vergleich zu Boden aus der Mykorrhizosphäre

mit einem lebenden Baum. Diesen frisst der Pilz offenbar nicht an und stellt damit keine zusätzlichen Nährstoffe für Bakterien zur Verfügung.

Das Signalmolekül D'orenon

Auf der Suche nach Signalmolekülen in dieser Rhizosphären-Lebensgemeinschaft haben wir zunächst nach so genannten Mykorrhiza-Helfer-Bakterien gesucht, d.h. nach Bakterien, die die Mykorrhizierung unterstützen. Tatsächlich konnten wir bei den bakteriellen Isolaten eine ganze Reihe solcher mit Eigenschaften finden, die das Pflanzenwachstum fördern, u. a. mit der Fähigkeit zur Produktion von Siderophoren zur besseren Eisenversorgung, zur Stickstofffixierung, zur Mobilisierung von Phosphat, zur Produktion von Antibiotika und zur Produktion von Indol-3-essigsäure mit oder ohne Tryptophan. Neben den bakteriellen Isolaten waren Zygomyceten eine der Hauptgruppen, die wir isolieren konnten. Zygomyceten – zu ihnen gehört z. B. der Gemeine Brotschimmel (*Rhizopus stolonifer*) – sind eigentlich am Abbau von organischer Substanz beteiligt. Sie sind dafür bekannt, dass sie im Laufe ihrer geschlechtlichen Vermehrung ein

Morphogen, die Trisporsäure, produzieren, das die Bildung von Zygosporien einleitet.

Allgemein sind Trisporoide also morphogenetische Substanzen in der Kreuzung der Zygomyceten. Ein Zwischenprodukt der Trisporoidbiosynthese wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Boland am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena synthetisiert. Dieses, D'orenon genannte Zwischenprodukt (Abb. 7) entsteht aus der Spaltung von Carotin auf dem Weg zu Trisporoiden.

Wir konnten nun zeigen, dass D'orenon tatsächlich einen Einfluss auf die Mykorrhiza hat. Es verstärkt bei *T. vaccinum* u. a. die Verzweigung der Hyphen, die Zahl an Mitochondrien an der Hyphenspitze und die Menge an sekretierter Indol-3-essigsäure. Ein Modell zur Wirkung von D'orenon (Abb. 7) zeigt die bereits oben besprochene Bildung von Indol-3-essigsäure durch den Mykorrhizapilz *T. vaccinum*. Dieses Pflanzenhormon wird exkretiert. Gelangt nun D'orenon zu einem noch unbekannten Rezeptor auf oder in der Zelle, verstärkt es die Transkription und Produktion der für die Mykorrhiza induzierten Aldehyddehydrogenase. Diese verstärkte Expression wiederum führt zu einer verstärkten Produktion und Exkretion von Indol-3-essigsäure. Es gibt also tatsächlich einen Einfluss der Rhizosphären-Lebensgemeinschaft auf die Mykorrhiza: Der Zygomycet erhöht die Indolelessigsäureproduktion und damit die Fähigkeit des Mykorrhizapilzes, mit dem Baum zu interagieren und eine Mykorrhiza zu bilden.

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass D'orenon die Zelllänge der Wurzelrindenzellen, den Durchmesser der Wurzel und der Wurzelspitze sowie die Dicke des Hyphenmantels erhöht. Das heißt, D'orenon aus Zygomyceten hat einen Einfluss auf den Pilz, der dadurch besser mykorrhizieren kann. Gleichzeitig wirkt es auf den Baum, der mehr Kurzwurzeln bildet, die mykorrhiziert werden können. Für die Mykorrhiza folgt daraus insgesamt die Bildung eines dickeren Hyphenmantels (Wagner et al. 2016).

Pflanzenhormone in der Mykorrhizosphäre

Indol-3-essigsäure ist nicht das einzige Pflanzenhormon, das von *Tricholoma* gebildet werden kann und das in dem Habitat der Mykorrhizosphäre vorkommt. Neben Indol-3-essigsäure

konnten wir die Produktion von Jasmonat, Ethylen, Abscisinsäure und Salicylsäure in *T. vaccinum* nachweisen, für Gibberellin konnten wir das Biosynthesegen zeigen (Wagner 2016). Interessanterweise werden keine Cytokinine (als Gegenspieler der Abscisinsäure) gebildet. Weiter wurde eine funktionelle Verwandtschaft zwischen D'orenon und Strigolactonen gezeigt; weitere Pflanzenhormone können von den Bakterien und Pilzen in der Mykorrhizosphäre produziert werden. Damit können wir insgesamt sagen, dass ein Einfluss einer ganzen Reihe von Pflanzenhormonen aus der Mykorrhizosphäre auf die Mykorrhizierung möglich ist und sich damit die Interaktion des Pilzes mit dem Baum verbessert.

