

**Identifizierung von Virulenzgenen des Maispathogens *Colletotrichum graminicola*
(Ces.) Wilson durch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

vorgelegt der Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dipl. Biol. Steffen Münch
geb. am 08.02.1978 in Erfurt

Gutachterinnen / Gutachter

1. Prof. Dr. Klaus Humbeck
2. Prof. Dr. Holger B. Deising
3. Prof. Dr. Erika Kothe

Halle (Saale), 28.08.2012

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XII
Anmerkungen zur Schreibweise	XIII

A	Einleitung	1
A.1	<i>Colletotrichum graminicola</i> ist ein wirtschaftlich relevantes Pathogen	1
A.2	Biologie von <i>Colletotrichum graminicola</i>	1
A.2.1	Saisonaler Verlauf der Blattflecken- und Stängelfäulekrankheit	1
A.2.2	Verlauf der Infektion von Mais	2
A.3	Virulenz- und Pathogenitätsgene phytopathogener Pilze	6
A.3.1	Signaltransduktion während der pathogenen Interaktion	6
A.3.2	Gene zur Etablierung einer kompatiblen Interaktion	7
A.3.3	Gene zur Ausbildung der nekrotrophen Interaktion	12
A.4	Methoden zur Identifizierung von Virulenzgenen	13
A.4.1	Zufallsmutagenesen	14
A.5	Sekretion von Virulenzfaktoren	17
A.5.1	Aufbau und Assemblierung der V-ATPase	17
A.5.2	Funktionen der V-ATPase	19
B	Ziele der Arbeit	21
C	Material und Methoden	22
C.1	Biologisches Material	22
C.1.1	<i>Colletotrichum graminicola</i>	22
C.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
C.1.3	<i>Zea mays</i>	22
C.1.4	Bakterienkulturen	23
C.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	23
C.2.1	Nährmedien	23
C.2.2	Puffer	25
C.2.3	Lösungen	27
C.3	Plasmide	28
C.4	Oligonukleotide	29
C.4.1	pPK2-Primer	29
C.4.2	<i>CgAAF1</i> -Primer	30
C.4.3	Sonstige Primer	31
C.5	Infektions- und Wachstumsversuche	32
C.5.1	Pflanzeninfektionen und Virulenztests	32
C.5.1.1	Herstellung des Inokulums	32
C.5.1.2	Inokulation von Mais und Kultivierung	32
C.5.1.3	Symptomaufnahme und Ernte inokulierter Blätter	33

C.5.1.4	Untersuchung der Infektionsstrukturen.....	34
C.5.2	Zytorrhizie.....	34
C.5.3	Wachstumsversuche	35
C.6	Molekularbiologische Methoden	35
C.6.1	Präparation von Nucleinsäuren.....	35
C.6.1.1	Präparation genomischer DNA.....	35
C.6.1.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	36
C.6.1.3	Präparation von RNA	36
C.6.2	Gelelektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren.....	37
C.6.2.1	DNA-Elektrophorese	37
C.6.2.2	RNA-Elektrophorese	37
C.6.3	Southern-Hybridisierung	38
C.6.3.1	Herstellung von Sonden.....	38
C.6.3.2	Restriktion und Gelelektrophorese	38
C.6.3.3	Transfer	39
C.6.3.4	Hybridisierung	39
C.6.3.5	Detektion der Sonde	39
C.6.4	PCR.....	40
C.6.4.1	Standard-PCR.....	40
C.6.4.2	DJ-PCR zur Erstellung von Transformationskassetten.....	41
C.6.4.3	Genomic Walking	43
C.6.4.4	RT-PCR	44
C.6.4.5	Quantitative RT-PCR	45
C.6.4.6	Quantitative PCR	46
C.6.5	Klonierung	48
C.6.5.1	Erzeugung von DNA-Fragmenten und Ligation in den Klonierungsvektor ...	48
C.6.5.2	Transformation von <i>E. coli</i>	48
C.6.5.3	Kolonie-PCR	49
C.6.6	Sequenzierung und Sequenzanalyse	49
C.6.7	Identifizierung der T-DNA-Integrationsstellen.....	51
C.6.8	Protoplastentransformation.....	52
C.6.8.1	Gewinnung von Protoplasten von <i>C. graminicola</i>	52
C.6.8.2	Transformation und Selektion	53
C.6.8.3	Gewinnung von Einzelsporisolaten	53
C.6.9	Gezielte Mutagenese-Strategien für <i>C. graminicola</i>	53
C.6.9.1	Deletion von <i>CgAAF1</i>	53
C.6.9.2	Komplementation von Δ Cgaaf1	54
C.6.9.3	<i>CgAAF1:eGFP</i> Fusion	55
C.6.10	Komplementation von <i>S. cerevisiae</i>	56
C.6.10.1	Erzeugung des Transformationsvektors.....	56
C.6.10.2	Transformation	57
C.6.10.3	Komplementationsanalyse.....	58

C.7	Mikroskopie und Fotografie	58
C.7.1	Lichtmikroskopie.....	58
C.7.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	58
C.7.3	Färbetechniken.....	59
C.7.4	Fotografie und Bildbearbeitung.....	59
C.8	Datenauswertung	59
D	Ergebnisse	60
D.1	Erzeugung einer <i>C. graminicola</i> Transformantenbank durch ATMT und ihre Charakterisierung	60
D.1.1	Häufigkeit und Modus der T-DNA Integration in das Genom von <i>C. graminicola</i>	60
D.2	Identifizierung und Charakterisierung von virulenzdefizienten Mutanten aus der Transformantenbank	63
D.2.1	Identifizierung von 19 Mutanten mit Virulenzdefizienz.....	63
D.2.2	Integrationsfrequenz der T-DNA in Virulenzmutanten.....	65
D.2.3	Identifizierung der genomischen T-DNA Insertionsstellen.....	67
D.2.3.1	Modifizierte C-Tailing-Sequenzierungsmethode.....	67
D.2.3.2	Identifizierung von weiteren T-DNA Integrationsstellen durch PCR-Fragmentsequenzierung.....	68
D.2.3.3	Validierung und Charakterisierung der identifizierten Disruptionsstellen in den Mutanten AT039 und AT171.....	70
D.2.4	Charakterisierung der Pathogenese ausgewählter Virulenzmutanten.....	71
D.2.4.1	Untersuchung der gebildeten Infektionsstrukturen.....	71
D.2.4.2	Untersuchung des Turgordrucks in Appressorien.....	73
D.2.4.3	Analyse der pflanzlichen Abwehr in AT039-infizierten Maisblättern.....	75
D.2.4.4	Nachweis von <i>CgAAF1</i> -Transkripten während der Infektion von Mais.....	76
D.3	Untersuchung der Bedeutung des V-ATPase Assembly Faktors <i>CgAAF1</i> für die Virulenz von <i>C. graminicola</i>	79
D.3.1	Sequenzierung von <i>CgAAF1</i> und seines Transkripts.....	79
D.3.2	<i>In silico</i> Analysen zur Struktur und Funktion von <i>CgAAF1</i>	80
D.3.3	Komplementation eines <i>PKR1</i> -defizienten Hefestammes mit <i>CgAAF1</i>	82
D.3.4	Deletion von <i>CgAAF1</i> in <i>C. graminicola</i>	83
D.3.5	Virulenz von <i>CgAAF1</i> defizienten Mutanten.....	85
D.3.5.1	Makroskopische Symptomanalyse.....	85
D.3.5.2	Mikroskopische Analyse der Infektionsstrukturen.....	87
D.3.5.3	Analyse der Papillenbildung als pflanzliche Abwehrreaktion.....	90
D.3.5.4	Symptomanalyse auf verwundeten Maisblättern.....	91
D.3.5.5	Untersuchung des Turgordrucks in Appressorien von <i>CgAAF1</i> defizienten Mutanten.....	92
D.3.5.6	Quantifizierung der Kolonialisierung der Pflanze als Maß der Virulenz.....	93

D.3.6	Axenisches Wachstum der <i>CgAAF1</i> defizienten Mutanten	95
D.3.7	Lokalisierung von <i>CgAAF1</i>	96
D.3.8	Komplementation der Mutante $\Delta Cgaa1$ mit <i>CgAAF1</i>	100
D.3.8.1	Virulenz der Komplementationsmutante	102
D.3.8.2	Axenisches Wachstum des komplementierten Isolats	103
E	Diskussion	105
E.1	ATMT als Methode zur Markierung und Identifizierung von Genen filamentöser Pilze	105
E.2	Effizienz der ATMT in <i>C. graminicola</i>	106
E.2.1	Transformationseffizienz.....	107
E.2.2	Integrationsfrequenz und Integrationsmuster	107
E.2.3	Einfluss des Bakterienstammes und des Ti-Plasmids	108
E.2.4	Einfluss des Induktors Acetosyringon	109
E.3	Identifizierung von <i>C. graminicola</i> Virulenzmutanten durch ATMT	110
E.3.1	Untersuchung der T-DNA Integrationen in den Virulenzmutanten.....	111
E.3.1.1	T-DNA Integrationsmuster.....	111
E.3.1.2	Zufälligkeit der T-DNA Integration	112
E.3.1.3	Effizienz der Markierung von virulenzrelevanten genomischen Bereichen	113
E.3.1.4	Identifizierung von Virulenzgenen	113
E.4	Charakterisierung von Virulenzmutanten	114
E.4.1	Die Allantoicase als Virulenzdeterminante in <i>C. graminicola</i>	114
E.4.2	Ein hypothetisches Protein als Virulenzdeterminante in <i>C. graminicola</i>	117
E.4.3	Ein V-ATPase Assembly Faktor als Virulenzdeterminante in <i>C. graminicola</i> .	117
E.4.3.1	Charakterisierung der reduzierten Virulenz in $\Delta Cgaa1$	118
E.4.3.2	Genetische Komplementation der Deletion von <i>CgAAF1</i>	120
E.4.3.3	<i>CgAAF1</i> komplementiert PKR1 in Hefe und lokalisiert in der ER-Membran.....	121
E.4.3.4	$\Delta Cgaa1$ zeigt reduziertes Wachstum auf Medien mit definierten C-Quellen.....	121
E.4.3.5	<i>CgAAF1</i> ist vermutlich für die Sekretion bedeutsam.....	123
F	Zusammenfassung	125
G	Literatur	127
H	Anhang	139
ATMT-Protokoll für <i>C. graminicola</i>		139
Abbildungsnachweis.....		140
Erklärung.....		141
Danksagung		142
Lebenslauf		143
Eigene Publikationen.....		144

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure(n)
aaf	V-ATPase Assembly Faktor-Gen aus <i>Colletotrichum graminicola</i>
AaflI	Restriktionsendonuklease aus <i>Acetobacter acetii</i>
ad	lat.: zu
AS	Acetosyringon
ATG	Startcodon für Translation
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediated transformation
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTX	Basic Local Alignment Search Tool X
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumion
<i>C. acutatum</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca(NO ₃) ₂	Calciumnitrat
cDNA	complementary DNA
<i>C. falcatum</i>	<i>Colletotrichum falcatum</i>
<i>C. fulvum</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>
CgAAF1	<i>Colletotrichum graminicola</i> V-ATPase Assembly Faktor
CgH3	<i>Colletotrichum graminicola</i> Histon H3
CgITS2	internal transcribed spacer sequence in <i>Colletotrichum graminicola</i>
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
CgM2	<i>Colletotrichum graminicola</i> Isolat M2
<i>C. graminicola</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i>
<i>C. heterostrophus</i>	<i>Colletotrichum heterostrophus</i>
Cl ⁻	Chlorion
<i>C. lagenarium</i>	<i>Colletotrichum lagenarium</i>
<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
CM	Komplettmedium
cm	Zentimeter
CoCl ₂	Kobaltchlorid
CSPD	Dinatriummethoxyspirotriccyclophenylphosphat
<i>C. trifolii</i>	<i>Colletotrichum trifolii</i>
Δ	Deletionsmutante
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin

DJ-PCR	Double-Joint PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpi	days post inoculation
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Eco32I</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
Ekt	Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> , lat.: und andere
ETI	effector triggered immunity
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
<i>gpdA</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenasegen (<i>Aspergillus nidulans</i>)
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
<i>HindIII</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Hemophilus influenzae</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest}	entionisiertes Wasser
<i>hph</i>	Hygromycin Phosphotransferase-Gen
hpi	hours post inoculation
HR	hypersensitive Reaktion
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITS	internal transcribed spacer sequence
kb	Kilobasenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
<i>KpnI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Klebsiella pneumonia</i>
L	Linné
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LB	left border
M	Molarität
MAMP	microbe-associated molecular patterns
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase

mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Mg ⁺	Magnesiumion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mg ₂ SO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
MIT	Massachusetts Institute of Technology
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
µm ²	Mikroquadratmeter
µN	Mikronewton
<i>M. oryzae</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>
MPa	Megapascal
mRNA	Messenger-RNA
Na ⁺	Natriumion
N. A.	numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
<i>nat</i>	Nourseothricin Acetyltransferase-Gen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
ng	Nanogramm
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
nic	non inoculated control
<i>NlaIII</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Neisseria lactamica</i>
NLS	nuclear lokalization sequence
nm	Nanometer
NO ₃ ⁻	Nitrat
<i>nos</i>	Gen für die Nopalinsynthese aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
NUV	near ultraviolett
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
o. g.	oben genannt(en)
<i>oliC</i>	Oligomycin Resistenzgen aus <i>Aspergillus nidulans</i>
oligo-C	oligomere Cytosinkette
OMA	oat meal agar
ORF	open reading frame
p	Irrtumswahrscheinlichkeit, Signifikanzniveau
P-ATPase	P-Typ H ⁺ -Adenosintri-phosphatase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDA	potato dextrose agar
PEG	Polyethylenglycol
pg	Picogramm
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , lat.: Wasserstoffionenkonzentration
<i>PKR1</i>	<i>Pichia farnosia</i> Killertoxin Resistenzgen aus <i>S. cerevisiae</i>

PMMA	Polymethylmethacrylat
PR	pathogen related
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTI	pathogen-associated molecular patterns triggered immunity
<i>PvuI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Proteus vulgaris</i>
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptions-PCR
R	Resistenz
RB	right border
REMI	restriction enzyme site-mediated DNA integration
RESDA-PCR	restriction enzyme site-directed amplification-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species
rpm	rotations per minute
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
18S / 28S	Sedimentationskoeffizienten ribosomaler RNA
SA	Salizylsäure
SAR	systemic acquired resistance
SC	Ura- synthetic Complete ohne Uracil
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCM	Saccharose Komplettmedium
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>SfiI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Streptomyces fimbriatus</i>
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
s. o.	siehe oben
SP	Signalpeptid
SSC	saline-sodium citrate
STC	Sorbitol/Tris/Calciumchlorid
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAIL	thermal asymmetric interlaced
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	Transfer DNA
TdT	terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TE	Tris/EDTA
Ti	Tumor induzierend
Tm	Schmelztemperatur (Primer)
<i>toxB</i>	Gen für wirtsspezifisches Toxin aus <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
<i>trpC</i>	Tryptophan-Synthasegen C aus <i>Aspergillus nidulans</i>
<i>tub1</i>	Gen für Tubulin α aus <i>Botrytis cinerea</i>
TSS	transformation and storage solution
u	Unit(s)
u. a.	unter anderem

<i>U. fabae</i>	<i>Uromyces fabae</i>
UK	United Kindom
<i>U. maydis</i>	<i>Ustilago maydis</i>
USA	United States of America
UV	ultraviolett
V	Volt
V-ATPase	vakuoläre H ⁺ - Adenosintri-phosphatase
vgl.	vergleiche
<i>vir</i>	Virulenz
v/v	Volumenprozent
WD	working distance
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
x	Multiplikationszeichen
<i>Xba</i> I	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas campestris pv. badrii</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl-beta-D-Galaktopyranosid
<i>Xho</i> I	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas campestris pv. holcicola</i>
YPD	yeast extract-peptone-dextrose
YSST	yeast secretion sequence trap
z. B.	zum Beispiel
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Infektion von <i>Zea mays</i> durch <i>C. graminicola</i>	2
Abbildung 2:	Modell der V-ATPase.....	18
Abbildung 3:	Untersuchung von <i>C. graminicola</i> Transformanten nach ATMT.....	62
Abbildung 4:	Saprophytische und phytopathogene Entwicklung von <i>C. graminicola</i> Transformanten, die durch ATMT erzeugt wurden.....	64
Abbildung 5:	Southern Blot Analyse von 19 Virulenzmutanten zur Bestimmung der T-DNA Integrationsfrequenz.....	66
Abbildung 6:	T-DNA Integrationsstellen im Genom der Virulenzmutanten und benachbarte Gene.....	69
Abbildung 7:	Sequenzierung der T-DNA Insertionsstelle in den Mutanten AT039 und AT171.....	70
Abbildung 8:	Bildung von Infektionsstrukturen.....	72
Abbildung 9:	Bildung der Infektionsstrukturen von <i>C. graminicola</i> Wildtyp und Mutanten.....	73
Abbildung 10:	Untersuchung des Turgordrucks in Appressorien durch Zytorrhizie.....	74
Abbildung 11:	Papillenbildung in infiziertem Maisblattgewebe bei AT039- und Wildtyp-Infektion.....	76
Abbildung 12:	Relative Transkriptmenge von <i>CgAAF1</i> während des Infektionsverlaufs in Maisblättern.....	77
Abbildung 13:	Sequenz von <i>CgAAF1</i> mit 558 bp.....	79
Abbildung 14:	Alignment der <i>CgAAF1</i> -Sequenz mit entsprechenden Sequenzen anderer Ascomycota.....	81
Abbildung 15:	Topologie von <i>CgAAF1</i>	82
Abbildung 16:	Komplementation einer <i>PKR1</i> -defizienten Hefemutante (Δ <i>pkr1</i>) mit <i>CgAAF1</i>	83
Abbildung 17:	Deletion von <i>CgAAF1</i>	84
Abbildung 18:	Virulenztest der Deletionsmutanten Δ <i>Cgaaf1</i> -1 bis -3 und der Disruptionsmutante AT039 im Vergleich zum Wildtyp und zur Transformante mit ektopischer Integration.....	86
Abbildung 19:	Quantifizierung der Infektionsstrukturen auf Mais.....	88
Abbildung 20:	Mikroskopische Aufnahmen der Infektionsstrukturen von <i>C. graminicola</i> Wildtyp und der Deletionsmutanten in Maisblättern.....	90
Abbildung 21:	Papillenbildung in infizierten Maisblättern 3 dpi.....	91
Abbildung 22:	Virulenztest auf verwundeten Maisblattsegmenten.....	92
Abbildung 23:	Untersuchung des Turgordrucks in Appressorien durch Zytorrhizie.....	93
Abbildung 24:	Quantifizierung der Virulenz durch qPCR, 4 dpi.....	94
Abbildung 25:	Wachstumsraten auf Minimalmedien mit verschiedenen C-Quellen.....	96

Abbildung 26:	Konstruktion und Charakterisierung der Mutanten mit <i>CgAAF1:eGFP</i>	98
Abbildung 27:	Lokalisierung von <i>CgAAF1</i> in <i>C. graminicola</i> durch Fluoreszenz des eGFP-markierten <i>CgAAF1</i> und durch ER spezifische Färbung.....	100
Abbildung 28:	Komplementation von $\Delta Cgaaf1$ mit <i>CgAAF1</i>	101
Abbildung 29:	Virulenz des komplementierten Isolats K1 im Vergleich zum Wildtyp.....	103
Abbildung 30:	Wachstum des komplementierten Isolats K1 auf Minimalmedien mit verschiedenen C-Quellen im Vergleich zum Wildtyp.....	104
Abbildung 31:	Purin Katabolismus.....	115
Abbildung 32:	Stickstoffversorgung phytopathogener Pilze im Verlauf der Pathogenese (nach Solomon et al. 2003).....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Ergebnisse der Suche nach <i>CgAAF1</i> -ähnlichen Sequenzen mit dem Programm BLASTX.....	80
-------------------	---	----

Anmerkungen zur Schreibweise

Da die vorliegende Arbeit in deutscher Sprache verfasst wurde, sind englische Begriffe weitestgehend ins Deutsche übersetzt worden. Gebräuchliche englische Fachbegriffe, deren Übersetzung nicht sinnvoll erschien und zu Missverständnissen geführt hätte, wurden nicht übersetzt. Lateinische Begriffe sowie Art- und Gattungsnamen wurden durch Kursivschrift gekennzeichnet. Genbezeichnungen erfolgten durch die Anfangsbuchstaben des Gattungs- und Artnamens in Groß- und Kleinschrift gefolgt von drei Großbuchstaben und einer Ziffer in Kursivschrift (z. B. *CgAAF1*). Die Bezeichnung des zugehörigen Proteins folgte der gleichen Nomenklatur, jedoch ohne kursive Markierung (z. B. CgAAF1). Mutanten mit einer Gendeletion wurden mit Δ und der Genbezeichnung in Kleinbuchstaben markiert (z. B. Δ Cgaaf1). Gene, Proteine und Mutanten, die aus der Literatur zitiert werden, werden nach der Nomenklatur in der entsprechenden Veröffentlichung benannt.

A Einleitung

A.1 *Colletotrichum graminicola* ist ein wirtschaftlich relevantes Pathogen

Colletotrichum graminicola (Cesati) Wilson [teleomorph *Glomerella graminicola* (Politis)] ist ein Ascomycet (Klasse *Sordariomycetes*, Unterklasse *Hypocreomycetidae*, Familie *incertae sedis Glomerellaceae*; Lumbsch & Huhndorf, 2007) und weltweit verbreiteter Erreger der Blattflecken- und Stängelfäulekrankheit an Mais (*Zea mays* L.). Diese Krankheit verursacht Verluste in der Maisproduktion; in der Vergangenheit führten Epidemien in den USA zu vollständigen Ertragsausfällen (Hooker & White, 1976; Warren et al., 1973). Dieses hohe phytopathogene Potenzial an einer der wichtigsten Kulturpflanzen der landwirtschaftlichen Produktion verleiht *C. graminicola* eine enorme wirtschaftliche Bedeutung (Bergstrom & Nicholson, 1999). Zur Kontrolle dieser Krankheit und damit zur Eindämmung von wirtschaftlichen Verlusten ist das Verstehen der Mechanismen des Infektionsvorgangs unerlässlich. Folglich rückte *C. graminicola* in den Fokus biologischer und molekularbiologischer Forschung. Seine einfache Kultivierung und Lagerung, etablierte Virulenztests mit gut evaluierbaren Symptomen und Infektionsstrukturen, die Möglichkeit der genetischen Manipulation und die Veröffentlichung der gesamten Genomsequenz im Jahr 2009 (*Colletotrichum* Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT, <http://www.broadinstitute.org>) machen *C. graminicola* zu einem Modellorganismus bei der Erforschung von Pilz-Pflanzen-Interaktionen (Perfect et al., 1999). Ein weiterer Vorteil dieses Pilzes ist seine hemibiotrophe Lebensweise. Das System *C. graminicola* – Mais ermöglicht die Untersuchung biotropher und nekrotropher Interaktionen. Ziele der aktuellen Forschung an *C. graminicola* liegen ganz klar in der Identifizierung und im Verständnis der molekularen Mechanismen, die die kompatible Interaktion zwischen beiden Partnern ermöglichen und steuern.

A.2 Biologie von *Colletotrichum graminicola*

A.2.1 Saisonaler Verlauf der Blattflecken- und Stängelfäulekrankheit

Die Pathogenese von *C. graminicola* ist in mehrere Phasen gegliedert. Die zunächst saprophytische Lebensphase des Pilzes ermöglicht ein Überwintern auf abgestorbenen Pflanzenresten im Boden. Zu Beginn einer neuen Vegetationsperiode wächst *C. graminicola*

zunächst weiter saprophytisch auf organischem Material am Boden und bildet bald große Sporenmengen als primäres Inokulum. In kleinen Wassertropfen werden die Sporen mit Regenwasser oder auch durch Wind über geringe Distanzen im Feld verbreitet. Die daraus folgende Infektion junger Maispflanzen markiert den Beginn der pathogenen Phase und führt zu den Blattantraknose-Symptomen (Abbildung 1A und B) und zur Bildung von Sporenlagern als sekundäres Inokulum. Diese Konidien infizieren höhere Blattetagen oder benachbarte Pflanzen. Durch vielfaches Wiederholen dieses Zyklus breitet sich *C. graminicola* rasch aus. Die kurze Reproduktionszeit von vier Tagen und die große Menge an Sporen ermöglichen die hohe Ausbreitungsgeschwindigkeit im Maisbestand (Bergstrom & Nicholson, 1999). Zusätzlich zu Maisblättern kann der Pilz in gleicher Weise auch Maisstängel befallen. Tiefere Gewebeschichten können jedoch nur nach vorheriger Verwundung durch den Maiszünsler *Ostrinia nubilalis* oder andere stängelbohrende Insekten infiziert werden (Venard & Vaillancourt, 2007). Eine Ausbreitung im Xylem der Pflanze führt zu einer systemischen Infektion und zu einer starken Beeinträchtigung des Wassertransports in der Pflanze (Bergstrom & Nicholson, 1999). In der Folge sterben obere Pflanzenteile ab (Abbildung 1C und D). Mit der Bildung von Sporenlagern und der anschließenden erneuten Inokulation weiterer Pflanzen setzt sich die Ausbreitung fort. Zum Ende der Vegetationsperiode wechselt *C. graminicola* wieder vollständig in die saprophytische Lebensweise und überwintert auf organischem Material im Boden.

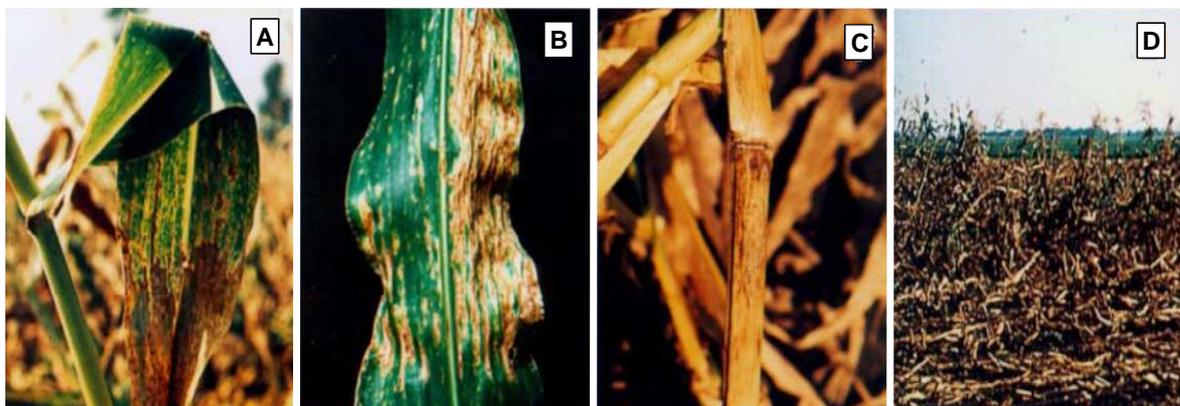


Abbildung 1: Infektion von *Zea mays* durch *C. graminicola*. (A) und (B) Blattantraknose-Flecken auf infizierten Maisblättern. (C) und (D) Eine Infektion des Stängels führt zur Besiedlung von Leitgeweben und zum Absterben der gesamten Pflanze. Abbildungen aus Bergstrom und Nicholson (1999).

A.2.2 Verlauf der Infektion von Mais

Zur erfolgreichen Besiedlung von Mais bildet *C. graminicola* während der prä- und postinvasiven Phase nacheinander spezifische Infektionsstrukturen. Gelangen Konidien in

kleinen Wassertropfen auf die Blattoberfläche von Mais erkennt der Pilz den Wirt anhand der spezifischen Härte und des spezifischen Hydrophobizitätsgrads der Kutikula (Chaky et al., 2001). Sekretierte Glykoproteine binden die Konidien bereits nach 30 Minuten fest an die pflanzliche Kutikula (Mercure et al., 1994). Fünf Stunden später keimen die einfach septierten Konidien aus, bilden in der Regel einen kurzen Keimschlauch und ein Appressorium (Bergstrom & Nicholson, 1999). Während der Reifung des Appressoriums wird Melanin in die appressoriale Zellwand eingelagert. Dadurch wird die Rigidität der Appressorienwand verstärkt (Howard et al., 1991). Gleichsam werden im Appressorium osmotisch aktive Substanzen in hohen Konzentrationen synthetisiert (Deising et al., 2000; Mendgen & Deising, 1993). Durch die selektive Permeabilität dringt Wasser in das Appressorium zum Konzentrationsausgleich ein (Deising et al., 2000). So entsteht im Appressorium ein hoher Druck von etwa 53 bar (5,3 MPa), der an der appressorialen Basis mit einer Kraft von $17 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ auf die Blattoberfläche wirkt (Bechinger et al., 1999). Ausgehend von der sich bildenden appressorialen Pore an der Kontaktstelle zum Maisblatt nutzt eine wachsende Penetrationshyph die Kraft zum Durchbrechen der pflanzlichen Epidermis und bildet direkt unterhalb der penetrierten Zellwand ein Infektionsvesikel.

Bislang ist nicht vollständig geklärt, inwieweit Zellwand-abbauende Enzyme wie Cutinasen, Cellulasen, Polygalacturonasen oder Xylanasen den Penetrationsprozess bei *C. graminicola* unterstützen. Auch für andere phytopathogene Pilze, die vorrangig durch Druckpenetration in ihren Wirt eindringen, wird diese Frage kontrovers diskutiert (Idnurm & Howlett, 2001; Lebeda et al., 2001; Scott-Craig et al., 1998). Durch die Vielzahl und die Redundanz an hydrolytischen Enzymen liefern entsprechende Deletionsmutanten oft keine klaren Antworten (Scott-Craig et al., 1998; Sposato et al., 1995). Die Deletion von *snf1* umgeht dieses Problem teilweise, da SNF1 ein zentraler Regulator Zellwand-abbauender Enzyme ist. Wernitz (2004) wies bei einer *snf1*-Deletionsmutante von *C. graminicola* reduzierte Enzymmengen und eine verzögerte Penetration nach. Möglicherweise unterstützen also Zellwand-abbauende Enzyme den Penetrationsvorgang bei *C. graminicola*. Eine sichtbare Schädigung des Wirtes durch Zellwand-abbauende Enzyme vor und während der biotrophen Phase von *C. graminicola* erfolgt aber nicht. Im Bohnenpathogen *Colletotrichum lindemuthianum* sind während der Appressorienbildung Transkripte des Endo-Polygalacturonase Gens *CIPG2* nachgewiesen worden. Das zugehörige Protein CIPG2 konnte in den Wänden der Appressorien lokalisiert werden. Während der Penetration werden die Mikrofibrillen der pflanzlichen Zellwand nicht nach unten verformt, die entstehende Penetrationspore ist sauber abgegrenzt und eine starke Degradierung der Zellwand ist nicht zu erkennen. Diese elektronenmikroskopischen Beobachtungen deuten auf eine minimale degradierende Aktivität von CIPG2 während der Penetrationsphase zur Unterstützung des Penetrationsprozesses hin (Herbert et al., 2004). Die geringe Aktivität und die ausbleibende

starke Degradierung der pflanzlichen Zellwand kann auch auf der Wirkung Endo-Polygalakturonase-inhibierender Proteine in der Pflanzenzellwand als Form pflanzlicher Abwehr basieren (Wijesundera et al., 1989). Der Bohnenrostpilz *Uromyces fabae* sekretiert sehr limitiert und äußerst lokal Zellwand-abbauende Enzyme, die zu minimaler Degradierung führen und den Penetrationsprozess unterstützen könnten (Deising et al., 1995; Heiler et al., 1993; Mendgen & Deising, 1993). Trotzdem ist die Funktion hydrolytischer Enzyme für die Penetration schwierig von einer Degradierungsfunktion für simple saprophytische Nahrungsaufnahme abzugrenzen. Da Endo-Polygalacturonasen auch in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces marxianus* vorkommen, wird den Enzymen eher eine ernährungs- als eine infektionsspezifische Funktion zugeschrieben (Jia & Wheals, 2000).

Aus dem Infektionsvesikel von *C. graminicola* entwickelt sich im Apoplasten der Maispflanze eine biotrophe Primärhyph. Während der biotrophen Interaktion wird die Pflanze nicht geschädigt und das Pathogen wird von der Pflanze nicht erfolgreich abgewehrt (Bergstrom & Nicholson, 1999). Der Pilz maskiert seine Zellwand, indem er nach außen exponierte Chitinmoleküle deacetyliert. Diese Strategie verhindert den Abbau von Chitin durch pflanzliche Chitinasen und damit eine Erkennung von Chitin Fragmenten durch die Pflanze. So wird eine Elicitierung von Pflanzenabwehr unterdrückt (El Gueddari et al., 2002). Durch das Wachstum der Primärhyph von *C. graminicola* stülpt sich die Zellmembran der Pflanzen-Epidermiszelle ein und es entsteht eine sehr enge Kontaktfläche zwischen dem Wirt und dem Pathogen (Bergstrom & Nicholson, 1999). Diese räumliche Nähe zwischen der Pilzhyphe und der Zellmembran der Pflanze ermöglicht eine schnelle und effektive Nährstoffversorgung des Pilzes mit pflanzlichen Metaboliten über den apoplastischen Raum. In diesem Zusammenhang wird die Induktion der Expression pflanzlicher Zucker-Effluxtransporter (SWEETs) durch phytopathogene Pilze diskutiert (Chen et al., 2010). Vom Pilz werden die Zucker dann aus dem Apoplasten durch entsprechende Zuckertransporter, die in der pilzlichen Plasmamembran lokalisiert sind, aufgenommen (Mendgen, 2002; Münch et al., 2008; Voegelé et al., 2001). Für *C. graminicola* wurden z. B. Hexosetransporter identifiziert und charakterisiert, deren Gene in der biotrophen Phase hochreguliert werden und die somit spezifisch für die biotrophe Phase sind (Lingner et al., 2011a).

Ca. 24 bis 36 Stunden nach der Penetration des Wirtes beginnt *C. graminicola* seine zerstörerische nekrotrophe Phase. Aus den voluminösen primären Hyphen gehen dünne, schnell wachsende und sich stark verzweigende sekundäre Hyphen hervor, die massiv Zellwand-abbauende Enzyme sekretieren. Mit Hilfe dieser Enzyme durchstoßen sie einerseits Zellwände benachbarter Zellen und versorgen sich andererseits mit den notwendigen Nährstoffen für das rasante Wachstum und die flächige Ausbreitung im Wirt.

Zusätzlich durchbrechen die sekundären Hyphen die pflanzliche Zellmembran und zerstören damit die Integrität der Wirtszellen. Es entstehen chlorotische Bereiche, die sich auf den Blättern ausbreiten und schnell zu nekrotisieren beginnen. Die typischen Anthraknose-Symptome werden sichtbar (Bergstrom & Nicholson, 1999). Toxische Verbindungen konnten für *C. graminicola* bisher nicht nachgewiesen werden (siehe Abschnitt A.3.3). Die nekrotrophe Phase und das Abtöten der Wirtszellen scheint daher maßgeblich auf der Wirkung lytischer Enzyme zu basieren. Das Reispathogen *M. oryzae* hingegen benutzt in der nekrotrophen Phase die toxischen Heptaketide Pyrikulol und Pyrikulariol, um Wirtszellen zu töten. Dieses Pflanzenpathogen scheint den Wirt sowohl mit einem enzymatischen als auch toxischen Angriff zu schädigen (Horbach et al., 2011; Thines et al., 2006).

C. graminicola schließt seinen asexuellen Lebenszyklus auf dem nekrotisierten Blattgewebe mit der Bildung der sichelförmigen Konidien ab. Die Konidien werden in Acervuli gebildet. Diese Sporenlager betten die Konidien in eine extrazelluläre Matrix hochmolekularer Glykoproteine mit einem hohen Prolinanteil ein. Diese Proteine dienen dem Schutz der Konidien vor dem Austrocknen und vor toxischen Phenolen der Pflanze (Nicholson & Moraes, 1980). Mycosporin-Alanin ist ein Keimungshemmer der Konidien im Acervulus (Leite & Nicholson, 1992). Erst bei Verdünnung des Inhibitors in der Matrix durch Wassertropfen lässt die inhibierende Wirkung nach. Die Konidien beginnen zu keimen und Spritzwasser verteilt sie räumlich. Enzyme wie Laccasen, Glucosidasen, Esterasen und Cutinasen wurden ebenfalls in der Matrix nachgewiesen. Ihnen wird eine Rolle bei der Etablierung der Interaktion zwischen Pilz und Pflanze beigemessen (Anderson & Nicholson, 1996; Pascholati et al., 1993).

A.3 Virulenz- und Pathogenitätsgene phytopathogener Pilze

Die Besiedlung der Pflanze wird durch pilzliche Virulenz- und Pathogenitätsgene vermittelt. Sie sind verantwortlich für die Erkennung des Wirtes, für die entsprechende Morphogenese spezieller Infektionsstrukturen, für die Unterdrückung pflanzlicher Abwehr, für die Degradierung pflanzlicher Strukturen, für die Aufnahme von Nährstoffen und für die Vollendung des Lebenszyklus im Wirt (Idnurm & Howlett, 2001). Die Begriffe Virulenz und Pathogenität beschreiben in quantitativer und qualitativer Weise das Resultat einer Wirtsinfektion durch ein Pathogen und damit das Auftreten einer Krankheit. Kompatibilität hingegen bezieht sich auf das Zustandekommen einer parasitischen Interaktion zwischen dem Pathogen und dem Wirt (Münch et al., 2008; Schäfer, 1994). Idnurm und Howlett (2001) schätzten, dass phytopathogene Pilze – abhängig von ihrem Lebensstil und ihrer Genomgröße – zwischen 60 und 360 Virulenz- und Pathogenitätsgene besitzen. Selbst für gut charakterisierte Pathogene wie *M. oryzae* und *U. maydis* wurde bisher nur eine recht geringe Zahl dieser Gene identifiziert. Daher scheint es vielversprechend zu sein, Strategien zur Identifizierung neuer Virulenzgene zu entwickeln und anzuwenden. Einige bedeutende identifizierte Gene aus *Colletotrichum*-Arten und nahe verwandten phytopathogenen Pilzen sollen hier kurz vorgestellt werden.

A.3.1 Signaltransduktion während der pathogenen Interaktion

Zu Beginn der Etablierung einer kompatiblen Interaktion muss das Pathogen die Oberfläche der Wirtspflanze erkennen, sich anheften und mit der Ausbildung spezifischer Infektionsstrukturen die Penetration des Wirtes vorbereiten. Signaltransduktion im Pilz hat hierbei eine zentrale Bedeutung. In *M. oryzae* wurde *PTH11* als Pathogenitätsgen identifiziert, da REMI (Restriction Enzyme site-mediated DNA Integration)-Mutanten Defekte in der Wirtserkennung und Appressoriendifferenzierung zeigen und apathogen sind. *PTH11* erkennt als transmembranaler Rezeptor Oberflächenstrukturen des Wirts und interagiert vermutlich mit heteromeren G-Proteinen zur Signalweiterleitung (DeZwaan et al., 1999). Eine Deletion der β -Untereinheit des G-Proteins führt zur Unterbrechung der Signalweiterleitung in *Cochliobolus heterostrophus* und blockiert die Konidien- und Appressorienbildung (Ganem et al., 2004). Virulenzdefekte aufgrund fehlender Signalweiterleitung wurden auch für *Colletotrichum lagenarium* gezeigt. Wird die Adenylat-Cyclase deletiert, kann ein aktiviertes G-Protein nicht mehr an sie binden und eine cAMP-vermittelte Signalweiterleitung durch eine folgende Aktivierung der Proteinkinase A bleibt aus. In *C. lagenarium* führt dies zu Penetrationsdefekten auf seinem Wirt Gurke (Takano et al., 2001). Auch eine Deletion der Untereinheit CPK1 der Proteinkinase A führt zu Penetrationsdefekten, was in

Colletotrichum trifolii gezeigt wurde (Yang & Dickman, 1999). Neben Adenylat-Cyclasen können aktivierte G-Proteine über mehrere Schritte (Deising et al., 2000) auch Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen via Ca^{2+} -Calmodulin aktivieren. Die Transkription von Calmodulin wird beispielsweise nach dem Auftreffen der Konidien von *Colletotrichum gloeosporioides* und *C. trifolii* auf harten Oberflächen induziert. Über die Ca^{2+} -Calmodulin Signalweiterleitung werden weitere Proteinkinasen aktiviert und letztlich Gene im Pathogen transkribiert, die für die Keimung und Appressorienbildung benötigt werden (Kim et al., 1998). Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) können ebenfalls wie die beschriebenen G-Proteine eine zentrale Stellung in Signaltransduktionswegen für die Virulenz einnehmen. Dabei erfolgt eine Signalweiterleitung kaskadenartig über mehrere MAPKs, die nacheinander aktiviert werden. In *M. oryzae* wurde das Gen *PMK1*, das für eine MAPK codiert, deletiert. Die apathogene Deletionsmutante kann keine Appressorien mehr bilden und wächst *in planta* nicht mehr invasiv. In axenischen Kulturen hingegen ist das Gen für vegetatives Wachstum sowie für die sexuelle und asexuelle Reproduktion nicht essentiell. Experimente mit Zugaben von cAMP ergaben, dass die Signalfunktion von *PMK1* für die Infektionsstruktur-Bildung einem cAMP-Signal nachgelagert sein muss (Xu & Hamer, 1996). In *C. lagenarium* und *C. gloeosporioides* wurden homologe Pathogenitätsgene (*CMK1*) zu *PMK1* gefunden, deren Deletion zu denselben Pathogenese-Defekten führt (Takano et al., 2000; Zhao et al., 2007). Die genannte Auswahl an Beispielen belegt die Bedeutung von Signaltransduktionswegen für die Besiedlung des Wirts bei einer Vielzahl phytopathogener Pilze. Signaltransduktionswege spielen aber auch zu späteren Zeitpunkten im Infektionsverlauf eine bedeutende Rolle.

A.3.2 Gene zur Etablierung einer kompatiblen Interaktion

In *C. graminicola* wurde erst kürzlich das Gen für die 4'-Phosphopantetheinyl Transferase *PPT1* als Pathogenitätsgen identifiziert. *PPT1* aktiviert verschiedene Enzyme, wie Polyketidsynthasen und nonribosomale Peptidsynthasen, die vermutlich direkt in den Pathogeneseprozess eingebunden sind. Deletionsmutanten zeigten eine starke Reduktion der Appressorienbildungsrate und eine vollkommen ausbleibende Melanisierung der Appressorien. Als Folge konnten die Mutanten das Pflanzengewebe nicht penetrieren. Da *PPT1*-defiziente Mutanten von *M. oryzae* ebenfalls apathogen sind und die Transferase als Regulator des primären und sekundären Metabolismus bei Pilzen verbreitet vorkommt, wird vermutet, dass *PPT1* Pathogenität auch bei weiteren Pflanzenpathogenen vermittelt (Horbach et al., 2009). Auch die Gene *ALB1* und *RSY1* in *M. oryzae*, die für Enzyme des Dihydroxynaphthalen-Melanin Biosynthesewegs codieren, sind für die Melanisierung der Appressorien erforderlich. Mutanten mit Mutationen in diesen Genen bildeten ausschließlich nicht melanisierte Appressorien, die das Wirtsgewebe nicht mehr penetrieren konnten.

(Chumley & Valent, 1990). In *C. lagenarium* wurden ebenfalls Gene der Melaninbiosynthese als Pathogenitätsgene identifiziert. *PKS1*, codierend für eine Polyketid-Synthase, *SCD1*, codierend für eine Skytalon-Dehydratase, *THR1*, codierend für eine 1,3,8-trihydroxynaphthalen-Reduktase und das regulatorische Gen *CMR1* sind für eine Melanisierung und für die Penetration des Wirts notwendig (Kubo et al., 2000). All die genannten Pathogenitätsgene unterstreichen die Bedeutung der Melanisierung für die Pathogenität unterschiedlicher Pilze.

Nach der Penetration, d. h. während der biotrophen Interaktion, schützen sich pilzliche Pathogene wie z. B. *C. graminicola*, *C. lindemuthianum*, *U. fabae* oder *Puccinia graminis* vor der Erkennung durch die Wirtspflanze. Eine Deacetylierung von Chitinpolymeren in der pilzlichen Zellwand bewirkt eine Maskierung der Chitinmoleküle. Pflanzliche Chitinasen können nun Chitin nicht mehr degradieren und es entstehen keine Abwehr-elicitierenden Chitinfragmente. Deacetylasen sind daher wichtige Virulenzgene (Blair et al., 2006; El Gueddari et al., 2002). Zusätzlich wurde das Avirulenzgen *Avr4* in *Cladosporium fulvum* charakterisiert, dessen Genprodukt ebenfalls pilzliches Chitin maskiert (Rivas & Thomas, 2005). Durch seine Chitin-bindende Domäne wird eine Anheftung dieses Proteins an Chitinmoleküle und damit der Schutz vor Chitinasen des Wirtes vermittelt (Van den Burg et al., 2003). Durch die verschiedenen Maskierungsstrategien verringert sich also die Menge an Elicitor-aktiven Chitinfragmenten und die Aktivierung pflanzlicher Abwehr wird verzögert, reduziert oder völlig unterdrückt. Eine ähnliche – aber nicht vollkommen aufgeklärte Funktion – hat das Protein CIH1 von *C. lindemuthianum* im extrazellulären Raum zwischen der Zellwand der biotrophen Hyphe und der Wirtszellmembran. *CIH1* wird exklusiv *in planta* während der biotrophen Phase exprimiert. Das Prolin- und Hydroxyprolin-reiche Protein zeigt Ähnlichkeiten mit der pflanzlichen Zellwand und könnte so die Erkennung des Pilzes durch den Wirt verhindern (Perfect et al., 1998).

Für verschiedene *Colletotrichum*-Arten wurden Faktoren identifiziert, die für die biotrophe Entwicklung unerlässlich sind oder die den Übergang von der biotrophen in die nekrotrophe Phase steuern. In *C. graminicola* wurde eine alpha-Aminoadipat Reduktase (AAR) als ein Pathogenitätsfaktor identifiziert, der für das biotrophe Wachstum notwendig ist (Horbach et al., 2009). *AAR1*-Deletionsmutanten zeigen eine normale Melanisierung der Appressorien und penetrieren das Pflanzengewebe erfolgreich, wenn auch mit einer geringeren Rate als der Wildtyp. Nach der Bildung von kurzen biotrophen Hyphen stoppt jedoch die Entwicklung *in planta*. Es werden keine ausgeprägten biotrophen Hyphen gebildet, der Übergang zur Nekrotrophie bleibt aus und es erfolgt keine Symptomausprägung. Die Arretierung in der biotrophen Phase erfolgt aufgrund eines Lysinmangels. *AAR1* steuert den Lysinstoffwechsel und die Deletionsmutanten sind Lysin-auxotroph. Durch Zugabe von Lysin zum

Inokulationstropfen wird eine Komplementierung des Defekts erreicht, die Deletionsmutanten bilden nach biotrophen auch nekrotrophe Hyphen und sporulieren *in planta*. Bei einer Inokulation von verwundeten Blättern konnte ebenfalls eine Komplementation und damit eine vollständige Entwicklung des Pilzes im Pflanzengewebe erreicht werden, da Lysin aus den verletzten Pflanzenzellen sofort verfügbar ist (Horbach et al., 2009). Im hemibiotrophen Gerstenpathogen *Cochliobolus sativus* wurde dieselbe Bedeutung der AAR hinsichtlich der biotrophen und nekrotrophen Entwicklung des Pilzes in seinem Wirt gezeigt. Deletionsmutanten von *AAR1* zeigten gleiche Defekte, die wie bei *C. graminicola* Deletionsmutanten durch Lysin-Zugabe oder durch Inokulation von verwundeten Blättern aufgehoben werden konnten (Leng & Zhong, 2012). Der Lysinbiosyntheseweg könnte generell für die Gruppe hemibiotropher Pilze ein entscheidender Stoffwechselweg sein, um biotroph zu wachsen und um darauf folgend nekrotrophe Hyphen zu bilden.

In *C. lindemuthianum* wurde ein Transkriptionsaktivator aus der pilzlichen Zink Cluster Familie als Pathogenitätsfaktor identifiziert. Mutanten mit einer Deletion des zugehörigen Gens *CLTA1* besiedeln Blätter von Bohnenpflanzen zunächst wie der Wildtyp und bilden normale biotrophe Hyphen aus. In diesem Stadium verharren die Mutanten aber und entwickeln keine nekrotrophen Hyphen. Eine mikroskopische Analyse zeigte in einzelnen Zellen des Wirtes eine Akkumulation von phenolischen Substanzen an. Dieses lokal begrenzte HR-ähnliche (Hypersensitive Reaktions-ähnliche) Merkmal wurde in verschiedenen suszeptiblen Genotypen der Bohnenpflanze, die mit der Deletionsmutante inokuliert wurden, festgestellt. Die von *CLTA1* gesteuerten Vorgänge sind bislang ungeklärt. Die Autoren (Dufresne et al., 2000) formulieren drei Hypothesen. *CLTA1* könnte 1. die Bildung von Elicitor-molekülen verhindern, 2. Pflanzenabwehr unterdrücken oder 3. die vollständige Ausbildung nicht spezifischer pflanzlicher Abwehrreaktionen durch ein Umschalten von der biotrophen zur nekrotrophen Lebensweise verhindern. Doch auch ohne eine genaue Kenntnis der Regulation zeigt der Phänotyp der Deletionsmutante, dass der Transkriptionsaktivator *CLTA1* für den Übergang in die nekrotrophe Phase unerlässlich ist und damit ein Pathogenitätsfaktor in *C. lindemuthianum* darstellt.

Auch für *C. graminicola* wurde ein Gen gefunden, *CPR1*, das für das nekrotrophe Wachstum verantwortlich ist. Eine *CPR1* REMI-Mutante, mit deutlich reduzierten *CPR1*-Transkriptmengen, zeigt in ihrer Entwicklung *in planta* bis einschließlich des biotrophen Wachstums keine Unterschiede zum Wildtyp. Ein Umschalten in die nekrotrophe Phase bleibt aber aus und die Mutante ist apathogen. *CPR1* codiert für ein Protein, das einer Untereinheit des Signalpeptidase-Komplexes in Hefe ähnelt. *CPR1* spielt also wahrscheinlich für den Transport sekretierter Proteine eine wichtige Rolle. Für die nekrotrophe Phase ist die

massive Sekretion von Enzymen entscheidend, eine Beeinträchtigung dieser Fähigkeit könnte das Umschalten von der Biotrophie zur Nekrotrophie verhindern (Thon et al., 2002).

Mutanten, in denen nicht die nekrotrophe sondern die biotrophe Phase fehlt, sind hingegen nicht bekannt. Die Etablierung einer biotrophen Phase wird für den Erfolg der *Colletotrichum* Arten als unabdingbar eingeschätzt, was die Bedeutung der zugehörigen Gene unterstreicht (Bailey, 1991; Bailey et al., 1992).

In der biotrophen Phase interagieren phytopathogene Pilze über zahlreiche Effektoren mit der Pflanze. Dabei werden Wirtszellstrukturen, -funktionen und Wirtsabwehrreaktionen durch den Pilz beeinflusst (Kamoun, 2006). Effektoren müssen vom Pilz sekretiert werden, da sie im Apoplasten oder im Cytoplasma der Pflanzenzelle wirken sollen. Manche Effektoren agieren beispielsweise im Zellkern der Pflanze als Transkriptionsfaktoren pflanzlicher Genaktivität, um u. a. die pflanzliche Abwehr zu unterdrücken und eine kompatible Interaktion mit dem Wirt zu ermöglichen. Andere degradieren oder phosphorylieren Abwehr-induzierende Wirtsproteine im Cytoplasma der Pflanzenzelle (Catanzariti et al., 2007). Funktionelle Effektoren müssen also an den entsprechenden Wirkungsort transportiert werden. Für das Verlassen der Hyphe und das Erreichen des apoplastischen Raumes zwischen der biotrophen Hyphe und der Membran der Wirtszelle ist die Sekretionsmaschinerie des Pilzes verantwortlich. N-terminale Signalpeptid-Sequenzen (SP) dirigieren den Export der Proteine. Eine evtl. folgende Translokation in das Cytoplasma des Wirtes ermöglicht die Wirkung des Proteins auch in der Pflanzenzelle. Dieser Translokationsvorgang ist jedoch erst wenig aufgeklärt. Einige Effektoren tragen zusätzlich Kernlokalisierungs-Sequenzen (NLS), wodurch das Protein in den Zellkern der Wirtszelle transportiert wird.

Die meisten Effektoren wurden bisher bei phytopathogenen Oomyceten identifiziert. Kamoun et al. (2006) geben eine umfassende Übersicht über Gene bekannter Effektoren bei Oomyceten. Die Komplexität des Effektoren-Sekretoms bei Oomyceten ist größer, als bisher angenommen. Mehrere Hundert Proteine könnten als Effektoren sekretiert werden. Identifizierte Gene apoplastischer Effektoren bei *Phytophthora infestans* sind z. B. Gene für Inhibitoren der Glukanase (*GIP1* und *GIP2*), der Serin-Protease (*EPI1* und *EPI10*) und der Cystein-Protease (*EPIC1* und *EPIC2*). Weiterhin wurden Gene identifiziert, die für Effektoren kleiner Cystein-reicher Proteine codieren. Gene cytoplasmatischer Effektoren wurden in *Phytophthora*-Arten ebenfalls identifiziert. Viele dieser Effektoren gehören zu einer Proteinfamilie mit einem konservierten RXLR-Sequenzmotiv das in der Peptidkette der Signalpeptidsequenz folgt. Es wird vermutet, dass das RXLR-Motiv mit der Translokation in die Pflanzenzelle in Zusammenhang steht.