Fazit

Zusammenfassend lässt sich für das System aus *Tricholoma vaccinum*, *Picea abies* und Mykorrhizosphäre festhalten, dass Phytohormone im Mykorrhizosphärenhabitat vorhanden sind und für den Signalaustausch und die Symbiose wichtig zu sein scheinen. *T. vaccinum* produziert viele Signale, die den Baum beeinflussen: Phytohormone, volatile Substanzen und verschiedene sekretierte Proteine (u. a. Effektoren und zellulolytische Enzyme), die die Mykorrhizierung steuern können. Der Baum dagegen bildet Signalmoleküle, die spezifische Hydrophobingene induzieren und damit möglicherweise ein Beispiel für die Erkennung spezifischer Pflanzensignale darstellen, die für die Wirtsspezifität und für die Fruchtkörperbildung des Pilzes wichtig sind. Rhizosphärenpilze können morphogenetische Substanzen wie D'orenon produzieren und damit die Symbiosepartner der Ektomykorrhiza (u. a. durch den Indolelessigsäure-Flux) und andere Signale beeinflussen. D'orenon zeigt strigolacton-ähnliche Eigenschaften und kann als Signal zwischen dem Pilz- und dem Pflanzenreich wirken.

Danksagung

Katharina Wagner, Catarina Henke, Dominik Senftleben und Katrin Krause haben zu diesen Arbeiten beigetragen. Die Autorin dankt Prof. Dr. Wilhelm Boland, der IMRPS und dem Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie sowie der Jena School for Microbial Communication für die Unterstützung der Arbeiten.

Literatur

- Asiimwe, T., K. Krause, I. Schlunk & E. Kothe. 2012. Modulation of ethanol stress tolerance by aldehyde dehydrogenase in the mycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*. – *Mycorrhiza*, 22(6): 471–484.
- Freihorst, D., T. J. Fowler, K. Bartholomew, M. Raudaskoski, J. S. Horton & E. Kothe. 2016. The mating-type genes of the basidiomycetes. – In: Wendland, J. (ed.): *The Mycota*, Vol. I: Growth, differentiation and sexuality. Springer, Heidelberg: 329–349.
- Henke, C. 2015. Ectomycorrhizal signaling: the role of indole-3-acetic acid and dehydrogenases in the basidiomycete *Tricholoma vaccinum*. – Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Henke, C., E. M. Jung, A. Voit, E. Kothe & K. Krause. 2016. Dehydrogenase genes in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*: A role for Ald1 in mycorrhizal symbiosis. – *Journal of Basic Microbiology*, 56(2): 162–174.
- Kothe, E., I. Schlunk, D. Senftleben & K. Krause. 2013. Ectomycorrhiza-specific gene expression. – In: Kempken, F. (ed.): *The Mycota*, Vol. XI: Agricultural Applications, 2nd edition. Springer, Berlin: 295–312.
- Krause, K., C. Henke, T. Asiimwe, A. Ulbricht, S. Klemmer, D. Schachtschabel, W. Boland & E. Kothe. 2015. Biosynthesis and secretion of indole-3-acetic acid and its morphological effects on *Tricholoma vaccinum*-spruce ectomycorrhiza. – *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20): 7003–7011.
- Lundström, U. S., D. C. Bain, A. F. S. Taylor, P. A. W. van Hees, C. A. Geibe, S. J. M. Holmström, P.-A. Melkerud, R. Finlay, D. L. Jones, L. Nyberg, J. P. Gustafsson, G. Riise & L. Tau Strand. 2003. Effects of acidification and its mitigation with lime and wood ash on forest soil processes in Southern Sweden. A joint multidisciplinary study. – *Water, Air, and Soil Pollution, Focus* 3: 167–188.
- Mankel, A., K. Krause & E. Kothe. 2002. Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. – *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1408–1413.
- Qian, X. M., I. Kottke & F. Oberwinkler. 1998. Influence of liming and acidification on the activity of the mycorrhizal communities in a *Picea abies* (L.) Karst. stand. – *Plant and Soil*, 199(1): 99–109.
- Sammer, D. 2016. Molecular characterization of hydrophobins from the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*. – Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Schlunk, I., K. Krause, S. Wirth & E. Kothe. 2015. A transporter for abiotic stress and plant metabolite resistance in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*. – *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24): 19384–19393.
- Simon, L., J. Bousquet, C. Levesque & M. Lalonde. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. – *Nature*, 363(6424): 67–69.
- Smith, S. E. & D. Read. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. – 3rd edition, Academic Press, New York, 800 pp.
- Smith, M. L., J. N. Bruhn & J. B. Anderson. 1992. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. – *Nature*, 356(6368): 428–431.
- Wagner, K. 2016. Chemical communication between soil microorganisms, basidiomycetes and their tree host. – Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Wagner, K., J. Linde, K. Krause, M. Gube, T. Koestler, D. Sammer, O. Kniemeyer & E. Kothe. 2015. *Tricholoma vaccinum* host communication during ectomycorrhiza formation. – *FEMS Microbiology Ecology*, 91(11): fiv120; doi:10.1093/femsec/fiv120.
- Wagner, K., K. Krause, A. David, M. Kai, E. M. Jung, D. Sammer, O. Kniemeyer, W. Boland & E. Kothe. 2016. Influence of zygomycete-derived D'orenone on IAA signaling in *Tricholoma*-spruce ectomycorrhiza. – *Environmental Microbiology*, 18(8): 2470–2480.
- Wessels, J. G. H., O. M. H. de Vries, S. A. Ásgeirsdóttir & F. H. J. Schuren. 1991. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. – *Plant Cell*, 3(8): 793–799.