In *C. gloeosporioides* wurde der Effektor CgDN3, der für die Etablierung der biotrophen Interaktion mit *Stylosanthes guianensis* erforderlich ist, identifiziert. Konidien von CgDN3-defizienten Mutanten keimen zwar auf der Blattoberfläche normal und bilden Appressorien, eine Besiedlung des Pflanzengewebes und eine Reproduktion des Pilzes bleibt jedoch aus. Mikroskopische Analysen ergaben, dass die Mutanten eine lokale HR auslösten. CgDN3 verhindert also die HR der Wirtspflanze (Stephenson et al., 2000). Im System *Melampsora lini* – *Linum usitatissimum* (Flachsrost – Flachs) wird durch ein Signalpeptid der Effektor AvrL567 über den sekretorischen Weg in die extra-haustoriale Matrix transportiert. Flachsellen, in denen *Agrobacterium*-vermittelt AvrL567 transient und heterolog exprimiert wird, lösen eine HR aus. Diese Reaktion zeigt die Existenz eines zugehörigen Resistenz-Proteins (R-Protein) im Cytoplasma des Wirts an und belegt die Funktion von AvrL567 als Avirulenzfaktor. Das impliziert gleichzeitig, dass in dieser Wirts-Pathogen Interaktion AvrL567 von der extra-haustorialen Matrix weiter in das Cytoplasma des Wirtes transportiert wird (Dodds et al., 2004). In Haustorien des Bohnenrosts *U. fabae* wird das Protein des Gens *Uf-RTP1* exprimiert und in die extra-haustoriale Matrix sowie in das Cytoplasma der infizierten Epidermiszelle transportiert. Im Verlauf der Haustorienentwicklung steigt die Menge des Proteins im Wirt an. Uf-RTP1 besitzt neben einem klassischen Signalpeptid zur Sekretion auch putative Kernlokalisierungs-Sequenzen. Tatsächlich wurde Uf-RTP1 auch im Zellkern der infizierten Wirtszelle durch immunocytoologische Färbung des Gewebes nachgewiesen. Diese Lokalisierung legt nahe, dass Uf-RTP1 während der Infektion die Genexpression des Wirts beeinflusst. Obwohl die Lokalisierung von Uf-RTP1 starke Hinweise auf eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Biotrophie liefert, ist diese Funktion nicht geklärt (Kemen et al., 2005). Uf-RTP1 ist aber ein Beispiel für einen komplexen Transport eines Effektors in die Wirtszelle. Diese nucleo-cytoplasmatischen Transportvorgänge spielen zum einen für das Pathogen zum Unterdrücken der Wirtsresistenz und zum anderen für den Wirt bezüglich der Erkennung des Pathogens und einer folgenden R-Protein-basierten Abwehr eine entscheidende Rolle (Kamoun, 2009).

In *M. oryzae* wurde eine von vier vorhandenen P-ATPasen als sekretionsrelevanter Virulenzfaktor charakterisiert. Mutanten mit einer Deletion des Gens *MgAPT2* bildeten keine Symptome auf dem Wirt und zeigten eine reduzierte Menge an extrazellulären Enzymen. Das vegetative Wachstum und die Sporulation hingegen waren bei *MgAPT2*-defizienten Mutanten nur minimal beeinträchtigt. In der Interaktion der Deletionsmutante mit einer gegenüber dem Wildtyp resistenten Wirtslinie wird keine HR elicitiert. Die Autoren vermuten, dass durch die Deletion der P-ATPase der Sekretionsweg beeinträchtigt ist, Effektoren nicht mehr effizient sekretiert werden und deswegen auf suszeptiblen Wirtslinien eine Virulenzreduktion beobachtet wird (Gilbert et al., 2006).

A.3.3 Gene zur Ausbildung der nekrotrophen Interaktion

Nach dem Umschalten von der biotrophen in die nekrotrophe Phase ändert sich das Verhalten von *C. graminicola* und anderer hemibiotropher Pflanzenpathogene enorm. Eine massive Sekretion hydrolytischer Enzyme, schnelles Wachstum, eine Vernachlässigung der Suppression pflanzlicher Abwehr und die Synthese toxischer Verbindungen erfordern die Transkription eines komplett anderen Sets an Virulenzgenen. In *C. lindemutianum* werden während der nekrotrophen Phase Endo-Polygalacturonasen, Pektin-Lyasen, α - und β -Galactopyranosidasen, α -Arabinofuranosidasen und Proteasen sekretiert. Durch die Aktivität dieser Enzyme wird die Struktur des Pflanzengewebes zerstört und der Wirt getötet. *CIPG1* und *CIPG2* codieren für zwei Endo-Polygalacturonasen und werden massiv exprimiert. *CIPG2* ist ein spezifisches Virulenzgen, da es nur während der Interaktion mit der Pflanze exprimiert wird, bei saprophytischem Wachstum auf Pektin-haltigem Medium wird *CIPG2* nicht exprimiert. Während Transkripte von *CIPG2* auch im Verlauf der biotrophen Phase gemessen wurden, aber kein Pektin Abbau nachweisbar war, wird *CIPG1* während der Interaktion mit der Pflanze nur in der nekrotrophen Phase exprimiert (Herbert et al., 2004; Wijesundera et al., 1989).

In der biotrophen Phase ist für den Pilz vorrangig Glukose und Fruktose verfügbar. In der nekrotrophen Phase ist das Spektrum jedoch sehr viel breiter. Durch den Abbau der strukturell vielfältigen Polymere der pflanzlichen Zellwand wird eine Vielzahl unterschiedlicher oligo- und monomerer Zucker für den Pilz verfügbar. Deswegen wird davon ausgegangen, dass Gene für Oligo- und Monosaccharid-Transporter mit vielen unterschiedlichen Substratspezifitäten exprimiert werden (Münch et al., 2008). *CgHXT2* und *CgHXT5* sind z. B. Gene für zwei Hexosetransporter in *C. graminicola*, die exklusiv während der nekrotrophen Phase exprimiert werden. *CgHXT5* zeigt ein enges Substratspektrum von Glucose und Mannose, *CgHXT2* zeigt hingegen ein breiteres Spektrum, das auch Fruktose, Galaktose und Xylose einschließt (Lingner et al., 2011a).

Nicht nur durch hydrolytische Enzyme kann die Pflanze abgetötet werden. Auch die Aktivierung von Genen zur Produktion von ROS (reactive oxygen species) oder zur Synthese von toxischen Sekundärmetaboliten kann zum Tod des Wirtsgewebes führen. Vor allem nekrotrophe Pilze wie *Botrytis cinerea* oder *C. heterostrophus* nutzen ROS oder Phytotoxine (Govrin & Levine, 2000; Weiergang et al., 1996). Auch in *C. graminicola* wurden einige sekundäre Metabolite wie z. B. Colletopyrone, Colletoquinone, Colletoanthrone A, Orcinol und Tyrosol identifiziert. Keine dieser Substanzen zeigte jedoch eine phytotoxische Aktivität (Horbach et al., 2009). In *Colletotrichum nicotiana* wirkt hingegen Colletotrichin A als nicht-wirtsspezifisches Phytotoxin, das die Membranintegrität der Pflanzenzellen stört und den Elektronenfluss in der mitochondrialen Atmungskette inhibiert (Thines et al., 2006). Jedoch

wurde für *Colletotrichum*-Arten ein konkret induzierter Tod von Wirtszellen in der nekrotrophen Phase bisher nicht festgestellt und Signale für den Beginn der Nekrotrophie sind noch unbekannt. Es wurde lediglich gezeigt, dass der bereits beschriebene Regulator des Sekundärmetabolismus PPT1 auch eine entscheidende Rolle für die Nekrotrophie bei *C. graminicola* spielt. *PPT1*-defiziente Mutanten können einerseits in intakte Pflanzen nicht mehr eindringen. Obwohl verwundete Pflanzen mit biotrophen Hyphen besiedelt werden, können andererseits nekrotrophe Hyphen hier nicht gebildet werden. Da PPT1 die Synthese von Polyketiden und nicht ribosomalen Peptiden steuert, wird spekuliert, ob evtl. toxische Sekundärmetabolite für die Nekrotrophie erforderlich sind (Horbach et al., 2009).

In der gesamten nekrotrophen Phase breitet sich das Pathogen großflächig in der Pflanze aus, ruft die typischen nekrotischen Symptome hervor und beendet schließlich seinen Lebenszyklus. Hierbei werden Entwicklungsgene für die Konidiogenese und für die Acervuli-Bildung in *C. graminicola* aktiviert.

A.4 Methoden zur Identifizierung von Virulenzgenen

Zur Identifizierung von Virulenzgenen in pflanzenpathogenen Pilzen gibt es verschiedene experimentelle Ansätze. Ein Weg ist beispielsweise die Auswahl von Genen mit vorhergesagten Funktionen für die Pathogenität, wie z. B. Gene für infektionsspezifische Morphogeneseprozesse, Toxinsynthesen, Transporterproteine oder lytische Enzyme. Die folgende funktionelle Charakterisierung gezielter Deletionsmutanten kann Aufschluss über die Rolle eines Gens während der Pathogenese geben (Fang & Dean, 2000; Jansen et al., 2005; Lysøe et al., 2006). Leider ergibt sich am Ende häufig kein Zusammenhang zwischen dem untersuchten Gen und der Virulenz des Pathogens, da entweder das Gen für die Infektion nicht benötigt wird oder sein Verlust trotz einer Funktion während der Pathogenese durch andere Virulenzgene kompensiert wird (Lee et al., 2005; Lysøe et al., 2006).

Mit differentiellen Hybridisierungs-Analysen oder Mikroarrays können andererseits die Expression einzelner Gene oder komplexe Genexpressionsmuster während der Infektion des Wirtes sichtbar gemacht werden (Guldener et al., 2006; Sugui & Deising, 2002). Über gezielte Gendeletionen kann im Anschluss eine Funktion für die Virulenz bestätigt oder widerlegt werden. Der entscheidende Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass sich unter der großen Zahl differentiell regulierter Gene nur wenige befinden, die tatsächlich eine maßgebliche Rolle für die Virulenz spielen. Andere Gene werden übersehen, da sie vielleicht nicht differentiell exprimiert sind, aber trotzdem eine zentrale Rolle für die Virulenz spielen.

Eine weitere Methode testeten Krijger et al. (2008) für *C. graminicola* mit einem Yeast Secretion Sequence Trap-Ansatz (YSST). Pilzliche sekretierte Proteine sind als Effektoren für die Etablierung einer kompatiblen Interaktion mit der Pflanze entscheidend (siehe Abschnitt A.3.2 Seite 10 und Kamoun, 2006). Deswegen wurden Transkripte von *C. graminicola* ermittelt, die für kleine sekretierte Proteine codieren und während der Infektion von Mais auftreten. Mit Hilfe von Deletionsanalysen konnte jedoch für keinen dieser Kandidaten eine entscheidende virulenzspezifische Funktion festgestellt werden (Weihmann, Kröling, Krijger, Wirsal, Deising; unveröffentlichte Daten).

Die bis hier beschriebenen rückwärts gerichteten Ansätze verlangen immer eine zuvor postulierte Funktion von einzelnen Genen als Virulenzgen. Deletionen dieser Gene mit sich anschließenden aufwändigen Charakterisierungen beanspruchen viel Zeit und Ressourcen. Erst im letzten Schritt kann durch einen Virulenztest der Phänotyp der Deletionsmutante festgestellt werden. Oft sind viele Deletionsmutanten unverändert virulent. Nur ein geringer Teil zeigt eine veränderte Virulenz und das deletierte Gen kann als Virulenzgen bezeichnet werden. Dem gegenüber steht die genetisch vorwärts gerichtete Strategie – die Zufallsmutagenese. Sie bietet entscheidende Vorteile: die Mutagenese ist nicht aufwändig und liefert in einem Ansatz eine Vielzahl an Transformanten, die sofort im Anschluss bezüglich des Virulenzphänotyps untersucht werden können. So ermittelt man schnell Mutanten, die tatsächlich den gewünschten Phänotyp zeigen. Durch die Identifizierung der mutagenisierten Stelle im Genom einer virulenzdefizienten Mutante wird ein aussichtsreicher Virulenzgenkandidat ermittelt. Über eine folgende gezielte Deletion dieses Gens muss der Phänotyp bestätigt werden und weitere Charakterisierungen können sich anschließen. Aufwändige gezielte Deletionen beschränken sich also nur auf aussichtsreiche Virulenzgenkandidaten, die vor Beginn der Experimente nicht als Kandidaten vorhergesagt werden mussten. Damit können Zufallsmutagenesen wesentlich effizienter eine Vielzahl an Virulenzgenen identifizieren (Münch et al., 2008).

A.4.1 Zufallsmutagenesen

Zufallsmutagenese-Experimente zur Markierung pilzlicher Gene, die zur Etablierung einer pathogenen Interaktion mit der Wirtspflanze notwendig sind, wurden bereits zahlreich durchgeführt (Hamer et al., 2001; Kahmann & Basse, 2001; Mullins & Kang, 2001). Die Pflanzenpathogene *C. graminicola*, *U. maydis*, *M. oryzae* und *C. heterostrophus* wurden beispielsweise mit der Methode der Restriction enzyme site-mediated DNA Integration (REMI) mutagenisiert. Protoplasten der Pilze werden mit geringen Mengen des Restriktionsenzym behandelt, mit dem auch das zu integrierende DNA-Fragment

geschnitten wurde. So wird die Integrationshäufigkeit der transformierten DNA in das Genom von beispielsweise *C. graminicola* um den Faktor 27 erhöht. Für die genannten Pilze konnte bei bis zu 2,0 % der generierten Transformanten ein Virulenzdefekt identifiziert werden (Bölker et al., 1995; Lu et al., 1994; Sweigard et al., 1998). Für *C. graminicola* lag der entsprechende Wert jedoch nur bei 0,3 % (Thon et al., 2000). Obwohl Thon et al. (2000) zeigten, dass 51 % der *C. graminicola* Transformanten den linearisierten Vektor an nur einer einzigen Stelle im Genom integriert haben, schmälern Analysen von *U. maydis*-Transformanten die Erfolgsaussichten der REMI-Mutagenese. Bis zu 50 % der generierten Transformanten sollen unmarkierte Mutationen als Folge der Behandlung mit dem Restriktionsenzym tragen (Kahmann & Basse, 1999; Maier & Schäfer, 1999). Somit können die erhaltenen Phänotypen nicht zwangsläufig nur mit der disruptierten markierten genomischen Stelle in Zusammenhang gebracht werden. Trotz der erfolgreichen Identifizierung einiger Virulenzgene, ließen diese Argumente Zweifel an der REMI-Mutagenese als eine effiziente Methode zur Markierung und Identifizierung von Virulenzgenen aufkommen (Kahmann & Basse, 1999).

Die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (ATMT) vermeidet Probleme, die bei der REMI-Mutagenese durch die Verwendung von Enzymen zur Protoplastierung und zur Restriktion der genomischen DNA verwendet werden. Der in der Natur vorkommende DNA-Transfer von *Agrobacterium tumefaciens* in Pflanzenzellen kann in abgewandelter Form gentechnisch genutzt werden. Der oft verwendete *A. tumefaciens* Stamm LBA1100 (Beijersbergen et al., 1992) enthält ein Ti-Helferplasmid, das die notwendigen *vir*-Gene für den T-DNA Transfer aus dem Bakterium in die Eukaryontenzelle beherbergt. Ein weiteres Plasmid, das binäre Ti-Plasmid, trägt die zu übertragende T-DNA in Form einer Resistenzkassette zur selektiven Markierung von Transformanten. Die T-DNA wird im Ti-Plasmid durch die LB (left border) und RB (right border) mit einer jeweils 25 bp langen Sequenz an den Enden begrenzt. Die phenolische Substanz Acetosyringon induziert die *vir*-Gene und der Transferprozess startet. Nach der Übertragung der T-DNA in den Empfängerorganismus und deren Transport in den Zellkern integriert die T-DNA mutmaßlich zufällig in das Genom. Die entstandene genomische Disruptionsstelle ist durch die T-DNA markiert, trägt den Selektionsmarker und ist durch die bekannte Sequenz der T-DNA lokalisierbar.

ATMT wurde zunächst erfolgreich als Methode für die Transformation von Pflanzen etabliert (Escobar & Dandekar, 2003; Gelvin, 2003). Die Anwendung der Methode zur Transformation von Hefe (Bundock et al., 1995) ebnete den Weg zu filamentösen Pilzen. De Groot *et al.* (1998) demonstrierten erstmals ATMT als eine erfolgreiche Methode zur zufälligen Mutagenisierung von *Aspergillus awamori*. In den folgenden Jahren wurde ATMT bei vielen

pflanzenpathogenen Pilzen wie z. B. *M. oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum falcatum*, *Calonectria morganii*, *Verticillium dahliae*, *B. cinerea* und dem Oomyceten *P. infestans* angewendet (Dobinson et al., 2004; Jeon et al., 2007; Khang et al., 2006; Malonek & Meinhardt, 2001; Maruthachalam et al., 2008; Rolland et al., 2003; Shen et al., 2008; Vijn & Govers, 2003). In den meisten der genannten Pilze erfolgte bei etwa 60 % bis 70 % der generierten Transformanten die Integration einer einzigen Kopie der T-DNA in das Genom. Ein hoher Anteil an solchen Einzelintegrationsmutanten ist das wichtigste Kriterium für die positive Einschätzung dieser Methode. Eine klare Zuordnung des Phänotyps einer Transformante zu einem einzigen Disruptionsort erhöht die Anzahl an aussichtsreichen Kandidaten und folglich auch die Effizienz bei der Identifizierung von Virulenzgenen.

Die Untersuchung des T-DNA Integrationsmusters in *M. oryzae* Transformanten ergab ein präziseres und etwas einfacheres Muster als es bei Pflanzen bekannt ist (Li et al., 2007). Die T-DNA wurde an der RB meist präzise integriert, an der LB hingegen wurde sie häufig verkürzt. Auch wurden Integrationen des gesamten Vektors festgestellt. Chromosomale Rearrangements wie Deletionen, Konversionen oder Translokationen, wie sie bei Pflanzen häufiger auftreten, waren nur in wenigen Transformanten beobachtet worden (Choi et al., 2007; Li et al., 2007). Aus einer Bibliothek von 6.179 Transformanten konnten 623 Integrationsstellen über die RB- und 124 Integrationsstellen über die LB-flankierende genomische Region identifiziert werden. Die Verteilung aller ermittelten Integrationsstellen im Genom war jedoch nicht vollkommen zufällig. Auffällig ist eine bevorzugte Integration in Promotoren-Bereiche, auch zwischen den Chromosomen ist die Verteilung nicht ausgewogen. Trotzdem ist die Integrationsstellenverteilung im Genom von *M. oryzae* als deutlich zufälliger eingeschätzt worden als in transformierten Pflanzen (Choi et al., 2007). Kürzlich wurde in einem ATMT Hochdurchsatz-Verfahren eine Bibliothek von 70.000 *M. oryzae* Transformanten erstellt und begonnen, die Disruptionsstellen zu bestimmen (Chen et al., 2011). Dieser Aufwand belegt, dass die ATMT von *M. oryzae* als eine effiziente Methode zur Identifizierung von Genen und deren Funktionen eingeschätzt wird.

Flowers und Vaillancourt (2005) untersuchten verschiedene experimentelle ATMT Parameter für *C. graminicola*. Den größten Einfluss auf die Transformationseffizienz hatten die Auswahl des *A. tumefaciens* Stammes und seines binären Vektors, das Verhältnis von Konidien und Bakterien während der Co-Kultivierung und die Dauer der Co-Kultivierung. Selbst bei einer optimalen Kombination der Parameter zeigten Southern Blot Analysen T-DNA Integrations-Modi, die ungünstig für die notwendige Identifizierung der angrenzenden genomischen Flanken sind. Sehr häufige Tandem-Integrationen von gesamten Ti-Plasmiden und ein Anteil von mindestens 36 % an Mehrfachintegrationen im Genom führten zu dem Schluss, die

ATMT sei ohne weitere Modifikationen als Methode der zufälligen Insertionsmutagenese für *C. graminicola* ungeeignet.

Ungeachtet der Schlussfolgerungen von Flowers und Vaillancourt (2005) und trotz vorhandener Unzulänglichkeiten bezüglich der Integrationsfrequenzen, Integrationsmodi und der Zufälligkeit bei anderen Pilzen, wird in der Literatur die ATMT für filamentöse Pilze als eine geeignete Methode zur Markierung und Identifizierung unbekannter Gene bzw. Virulenzgene beschrieben.

A.5 Sekretion von Virulenzfaktoren

Die Sekretion von Proteinen ist für Pilze ein entscheidender Vorgang. Einerseits werden lytische Enzyme sekretiert, um Nährstoffe außerhalb der Zelle abzubauen und in gelöster Form aufzunehmen. Andererseits können sekundäre Metabolite nach außen gelangen. Phytopathogene Pilze sind hinsichtlich der Besiedlung ihrer Wirtspflanze zusätzlich aus einem anderen Grund vom Sekretionsweg abhängig. Virulenzfaktoren, die außerhalb der Pilzzelle oder sogar in der Wirtszelle wirken sollen, müssen sekretiert werden. Die vakuoläre (H^+)-ATPase (V-ATPase) spielt u. a. für die Sekretion eine wichtige Rolle (Hinton et al., 2009) und soll genauer beschrieben werden.

A.5.1 Aufbau und Assemblierung der V-ATPase

V-ATPasen sind sehr komplexe membranständige Enzyme. Auf der cytoplasmatischen Seite des Enzyms wird ATP gespalten. Die freiwerdende Energie wird in elektrochemische Energie umgesetzt, indem Protonen aus dem cytoplasmatischen Raum über die Membran gepumpt werden. So entsteht einerseits eine protonenmotorische Kraft über die Membran und andererseits eine Absenkung des pH-Werts im Innenraum beispielsweise der Vakuole oder des Golgi-Systems.

Die Zusammensetzung pilzlicher V-ATPasen wurde in *S. cerevisiae* sehr detailliert untersucht. Das Enzym ist aus 13 Untereinheiten aufgebaut, acht davon gruppieren die hydrolytische V_1 -Domäne und fünf die Protonen translozierende membranständige V_0 -Domäne (Bowman & Bowman, 2000; Stevens & Forgac, 1997). Die Untereinheit a ist mit 100 kDa die größte und wird in *S. cerevisiae* durch zwei Gene codiert, um Organellenspezifische Isoformen bilden zu können (Manolson et al., 1994). In Abbildung 2 ist ein Schema des Enzymkomplexes dargestellt.

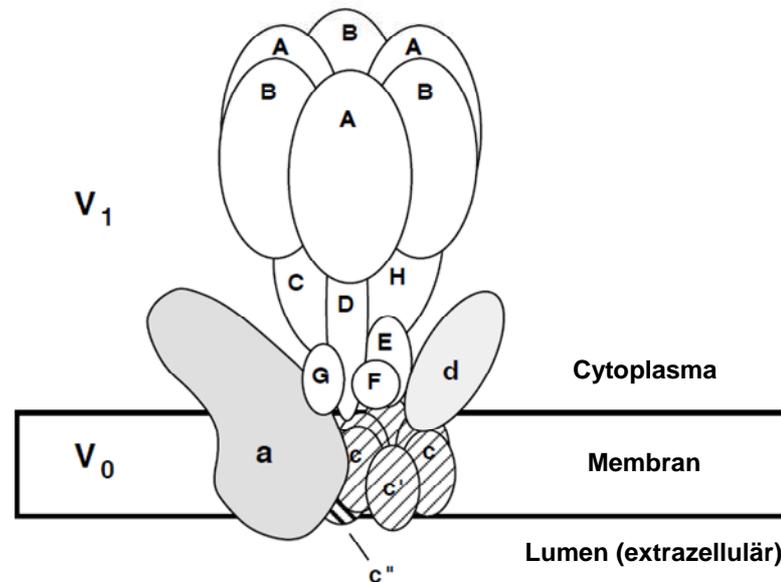


Abbildung 2: Modell der V-ATPase. Die V-ATPase besteht aus zwei Domänen. V₁, die periphere Domäne mit den Untereinheiten A bis H, ist ein löslicher Komplex von 500-600 kDa und trägt die ATP-katalytische Einheit. V₀, die transmembranale Protonen-translozierende Domäne, ist 250-300 kDa groß und beinhaltet die hydrophoben Proteolipid-Polypeptide c, c' und c'', die integrale 100 kDa Untereinheit a sowie die peripher assoziierte Untereinheit d. Abbildung nach Stevens (1997)

In *S. cerevisiae* sind alle 14 Gene der V-ATPase-Untereinheiten bekannt (Kane & Stevens, 1992; Kane, 2007). Analog hierzu wurden auch in *Neurospora crassa* 13 V-ATPase-Untereinheiten identifiziert und bereits 12 der Gene isoliert (Bowman & Bowman, 2000). Entgegen *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten wird in *N. crassa* jede Untereinheit von nur einem Gen kodiert, Isoformen existieren also nicht. Ein Vergleich der eukaryotischen V-ATPasen zeigt eine hohe Konservierung des gesamten Proteinkomplexes (Bowman & Bowman, 2000).

Hefemutanten, in denen die V-ATPase-Aktivität komplett fehlt, sind lebensfähig. Das erlaubt in Hefe die Untersuchung veränderter V-ATPasen in Mutanten, in denen eine der 13 Untereinheiten fehlt. Wird einerseits eine Untereinheit der V₁-Domäne deletiert, werden die restlichen V₁-Untereinheiten zwar gebildet, jedoch erfolgt – abhängig von der fehlenden Untereinheit – das Assembly im Cytoplasma nur partiell (Doherty & Kane, 1993). Obwohl die V₀-Domäne korrekt gebildet und in der Membran verankert wird, erfolgt keine Kopplung von V₁ an V₀ (Kane et al., 1992). Wird andererseits eine Untereinheit der V₀-Domäne inaktiviert, kann sich die gesamte V₀-Domäne nicht ordnungsgemäß assemblieren und keine der gebildeten V₀-Untereinheiten ist in der Membran lokalisierbar. Die vollständige V₁-Domäne ist hier frei im Cytoplasma vorhanden (Doherty & Kane, 1993; Tomashek et al., 1996). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass sich nur eine vollständige V₀-Domäne in die Membran einlagern kann und dass eine Kopplung der V₁- an die V₀-Domäne ausschließlich mit zwei

vollständigen Domänen erfolgt. Die Aktivität der V-ATPase wird *in vivo* u. a. über eine reversible Dissoziation der V_1 -Domäne von der V_0 -Domäne gesteuert. Nitrat und andere oxidierende Agenzien bewirken eine solche Dissoziation und führen damit zu einer zeitweisen Inaktivierung der Protonenpumpe (Bowman et al., 1989; Kane et al., 1989).

Neben den bereits genannten Genen für die Untereinheiten der V-ATPase wurden weitere Gene identifiziert, die nicht für strukturelle Komponenten sondern für Assemblierungsfaktoren kodieren. In Hefe sind die Faktoren *Vma12*, *Vma21* und *Vma22* in die Membran des ER inkorporiert. Diese drei Faktoren sind im frühen Stadium für die Zusammensetzung der V_0 -Domäne verantwortlich und vermitteln eine Einlagerung in die ER-Membran. Es wird vermutet, dass *Vma21* zusätzlich den V_0 -Komplex nach dessen Assemblierung aus der ER-Membran entfernt (Hill & Stevens, 1995; Jackson & Stevens, 1997; Malkus et al., 2004). Davis-Kaplan et al. (2006) identifizierten und charakterisierten einen weiteren Assembly-Faktor der V_0 -Domäne. Eine Deletion des Gens *PKR1* führte zu einer reduzierten Menge an funktioneller V-ATPase. Mutanten hingegen, in denen eine der V_0 -Untereinheiten oder einer der drei ER-membranständigen Assemblierungsfaktoren deletiert wurde und in denen keine funktionelle V_0 -Domäne entstehen kann, weisen einen kompletten Verlust der V-ATPase Aktivität auf. Wird in *PKR1*-defizienten Mutanten *Vma21* überexprimiert, so wird der Defekt ausgeglichen und der Phänotyp des Wildtyps wieder hergestellt. Beide Assemblierungsfaktoren erstellen zusammen mit *Vma12* und *Vma22* eine funktionale V_0 -Domäne und damit eine funktionale V-ATPase. In der späten Phase der Zusammenlagerung des V-ATPase-Komplexes wurden zwei weitere Faktoren, *Vma45* und *Vma41*, gefunden. Beide Faktoren übernehmen vermutlich die späte Assemblierung. *Vma45* wurde in der Golgi-Membran und *Vma41* im Cytosol lokalisiert (Oluwatosin & Kane, 1997, 1998).

A.5.2 Funktionen der V-ATPase

Als membranständige Protonenpumpe ist die V-ATPase für die Azidifizierung der Vakuole, der Endosomen, der Lysosomen, des Golgi Apparates und der sekretorischen Vesikel verantwortlich (Forgac, 1989; Hinton et al., 2009). Das von der V-ATPase erzeugte saure Milieu ist entscheidend z. B. für die Prozessierung von Proteinen in den Kompartimenten (Forgac, 1989). Der Sekretionsweg von Proteinen, der vom Ort der Proteinbiosynthese am ER über das Lumen des ER, das Golgi System und über sekretorische Vesikel entlang des Cytoskeletts in den extrazellulären Raum führt, ist mit der Modifizierung von Proteinen verknüpft (Conesa et al., 2001). Im Verlauf dieses Weges nimmt der pH-Wert in den Kompartimenten stetig ab, in den sekretorischen Vesikeln beträgt er nur noch zwischen 6

und 5. Die Reifung der Proteine durch Glykosilierungen und Faltung beginnt im ER. Ein entsprechender pH-Wert im Golgi Apparat ermöglicht weitere Glykosilierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen. Außerdem werden hier zu sekretierende Proteine entsprechend ihres Zielortes sortiert und in sekretorische Vesikel verpackt. Auch für die letzte Phase der Prozessierung in den sekretorischen Vesikeln ist der saure pH-Wert wichtig, um die Proteine in ihre reife und aktive Form zu überführen (Forgac, 2007). Zusätzlich können durch die Anreicherung von Protonen im Inneren des Vesikels via Antiport Na^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} sowie Hexosen, Saccharose und Aminosäuren, die für die posttranslationale Modifizierung benötigt werden, in die Kompartimente transportiert werden. Durch das Protonen-basierte elektrische Potenzial können auch negativ geladene Ionen oder Moleküle wie Cl^- oder NO_3^- in das Vesikel gelangen (Forgac, 2007).

Mutageneseexperimente mit der V_0 -Domäne in *S. cerevisiae* belegen eine weitere Funktion der V-ATPase. Peters et al. (2001) zeigten für Hefe, dass die Deletion einer der Untereinheiten der V_0 -Domäne den vesikulären Transport zur Zellmembran wesentlich stärker inhibiert als eine Deletion einer V_1 -Untereinheit, obwohl in beiden Fällen die Aktivität der Protonenpumpe fehlt. Neben der Rolle der V-ATPase als Protonenpumpe und deren Bedeutung für die beschriebenen nachfolgenden Prozesse vermittelt die V_0 -Domäne der V-ATPase nach einem Vesikeltransport die Membranfusion mit der Zielmembran (Peters et al., 2001; Strasser et al., 2011). v-SNAREs, die in die Membran der Vesikel als *cis*-Komplex eingebunden sind, werden aktiviert (priming). Sie bestimmen durch die Bildung eines *trans*-Komplexes mit spezifisch passenden t-SNAREs, die in der Zielmembran lokalisiert sind, den Zielort des Vesikels. So gelangen am richtigen Zielort beide Membranen in unmittelbare Nähe (docking). Eine korrekt assemblierte und funktionsfähige V_0 -Domäne in der Membran des Vesikels ist Voraussetzung für eine nachfolgende Fusion der beiden Membranen. Es wurde gezeigt, dass die Proteolipide c, c' und c'', die als Untereinheiten der V_0 -Domäne einen hexameren Ring in der Vesikelmembran bilden, an SNARE trans-Komplexe gebunden werden. Dabei wird die V_1 -Domäne verdrängt und eine Konformationsänderung des Proteolipid-Rings hervorgerufen. Dadurch erfolgt eine partielle Dissoziation des Rings und ein entstehender hydrophober Spalt bewirkt eine Umorientierung der Lipide benachbarter Membranen. Die Vermischung und Fusion der Lipidschichten führt zu einem Hemifusions-Intermediat. Durch eine Vergrößerung der Pore des Proteolipid-Rings erfolgt letztendlich auch eine Vermischung der Inhalte und der Membran-Fusionsvorgang ist beendet (Peters et al., 2001; Scott et al., 2011; Strasser et al., 2011). Die Sekretion von Virulenzfaktoren ist also maßgeblich von der Funktionalität der V_0 -Domäne abhängig. Die ordentliche Modifizierung von proteinogenen Virulenzfaktoren ist hingegen von der Funktion des gesamten V-ATPase Komplexes mit seiner Protonenpumpaktivität abhängig.

B Ziele der Arbeit

Zur Identifizierung weiterer Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren in der Interaktion zwischen *Colletotrichum graminicola* und seiner Wirtspflanze Mais stehen bei dieser Arbeit zwei zentrale Ziele im Vordergrund. Erstens soll geklärt werden, ob sich die Methode der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation (ATMT) bei *C. graminicola* eignet, um verschiedene Virulenz- oder Pathogenitätsgene effizient zu markieren und zu identifizieren. Zweitens zielt das Projekt auf die Identifizierung von konkreten Virulenz- oder Pathogenitätsgenen von *C. graminicola* mit einer sich anschließenden Charakterisierung solcher Gene.

Die Integration der T-DNA an eine einzelne Stelle im Genom von *C. graminicola* ist die ideale Situation, um die entstandene disruptede Stelle zu identifizieren und den Phänotyp der Transformante auf eine einzige Mutation zurückzuführen. Eine bereits erstellte Transformanten-Bibliothek von *C. graminicola* soll daher zunächst auf die T-DNA Integrationsfrequenz untersucht werden. Zusätzlich ist geplant zu klären, ob sich anstelle einer Kopie der T-DNA evtl. Kopien eines gesamten Ti-Plasmids integriert haben. Im weiteren Verlauf soll anhand der Bibliothek untersucht werden, ob per ATMT Kandidaten mit Virulenzdefekten generiert wurden. Für Mutanten mit reduzierter Virulenz ist es geplant, die Integrationsorte der T-DNA zu ermitteln. Mit diesen Ergebnissen kann dann die genannte Evaluierung der ATMT vorgenommen werden.

Eventuell identifizierte T-DNA Integrationsstellen und dazugehörige Gene können dann als putative Virulenzgene weiter untersucht werden. Eine Deletion eines ausgewählten Virulenz-Kandidatengens und die anschließende Charakterisierung der Deletionsmutante soll das Gen als Virulenzgen beschreiben. Weiterhin sind Experimente geplant, die das Gen und seine Funktion bezüglich der Virulenz näher beschreiben. Eine Lokalisierung des Genprodukts und die Untersuchung der Genexpression sind hierbei angedacht.

C Material und Methoden

C.1 Biologisches Material

C.1.1 *Colletotrichum graminicola*

Für alle Untersuchungen mit *C. graminicola* wurde das Wildtyp-Isolat CgM2 verwendet (Anderson & Nicholson, 1996; Bergstrom & Nicholson, 1999; Panaccione et al., 1988). Die Kultivierung und Konidienbildung erfolgte auf Haferflockenagar (OMA) bei 23°C unter NUV-Beleuchtung (Röhrentyp: TLD36W/08; Phillips, Hamburg) im Kultivierungsschrank KBW720 (Binder, Tuttlingen). Mutanten von *C. graminicola* wurden auf festem Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA) mit dem Antibiotikum Hygromycin B bzw. Nourseothricin (siehe Abschnitt C.2.1) ebenfalls bei 23°C kultiviert. Zur Erzeugung großer Myzelmassen wurde *C. graminicola* in flüssigem Kompletmedium (CM) bei 23°C und 100 rpm in einem Unitron Schüttelinkubator (Infors; Bottmindingen, Schweiz) kultiviert. Zur Erstellung von Dauerkulturen wurden Konidien in sterilem H₂O_{bidest} von einer OMA-Kultur aufgenommen und in 25 % (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert. Erzeugte mutagenisierte Isolate von *C. graminicola* wurden in derselben Weise kultiviert und dauergelagert.

C.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Für funktionelle Komplementationsanalysen in *S. cerevisiae* wurde das Referenz-Isolat BY4742 (Accession No. Y10000; Euroscraf, Frankfurt/Main) und die Mutante Δ pkr1 (Accession No. Y16564; Euroscraf, Frankfurt/Main) auf festem YPD-Medium bei 30°C im Inkubator Stuart SI500 (Bibby Scientific Limited, Stone, UK) kultiviert. Eine anschließende Lagerung auf YPD-Medium für ca. 4 Wochen erfolgte bei 8°C. Flüssige Kulturen in YPD wurden im selben Inkubator bei 200 rpm und 30°C für 16 h inkubiert. Für Dauerkulturen zur Lagerung bei -80°C wurde eine Übernachtskultur mit Glycerol versetzt, so dass die Endkonzentration von Glycerol 20 % (v/v) betrug.

C.1.3 *Zea mays*

Die Interaktion von *C. graminicola* mit Mais wurde mit der Sorte Nathan (KWS, Einbeck) untersucht. Drei Pflanzen pro Topf (9 cm x 9 cm x 9 cm) wurden in gedämpfter Komposterde

und Einheitserde ED73 (Einheitserde- und Humuswerke GmbH & Co KG, Sinntal-Jossa) im Verhältnis 5:1 unter kontrollierten Umweltbedingungen angezogen. Infektionen lebender Pflanzen und Virulenztests mit lebenden Pflanzen wurden in Klimaschränken AR-75L (Percival Scientific, Perry, USA) mit den Einstellungen Tag (16 h, 50 % relative Luftfeuchte, 25°C, 70 % Lichtintensität) und Nacht (8 h, 70 % relative Luftfeuchtigkeit, 20°C, 0 % Lichtintensität) durchgeführt.

C.1.4 Bakterienkulturen

Escherichia coli NEB 5-alpha F' (New England Biolabs, Frankfurt am Main) wurde auf LB-Agar bei 37°C oder in flüssigem LB-Medium bei 200 rpm im Inkubator Stuart SI500 (Bibby Scientific Limited, Stone, UK) kultiviert. Die Kultivierung von *E. coli*-Transformanten erfolgte unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums. Kulturen auf LB-Agar wurden im Kühlschrank bei 8°C bis zu vier Wochen gelagert. Dauerkulturen in flüssigem LB-Medium mit 20 % (v/v) Glycerol wurden bei -80°C aufbewahrt.

C.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) und Enzyme sowie Reagenzien für molekularbiologische Experimente von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen. Synthetische Oligonucleotide wurden von biomers.net (Ulm) hergestellt. Weitere Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Heinemann (Duderstadt) erworben.

C.2.1 Nährmedien

OMA, Haferflockenagar (Oat Meal Agar) nach (Koneman et al., 1997)

In 500 ml H₂O_{bidest} wurden 50 g Haferflocken in einem Mixer (Waring Blender BB 90 E; Waring, Torrington, USA) sechs mal 20 s auf höchster Stufe homogenisiert und mit 500 ml flüssigem 2,4 % (w/v) Wasseragar gemischt. Beide Ansätze wurden vereint und 45 min autoklaviert.

CM, Kompletmedium modifiziert nach (Leach et al., 1982)

10 g Glukose, 1 g Hefeextrakt, 1 g Caseinhydrolysat (Difco Laboratories, Augsburg), 10 ml Stammlösung A, 10 ml Stammlösung B, ad 1.000 ml H₂O_{bidest}

LB, Lysogeny Broth (Bertani, 2004)

10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ggf. 15 g Agar-Agar, *ad* 1.000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, ggf. Zugabe von Antibiotika nach dem Autoklavieren und Abkühlen

SCM, Saccharose Komplettmedium

171 g Saccharose, 1 g Hefeextrakt, ggf. 15 g Agar-Agar, *ad* 1.000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

PDA, Kartoffel-Dextrose-Agar (Potatoe Dextrose Agar)

24 g PDA (BD, Heidelberg), 15 g Agar-Agar, *ad* 1.000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, ggf. 1 ml einer Hygromycin B-Stammlösung (100 mg/ml) bzw. 1 ml einer Nourseothricin-Stammlösung (100 mg/ml), die Zugabe des jeweiligen Antibiotikums erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 45°C, die Endkonzentration eines Antibiotikums im Medium soll 100 µg/ml betragen

Minimalmedium (abgewandelt nach Tonukari et al., 2000)

10 ml Stammlösung A, 10 ml Stammlösung B, 0,01 g Hefeextrakt, 15 g Agarose, *ad* 1.000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Minimalmedium mit verschiedenen C-Quellen

Entspricht dem Minimalmedium (s.o.) mit 20 g/l einer der C-Quellen Glukose, Saccharose, Maltose, Raffinose, Pektin oder Cellulose.

Regenerationsmedium

342,3 g Saccharose, 1 g Hefeextrakt, 1 g Caseinhydrolysat, 6 g Agar-Agar, *ad* 1.000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Selektionsmedium

342,3 g Saccharose, 1 g Hefeextrakt, 1 g Caseinhydrolysat, 15 g Agar-Agar, *ad* 1.000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 4 ml einer Nourseothricin-Stammlösung (100 mg/ml) bzw. einer Hygromycin-Stammlösung (100 mg/ml), die Zugabe des Antibiotikums erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 45°C, die Endkonzentration eines Antibiotikums im Medium soll 400 µg/ml betragen

YPD, Yeast Extract-Peptone-Dextrose

10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Glukose, ggf. 15 g Agar-Agar, *ad* 1.000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

SC Ura-, Synthetic Complete ohne Uracil

5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,77 g Complete Supplement Mixture ohne Uracil (Formedium Ltd, Hunstanton, UK), 1,9 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

(Formedium Ltd, Hunstanton, UK), 20 g Glukose, 20 g Agar-Agar, *ad* 1.000 ml H_2O_{bidest}

YPD $CaCl_2$, Yeast Extract-Peptide-Dextrose mit $CaCl_2$

10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Glukose, 15 g Agar-Agar, *ad* 500 ml H_2O_{bidest} , autoklavieren; Separat ansetzen: 77,7 g $CaCl_2$, *ad* 500 ml H_2O_{bidest} , autoklavieren; beide sterilen Lösungen vereinigen

C.2.2 Puffer

DNA-Extraktionspuffer I

7 M Harnstoff, 2 % (w/v) SDS, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

DNA-Extraktionspuffer II

150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

TE-Puffer

0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1x TAE-Puffer

20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, pH 8,3

1x Natriumborat-Puffer

20 mM Natriumborat, mit Borsäure pH 6,7 einstellen

Methylenblaufärbelösung

0,002 % (w/v) Methylenblau in 0,1x TAE

6 x DNA Probenpuffer

30 % (v/v) Glycerin, 60 % (v/v) 10x TAE-Puffer, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

6 x RNA Probenpuffer

30 % (v/v) Glycerin; 60 % (v/v) 10x TAE-Puffer, der mit DEPC Wasser hergestellt wurde; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

20x SSC-Transferpuffer

3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,5

Hybridisierungspuffer

5x SSC-Transferpuffer, 0,1 % (w/v) N-Lauroyl-Sarcosin, 0,02 % SDS, 1 % (w/v) Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim), autoklaviert

2x Waschpuffer I

2x SSC-Transferpuffer, 0,1 % (w/v) SDS

0,5x Waschpuffer I

0,5x SSC-Transferpuffer, 0,1 % (w/v) SDS

0,25x Waschpuffer I

0,25x SSC-Transferpuffer, 0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer II

150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure-NaOH, pH 7,5

Blockingpuffer

1 % (w/v) Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) in Waschpuffer II, autoklavieren

Detektionspuffer

100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5

Protoplastierungspuffer

0,7 M NaCl, 0,1 % beta-Mercaptoethanol, 2 % (w/v) Lyse-Enzyme von *Trichoderma harzianum* (Sigma, Deisenhofen)

STC-Puffer

1 M Sorbitol, 50 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, autoklaviert

PEG-Puffer

40 % (w/v) PEG 4000, 600 mM KCl, 50 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Transformationspuffer I

100 mM Lithiumacetat, 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Transformationspuffer II

40 % (w/v) PEG 3350 in Transformationspuffer I

Natriumphosphatpuffer

70 mM Na₂HPO₄, pH 9,0; der pH-Wert wird mit 70 mM NaH₂PO₄ eingestellt

PBS

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

C.2.3 Lösungen

Stammlösung A

50 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, ad 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, autoklaviert

Stammlösung B

10 g KH_2PO_3 , 12,5 g $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 2,7 g NaCl, ad 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, autoklaviert

TSS, Transformation & Storage Solution

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,17 M NaCl, 20 mM MgCl_2 , 20 mM Mg_2SO_4 , 10 % (w/v) PEG 4000, nach dem Autoklavieren 5 % (v/v) Dimethylsulfoxid (sterilfiltriert) hinzugeben

Depurinierungslösung

0,25 M HCl

Denaturierungslösung

0,4 M NaOH

Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, sterilfiltriert

Kanamycin-Stammlösung

50 mg/ml Kanamycin in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, sterilfiltriert

Hygromycin-Stammlösung

100 mg/ml Hygromycin B in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, sterilfiltriert

Nourseothricin-Stammlösung

100 mg/ml Nourseothricin (Werner BioAgents, Jena) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, sterilfiltriert

Anilinblau-Färbelösung

Eine 10x Stammlösung besteht aus 0,05 % (w/v) Anilinblau. Für 1x Arbeitslösung werden zu 1 ml der 10x Stammlösung 9 ml Natriumphosphatpuffer hinzugegeben.

C.3 Plasmide

pJET1.2/blunt (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

PCR-Produkte mit glatten Enden werden in diesem „high-copy“-Plasmid in *E.coli* kloniert. pJET1.2/blunt ermöglicht eine lebend-tot-Selektion von *E. coli*-Transformanten auf Ampicillin-haltigem Medium.

pJEM-Teasy (Promega, Mannheim)

Im Klonierungsvektor pJEM-Teasy wurden PCR-Produkte mit 3'-A-Überhängen kloniert. Auf Ampicillin-haltigem Medium mit X-Gal und IPTG kann eine Blau-Weiß-Selektion der Transformanten vorgenommen werden.

pPK2 (Covert et al., 2001)

Ti-Plasmid mit der Transfer DNA (T-DNA) zwischen der „left border“ (LB) und „right border“ (RB), die während der ATMT von *A. tumefaciens* auf den Rezipienten übertragen wird. Im Bereich der T-DNA befindet sich das *hph*-Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase zur Selektion in Pilzen. Das Gen steht unter der Kontrolle des Promotors *gpdA* aus *Aspergillus nidulans* und wird terminiert durch den Terminator *trpC*, der ebenfalls aus *A. nidulans* stammt. Die bakterielle Selektion erfolgt über ein Kanamycin-Resistenzgen, das außerhalb der T-DNA auf pPK2 liegt.

pAG300

Transformationsvektor für die Expression von Genen in *S. cerevisiae*. Eine Selektion ist über Uracil-Mangelmedium (SC Ura-) möglich, da der Vektor die Fähigkeit zur Uracil-Synthese vermittelt.

pNR1 (Malonek et al., 2004)

Transformationsvektor für Pilze. Vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin in *E. coli* und Nourseothricin in Pilzen. Das *nat1*-Gen (Nourseothricin-Acetyltransferase) steht unter der Kontrolle des *oliC*-Promotors aus *A. nidulans*, der *tub1*-Terminator aus *Botrytis cinerea* terminiert das Gen.

pJET-CgAAF1

Plasmidvektor pJET1.2 mit *CgAAF1*

pJET-ΔCgAAF1

Plasmidvektor pJET1.2 mit der *CgAAF1*-Deletionskassette

pJET-cCgAAF1

Plasmidvektor pJET1.2 mit der *CgAAF1*-Komplementationskassette

pJET-AGF

Plasmidvektor pJET1.2 mit der *CgAAF1:eGFP* Transformationskassette

pAG-CgAAF1

Plasmidvektor pAG-300 mit der *CgAAF1*-Komplementationskassette

pSM1

Plasmidvektor. Vermittelt in *E. coli* Resistenz gegenüber Ampicillin. Enthält das Gen *hph* mit dem Promotor *trpC* aus *A. nidulans* und das Gen *eGFP*, mit dem Promotor *gpdA* aus *A. nidulans* und dem Terminator *trpC* aus *A. nidulans*.

p123mcherry

Plasmidvektor. Vermittelt in *E. coli* Resistenz gegenüber Ampicillin. Enthält das Gen *hgh* für das rot fluoreszierende Protein mCherry und wird begrenzt durch den Terminator *nos* aus *A. tumefaciens*.

pGG-9 (Fabian Weihmann, unveröffentlichte Daten)

Plasmidvektor. Vermittelt in *E. coli* Resistenz gegenüber Ampicillin. Enthält das Gen *eGFP* mit dem Promotor *toxB* aus *Pyrenophora tritici-repentis*.

pUC18 (Fermentas, St. Leon-Rot)

Plasmidvektor. Vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin.

C.4 Oligonukleotide**C.4.1 pPK2-Primer**

Primer	Sequenz (5' → 3')
ELP_KF3_F5	CCCTACAACGACCATCAAAG
ELP_KF3_R5t	TGTATGTATGGTATCCCCGCATGCTTAAGTGGATCCCGCGGTCTG
Cg-SQ_3	TCGCCCTTCCCAACAGTTGC
Cg-SQ_8	CAGATCAACGGTCGTCAGAG
Cg-SQ_8n	ACTGAGGAATCCGCTCTTGG
Cg-SQ_19	CCTTGA ACTCTCAAGCCTACAG
Cg-SQ_rev07	CGACGTATTTTCAGTGTCGAAAG
Cg-SQ_rev8	GATTCGAAAGCGCCTTCAGC
Cg-SQ_rev20	GGTTTGCGTATTGGCTAGAG
pPK2_rev07	TCACTGCCCGCTTTCCAGTC

C.4.2 CgAAF1-Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
ELP_F10	TCCCGACCAAACGGACCAAG
ELP_R10	AGACGCCCTCGGAGACATTG
ELP_RT_F01	GGCGTCCTTCATAACCAACC
ELP_RT_R01	TCGTTCCCAGACACCTTCTC
ELP_RT_F02	GCCGCGTAGGTGTAGGAAAG
ELP_RT_R02	ACCGGATTCCGGCTGCTACTG
ELP_RT_R05	CATCGGTCGTCTGGATGTTG
ELP_KK_F1	TCGCATCGACTCGGTTCATC
ELP_KK_R1	TTGGTCGCATCGGCAGTTTG
ELP_F1f	TCCCACCCTCCCAACCTATG
ELP_F1r_N	AATCGGGAATGCGGCTCTAGAGCGGCGGACGGGATATGGCTGTTC
ELP_Fr1r	ATGACGGCCTGGATCTGTGG
ELP_Fr1f_N	ATGATTACTAACAGATATCAAGCTTGCATGCGGGGGATAACCATAC
ELP_F12f	TCATTCCGGCTGCTGCTGTC
ELP_Fr2r	TCCTGGACCATCGCCATGTG
ELP_GDK_fw	GACTGACACCTCCTCCTTAC
ELP_GDK_rev	ACAGCACATCGCAGGTTAGC
ELP_PDK300_rev	TTTGGTCGCAGATGCGTGAG
ELP_P150Fr2rev	CGTGGAGCTGCTCAACGAAG
ELP_Gen03	ACCGCTGTCTGACCACATAC
CgAT01-02	GTGGTCAGACAGCGGTATCC
CgAT01-04	ACATACCCGTGGAGGCAGAC
ELP_KF1_F5	CATCCAAAGTACCCGAGCCG
ELP_KF1_R5t	AAATGTTTGAACGATCTGCAGCCGGGCCGAGACGCTCATTTGTCC
ELP_KF4_F5	GCATGCGGGGGATAACCATAC
ELP_KF4_R5	AGAGGGCAAAGACTCCAAAG
ELP_KK_F1	TCGCATCGACTCGGTTCATC
ELP_KK_R1	TTGGTCGCATCGGCAGTTTG
EGF_egFusion_F1	CCTTACGAACAGCCATATCC
EGF_egFusion_R1t	ACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTTTGTCTTCTCGTTCTCGTTCCC
EGF_F1_F5	CCTTCGCATCGACTCGTTTC
EGF_F1_R5t	GATGTGTTGACCTCCACTAGCTCCACGGACGGGATATGGCTGTTC
EGF_F6_F5t	GGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCGCATGCGGGGGATAACCATAC
EGF_F6_R5	GGGCATAGAGGTCAACAAGC
EGF_Kass_F1	TCCCACCCTCCCAACCTATG
EGF_Kass_R1	TCTCCACCGACTCCCAACATC
ELP_YK_F01	GGCCATTACGGCCCCATGGCGTCCTTCATAACC
ELP_YK_R01	GGCCGAGGCGGCCGACGCTCATTTGTCTTCTC

C.4.3 Sonstige Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
KpnWalk	GGAGACTGACATGGACTGAAGGAGTAAAGGGIIGGGIIGGGIIGGGTACC
PvuWalk	GGAGACTGACATGGACTGAAGGAGTAAAGGGIIGGGIIGGGIIGGGATCG
AatWalk	GGAGACTGACATGGACTGAAGGAGTAAAGGGIIGGGIIGGGIIGGGACGTC
TailNested	GGAGACTGACATGGACTGAAGGAGT
Nours_F02	CTCTTGACGACACGGCTTAC
Nours_R02	GGCAGGGCATGCTCATGTAG
ELP_KF2_F5	CCGGCTGCAGATCGTTC
ELP_KF2_R5t	TACGACTTTGATGGTCGTTGTAGGGCCGGCAGATCTGATATCATC
CgAT03-10	TGCATCACTCTGCCCCGAGAC
CgAT03-11	GTTTACTTGTCTGGGCCGTTG
CgAT04-01	CCTGTTTCGCTGGCCATCTTG
CgAT04-02	ACGGGATGGACGAGGTACAC
CgAT05-04	AAGCCCTGGTCCAGCTTCTC
Cg-ITS2-F1.1	CGTCGTAGGCCCTTAAAGGTAG (Weihmann, unveröffentlichte Daten)
Cg-ITS2-R1	TTACGGCAAGAGTCCCTC (Weihmann, unveröffentlichte Daten)
M13_For	GTA AACGACGGCCAGTGC (Fermentas, St. Leon Rot)
M13_Rev	CACAGGAAACAGCTATGACC (Fermentas, St. Leon Rot)
CgDAL2_P300Fr_1fw	ACCTCCAACCTCCCTGGATGC
hphwalk2n	GTGTA CTGTGTAAGCGCCCACTC
Gpd-Sonde	ATGTTGGCGACCTCGTATTGG
Hyg1-Sonde	GTCCCTCAGTCCCTGGTAGG
Nours_fw	CCGCTCTAGAGCCGCATTC
Nours_rev	AAGCTTGATATCTGTTAGTAATCATCATTAAG
EGF_egFusion_F2	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
EGF_egFusion_R2	TCCGGAGCTGACATCGACAC
EGF_F2_F5	TGGAGCTAGTGGAGGTCAAC
EGF_F2_R5	TTCCCGGTCGGCATCTACTC
EGF_F3_F5t	GAATAGAGTAGATGCCGACCGGAACCGGCTGCAGATCGTTC
EGF_F3_R6t	GGTACCTGGACAAGACACGTGGCCTCCGGCAGATCTGATATCATC
EGF_F4_F6	AGGCCACGTGTCTTGTCCAG
EGF_F4_R6t	GGTTGGTTATGAAGGACGCCATGGTAGGCCAGTCTTGTGCTCCAG
EGF_F5_F5	ACCATGGCGTCCTTCATAAC
EGF_F5_R5	GCCGCTTACTTGTACAGCTC
Fusion_Ctrl_F1	CTGGGAACGAGAACGAGAAG
Fusion_Ctrl_R1	TCCATGCCGAGAGTGATCCC
CgH3-qRT.F1	CGAGATCCGTCGCTACCAGA (Krijger et al., 2008)
CgH3-qRT.R1	GGAGGTCGGACTTGAAGTCCCT (Krijger et al., 2008)
pJET_fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC (Fermentas, St. Leon Rot)
pJET_rv	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG (Fermentas, St. Leon Rot)

PAG_F01	ACAATCAACTCCGGATCCTC
PAG_R01	AAGCCGACAACCTTGATTGG
T7	ATTATGCTGAGTGATATCCC (Promega, Mannheim)
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA (Promega, Mannheim)

C.5 Infektions- und Wachstumsversuche

C.5.1 Pflanzeninfektionen und Virulenztests

C.5.1.1 Herstellung des Inokulums

C. graminicola wurde wie in Abschnitt C.1.1 beschrieben auf OMA 14 Tage kultiviert. Konidien wurden mit 1 ml sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ von der Petrischale abgeschwemmt. Die Sporen wurden drei mal mit je 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Dabei wurde die Suspension jeweils 1 min bei 5.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 1 ml 0,02 % (v/v) Tween20 aufgenommen. Die Konzentration der gewaschenen Konidien in der Suspension wurde mit der Thoma-Zählkammer (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf) bei 400facher Vergrößerung im Hellfeld (Forschungsmikroskop Eclipse E600; Nikon, Düsseldorf) bestimmt. Anhand dieser Konzentration wurden die gewünschten Endkonzentrationen der Inokulations-Suspension durch Verdünnen mit 0,02 % (v/v) Tween20 hergestellt.