Diskussion

E. Grill: Ist D'orenon wirklich ein Morphogen, das tatsächlich die Anzahl der Verzweigungen und die Zelllänge verändert? Könnte es nicht sein, dass es nur eine Vorstufe ist, die hier eingreift?

E. Kothe: Ein Morphogen ist es innerhalb der Zygomyceten. Dort wird durch D'orenon, respektive durch Trisporoide, die Bildung von verschlungenen Strukturen ausgelöst, aus denen sich die Zygosporangien entwickeln. Für die Ektomykorrhizapilze können wir in der Tat nicht sagen, ob D'orenon direkt als Morphogen wirkt.

M. Müller: Inwieweit sind die gezeigten Beobachtungen von der Nährkraft und den Wasserverhältnissen des forstlichen Standortes abhängig? In der Umgebung von Jena haben wir vor allem Muschelkalk und es gibt dort keine natürlichen Fichtenwälder. Um Fichte am natürlichen Standort zu beproben, hätten Sie eher in die Kammlagen des Thüringer Waldes gehen müssen. Haben Sie solche Vergleiche durchgeführt?

E. Kothe: Die vorgestellten Ergebnisse zur Mykorrhizosphäre stammen tatsächlich nur aus dem Boden im Münchener Forst auf Muschelkalk. Wir haben auch Untersuchungen im Thüringer Wald durchgeführt, die aber noch nicht abgeschlossen sind. Aber das Prinzip greift auch dort – genauso wie in den Laborexperimenten.

A. Mithöfer: Strigolacton ist auch als »branching factor« für Pilze beschrieben worden. Kann man die Daten dahingehend interpretieren, dass Strigolactone auch den Gehalt von Indol-3-essigsäure in den Pilzen erhöhen? Dass also letztlich alles von Indol-3-essigsäure induziert ist und die Strigolactone bzw. das D'orenon dabei nur eine vermittelnde Rolle spielen?

E. Kothe: Das ist eine schwierige Frage. Denn auch Indol-3-essigsäure erhöht ja den Verzweigungsgrad im Pilz. Die angesprochene Wirkung als »branching factor« wurde bisher nur für die arbuskuläre Mykorrhiza (AM) gezeigt und nicht für Ektomykorrhizapilze, sodass es einen Unterschied geben könnte.

J. Ruther: Die Pilze, die ich als Lebensmittelchemiker kenne, haben eine eigene Invertase und können sehr gut mit Saccharose umgehen. Ist die Invertase irgendwann in der Entwicklung verlorengegangen?

E. Kothe: Die Idee ist tatsächlich, dass es sich um eine Anpassung an die Symbiose mit der Pflanze handelt.