C.5.1.2 Inokulation von Mais und Kultivierung

Maispflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen angezogen (siehe Abschnitt C.1.3). Für die Virulenztests wurden 14 Tage alte Pflanzen inokuliert. Die Inokulations-Suspension hatte eine Konzentration von 10^6 Konidien/ml für Tests mit lebenden Pflanzen oder Maisblattsegmenten für die qPCR Analyse. Für Tests mit Maisblattsegmenten zur Analyse von Infektionsstrukturen wurde eine Konzentration von 2×10^5 Konidien/ml verwendet.

Für einen Spray-Test mit lebenden Pflanzen wurden auf neun Pflanzen 10 ml des Inokulums mit einem Zerstäuber (Carl Roth, Karlsruhe) gleichmäßig verteilt. Zusätzlich erfolgte eine Kontrollinokulation mit 0,02 % (v/v) Tween20 ohne Konidien. Die inokulierten Pflanzen wurden die ersten 24 Stunden in den Klimaschränken bei 25°C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit, einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h / 8 h und bei einer Lichtintensität am Tag von 70 % inkubiert. Um in den ersten 24 Stunden die relative Luftfeuchtigkeit von 100 %

zu gewährleisten, wurden nur für diesen Zeitraum die Pflanzen in den Klimaschränken zusätzlich unter eine feuchte Glocke gestellt. Nach 24 Stunden wurden die Bedingungen für den weiteren Verlauf der Infektion verändert. Die Temperatur für die Nacht wurde auf 20°C eingestellt und die relative Luftfeuchtigkeit wurde für den Tag auf 50 % und für die Nacht auf 70 % abgesenkt.

Bei einem Virulenztest mit lebenden Pflanzen und aufgetropftem Inokulum wurden die Pflanzen mit ihrem Topf waagrecht in eine große Inkubationsschale gelegt. Das dritte Blatt wurde in der Schale minimal mit Tesafilm fixiert und mit 6 Tropfen von jeweils 10 µl der Sporensuspension inokuliert. Die Tropfen hatten einen Abstand von 2,5 cm zueinander. Die Inkubation erfolgte wie im Test mit aufgesprühten Konidien. Einziger Unterschied ist die Aufrichtung der liegenden Pflanzen nach 24 Stunden.

Für Virulenztests mit Blattsegmenten und für qPCR Analysen wurden dritte Blätter von den Pflanzen abgetrennt und auf Filterpapier in Petrischalen mit Tesafilm fixiert. In jede Schale wurden 6 Blattsegmente eingebracht. Die Inokulation erfolgte mit Tropfen von 10 µl Inokulum (entspricht 2.000 Sporen, s. o.). Das Filterpapier wurde dann angefeuchtet und die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen. Die Inkubation der Schalen erfolgte im Kultivierungsschrank KBW720 (Binder, Tuttlingen) bei 23°C in Dunkelheit. Für Tests mit verwundeten Maisblättern wurde das Blattsegment an den Inokulationsstellen mit einer Labornadel durch 5 Einstiche verletzt.

C.5.1.3 Symptomaufnahme und Ernte inokulierter Blätter

Zur Dokumentation des Schadbildes wurden bis zum siebten Tag nach der Inokulation täglich Blätter der inokulierten Pflanzen bzw. Maisblattsegmente fotografiert (Fotokamera D50; Nikon, Düsseldorf). Für eine anschließende mikroskopische Analyse wurden die Blätter in Ethanol mit 25 % (v/v) Acetat über Nacht bei Raumtemperatur entfärbt. Eine Lagerung entfärbter Blätter konnte anschließend in 50 % (v/v) Glycerol bei 8°C erfolgen. Vor der Mikroskopie (siehe Abschnitt C.7) wurde die Mittelrippe der Blätter entfernt.

Zur Gewinnung von RNA aus inokulierten intakten Pflanzen wurden dritte Blätter von Pflanzen aus dem Spray-Test 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi und 96 hpi geerntet. Zu jedem Zeitpunkt wurden fünf dritte Blätter geerntet und als eine Probe definiert. In drei biologischen Wiederholungen wurde die Probennahme durchgeführt. Die Lagerung der geernteten Blätter bis zur Isolierung der RNA erfolgte zunächst in flüssigem Stickstoff und danach bei -80°C.

Für qPCR Analysen wurden 96 hpi aus inokulierten Maisblattsegmenten die Inokulationsstellen als Scheiben mit einem konstanten Durchmesser von 8 mm gestanzt. Es

wurden fünf biologische Wiederholungen durchgeführt, jede Wiederholung umfasste acht Blattscheiben. Die Lagerung der geernteten Blattscheiben erfolgte in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80°C .

C.5.1.4 Untersuchung der Infektionsstrukturen

Zur Untersuchung der gebildeten Infektionsstrukturen wurden inokulierte Maisblattsegmente ab dem ersten bis zum vierten Tag und wenn möglich bis zum siebten Tag nach Inokulation täglich geerntet und über Nacht entfärbt (siehe Abschnitt C.5.1.3). Danach erfolgte die Mikroskopie (siehe Abschnitt C.7.1). Für die Bestimmung der Keimrate wurde der Anteil gekeimter Konidien an der Gesamtzahl der Konidien auf der Blattoberfläche ermittelt. Die Appressorienbildungsrate beschreibt den Anteil gebildeter Appressorien an der Gesamtzahl gekeimter Konidien. Die Melanisierungsrate wurde aus dem Anteil melanisierter Appressorien an der Gesamtzahl gebildeter Appressorien berechnet. Die Penetrationsrate stellt schließlich den Anteil von Appressorien, die das Pflanzengewebe penetriert haben an der Gesamtzahl gebildeter Appressorien dar. Pro Erntezeitpunkt wurde für jeden Kandidaten die Untersuchung mit fünf biologischen Wiederholungen durchgeführt. Pro biologischer Wiederholung wurden zur Bestimmung jeder Bildungsrate 100 der betreffenden Infektionsstrukturen gezählt. Aus den Werten der biologischen Wiederholungen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Zusätzlich wurden Fotos der Infektionsstrukturen angefertigt (siehe Abschnitt C.7.1)

C.5.2 Zytorrhizie

Konidien der zu untersuchenden Isolate von *C. graminicola* und des Wildtyps wurden in einer Konzentration von 10^4 Konidien/ml auf Objektträger gegeben. In einer feuchten Kammer wurden die Objektträger 24 h bei 23°C inkubiert. Das Wasser der Suspension wurde dann vorsichtig abgesaugt und die Objektträger wurden mit Lösungen von Glycerol der Konzentrationen 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M, 2,0 M, 2,5 M, 3,0 M und 3,5 M sowie zur Kontrolle mit Wasser geflutet. Nach einer Inkubationszeit von 30 min erfolgte die Auswertung durch Mikroskopie und eine fotografische Dokumentation (siehe Abschnitt C.7.1). Die Anzahl kollabierter und nicht kollabierter Appressorien wurde für jeweils fünf biologische Wiederholungen bestimmt. Je Wiederholung wurden 100 Appressorien betrachtet. Eine Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung schloss sich an.

C.5.3 Wachstumsversuche

Das Wachstum des Wildtyps von *C. graminicola* und von verschiedenen Mutanten wurde auf festen Minimalmedien mit verschiedenen C-Quellen (Abschnitt C.2.1) und zur Kontrolle ohne C-Quelle untersucht. Die Platten wurden mit 10 μ L einer Konidien suspension mit 10^4 Konidien/ml angeimpft und bei 23°C im Kultivierungsschrank KBW720 (Binder, Tuttlingen) inkubiert. Täglich wurde der Durchmesser der wachsenden Kolonien mit einem Lineal bestimmt. Nach 10 Tagen Wachstum wurden die Kulturen fotografiert und der Versuch beendet.

C.6 Molekularbiologische Methoden

C.6.1 Präparation von Nucleinsäuren

C.6.1.1 Präparation genomischer DNA

Genomische DNA aus *C. graminicola* wurde nach dem Protokoll von Döbbling et al. (1997) isoliert. Etwa 500 mg Pilzmyzel aus einer 7 Tage alten Flüssigkultur mit CM-Medium wurden auf saugfähigem Papier getrocknet und in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das gefrorene Myzelpulver wurde mit 800 μ L Extraktionspuffer I versetzt. Für die Phenol-Chloroform Extraktion wurden 1.100 μ L Phenol-Chloroform (1:1) hinzugegeben, der Ansatz wurde sorgfältig gemischt und bei 14.500 g für 10 min bei 4°C in der Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Die entstehende obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem gleichen Volumen Chloroform gemischt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Nach einer Inkubation für 60 min bei -20°C wurde der Ansatz bei 6.800 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das gebildete Pellet wurde in 700 μ L Extraktionspuffer II resuspendiert. Durch Zugabe von 3,5 μ L RNase A (10 mg/ml; Roche Diagnostics Mannheim) und einer Inkubation bei 37°C für 30 min wurde die RNA abgebaut. Durch die anschließende Zugabe von 10 μ L Proteinase K (20 mg/ml; Roche Diagnostics, Mannheim) und einer Inkubation bei 60°C für 60 min sollten Proteine entfernt werden. Es erfolgte erneut eine Phenol-Chloroform- und eine Chloroform-Extraktion mit anschließender Isopropanol-Fällung wie oben beschrieben. Die gefällte und sedimentierte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 14.500 g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen und das Pellet unter der Sterilbank getrocknet. Das Pellet und somit die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst. Eine Lagerung der DNA-Lösung erfolgte bei -20°C.

Zur Isolation genomischer DNA von *C. graminicola* aus infizierten Blattsegmenten für qPCR Analysen wurden Blattsegmente mit Sporen von *C. graminicola* inokuliert (siehe Abschnitt C.5.1.2) und die entsprechenden Bereiche in der angegebenen Anzahl der Wiederholungen 96 hpi geerntet (siehe Abschnitt C.5.1.3). Die zu einem Ansatz gruppierten Blattscheiben wurden zusammen in einem Reaktionsgefäß mit zwei Stahlkügelchen mit einem Durchmesser von 2 mm im Tissue-Lyser (Quiagen, Hilden) für 20 s bei einer Frequenz von 30 Schlägen/s homogenisiert. Anschließend wurde mit dem Kit „peqGOLD Plant DNA Mini“ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) die Gesamt-DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert. Zur Evaluierung von Verlusten während der Isolationsprozedur wurden in jeden Ansatz vor der Zelllyse 50 pg des Plasmids pUC18 (10 µl von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 5 pg/µl) hinzugegeben. Nach der qPCR Analyse wurden relative DNA-Verluste, die während der Isolation entstehen, anhand des Verlusts von pUC18 bestimmt. Diese Werte wurden als Normalisierungsfaktoren zum Vergleich der biologischen Wiederholungen berücksichtigt.

C.6.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

E. coli NEB 5-alpha F' wurde in 3 ml flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37°C im Inkubator Stuart SI500 (Bibby Scientific Limited, Stone, UK) bei 200 rpm kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde am nächsten Tag bei 5.000 g für 10 min in der Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Aus den sedimentierten Bakterien wurde die Plasmid DNA mit dem Kit „peqGOLD Plasmid Miniprep I“ (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) isoliert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

C.6.1.3 Präparation von RNA

Von 5 Tage alten *C. graminicola* CM-Kulturen wurde das Pilzmyzel geerntet und auf saugfähigem Papier getrocknet. Anschließend wurde mit flüssigem Stickstoff das Myzel homogenisiert. Jeweils 100 mg des gefrorenen Myzelpulvers wurden unverzüglich in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 450 µl RLT-Puffer (Quiagen, Hilden) gemischt. Die weiteren Schritte der RNA-Isolation wurden mit dem Kit „peqGOLD Plant RNA“ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) gemäß der Anleitung des Herstellers inklusive der DNase-Behandlung durchgeführt.

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus mit *C. graminicola* infizierten Maispflanzen wurde die Ernte von Blättern wie in Abschnitt C.5.1.3 beschrieben durchgeführt. Die geernteten Maisblätter wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das gefrorene Blattpulver wurde mit RLT-Puffer (Quiagen, Hilden) versetzt, wobei zu 100 mg gemörsertem Blattmaterial 450 µl RLT-Puffer hinzugegeben wurden. Die weitere Isolation erfolgte analog zur Prozedur der RNA-Isolation aus *C. graminicola* CM-Kulturen (s.o.).

Isolierte RNA-Proben wurden in einer Gelelektrophorese überprüft (siehe Abschnitt C.6.2.2).

C.6.2 Gelelektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren

C.6.2.1 DNA-Elektrophorese

DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 1.000 bp wurden in Gelen mit einer Agarose-Konzentration (Biozym Scientific, Oldendorf) zwischen 1,0 % und 1,5 % (w/v) hergestellt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in Natriumborat-Puffer gegeben. Durch Aufkochen in einer Mikrowelle wurde die Agarose gelöst und in einen Gelträger gegossen. Für größere DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Konzentration zwischen 0,7 % und 1,0 % (w/v) gewählt und 1x TAE-Puffer verwendet. In der Elektrophoresekammer HU13 (Biostep, Jahnsdorf), die mit dem entsprechenden Puffer gefüllt waren, wurden die mit 6x DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Proben in die Geltaschen gefüllt. Als Größenstandard wurden DNA-Fragmente definierter Länge verwendet (GeneRuler DNA Ladder Mix; Fermentas, St. Leon-Rot). Bei einer konstanten Spannung von 300 V für Natriumborat-Gele und 60 V für TAE-Gele wurden die Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) für 15 min gefärbt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit einer Videodokumentationsanlage unter UV-Licht Bestrahlung (Alphamager, Biozym Scientific, Oldendorf) aufgezeichnet. Alternativ wurden Agarosegele in einer Methylenblaufärbelösung für 2 h inkubiert. Die DNA-Fragmente im Gel sind auf einer weißen Unterlage ohne weitere Hilfsmittel sichtbar.

C.6.2.2 RNA-Elektrophorese

Zum Auftrennen von RNA wurde ein Gel mit 1,0 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer, der mit DEPC-Wasser (Carl Roth, Karlsruhe) hergestellt wurde, gegossen. Die Elektrophoresekammer wurde vor ihrer Verwendung mit 70 % Ethanol ausgespült und als Laufpuffer wurde erneut 1x TAE-Puffer verwendet, der mit DEPC-Wasser hergestellt wurde.

2 µl der isolierten RNA wurden mit 6x RNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V. Die weiteren Schritte sind in Abschnitt C.6.2.1 beschrieben. Anhand der Integrität der ribosomalen 18 S und 23 S RNA-Banden wurde die Qualität der RNA-Probe kontrolliert.

C.6.3 Southern-Hybridisierung

C.6.3.1 Herstellung von Sonden

Zur Markierung und Visualisierung von DNA-Fragmenten auf einer Nylonmembran wurden DNA Fragmente mit DIG-dUTP als DNA-Sonden in einer Standard-PCR hergestellt (Abschnitt C.6.4.1). Als dNTP-Mix wurde in der PCR ein spezieller DIG-dNTP-Mix verwendet, der je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und 1,9 mM dTTP sowie 0,1 mM DIG-dUTP (PCR DIG Labelling Mix Alkali-labil; Roche Diagnostics, Mannheim) enthält. Als Matrize wurde 1 ng Plasmid-DNA verwendet. Ein Kontrollansatz ohne DIG-dUTP wurde zusammen mit der markierten Sonde in einem 0,8 %igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt C.6.2.1). Die markierte Sonde zeigt ein etwas verzögertes Laufverhalten im Vergleich zur nicht markierten Probe. Folgende Primer wurden zur Amplifikation verschiedener Sonden verwendet:

Sonde	Matrize	Primer1	Primer2	Sondengröße
<i>hph</i>	pPK2	Gpd-Sonde	Hyg1-Sonde	1.009 bp
<i>aaf</i>	pJET-CgAAF1	ELP_RT_F01	ELP_RT_R01	537 bp
<i>nat</i>	pNR1	Nours_F02	Nours_R02	558 bp

C.6.3.2 Restriktion und Gelelektrophorese

Jeweils 10 µg genomische DNA wurden mit 10 u des Restriktionsenzym (HindIII, Eco32I, XbaI, XhoI) und dem entsprechenden Puffer in einem Ansatz von 50 µl im Inkubator Stuart SI500 (Bibby Scientific Limited, Stone, UK) bei 37°C für 20 h inkubiert. Die kompletten Restriktionsansätze wurden dann in einem 0,7 %igen (w/v) Agarosegel mit TAE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch die anschließende Färbung im Ethidiumbromidbad wurden die Restriktion und die Auftrennung im Gel kontrolliert.

C.6.3.3 Transfer

Die aufgetrennten genomischen DNA-Fragmente wurden nun auf eine Nylonmembran (Hybond-N+; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen. Dazu wurde das Agarosegel zunächst 30 min in 0,25 M HCl und anschließend in 0,4 M NaOH inkubiert und leicht geschüttelt. Auf einem 10 cm hohen Stapel aus Papierhandtüchern wurden 3 Lagen Filterpapier (Whatman 3MM; Whatman, Göttingen), darauf die Nylonmembran, das Agarosegel und zwei weitere Lagen Filterpapier positioniert. Die Membran und das Filterpapier hatten genau die Größe des Agarosegels und wurden so angeordnet, dass alle Einheiten deckungsgleich aufeinander lagen. Den Abschluss bildeten lange Streifen Filterpapier in Gelbreite, die eine Verbindung zum Reservoir an 20x SSC-Transferpuffer herstellten. In einem abwärts gerichteten Kapillartransfer wurde die DNA innerhalb von 3 h aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran übertragen. Nach dem Transfer wurde die DNA durch eine zweistündige Inkubation der Membran bei 80°C kovalent an die Membran gebunden.

C.6.3.4 Hybridisierung

Die Membran wurde zunächst für 2 h in 20 ml Hybridisierungspuffer bei 65°C im Hybridisierungsofen (Biozym Scientific, Oldendorf) prähybridisiert. Die Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg), in Eiswasser schnell abgekühlt und in den Hybridisierungspuffer gegeben. Der gesamte Ansatz wurde über Nacht weiterhin bei 65°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zwei mal für 5 min in 40 ml 2x Waschpuffer I bei Raumtemperatur, ein mal für 15 min in 40 ml 0,5x Waschpuffer I bei 65°C und ein mal für 15 min in 40 ml 0,25x Waschpuffer I bei 65°C inkubiert.

C.6.3.5 Detektion der Sonde

Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Zur Vorbereitung wurde die Membran für eine Minute in 40 ml Waschpuffer II gespült. Danach erfolgte die Inkubation für 1 h in 40 ml Blockingpuffer. Anschließend wurde der Antikörper (anti-DIG AP Fab-Fragmente; Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10.000 hinzugegeben und für 30 min inkubiert. Durch drei Waschgänge für je 10 min und mit jeweils 40 ml Waschpuffer II wurden ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend erfolgte eine Behandlung der Membran für 2 min mit 40 ml Detektionspuffer. Danach wurde 1 ml des Substrats CSPD (0,25 mM CSPD ready-to-use; Roche Diagnostics, Mannheim) auf der

Membran verteilt, die zwischen zwei Plastikfolien gebettet 5 min inkubiert wird. Zum Schluss wurde die Membran in Saranfolie verpackt (Saran Wrap; DuPont, Wilmington, USA) und zusammen mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in eine Filmkassette gelegt. Nach einer Belichtungszeit, die sich nach der Signalstärke richtete, wurde der Film in einem Entwicklungsgerät (Optimax TR; MS Laborgeräte, Heidelberg) entwickelt.

C.6.4 PCR

C.6.4.1 Standard-PCR

Alle Reaktionen wurden mit den PCR-Maschinen T-Professional und T-Personal Combi (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Enzyme wurden bei der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) erworben. Standardmäßig wurde ein PCR-Ansatz von 20 μ l wie folgt erstellt:

Reagenz	Stammkonzentration	Volumen
dNTPs	8 mM	2 μ l
Primer1	10 μ M	1 μ l
Primer2	10 μ M	1 μ l
PCR-Puffer	10x	2 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase	5 Units/ μ l	0,2 μ l
DNA-Matrize	10 ng/ μ l	2 μ l
H ₂ O _{bidest}	-	11,8 μ l

Das Programm in der PCR-Maschine umfasste folgende Schritte:

95°C	2 min	initiale Denaturierung	30-40 Zyklen
95°C	30 s	Denaturierung	
T _m	30 s	Annealing	
72°C	1 min/kb	Elongation	
72°C	5 min	finale Elongation	

T_m kennzeichnet die Annealing-Temperatur und richtet sich nach der niedrigsten Schmelztemperatur der eingesetzten Primer. Die Länge des zu amplifizierenden Fragments bestimmt die Dauer der Elongation. Pro kb wird mit 1 min kalkuliert.

Wird als DNA-Polymerase die Phusion DNA Polymerase mit Proofreading-Funktion verwendet (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte), ergibt sich ein modifiziertes PCR-Ansatzschema:

Reagenz	Stammkonzentration	Volumen
dNTPs	8 mM	2,0 µl
Primer1	10 µM	1,0 µl
Primer2	10 µM	1,0 µl
HF-Puffer	5x	4,0 µl
Phusion Polymerase	5 Units/µl	0,2 µl
DNA-Matrize	10 ng/µl	2,0 µl
H ₂ O _{bidest}	-	9,8 µl

Außerdem wird ein PCR-Profil verwendet, in dem der Annealing- und Elongationsschritt zusammen bei 72°C erfolgt:

98°C	30 s	initiale Denaturierung	35 Zyklen
98°C	10 s	Denaturierung	
72°C	25 s/kb	Annealing/Elongation	
72°C	5 min	finale Elongation	

C.6.4.2 DJ-PCR zur Erstellung von Transformationskassetten

Die Transformationskassetten für die Mutagenisierung von *C. graminicola* wurden nach der Methode der Double Joint-PCR (DJ-PCR) nach Yu et al. (2004) hergestellt. Dabei werden zunächst einzelne Fragmente einer Transformationskassette in einer ersten PCR erzeugt. Im darauf folgenden zweiten PCR-Schritt werden zwei oder drei Fragmente ohne die Verwendung von Primern zusammengefügt. Durch homologe Überhänge der Fragmente zueinander übernehmen die Fragmente selbst die Funktion von Primern und vermitteln die Fusion der Fragmente. In einer dritten PCR wird die gesamte Transformationskassette unter Einsatz von Primern amplifiziert. Die drei PCR-Schritte wurden jeweils in 50 µl Ansätzen durchgeführt. Als Matrize wurden 50 ng genomische DNA von *C. graminicola* oder 5 ng des jeweiligen Plasmids eingesetzt. In der zweiten und dritten PCR wurde als Matrize 1 µl des gereinigten Ansatzes der vorhergehenden PCR eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mit dem Kit „peqGOLD Cycle-Pure“ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die PCR-Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

Reagenz	Stammkonzentration	Volumen
dNTPs	8 mM	5,0 µl
Primer1	10 µM	2,5 µl
Primer2	10 µM	2,5 µl
HF-Puffer	5x	10,0 µl
Phusion-Polymerase	2 Units/µl	0,5 µl
DNA-Matrize	variabel	variabel
H ₂ O _{bidest}	-	ad 50 µl

Die PCR-Profile wurden wie folgt gewählt:

Erste und dritte DJ-PCR		
98°C	30 s	initiale Denaturierung
98°C	15 s	Denaturierung
60°C	15 s	Annealing
72°C	15 s/kb	Elongation
72°C	5 min	finale Elongation

30
Zyklen

Zweite DJ-PCR		
98°C	30 s	initiale Denaturierung
98°C	15 s	Denaturierung
60°C	15 s	Annealing
72°C	15 s/kb	Elongation
98°C	15 s	Denaturierung
72°C	30 s	Annealing
72°C	15 s/kb	Elongation
72°C	5 min	finale Elongation

10
Zyklen

25
Zyklen

Der dritte PCR-Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt C.6.2.1). Durch eine Methylenblaufärbung des Agarosegels konnte der Gelbereich mit der vollständigen Transformationskassette mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Mit dem Kit „peqGOLD Gel-Extraction“ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) wurde daraus die Transformationskassette isoliert. Anschließend wurde die Transformationskassette in pJET2.1 (Fermentas, St. Leon-Rot) kloniert (siehe Abschnitt C.6.5).

C.6.4.3 Genomic Walking

Die DNA mit den oligo-C Anhängen dient als Template für die folgende C-Walk-PCR:

Reagenz	Stammkonzentration	Volumen
dNTPs	8 mM	2 µl
spezifischer Primer	10 µM	1 µl
degenerierter Primer	10 µM	2,5 µl
PCR-Puffer	10x	2 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	5 Units/µl	0,2 µl
DNA-Matrize	-	2 µl
H ₂ O _{bidest}	-	10,3 µl

Die Wahl des spezifischen Primers richtete sich nach der zu amplifizierenden Flanke und bindet an die T-DNA. Fragmente der LB wurden mit dem Primer pPK2-rev 07 und Fragmente der RB mit dem Primer Cg-SQ_8 amplifiziert. Der degenerierte Primer (KpnWalk, PvuWalk oder AatWalk) bindet an den 3' Restriktionsüberhang der geschnittenen DNA-Fragmente und an den oligo-C Anhang. Die Wahl des Primers richtet sich nach dem verwendeten Restriktionsenzym. Zusätzlich tragen die degenerierten Primer den 5' Anhang (5'-GGA GAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG T) als Matrize für eine nested-PCR. Die C-Walk-PCR lief nach folgendem Profil ab:

C-Walk-PCR			
95°C	2 min	initiale Denaturierung	
95°C	30 s	Denaturierung	5 Zyklen
70°C	30 s	Annealing	
72°C	2 min	Elongation	
95°C	30 s	Denaturierung	5 Zyklen
65°C	30 s	Annealing	
72°C	2 min	Elongation	
95°C	30 s	Denaturierung	20 Zyklen
60°C	30 s	Annealing	
72°C	2 min	Elongation	
72°C	5 min	finale Elongation	

Aus dem Reaktionsansatz der C-Walk-PCR wurde 1 µl als Matrize für die folgende nested-PCR eingesetzt. Der Primer TailNested bindet an die 5' Anker-Sequenz, die durch die Primer KpnWalk, PvuWalk und AatWalk generiert wurde. Als zweiter Primer wurde für Fragmente der LB Cg-SQ_rev20 und für Fragmente der RB der Primer Cg-SQ_8n verwendet. Es wurden 20 µl Ansätze hergestellt:

Reagenz	Stammkonzentration	Volumen
dNTPs	8 mM	2 µl
Cg-SQ_rev20 bzw. Cg-SQ_8n	10 µM	1 µl
TailNested	10 µM	1 µl
PCR-Puffer	10x	2 µl
Taq-Polymerase	5 Units/µl	0,2 µl
DNA-Matrize	-	1 µl
H ₂ O _{bidest}	-	12,8 µl

Das Profil der nested-PCR entsprach dem Profil der Standard-PCR (Abschnitt C.6.4.1) mit einer Annealing Temperatur von 59°C und einer Elongationszeit von jeweils 3 min.

C.6.4.4 RT-PCR

Zum Nachweis von Transkripten aus unterschiedlichen Isolaten von *C. graminicola* und dem Wildtyp wurden Reaktionen mit dem OneStep RT-PCR Kit (Quiagen, Hilden) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben durchgeführt. Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte aus 5 Tage alten CM-Flüssigkulturen bzw. aus infizierten Maisblättern (siehe Abschnitt C.6.1.3). In 10 µl-Ansätzen wurden 50 ng RNA eingesetzt:

Reagenz	Stammkonzentration	Volumen
RT-PCR Puffer	5x	2,0µl
dNTPs	10 mM	0,4 µl
Primer1	10 µM	0,6 µl
Primer2	10 µM	0,6 µl
RT-PCR Enzymmix	50x	0,2 µl
Matrize	50 ng/µl	1,0 µl
H ₂ O _{bidest}	-	5,2 µl

Zur Amplifikation eines 537 bp langen Fragments anhand der cDNA des *CgAAF1*-Transkripts wurden die Primer ELP_RT_F01 und ELP_RT_R01 verwendet. Zur Kontrolle wurden Transkripte des konstitutiv exprimierten Histon H3 Gens aus *C. graminicola* betrachtet (Krijger et al., 2008). Ausgehend von cDNA wurde mit den Primern CgH3-qRT.F1 und CgH3-qRT.R1 ein 100 bp langes Fragment amplifiziert, mit genomischer DNA als Matrize entstand aufgrund eines eingeschlossenen Introns eine Fragmentlänge von 152 bp. Somit konnte gut unterschieden werden, ob DNA-Kontaminationen in den RNA-Proben vorlagen. Die Reaktionen wurden mit dem folgenden PCR-Profil durchgeführt:

50°C	30 min	Reverse Transkription	25-40 Zyklen
95°C	15 min	Denaturierung und Aktivierung	
94°C	30 s	Denaturierung	
60°C	30 s	Annealing	
72°C	50 s	Elongation	
72°C	5 min	Finale Elongation	

Nach der RT-PCR wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert (siehe Abschnitt C.6.2.1).

C.6.4.5 Quantitative RT-PCR

Mit dieser Methode können Transkriptmengen miteinander verglichen werden. Die relative Quantifizierung erfolgte mit einem MyiQ-Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und der Software iQ5-Standardsoftware (Version 2.0.148.60623).

Maispflanzen wurden in drei biologischen Wiederholungen mit *C. graminicola* Wildtyp, mit der Mutante AT039, der Mutante Δ Cgaaf1 und zur Kontrolle mit Wasser inokuliert. Dritte Blätter wurden zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 hpi geerntet und die Gesamt-RNA daraus isoliert (siehe Abschnitt C.5.1.2, C.5.1.3 und C.6.1.3). Für jede RNA-Probe wurde die relative Transkriptmenge von *CgAAF1* und in einer zweiten Reaktion die Transkriptmenge des konstitutiv exprimierten Histon H3 Gens bestimmt (Krijger et al., 2008). Für *CgAAF1* wurden die Primer ELP_RT_F02 und ELP_RT_R02 zur Amplifikation eines 137 bp langen Fragments verwendet. Zur Amplifikation des Histon H3 Genfragments von 100 bp wurden die Primer CgH3-qRT.F1 und CgH3-qRT.R1 verwendet (siehe Abschnitt C.6.4.4). Für die reverse Transkription und Amplifizierung von cDNA-Fragmenten wurde das Power SYBR Green RNA-to-C_T 1-Step Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) eingesetzt. Dabei wurden die Ansätze mit einem Volumen von 20 μ l wie folgt hergestellt:

Reagenz	Stammkonzentration	Volumen
SYBR Green Mastermix	2x	10,0 μ l
Primer1	10 μ M	0,2 μ l
Primer2	10 μ M	0,2 μ l
Enzymmix	125x	0,16 μ l
Matrize	50 ng/ μ l	1,0 μ l
H ₂ O _{bidest}	-	8,5 μ l

Das folgende PCR-Profil wurde verwendet:

48°C	30 min	Reverse Transkription	
95°C	10 min	Denaturierung und Aktivierung	
95°C	15 s	Denaturierung	50 Zyklen
60°C	1 min	Annealing und Elongation	

Nach der qRT-PCR wurde durch eine Gelelektrophorese in einem 1 %igen TAE-Agarosegel (siehe Abschnitt C.6.2.1) kontrolliert, ob in den Ansätzen Fragmente der richtigen Größe entstanden sind. Mit Hilfe des Programms SigmaPlot Version 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) wurde die Funktion des sigmoidalen Kurvenverlaufs der qRT-PCR Messdaten von jeder Reaktion bestimmt. Anhand dieser Funktion wurde der jeweils zugehörige initiale Fluoreszenzwert F_0 ermittelt, der mit der Menge der Matrize zu Beginn der Reaktion in einem Ansatz korreliert (Liu & Saint, 2002). Alle *CgAAF1* F_0 -Werte wurden anhand der *Histon H3* F_0 -Werte normalisiert. Aus den normalisierten Werten von jeweils drei zueinander gehörigen biologischen Wiederholungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Diese Werte wurden zueinander relativiert und stellen so die relativen Unterschiede der *CgAAF1*-Transkriptmengen in den infizierten Blättern zu unterschiedlichen Zeitpunkten und zwischen verschiedenen *C. graminicola* Isolaten dar.

C.6.4.6 Quantitative PCR

Die Quantifizierung des pilzlichen Besiedlungsgrads infizierter Maisblätter wurde per qPCR Analysen mit fünf biologischen Wiederholungen durchgeführt. Maisblattsegmente wurden mit Konidien verschiedener *C. graminicola* Isolate und des Wildtyps sowie zur Kontrolle mit Wasser tropfenweise inokuliert, inkubiert und geerntet (siehe Abschnitt C.5.1). Anschließend wurde die gesamte DNA aus dem infizierten Pflanzengewebe nach Zugabe von 50 pg des Plasmids pUC18 isoliert (siehe Abschnitt C.6.1.1).

Da durch die qPCR Analyse die relative Anzahl an Genomäquivalenten des Pilzes in einem definierten Areal von Maisblättern bestimmt wird, verfälschen Verluste während des DNA-Isolationsprozesses die Ergebnisse. Um diese Verluste bei der Berechnung der pilzlichen Genomäquivalente berücksichtigen zu können, wurden 50 pg des Plasmids pUC18 vor Beginn der DNA-Isolation in jeden Ansatz hinzugegeben. Geht geerntetes Gewebe oder gelöste DNA während der Isolation teilweise verloren, reduziert sich die Menge an pUC18 und an genomischer DNA von *C. graminicola* anteilig gleich. Per qPCR ermittelte relative pUC18-Mengenunterschiede zwischen verschiedenen DNA-Proben können zur

Normalisierung und damit zur Korrektur verwendet werden (Weihmann und Wirsal, unveröffentlichte Daten).

Die Abschätzung der relativen Anzahl an *C. graminicola* Genomäquivalenten erfolgte durch die Amplifizierung eines 98 bp langen Fragments der mehrfach im Genom vorkommenden ITS2-Sequenz (internal transcribed spacer sequence) mit den Primern Cg-ITS2-F1.1 und Cg-ITS2-R1. Ein Fragment des Plasmids pUC18 mit einer Länge von 105 bp wurde mit den Primern M13-For und M13-Rev amplifiziert. Unter Verwendung des MyiQ-Single Color Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und der iQ5-Standardsoftware (Version 2.0.148.60623) wurde die qPCR mit dem Fast SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, Warrington, UK) in 20 µl Ansätzen durchgeführt:

Reagenz	Stammkonzentration	Volumen
Fast SYBR Green Mastermix	2x	10,0µl
Primer1	10 µM	0,2 µl
Primer2	10 µM	0,2 µl
Matrize	10 ng/µl	1,0 µl
H ₂ O _{bidest}	-	8,6 µl

Die PCR wurde folgte dem nachstehenden Ablauf:

95°C	10 min	Denaturierung und Aktivierung	50 Zyklen
95°C	15 s	Denaturierung	
60°C	1 min	Annealing und Elongation	

Durch eine Gelelektrophorese in einem 1 %igen TAE-Agarosegel (siehe Abschnitt C.6.2.1) wurde kontrolliert, ob in den Ansätzen Fragmente der richtigen Größe entstanden sind. Wie im Abschnitt C.6.4.5 beschrieben wurde für jede Reaktion der F₀-Wert bestimmt. Alle pUC18 F₀-Werte wurden zueinander relativiert. Jeder relativierte pUC18 F₀-Wert wurde als Faktor zur Normalisierung des jeweils zugehörigen CgITS2 F₀-wertes verwendet. Aus den normalisierten Werten von jeweils fünf zueinander gehörenden biologischen Wiederholungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Diese Werte wurden zueinander relativiert und stellen die relativen Unterschiede der *CgITS2* Matrizenmenge zu Beginn der Reaktionen dar. Diese Unterschiede verdeutlichen die unterschiedlich ausgeprägte Besiedlung des Blattgewebes zwischen den vier Zeitpunkten und zwischen verschiedenen *C. graminicola* Isolaten.

C.6.5 Klonierung

C.6.5.1 Erzeugung von DNA-Fragmenten und Ligation in den Klonierungsvektor

DNA-Fragmente wurden in einer PCR (siehe Abschnitt C.6.4) hergestellt. Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Agarosegel mit Methylblau gefärbt (siehe Abschnitt C.6.2.1). Die anschließende Gelelution der Fragmente erfolgte mit dem Kit „peqGOLD Gel-Extraction“ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Unter Verwendung des „CloneJET PCR Cloning Kit“ (Fermentas, St. Leon-Rot) konnten die Fragmente, die mit der Phusion DNA-Polymerase (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific Inc, Schwerte) hergestellt wurden, nach den Herstellerangaben in den linearisierten Klonierungsvektor pJET1.2/blunt ligiert werden. Mit der *Taq*-Polymerase hergestellte DNA-Fragmente wurden in den Vektor pGEAM-Teasy (T/A Cloning Kit; Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben ligiert.

C.6.5.2 Transformation von *E. coli*

Zunächst wurden chemokompetente Zellen von *E. coli* hergestellt. Als Übernachtskultur wurden 5 ml flüssiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie von *E. coli* angeimpft und bei 37°C und 200 rpm im Inkubator Stuart SI500 (Bibby Scientific Limited, Stone, UK) kultiviert. Am nächsten Tag wurden 25 ml LB-Medium mit 200 µl der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 200 rpm ca. 3 h inkubiert bis die OD₆₀₀ der Kultur einen Wert zwischen 0,3 und 0,4 annahm (Spektrometer Spekol 2000; Analytik Jena, Jena). Durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 1.000 g (Rotor SS-34; Zentrifuge Sorvall-RC-6, Sorvall Deutschland, Bad Homburg) wurden die Zellen pelletiert und in 2,5 ml TSS aufgenommen. In sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße wurde die Suspension zu je 100 µl aufgeteilt und 10 min auf Eis gelagert. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

Bei -80°C gelagerte kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Der komplette Ligationsansatz (siehe Abschnitt C.6.5.1) wurde in das Reaktionsgefäß mit den aufgetauten Zellen gegeben. Nach leichtem Mischen erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min bis 60 min, ein Hitzeschock bei 42°C für 60 s bis 90 s (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg) und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurde der Ansatz mit 900 µl LB-Medium komplettiert und bei 37°C für 30 min bis 60 min inkubiert (Thermomixer Comfort; Eppendorf, Hamburg).

Die Selektion der Transformanten mit pJET1.2/blunt auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin erfolgte einerseits durch eine Ampicillin-Resistenzgen auf dem Plasmid. Eine zweite Selektion basierte auf einer Unterbrechung des codierenden Bereichs des *eco47IR*-Gens durch das inserierte PCR-Fragment. Dadurch wurde die Expression einer cytotoxischen Restriktionsendonuclease unterbunden. Eine Rezirkularisierung des Vektors ohne Insertion des PCR-Fragments führte zur Expression des letalen Faktors. Transformanten mit dem Vektor pJEM-Teasy waren ebenfalls Ampicillin-resistent. Die Identifizierung von Transformanten mit und ohne Vektorinsertion erfolgte über eine Blau-Weiß-Selektion. Eine Insertion führte zur Unterbrechung des offenen Leserahmens des β -Galaktosidasegens und damit zu keiner Farbreaktion. Als Selektionsmedium wurde deswegen LB-Agar mit IPTG, X-Gal und 100 µg/ml Ampicillin verwendet.

Auf dem entsprechenden Selektionsmedium wurden 10-100 µl des Transformationsansatzes ausplattiert. Bei 37°C erfolgte im Inkubator Stuart SI500 (Bibby Scientific Limited, Stone, UK) die Kultivierung über Nacht. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien isoliert. Die weitere Lagerung von Transformanten erfolgte wie in Abschnitt C.1.4 beschrieben.

C.6.5.3 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle des Inserts in pJET1.2/blunt bzw. pJEM-Teasy wurde in einen PCR-Ansatz mit einem sterilen Zahnstocher ein kleiner Teil der entsprechenden *E. coli* Kolonie übertragen. Der PCR Ablauf richtet sich nach einer Standard PCR (siehe Abschnitt C.6.4.1), jedoch wurde eine initiale Denaturierung von 5 min durchgeführt. Als Primer wurden für pJET1.2/blunt pJET_fw und pJET_rv und für pJEM-Teasy T7 und SP6 verwendet. Im Anschluss wurden die amplifizierten Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf die richtige Größe kontrolliert.

C.6.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die verwendete Methode zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten richtet sich nach Sanger et al. (1977). Die vier im Reaktionsmix (Applied Biosystems, Warrington, UK) enthaltenen Didesoxynucleotide sind durch unterschiedliche Chromophore markiert und können anhand ihrer spezifischen Fluoreszenz identifiziert und voneinander unterschieden werden. Das ermöglicht die Detektion der unterschiedlich langen PCR-Fragmente und somit die Sequenzierung. Als Templates für die Sequenzierreaktionen wurden PCR-Produkte oder Plasmid-DNA eingesetzt.

Ein 10 µl Sequenzieransatz wurde mit dem „BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Warrington, UK) hergestellt. Als Template wurden ca. 10 ng-20 ng für die direkte Sequenzierung von PCR-Fragmenten und ca. 200 ng für die Sequenzierung eines Plasmids verwendet. Der Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Reagenz	Stammkonzentration	Volumen
BigDye Reaktionsmix	-	1 µl
Sequenzierpuffer	5x	2 µl
Sequenzierprimer	2 µM	1 µl
Matrize	-	variabel
H ₂ O _{bidest}	-	ad 10 µl

Das PCR-Programm beinhaltete folgende Schritte:

96°C	2 min	Denaturierung und Aktivierung	15 Zyklen
96°C	10 s	Denaturierung	
50°C	5 s	Annealing	
60°C	1 min 15 s	Elongation	
96°C	10 s	Denaturierung	5 Zyklen
50°C	5 s	Annealing	
60°C	1 min 30 s	Elongation	
96°C	10 s	Denaturierung	5 Zyklen
50°C	5 s	Annealing	
60°C	2 min	Elongation	

Im Anschluss wurden die Ansätze gereinigt. Zu dem kompletten Reaktionsansatz wurden 5 µl 0,125 M EDTA, 60 µl Ethanol und 10 µl H₂O_{bidest} hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde für 20 min bei 14.000 g und 4°C zentrifugiert (Tischzentrifuge 5417R; Eppendorf, Hamburg), das Pellet mit ca. 60 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde unter der Sterilbank getrocknet und bei -20°C gelagert.

Die Sequenzanalysen wurden mit dem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Warrington, UK) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen und die manuelle Korrektur wurde mit dem Programm Chromas Lite 2.01 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) und mit der Software CloneManager 9.0 (Sci Ed Software; New York, USA) vorgenommen. Homologievergleiche (BLAST Search; Altschul et al., 1990) und Datenbankrecherchen erfolgten über die Internetseite des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

C.6.7 Identifizierung der T-DNA-Integrationsstellen

Die Identifizierung der T-DNA Integrationsstellen in den Transformanten erfolgte über die Amplifizierung des Übergangsbereichs von der RB bzw. von der LB der T-DNA zur angrenzenden unbekanntem genomischen Region. Dazu wurde die Methode nach Liu und Baird (2001) in abgewandelter Form verwendet. Zunächst wurden 10 µg genomische DNA einer Transformante mit 10 u des Restriktionsenzym *KpnI*, *PvuI* oder *AatII* in einem Ansatz von 50 µl 1x Reaktionspuffer über Nacht bei 37°C verdaut. Der Ansatz wurde mit einer SureClean-Lösung (Bioline, Luckenwalde) gereinigt und an die 3' Enden der DNA-Fragmente wurde in einer anschließenden C-Tailing Reaktion ein oligo-C Anhang synthetisiert. Der Tailing-Ansatz bestand aus der gereinigten DNA-Lösung, 10 u der terminalen Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT), 1x Reaktionspuffer der TdT, 0,25 mM CoCl₂ und 0,2 mM dCTP. Der gesamte Ansatz von 50 µl wurde für 1 h bei 37°C und zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70°C inkubiert (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg). Ausgehend von diesem Ansatz wurden mit einer C-Walk-PCR und einer anschließenden nested-PCR (siehe Abschnitt C.6.4.3) Fragmente amplifiziert, deren Sequenz den Übergang von der LB bzw. von der RB der T-DNA in die genomische Flanke repräsentiert. Im Anschluss wurden die entstandenen PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt, das Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt (siehe Abschnitt C.6.2.1) und entstandene Fragmente >500 bp aus dem Gel eluiert (peqGOLD Gel-Extraction Kit, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die DNA-Fragmente wurden in pJEM-Teasy (Promega, Mannheim) kloniert (siehe Abschnitt C.6.5.2), sequenziert und analysiert (siehe Abschnitt C.6.6). Für die Sequenzier-PCR wurden die Primer T7 und SP6 verwendet. Bei einer direkten Sequenzierung der Fragmente ohne Klonierungsschritt wurde in der Sequenzier-PCR einer der Primer Cg-SQ_rev20 und Cg-SQ_8n sowie TailNested verwendet.

Nach der Ermittlung der Integrationsorte wurde der T-DNA Integrationsort noch einmal überprüft. Dazu wurden in einer Standard-PCR (siehe Abschnitt C.6.4.1) und in einer anschließenden Sequenzierung der generierten Fragmente (siehe Abschnitt C.6.6) folgende Primer verwendet:

Transformante	Primerkombination für Standard-PCR	Sequenzierprimer
AT039	ELP_PDK300_rev / pPK2-rev07	CgAT01-02
AT039	CgAT01_04 / Cg-SQ_19	CgAT01-04
AT158	CgAT03-10 / Cg-SQ_rev8	CgAT03-10
AT158	CgAT03-11 / hphwalk2 -	CgAT03-11
AT171	CgDAL2_P300Fr_1fw / pPK2_rev07	CgDAL2_P300Fr_1fw
AT171	CgAT04-01 / Cg-SQ_19	CgAT04-01
AT171	CgDAL2_P300Fr_1fw / Cg-SQ_rev20	Cg-SQ_rev20

Transformante	Primerkombination für Standard-PCR	Sequenzierprimer
AT171	Cg-SQ_3 / CgAT04-02	Cg-SQ_3
AT399	CgAT05-04 / Cg-SQ_rev8	CgAT05-04
AT399	CgAT05-04 / Cg-SQ_rev8	Cg-SQ_rev8

Wurde eine T-DNA Integrationsstelle an einer bestimmten genomischen Position vermutet, wurden mit jeweils zwei spezifischen Primern Fragmente amplifiziert, die die Übergänge von der LB bzw. der RB zu den genomischen Flanken darstellen. Dazu wurde eine Standard-PCR (siehe Abschnitt C.6.4.1) bei einer Annealing-Temperatur von 60°C durchgeführt. Zur Ermittlung der T-DNA Integrationsstellen in den Transformanten AT396, AT397, AT402, AT405, AT414, AT420, AT668 und AT673 wurden die Primer CgAT05-04 und Cg-SQ_rev8 eingesetzt. Die Größe der generierten Fragmente wurde gelelektrophoretisch überprüft (siehe Abschnitt C.6.2.1). Danach wurden die Fragmente mit dem Primer CgAT05-04 sequenziert (siehe Abschnitt C.6.6). Durch die Auswertung der Sequenzen konnte der Integrationsort der T-DNA ermittelt werden.

C.6.8 Protoplastentransformation

C.6.8.1 Gewinnung von Protoplasten von *C. graminicola*

Konidien von *C. graminicola* einer 14 Tage alten Kultur auf OMA wurden durch Abspülen mit H₂O_{bidest} gewonnen. Kolben mit 100 ml flüssigem SCM wurden mit ca. 10.000 Konidien beimpft und für 3 Tage bei 23°C inkubiert. Die Kultur wurde anschließend durch eine Lage Miracloth (Calbiochem, San Diego, USA) filtriert. Die Konidien im Filtrat wurden durch Zentrifugieren bei 4.000 g für 10 min bei Raumtemperatur sedimentiert (Rotor SLA-1500, Zentrifuge Sorvall-RC-6; Sorvall Deutschland, Bad Homburg). Die Protoplastierung der Konidien erfolgte durch Zugabe von 20 ml Protoplastierungspuffer für 4 h bei 23°C unter leichtem Schütteln bei 50 rpm in einem Unitron Schüttelinkubator (Infors, Bottmenden, Schweiz). Die Protoplasten wurden für 10 min bei 2.000 g und 4°C sedimentiert (Rotor SS-34, Zentrifuge Sorvall-RC-6; Sorvall Deutschland, Bad Homburg), in 20 ml STC-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1 ml STC-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte auf Eis.

C.6.8.2 Transformation und Selektion

Zu 100 µl der Protoplastenlösung (siehe Abschnitt C.6.8.1) wurden in sterilen 15 ml Reaktionsröhrchen ca. 5 µg der Transformationskassette gegeben. Zusätzlich wurden zwei Kontrollansätze ohne DNA mitgeführt. Alle drei Ansätze wurden für 30 min auf Eis gelagert. Danach schloss sich die Zugabe von jeweils 1 ml PEG-Puffer und eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur an. Zum Schluss wurden in jeden Ansatz 5 ml flüssiges und 45°C warmes Regenerationsmedium gegeben, kurz gemischt und sofort auf festem Selektionsmedium ausplattiert. Ein Kontrollansatz wurde auf Selektionsmedium ohne Antibiotikum ausplattiert, um die Vitalität der Protoplasten zu prüfen. Die anderen beiden Ansätze wurden auf Selektionsmedium mit Antibiotikum ausplattiert. Hier dient der Kontrollansatz zum Test der Selektion durch das Antibiotikum.

C.6.8.3 Gewinnung von Einzelsporisolen

Etwa 7 Tage nach der Transformation wurden einzelne Kolonien auf den Selektionsplatten isoliert und auf OMA-Medium übertragen. Nachdem auf diesem Medium Konidien gebildet wurden, konnten diese mit H₂O_{bidest} abgeschwemmt werden. Stark verdünnt wurden die Konidien auf PDA mit 100 µg/ml Nourseothricin bzw. Hygromycin B ausplattiert. Nach entsprechender Kultivierung konnten Kolonien, die aus einer einzelnen Konidie hervorgegangen sind, auf neue PDA-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml) übertragen werden.

C.6.9 Gezielte Mutagenese-Strategien für *C. graminicola*

C.6.9.1 Deletion von *CgAAF1*

Ein Bereich von 609 bp, in dem sich der codierende Bereich von *CgAAF1* mit 558 bp befindet, wurde im Genom von *C. graminicola* deletiert. An diese Stelle wurde ein Fragment einer Länge von 2.164 bp eingefügt. Dieses Fragment umfasst das Resistenzgen *nat1*, das für eine Nourseothricin Acetyltransferase codiert, den Promotor *oliC* aus *A. nidulans* und den Terminator *tub1* aus *B. cinerea*. Die gesamte Deletionskassette – inklusive der homologen linken und rechten Flanke – besitzt eine Länge von 4.252 bp und wurde wie in Abschnitt C.6.4.2 beschrieben durch DJ-PCRs hergestellt. Dabei wurden folgende Primer und Matrizen verwendet:

CgAAF1-Deletionskassette			
Fragment	Primer1	Primer2	Matrize
A: 5' Flanke	ELP_FI1f	ELP_FI1r_N	gDNA <i>C. graminicola</i>
B: Resistenzkassette	Nours_fw	Nours_rev	pNR1
C: 3' Flanke	ELP_Fr1f_N	ELP_Fr1r	gDNA <i>C. graminicola</i>
A-B-C	ELP_FI2f	ELP_Fr2r	Fragmente A, B und C

Aus fünf verschiedenen *E. coli* Stämmen mit dem Plasmidvektor pJET- Δ CgAAF1, der die erzeugte Deletionskassette enthält, wurde pJET- Δ CgAAF1 isoliert. Die fünf Plasmidlösungen wurden vereinigt und als Template in einer PCR zur massenhaften Amplifizierung der Deletionskassette verwendet. Dabei wurde das Protokoll der ersten PCR (siehe Abschnitt C.6.4.2) mit den Primern ELP_FI2f und ELP_Fr2r verwendet. Zehn parallele Ansätze wurden erstellt. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung der vereinigten Ansätze mit anschließender Methylenblaufärbung (siehe Abschnitt C.6.2.1) wurde die entsprechende Bande mit der Deletionskassette mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Mit Hilfe des Kits „peqGOLD Gel-Extraction“ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) wurde die DNA gewonnen und deren Konzentration mit dem Spektrometer Nanodrop 1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Zur Deletion von *CgAAF1* wurden Protoplasten von *C. graminicola* mit 5 μ g der Deletionskassette transformiert. Dabei wurde nach den Angaben in Abschnitt C.6.8 vorgegangen.

Die korrekte Integration der Deletionskassette in das Genom von *C. graminicola* Einzelsporisolate wurde mit einer Southern Blot Analyse nachgewiesen. Dazu wurde genomische DNA der Isolate in getrennten Ansätzen mit *Hind*III und *Xho*I verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach einem Blot der DNA auf eine Nylonmembran erfolgte eine Hybridisierung mit den Sonden *nat* und *aaf* (siehe Abschnitt C.6.3).

C.6.9.2 Komplementation von Δ Cgaaf1

Zur Komplementation von Δ Cgaaf1 mit *CgAAF1* wurde der 2.164 bp-umfassende Bereich in Δ Cgaaf1, der eine Hygromycin-Resistenzkassette beinhaltet, durch ein 3.143 bp langes Fragment der Komplementationskassette ersetzt. Die gesamte Komplementationskassette mit einer Länge von 5.613 bp beinhaltet den Promotor von *CgAAF1* als linke Flanke, das Gen *CgAAF1*, den *nos* Terminator aus *A. tumefaciens*, den *gpdA* Promotor aus *A. nidulans*, das Gen *hph* und den Terminator von *CgAAF1* als rechte homologe Flanke. Die Herstellung der Komplementationskassette erfolgte, wie in Abschnitt C.6.4.2 beschrieben, unter Verwendung der folgenden Primer und Matrizen:

CgAAF1-Komplementationskassette			
Fragment	Primer1	Primer2	Matrize
A: <i>CgAAF1</i> mit Promotor	ELP_KF1_F5	ELP_KF1_R5t	gDNA <i>C. graminicola</i>
B: <i>nos</i> Terminator	ELP_KF2_F5	ELP_KF2_R5t	p123mcherry
C: <i>hph</i> mit <i>gpdA</i> Promotor	ELP_KF3_F5	ELP_KF3_R5t	pPK2
D: Terminator von <i>CgAAF1</i>	ELP_KF4_F5	ELP_KF4_R5	gDNA <i>C. graminicola</i>
A-B	ELP_KF1_F5	ELP_KF2_R5t	Fragmente A und B
C-D	ELP_KF3_F5	ELP_KF4_R5	Fragmente C und D
(A-B)-(C-D)	ELP_KF1_F5	ELP_KF4_R5	Fragmente (A-B) und (C-D)

Der weitere experimentelle Ablauf der Komplementation erfolgte grundsätzlich wie der Ablauf zur Deletion von *CgAAF1* (siehe Abschnitt C.6.9.1 und C.6.8). Für die massenhafte Amplifizierung der Komplementationskassette ausgehend von pJET-cCgAAF1 wurden die Primer ELP_KK_F1 und ELP_KK_R1 verwendet. Zusätzlich zur Southern Hybridisierung wurde die erfolgreiche Komplementation durch die Wachstumsfähigkeit komplementierter Isolate, des Wildtyps und der Deletionsmutante Δ Cgaaf1 auf PDA mit 100 μ g/ml Nourseothricin bzw. Hygromycin B getestet (siehe Abschnitt C.1.1).

C.6.9.3 *CgAAF1:eGFP* Fusion

Zur Lokalisierung von *CgAAF1* in *C. graminicola* wurde eine Transformationskassette erstellt, die inklusive der homologen Flanken eine gesamte Länge von 5.470 bp aufweist. Mit dieser Kassette wurde in Δ Cgaaf1 das Deletionsfragment von 2.164 bp durch ein Fragment von 3.456 bp ersetzt. Zunächst wurden nach dem Protokoll aus Abschnitt C.6.4.2 die codierenden Bereiche von *CgAAF1* und *eGFP* fusioniert. Anschließend wurde die gesamte Transformationskassette nach demselben Protokoll erstellt. Die Kassette umfasst eine linke Flanke, den *trpC* Promotor aus *A. nidulans*, das Gen *hph*, den *nos* Terminator aus *A. tumefaciens*, den *toxB* Promotor aus *Pyrenophora tritici-repentis*, das Fusionskonstrukt *CgAAF1:eGFP* und den *CgAAF1* Terminator als rechte homologe Flanke. Die verwendeten Primer und Matrizen sind aufgelistet:

AGF-Kassette			
Fragment	Primer1	Primer2	Matrize
E1: <i>CgAAF1</i>	EGF_egFusion_F1	EGF_egFusion_R1t	gDNA <i>C. graminicola</i>
E2: <i>eGFP</i>	EGF_egFusion_F2	EGF_egFusion_R2	pSM1
E1-E2-Fusion	EGF_F5_F5	EGF_F5_R5	Fragmente E1 u. E2
A: 5' Flanke	EGF_F1_F5	EGF_F1_R5t	gDNA <i>C. graminicola</i>
B: <i>hph</i> mit <i>trpC</i> Promotor	EGF_F2_F5	EGF_F2_R5	pSM1

C: <i>nos</i> Terminator	EGF_F3_F5t	EGF_F3_R6t	p123mcherry
D: <i>toxB</i> Promotor	EGF_F4_F6	EGF_F4_R6t	pGG-9
E: <i>CgAAF1:eGFP</i>	EGF_F5_F5	EGF_F5_R5	E1-E2-Fusion
F: <i>CgAAF1</i> Terminator	EGF_F6_F5t	EGF_F6_R5	gDNA <i>C. graminicola</i>
A-B-C	EGF_F1_F5	EGF_F3_R5t	Fragmente A, B u. C
D-E-F	EGF_F4_F5	EGF_F6_R5	Fragmente D, E u. F
(A-B-C)-(D-E-F)	EGF_F1_F5	EGF_F6_R5	(A-B-C) und (D-E-F)

Der weitere experimentelle Ablauf folgte der Beschreibung in den Abschnitten C.6.9.1 und C.6.8. Anhand des Vektors pJET-AGF wurde die Transformationskassette mit den Primern EGF_Kass_F1 und EGF_Kass_R1 massenhaft amplifiziert. Anstelle der Southern Hybridisierung wurde die Integration der Transformationskassette in das Genom von $\Delta Cgaaf1$ mit einer Standard-PCR untersucht (Abschnitt C.6.4.1). Als Matrize diente genomische DNA der transformierten Isolate, des Wildtyps und der Deletionsmutante $\Delta Cgaaf1$. Es wurden Fragmente in den codierenden Bereichen der Gene *CgAAF1*, *nat1* und *hph* mit den Primerkombinationen ELP_RT_F01 / ELP_RT_R01, Nours_F02 / Nours_R02 und Fusion_Ctrl_F1 / Fusion_Ctrl_R1 amplifiziert. Zusätzlich wurde die erfolgreiche Integration der Kassette funktionell durch das Wachstum der transformierten Isolate, des Wildtyps und $\Delta Cgaaf1$ auf PDA mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin bzw. Hygromycin B getestet (siehe Abschnitt C.1.1).

C.6.10 Komplementation von *S. cerevisiae*

C.6.10.1 Erzeugung des Transformationsvektors

Die Transformation der Hefe *S. cerevisiae* richtete sich nach dem Protokoll von Elble et al. (1992). Zunächst wurde mit Hilfe einer Standard-PCR unter Verwendung der Phusion Polymerase, der Primer ELP_YK_F01 und ELP_YK_R01 sowie genomischer DNA von *C. graminicola* als Matrize ein Fragment von 565 bp amplifiziert, das das Gen *CgAAF1* einschließt. Die Größe des amplifizierten Fragments wurde durch eine Gelelektrophorese überprüft (siehe Abschnitt C.6.2.1) und der PCR-Ansatz mit dem Kit „peqGOLD Cycle-Pure“ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) gereinigt. Die verwendeten Primer enthalten am 3' Ende als Verlängerung eine *SfiI*-Schnittstelle mit einer Länge von 13 bp. *SfiI*-Schnittstellen bestehen aus zwei erkenntungsspezifischen Flanken mit der Sequenz 5' GGCC und fünf variablen Basenpaaren, deren Sequenz die Restriktion nicht beeinflusst. Nach einer Restriktion mit *SfiI* entsteht ein 3' Überhang von 3 bp, wobei diese drei Basenpaare in der Mitte der variablen 5 bp liegen. Durch eine unterschiedliche Sequenz der genannten 5 bp in

beiden Primern, die jeweils eine Entsprechung in *SfiI*-Schnittstellen im Transformationsvektor pAG300 finden, kann nach Restriktion des *CgAAF1*-Fragments und des Vektors mit *SfiI* eine gerichtete Ligation in den Vektor erfolgen. Die Restriktion erfolgte mit jeweils 2 Units *SfiI* und 5 μ l des 10x Reaktionspuffers in einem Volumen von 50 μ l bei 37°C für 30 min (Inkubator Stuart SI500; Bibby Scientific Limited, Stone, UK). Danach wurde das Enzym bei 80°C innerhalb von 10 min inaktiviert (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg). Beide Restriktionsansätze wurden mit dem Kit „peqGOLD Cycle-Pure“ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) gereinigt und die DNA-Konzentrationen wurden mit dem Spektrometer Nanodrop 1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Eine Ligation von 50 ng des Transformationsvektors pAG300 und 30 ng des PCR-Fragments erfolgte mit 5 Units T4-Ligase und 10 μ l des 2x Reaktionspuffers in einem Volumen von 20 μ l für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der ligierte Vektor in *E. coli* transformiert (siehe Abschnitt C.6.5.2). Mit einer Kolonie-PCR wurden Klone identifiziert, die den Transformationsvektor pAG300 mit dem richtigen Insert tragen (siehe Abschnitt C.6.4.1). Dazu wurden die Primerkombinationen PAG_F01 und PAG_R01, PAG_F01 und ELP_RT_05 sowie PAG_R01 und ELP_RT_F02 verwendet. Fragmentgrößen von 707 bp, 344 bp und 314 bp zeigten die Insertion von *CgAAF1* und dessen richtige Orientierung an. Aus drei *E. coli* Klonen mit einem korrekten Insert in pAG300 wurde der Transformationsvektor isoliert (siehe Abschnitt C.6.1.2). Die drei Plasmidlösungen wurden vereinigt und nach einer DNA-Konzentrationsbestimmung (Spektrometer Nanodrop 1000; PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) zur Transformation von Hefe verwendet. Nach demselben Protokoll wurde zur Kontrolle ein „leerer Vektor“ ohne Insert erzeugt.

C.6.10.2 Transformation

Die *S. cerevisiae* Mutante Δ pkc1 (Accession No. Y16564; Euroscarf, Frankfurt/Main) wurde transformiert. Von einer YPD Kultur wurde eine Spatelspitze Hefezellen in 0,5 ml Transformationspuffer verteilt und für 5 s zentrifugiert (Tischzentrifuge 5417R; Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde auf 100 μ l reduziert. Zu diesem Ansatz wurden 10 μ l einer Lachsperma-DNA Lösung (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, Steinheim) und 1 μ g des Transformationsvektors hinzugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurden 600 μ l des Transformationspuffers II hinzugegeben. Erneutes Mischen und eine Inkubation von 6 h bei Raumtemperatur schlossen sich an. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg). Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 5 s pelletiert (Tischzentrifuge 5417R; Eppendorf, Hamburg) und in 500 μ l sterilem H₂O_{bidest} resuspendiert. Auf SC Ura- Agar wurden 100 μ l der Zellsuspension ausplattiert und bei 30°C für 4 Tage inkubiert (Inkubator Stuart SI500; Bibby Scientific Limited, Stone, UK). Einzelne

Kolonien wurden isoliert und erneut auf SC Ura- Agar kultiviert und gelagert (siehe Abschnitt C.1.2). Die gesamte Transformation wurde mit dem Transformationsvektor mit Insert und als Kontrolle in einem separaten Ansatz mit dem Transformationsvektor ohne Insert durchgeführt.

C.6.10.3 Komplementationsanalyse

Auf YPD CaCl₂-Medium zeigt die Deletionsmutante Δ pk_{r1} einen starken Wachstumsdefekt, während das Referenzisolat BY4742 von *S. cerevisiae* normal wächst (Dudley et al., 2005). Daher wurden die selbst erstellten Transformanten mit dem Transformationsvektor mit Insert, Transformanten mit dem Transformationsvektor ohne Insert, Δ pk_{r1} und das Referenzisolat auf YPD CaCl₂ Agar bei 30°C für 5 Tage kultiviert (Inkubator Stuart SI500; Bibby Scientific Limited, Stone, UK). Zur Dokumentation des Wachstums wurden die Kulturen anschließend fotografiert.

C.7 Mikroskopie und Fotografie

C.7.1 Lichtmikroskopie

Die Mikroskopie von Pflanzen- und Pilzmaterial erfolgte mit einem Eclipse E600-Forschungsmikroskop (Nikon, Düsseldorf) im Hellfeld. Folgende Objektive wurden verwendet:

Plan Fluor 10x, N.A. 0.3, WD 16.0;

Plan Fluor 40x, N.A. 0.75, WD 0,72

Plan Fluor 100x, N.A. 1.3 oil, WD 0.20

Zur Dokumentation wurden Bilder von Infektionsstrukturen mit Hilfe einer digitalen Mikroskopkamera (Digital Slight DS-U3; Nikon, Düsseldorf) aufgenommen.

C.7.2 Fluoreszenzmikroskopie

Mit *C. graminicola* infiziertes pflanzliches Blattgewebe wurde auf fluoreszierende Strukturen mit dem Mikroskop Eclipse E600 (Nikon, Düsseldorf) unter Bestrahlung mit UV-Licht (Super high pressure Mercury lamp; Nikon, Düsseldorf) untersucht. Die verwendeten Objektive sind in Abschnitt C.7.1 aufgelistet. Als Filter zur Detektion der Fluoreszenz wurden die Filter „GFP 535/50“ und „UV-2A 420“ (Nikon, Düsseldorf) verwendet. Bilder der Objekte wurden mit der Mikroskopkamera Digital Slight DS-U3 (Nikon, Düsseldorf) aufgezeichnet.

Hyphen aus CM-Flüssigkulturen GFP-markierter Isolate von *C. graminicola* wurden mit einem Nikon Eclipse 90i Confocal Laser Scanning-Mikroskop (Nikon, Düsseldorf) analysiert. Die Anregungswellenlänge und der Detektionsbereich wurden entsprechend der Spezifikation des Fluorophors gewählt. Es wurden die gleichen Objektive wie in Abschnitt C.7.1 verwendet. Digitale Bilder der Objekte wurden während des Scan-Prozesses generiert.

C.7.3 Färbetechniken

Zur Färbung Callose-haltiger Strukturen wurden infizierte Maisblätter zunächst entfärbt (siehe Abschnitt C.5.1.3). Anschließend wurde das Pflanzengewebe für 30 min in einer Anilinblau-Färbelösung gefärbt. Nach einem Waschschrift mit Wasser wurde das Objekt im Durchlicht und unter UV-Einstrahlung mikroskopiert (siehe Abschnitte C.7.1 und C.7.2).

Eine Färbung des ER in Hyphen von *C. graminicola* erfolgte mit dem ER-Tracker Blue-White DPX (Invitrogen, Paisley, UK) nach Herstellerangaben.

Vesikel und Vakuolen in Konidien und Hyphen von *C. graminicola* wurden mit dem Farbstoff Neutralrot (Applichem GmbH, Darmstadt) gefärbt. Dazu wurde eine Arbeitslösung von 10 mg/ml (w/v) in PBS hergestellt. Hyphen oder Konidien wurden auf einem Objektträger mit 20 µl der Arbeitslösung versetzt und für 10 min inkubiert. Durch eine leichte Spülung mit Wasser wurde der überschüssige Farbstoff entfernt. Wie in Abschnitt C.7.1 beschrieben, erfolgte die Mikroskopie.

C.7.4 Fotografie und Bildbearbeitung

Zur Dokumentation von experimentellen Ergebnissen wurden Fotos mit der Fotokamera D50 (Nikon, Düsseldorf). Fotografische Bilder wurden mit dem Programm Adobe Photoshop CS 8.8 (Adobe Systems, San Jose, USA) bearbeitet.

C.8 Datenauswertung

Experimentelle Daten wurden mit der Software Microsoft Office 2007 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) ausgewertet und grafisch bearbeitet. Auch die statistische Analyse durch den zweiseitigen T-Test wurde mit der genannten Software durchgeführt.

Sequenzdaten wurden, wie in Abschnitt C.6.6 beschrieben, ausgewertet.

D Ergebnisse

D.1 Erzeugung einer *C. graminicola* Transformantenbank durch ATMT und ihre Charakterisierung

Für *C. graminicola* wurde ein *Agrobacterium tumefaciens*-vermitteltes Transformationssystem in der Diplomarbeit von Floß (2004) unter Verwendung des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes LBA1100 und des Ti-Plasmids pPK2 (Abbildung 3A) etabliert. Unter Verwendung dieses Transformationsprotokolls (siehe Abschnitt H) erstellte Nancy Ludwig eine Bibliothek von ca. 2.000 *C. graminicola* Transformanten. Die dauerhafte Resistenz dieser Transformanten gegenüber dem verwendeten Selektionsmarker Hygromycin B wurde nachgewiesen und suggeriert eine stabile Integration des in der T-DNA enthaltenen Hygromycin-Phosphotransferase Gens (*hph*) in das Genom von *C. graminicola*. Alle Transformanten dieser Bibliothek lagen zunächst uncharakterisiert vor.

D.1.1 Häufigkeit und Modus der T-DNA Integration in das Genom von *C. graminicola*

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Transformanten, um die ATMT-Methode hinsichtlich ihrer Effektivität zum Markieren unterschiedlicher Gene und Virulenzgene zu evaluieren. Zufallsmutagenese-Experimente sollten darauf ausgerichtet sein, einen möglichst hohen Anteil an Transformanten mit nur einer Kopie der T-DNA an einer Integrationsstelle im Genom zu erzeugen. So kann einerseits die Integrationsstelle schnell identifiziert werden und andererseits umgeht man bei mehreren disruptierten Loci aufwendige Zuordnungen des Phänotyps zu einem Locus. Zunächst wurde die Anzahl der T-DNA Integrationsstellen in den Genomen der einzelnen Transformanten durch genomische Southern Blot Analysen untersucht. Für eine repräsentative Untersuchung der o.g. Bibliothek wurden 105 Transformanten zufällig ausgewählt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde diese Analyse zweifach ausgeführt: einerseits mit *HindIII*-geschnittener und andererseits mit *Eco32I*-geschnittener genomischer DNA der Kandidaten. Als Hybridisierungssonde zum Detektieren der T-DNA wurde ein 1.009 bp langes Digoxigenin-(DIG)-markiertes PCR-Fragment verwendet, das mit 688 bp auf der *hph* Gensequenz und mit 321 bp auf dem *gpdA* Promotor hybridisiert (Abbildung 3B). In Abbildung 3C ist ein Auszug der Hybridisierungsbilder der Southern Blots mit *HindIII*-verdauter DNA von 40 der untersuchten 105 Kandidaten dargestellt. Die Auswertung aller Hybridisierungsbilder der Southern Blots mit *HindIII*- und *Eco32I*-verdauter DNA für alle 105 Transformanten ergibt folgende Verteilung: 73 Transformanten (69,5 %) zeigen eine einzige Bande, 28 Transformanten

(26,7 %) zeigen zwei Banden und vier Kandidaten (3,8 %) zeigen drei oder mehr Banden (Abbildung 3C). Die genannten 73 Kandidaten repräsentieren Transformanten mit nur einer einzigen T-DNA Insertionsstelle im Genom. Die 28 Transformanten mit zwei Hybridisierungsbanden besitzen zwei unterschiedliche disruptierte Stellen im Genom und somit zwei T-DNA Insertionsstellen (Doppelintegrations-Transformanten). Zwei Hybridisierungsbanden können aber auch auf eine Disruption nur eines Locus hindeuten, wenn eine tandemartige Integration der T-DNA in diesen Locus erfolgt ist. Eine Bande würde hier die Länge der T-DNA von 4,5 kb als wiederholendes Tandem repräsentieren, die andere Bande würde das letzte Tandem mit der angrenzenden genomischen Flanke bis zur nächsten Restriktionsschnittstelle im Genom darstellen. In allen Hybridisierungsbildern wurde jedoch keine Transformante identifiziert, die sowohl im *HindIII*- als auch im *Eco32I*-Ansatz gleichermaßen eine Bande von 4,5 kb aufweist. Damit kann geschlossen werden, dass in die Gruppe der Doppelintegrations-Transformanten keine Einzelintegrations-Transformanten mit tandemartiger Integrationsweise eingeordnet wurden. In der letzten Gruppe wurden vier Mehrfachintegrations-Transformanten zusammengefasst, bei denen an drei oder sogar an mehr als drei verschiedenen Stellen im Genom die T-DNA integriert wurde. Erneut spielen auch für diese Gruppe tandemartige Integrationsweisen der T-DNA keine Rolle, da diese Tandems nicht nachweisbar waren.

Die Southern Blot Analysen gaben näherungsweise auch Aufschluss über eine mögliche Integration des gesamten Ti-Plasmids in einen einzigen chromosomalen Locus (Flowers & Vaillancourt, 2005; Li et al., 2007). Bei Integration eines einzelnen vollständigen Ti-Plasmids – beginnend und endend an der RB, umfasst die integrierte DNA eine Länge von 10,7 kb. Bei *HindIII*-geschnittener und geblotteter genomischer DNA muss hier im Hybridisierungsbild eine Bande von mindestens 10,5 kb sichtbar sein; 10,5 kb entsprechen auf dem Vektor pPK2 der Distanz zwischen der *HindIII*-Schnittstelle und der RB, wenn *hph* enthalten ist. Die tatsächliche Größe der Bande über 10,5 kb hinaus ist abhängig von der Distanz zur nächsten *HindIII*-Schnittstelle in der flankierenden genomischen Region. Bei 35 Kandidaten (33,3 %) konnten Bandengrößen von mindestens 10,5 kb detektiert werden. Diese Zahl überschätzt aber die Anzahl an Transformanten mit Integration des gesamten Ti-Plasmids, da die Bandengröße keine Abgrenzung zu reinen T-DNA Integrations-Transformanten mit einem weiten Abstand zur nächsten *HindIII*-Schnittstelle in der LB-flankierenden genomischen Region zulässt. Es können also maximal 33,3 % aller untersuchten Transformanten eine Kopie des gesamten Ti-Plasmids in das Genom von *C. graminicola* integriert haben. Im Umkehrschluss bedeutet dieses Ergebnis, dass mindestens 66,7 % aller Transformanten Banden kleiner als 10,5 kb aufwiesen und somit definitiv nicht das gesamte Ti-Plasmid integriert haben. Bei einer darüberhinaus gehenden tandemartigen Integration des gesamten Ti-Plasmids in eine einzige genomische Stelle müsste bei *HindIII*-

D.2 Identifizierung und Charakterisierung von virulenzdefizienten Mutanten aus der Transformantenbank

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Evaluierung der Effizienz der ATMT Methode, Virulenz- oder Pathogenitätsgene zu markieren und durch diese Markierung lokalisierbar zu machen. Daher wurden Transformanten aus der o. g. bestehenden *C. graminicola* Transformantenbank zunächst hinsichtlich ihrer Virulenz untersucht. Identifizierte Virulenzmutanten wurden im weiteren Verlauf infektionsbiologisch und molekular genau charakterisiert. Ziel dieser Experimente ist die Identifizierung von Virulenzgenen in den Transformanten, die per ATMT erzeugt wurden.

D.2.1 Identifizierung von 19 Mutanten mit Virulenzdefizienz

Aus der Transformantenbank wurden die ersten 500 Kandidaten in einem Screen auf ihre Virulenz untersucht. Maisblattsegmente wurden mit Konidien suspensionen der Kandidaten inokuliert und inkubiert. Nach 5 dpi zeigten 439 Transformanten eine normale Symptomausprägung, die der des Wildtyps entsprach. Hier waren keine Virulenzdefekte erkennbar. 61 Kandidaten hingegen ließen Virulenzdefizienzen erkennen, die Symptome waren schwächer ausgebildet als bei Wildtyp-infizierten Blättern oder es waren gar keine Symptome erkennbar. Diese 61 Kandidaten wurden dann in weiteren Virulenztests auf lebenden Maispflanzen und erneut auf Maisblattsegmenten genauer untersucht. Jeder Test wurde für jeden Kandidaten in drei unabhängigen biologischen Wiederholungen durchgeführt. Als Referenz wurden bei jedem Durchgang Inokulationen mit Konidien des Wildtyps und mit Wasser (non-inoculated control; n.i.c.) durchgeführt. Letztendlich konnten so 19 Mutanten identifiziert werden, die einen klaren und reproduzierbaren Virulenzdefekt aufweisen (Abbildung 4). Diese Mutanten lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden die drei Mutanten AT039, AT147 und AT171. Die hervorgerufenen Symptome sind im Vergleich zum Wildtyp zwar stark abgeschwächt, aber es werden trotzdem noch Symptome ausgebildet. Diese Mutanten haben also ihr pathogenes Potenzial nicht vollständig verloren. Die zweite Gruppe hingegen umfasst die restlichen 16 Mutanten, die ihre Fähigkeit, die Wirtspflanze zu befallen und Symptome hervorzurufen, vollständig verloren haben. In ihrer saprophytischen Lebensform auf Petrischalen mit Haferflockenmedium sind alle 19 Mutanten in der Lage, Konidien zu bilden. Die zugehörigen Fotos der Abbildung 4 belegen diese Fähigkeit auch im Vergleich zum Wildtyp.

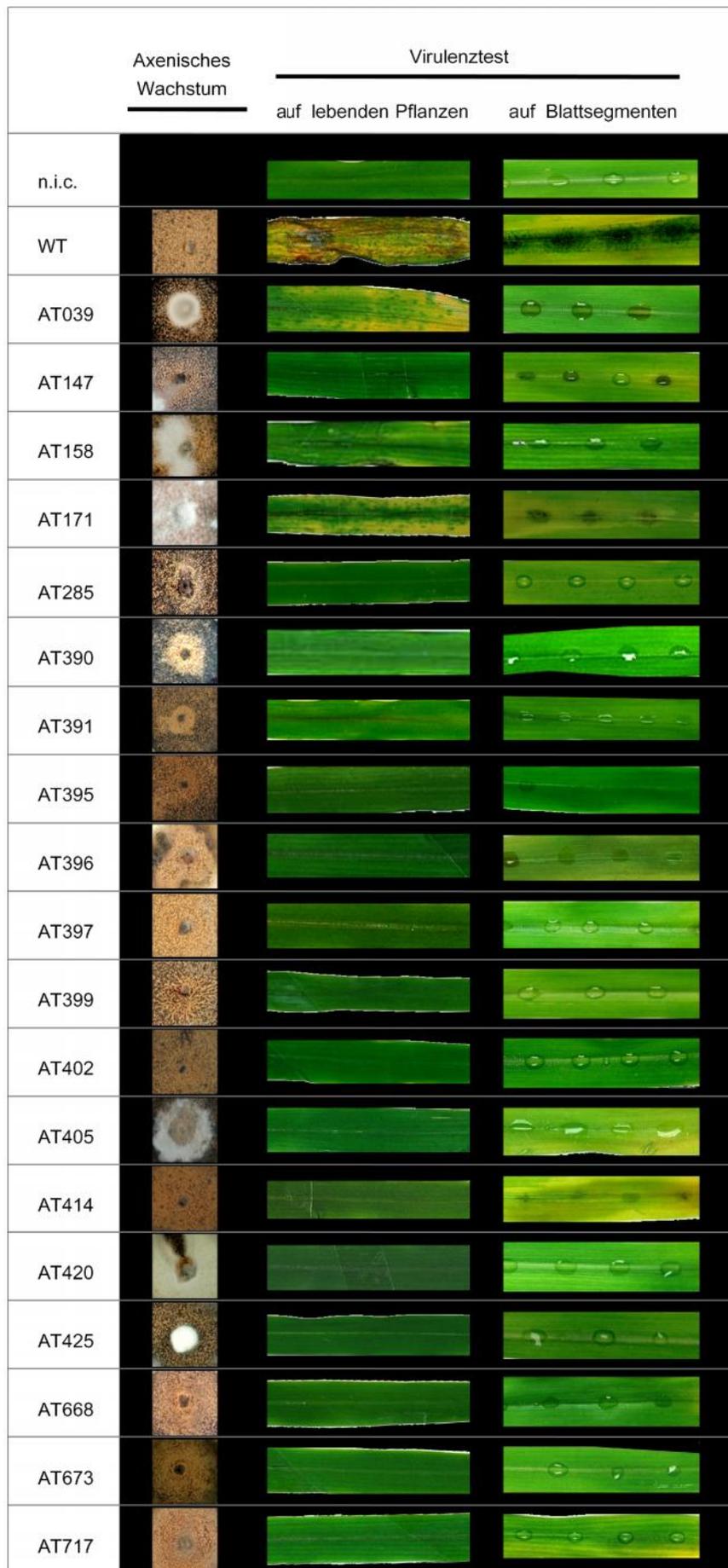


Abbildung 4:
Saprophytische und phytopathogene Entwicklung von *C. graminicola* Transformanten, die durch ATMT erzeugt wurden.

Die Phänotypen des axenischen Wachstums sind links dargestellt. Fotos inokulierter Maisblätter lebender Pflanzen (5dpi) und abgetrennter Maisblattsegmente (4dpi) zeigen für alle dargestellten Transformanten eine reduzierte Symptomausprägung und verdeutlichen die reduzierte Virulenz verglichen mit dem Wildtyp (WT). nic – nicht inokulierte Kontrolle.

D.2.2 Integrationsfrequenz der T-DNA in Virulenzmutanten

Die identifizierten Virulenzmutanten wurden nun in einer genomischen Southern Blot Analyse auf die Integrationshäufigkeit der T-DNA in das Genom untersucht. Dazu wurde von allen 19 Kandidaten genomische DNA einerseits mit *Xba*I und andererseits mit *Hind*III verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer *hph* Sonde (Abbildung 3B) hybridisiert. Als Kontrolle wurde die genomische DNA vom Wildtyp und das Ti-Plasmid pPK2 mitgeführt und gleichermaßen behandelt. Es wurden acht Mutanten identifiziert (AT039, AT147, AT158, AT171, AT285, AT391, AT390, AT399) deren zugehörige Banden sich in ihrer Größe voneinander unterscheiden (Abbildung 5A). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass bei den genannten acht Kandidaten die T-DNA in unterschiedliche genomische Stellen integriert wurde. Sieben der acht Kandidaten (AT039, AT147, AT158, AT171, AT285, AT391, AT399) zeigen im Hybridisierungsbild (Abbildung 5A) genau eine Bande, die jeweils genau eine Disruptionsstelle im Genom verdeutlicht. Diese Mutanten sind also Mutanten mit einer T-DNA Einzelintegration. Die Mutante AT390 hingegen zeigt zwei Banden. Da keine der beiden Banden entweder der Länge einer T-DNA (4,5 kb) oder der Länge des gesamten Vektors pPK2 (10,7 kb) entspricht, kann das Entstehen einer zweiten Hybridisierungsbande durch eine tandemartige Integration entweder der T-DNA oder des gesamten Vektors in einen genomischen Locus ausgeschlossen werden. Die Mutante AT390 besitzt also zwei T-DNA Integrationsstellen im Genom. Die mitgeführte Wildtyp-Kontrolle zeigt erwartungsgemäß keine Bande, da sie keine T-DNA und somit kein *hph* Gen besitzt. Die pPK2 Kontrolle zeigt hingegen eine klare Bande bei >10 kb, was der tatsächlichen linearen Länge des geschnittenen Ti-Plasmids (10,7 kb) entspricht.

Auffallend sind zehn zusätzliche Mutanten (AT395, AT396, AT397, AT402, AT414, AT425, AT668, AT673, AT405 und AT420), die bei *Xba*I-geschnittener DNA exakt dieselbe Bande mit einer Größe von ca. 10 kb aufweisen wie die bereits beschriebene Mutante AT399 (Abbildung 5B). Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass einschließlich der Mutante AT399 bei diesen elf Kandidaten eine Disruption an genau derselben genomischen Stelle erfolgt ist. Untermuert wird diese Annahme durch die Southern Hybridisierung von *Hind*III-geschnittener DNA. Auch hier zeigen alle Kandidaten eine Bande derselben Größe von 7 kb. Ausgenommen der Mutanten AT405 und AT420 zeigen neun der elf Mutanten nur eine Bande und besitzen somit wie die Mutante AT399 nur eine Integrationsstelle im Genom. Die Mutanten AT405 und AT420 zeigen jedoch noch eine zusätzliche zweite Bande mit zueinander gleicher Größe. Da diese Größe nicht der einer T-DNA-Länge oder eines linearen Ti-Plasmids entspricht, handelt es sich hierbei um zwei gleiche Mutanten mit jeweils zwei T-DNA Integrationsstellen. Eine Southern Hybridisierung mit *Hind*III-geschnittener DNA bestätigt dieses Resultat.

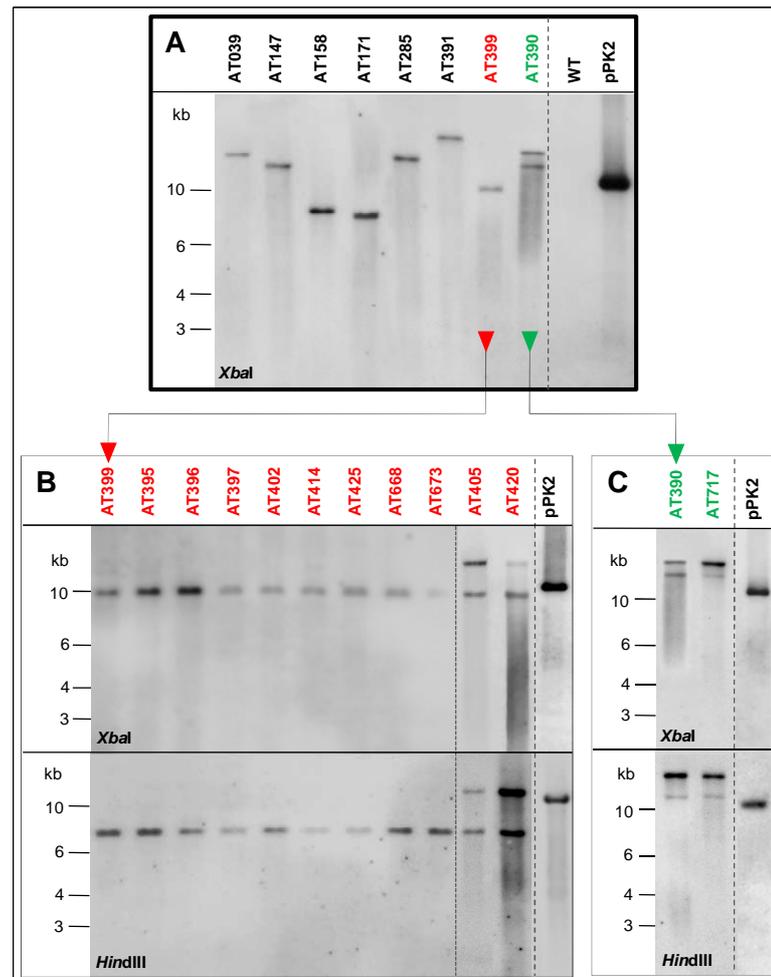


Abbildung 5: Southern Blot Analyse von 19 Virulenzmutanten zur Bestimmung der T-DNA Integrationsfrequenz. Hybridisierungsbilder nach einem Southern Blot von *Xba*I- bzw. *Hind*III-geschnittener DNA der Kandidaten. Sonde: *hph*. Kontrollen: Wildtyp (WT), Ti-Plasmid (pPK2). **(A)** Acht voneinander verschiedene Integrationsmutanten, davon sieben Mutanten mit einer T-DNA Einzelintegration (schwarz und rot) und eine Mutante mit zwei T-DNA Integrationsstellen (grün). **(B)** Elf Mutanten mit demselben T-DNA Integrationsort, davon neun Mutanten mit einer T-DNA Einzelintegration und zwei Mutanten (AT405 und AT420) mit einem zweiten zueinander gleichen T-DNA Integrationsort. **(C)** Zwei Mutanten mit denselben zwei Integrationsorten der T-DNA.

Auch die Mutante AT390 zeigt ein Integrationsmuster, das gleichsam in einer weiteren Mutante (AT717) identifiziert werden konnte (Abbildung 5C). Unter Berücksichtigung der o. g. Argumente kann auch für diese beiden Mutanten mit jeweils zwei Banden geschlossen werden, dass es sich hierbei um Mutanten mit zwei gleichen T-DNA-Integrationen handelt.

Zusammenfassend schlägt die genomische Southern Blot Analyse also für die 19 Virulenzmutanten acht Kandidaten mit voneinander unterschiedlichen Disruptionsstellen vor. Bei elf der 19 Virulenzmutanten scheint die T-DNA in denselben genomischen Locus integriert worden zu sein. Zwei weitere der 19 Kandidaten zeigen ebenfalls ein zueinander

identisches Integrationsmuster. Insgesamt liegen 15 Virulenzmutanten vor, bei denen eine Einzelintegration der T-DNA festgestellt wurde, vier Kandidaten besitzen zwei T-DNA Integrationsstellen.

D.2.3 Identifizierung der genomischen T-DNA Insertionsstellen

D.2.3.1 Modifizierte C-Tailing-Sequenzierungsmethode

Zur Identifizierung der T-DNA Integrationsstellen im Genom der Virulenzmutanten wurden PCR basierte Methoden angewendet, deren grundlegende Prinzipien gleich sind. Mit einem spezifischen T-DNA Primer und einem degenerierten Primer auf der angrenzenden genomischen Flanke werden Fragmente amplifiziert, die den Übergangsbereich zwischen T-DNA und genomischer DNA repräsentieren. Die Sequenz dieser Fragmente liefert dann die Information über die Integrationsstelle. Mit Hilfe der veröffentlichten Genomsequenz von *C. graminicola* kann die Disruptionsstelle in den chromosomalen Kontext gestellt werden.

Die RESDA-PCR Methode (Restriction enzyme site-directed amplification-PCR) von Gonzalez-Ballester et al. (2005) führte nicht zur erfolgreichen Amplifikation von entsprechenden PCR-Fragmenten, deren Sequenzierung Informationen über die flankierende genomische DNA liefern könnten.

Die von Liu und Baird (2001) veröffentlichte Methode der partiellen *NlaIII* Restriktion, des anschließenden Polynukleotid-Tailings und der folgenden C-Walk PCR mit einem semispezifischen Primer auf dem oligo C-Anhang und auf dem 3' Überhang der Restriktionsschnittstelle war zunächst ebenfalls nicht erfolgreich. Durch Modifikationen in den Restriktionsbedingungen und im Primerdesign konnte die Methode jedoch verbessert und erfolgreich angewendet werden. Die genomische DNA der Kandidaten wurde nicht partiell mit *NlaIII* sondern vollständig mit *AatII*, *KpnI* und *PvuI* in getrennten Ansätzen verdaut. Die drei verwendeten Enzyme binden an die entsprechende Restriktionsschnittstelle im Genom nicht wie *NlaIII* mit vier homologen Basen sondern mit sechs Basen. Somit schneiden die Enzyme statistisch gesehen seltener als *NlaIII*, was zu längeren Fragmenten führt. Solche Fragmente waren besser zu detektieren. Die degenerierten Primer für die folgende C-Walk-PCR wurden den freien 3' Überhängen der Restriktionsschnittstellen angepasst. Für *AatII* und *KpnI* ist dieser Überhang fünf Basen lang, für *PvuI* sind es nur vier Basen. Mit dieser veränderten Methode konnten für die sechs Mutanten AT039, AT158, AT171, AT395, AT399 und AT425 Sequenzen der genomischen Flanken ermittelt werden. Durch Vergleiche dieser Sequenzen mit der veröffentlichten Genomsequenz von *C. graminicola* wurde der T-DNA

Integrationsort genau bestimmt (Abbildung 6). Dabei war mehrheitlich das Lesen über die LB hinaus in die genomische Flanke erfolgreich. Aber auch Sequenzierungen über die RB, wie im Beispiel der Mutante AT039, lieferten Informationen zum Integrationsort. Die Verwendung von *KpnI* lieferte die meisten Ergebnisse, trotzdem ist gezeigt worden, dass prinzipiell alle drei Enzyme (*AatII*, *KpnI* und *PvuII*) erfolgreich eingesetzt werden können. Für die Mutante AT039 wurde der T-DNA Integrationsort 450 bp vor dem Gen GLRG_04446.1 bestimmt. Dieses Gen codiert für ein Protein, das mit dem ER assoziiert ist und als Assembly Faktor für die V-ATPase annotiert wurde. In der Mutante AT158 wurde das Genom an einer Stelle disruptiert, die zum benachbarten Gen auf der einen Seite 3.956 bp (GLRG_02266.1) und auf der anderen Seite 5.911 bp entfernt ist (GLRG_02267.1). Der T-DNA Integrationsort in der Mutante AT171 liegt nur 83 bp vor dem Gen GLRG_07310.1, das für eine Allantoicase codiert. Die Integrationsorte in den Mutanten AT395, AT399 und AT425 konnten ebenfalls bestimmt werden. In allen drei Mutanten befindet sich die T-DNA an exakt derselben genomischen Position. Das Gen GLRG_05236.1, für ein hypothetisches Protein codierend, wurde 239 bp nach dem Start der codierenden Region disruptiert. Vergleiche der Sequenz des Gens GLRG_05236.1 mit veröffentlichten Sequenzen anderer Pilze ergaben keine konkretere Annotierung. Zusätzlich wurde für diese drei Mutanten ein direkter Übergang von einer T-DNA LB zu einer sehr stark verkürzten T-DNA RB sequenziert, was grundsätzlich auf eine Integration von T-DNA Tandems an einen Integrationsort hindeutet. Die verkürzte RB führt dazu, dass die Tandemkopien der T-DNA nach Restriktion mit *XbaI* bzw. *HindIII* auf einem Fragment liegen (vgl. Abbildung 3A) und somit in der Southern Hybridisierung (Abbildung 5B) nur eine *hph*-Hybridisierungsbande entsteht.

D.2.3.2 Identifizierung von weiteren T-DNA Integrationsstellen durch PCR-Fragmentsequenzierung

Neben den Mutanten AT399, AT395, AT425, deren T-DNA Integrationsort nun bekannt ist, zeigt die Southern Blot Analyse (siehe Abbildung 5B) noch acht weitere Mutanten (AT396, AT397, AT402, AT414, AT668, AT673, AT405 und AT420), bei denen gleichermaßen eine Bande von ca. 10 kb bzw. 7 kb sichtbar ist. Bei diesen Mutanten wird also derselbe T-DNA Integrationsort suggeriert. Per PCR mit spezifischen Primern am vermuteten T-DNA Insertionslocus und anschließender Sequenzierung der Fragmente wurde für die acht genannten Kandidaten exakt derselbe T-DNA Integrationsort wie für die drei Kandidaten AT399, AT395 und AT425 ermittelt (s. o.). Somit ist erstens die Aussage der Southern Hybridisierung einer exakt gleichen Integrationsstelle für die elf Mutanten bestätigt und zweitens ist der Integrationsort identifiziert worden. Die Mutanten AT405 und AT420 zeigten darüber hinaus noch eine zusätzliche zweite Hybridisierungsbande, die einen zweiten

Integrationsort vorschlägt. Diese Stelle konnte jedoch nicht ermittelt werden. Zusammenfassend zeigen diese Analysen, dass insgesamt vier verschiedene T-DNA Integrationsstellen identifiziert werden konnten. Eine dieser Stellen wurde in elf Kandidaten identifiziert, die verbleibenden drei Stellen wurden in jeweils einer Mutante nachgewiesen. In fünf Mutanten (AT147, AT285, AT390, AT391 und AT717) wurde der Disruptionsort noch nicht ermittelt.

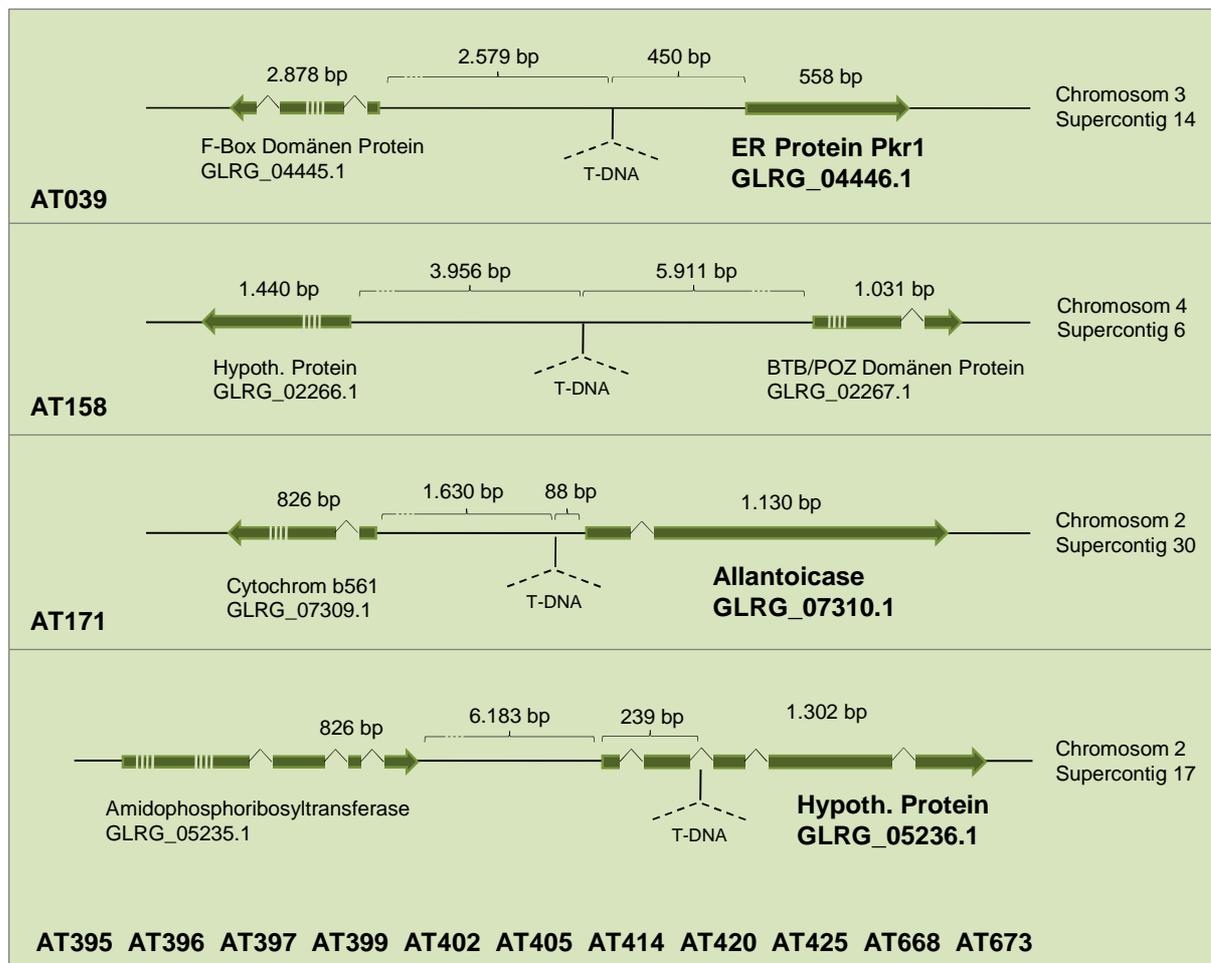


Abbildung 6: T-DNA Integrationsstellen im Genom der Virulenzmutanten und benachbarte Gene. Dargestellt sind jeweils die T-DNA Integrationsstelle und die Entfernung zu benachbarten Genen. Die Aktivität von Genen mit dick dargestellten Gennamen könnte aufgrund ihrer Nähe zur T-DNA Disruptionsstelle beeinflusst sein. Die Integrationsstelle der T-DNA in den Mutanten AT039, AT158 und AT171 wurde einzig in der jeweiligen Mutante gefunden. Die Integrationsstelle der Mutante AT395 wurde zusätzlich auch in allen weiteren angegebenen Mutanten gefunden.

D.2.3.3 Validierung und Charakterisierung der identifizierten Disruptionsstellen in den Mutanten AT039 und AT171

Aufgrund der unmittelbaren Nähe der Disruptionsstelle zu einem bekannten Gen sind die Mutanten AT039 und AT171 zunächst die beiden interessantesten Mutanten in Hinblick auf die Identifizierung und Charakterisierung von Virulenzgenen. Aus diesem Grund wurden für diese Mutanten die Übergänge von der T-DNA LB und RB in die genomischen Flanken zur Bestätigung noch einmal untersucht. Mit der Kenntnis des Disruptionsortes konnten nun jeweils zwei spezifische Primer zur Amplifikation von Fragmenten an den genannten Übergängen verwendet werden. Die Sequenzdaten der Fragmente bestätigen für beide Mutanten den bereits in Abbildung 6 dargestellten Integrationsort der T-DNA. Ferner wurde für die Mutante AT039 eine Deletion einer Sequenz von 18 Basen (5' CTCTCCTGCCCAATA) an der Stelle der T-DNA-Integration festgestellt. In der Mutante AT171 hingegen erfolgte eine Duplikation von fünf Basen (5' TTTGT). Die genauen Positionen der gelesenen Sequenzen sind in Abbildung 7 dargestellt.

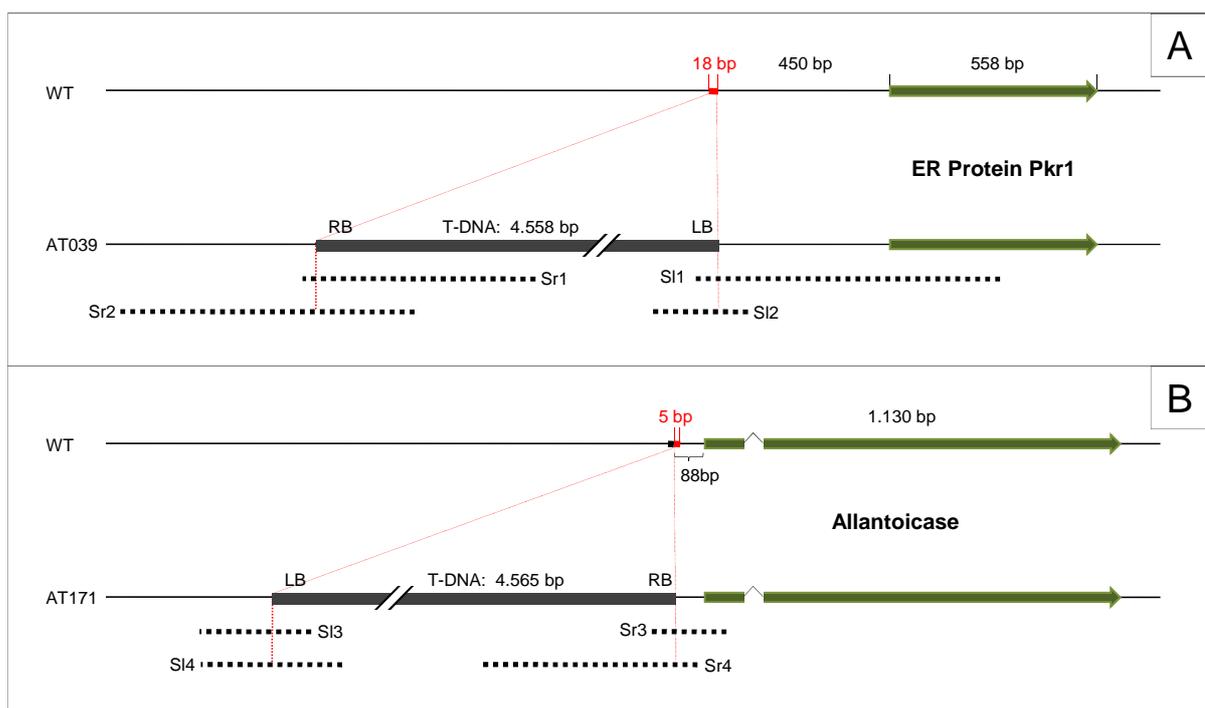


Abbildung 7: Sequenzierung der T-DNA Insertionsstelle in den Mutanten AT039 und AT171. Gestrichelte schwarze Linien stellen die sequenzierten Abschnitte des Genoms der Mutanten dar, die zugehörigen Sequenzbezeichnungen (Sr1, Sr2, Sr3, Sr4, SI1, SI2, SI3, SI4) stehen jeweils am Sequenzstart. RB – right border der T-DNA, LB – left border der T-DNA. Maßstabseinheitliche Darstellung. **(A)** An der Stelle der T-DNA Integration in der Mutante AT039 wurden 18 bp der genomischen DNA deletiert (rot markiert). **(B)** In der Mutante AT171 erfolgte eine Duplikation von 5 bp. Den originalen fünf Basen (schwarz markiert) folgen direkt die duplizierten fünf Basen (rot markiert). Zwischen beiden Elementen erfolgte die T-DNA Integration.

D.2.4 Charakterisierung der Pathogenese ausgewählter Virulenzmutanten

D.2.4.1 Untersuchung der gebildeten Infektionsstrukturen

Zur genaueren Beschreibung der Virulenzdefekte der Mutanten wurden inokulierte Maisblattsegmente mikroskopisch untersucht. Insbesondere stand die Frage im Vordergrund, an welcher Stelle des Infektionsverlaufs die jeweilige Mutante ihre pathogene Entwicklung stoppt oder in reduziertem Maße verglichen mit dem Wildtyp fortführt. Dazu wurden auf bzw. in Maisblättern die Infektionsstrukturen von *C. graminicola* wie gekeimte Konidien, Appressorien, melanisierte Appressorien sowie invasive Hyphen quantitativ erfasst. Aus diesen Werten wurden Bildungsraten für die genannten Strukturen errechnet. Die Bildungsrate einer Struktur bezieht sich hierbei immer auf 100 % der gebildeten Vorgängerstruktur. Inokulierte Maisblattsegmente wurden – soweit es der Zustand des Blattes erlaubte – bis zum siebten Tag nach Inokulation täglich mikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurde bei den genannten Untersuchungen ein Augenmerk auf die Morphologie der Infektionsstrukturen und damit auf eventuelle Abweichungen vom Wildtyp gerichtet.

Zur Eingrenzung der mikroskopischen Analyse wurden die Mutanten, bei denen der genomische Disruptionsort nicht ermittelt wurde (Abschnitt D.2.3.2), nicht berücksichtigt. Ebenfalls wurde die Mutante AT158 außer Acht gelassen, da der T-DNA Integrationsort hier in einer intergenischen Region liegt (Abschnitt D.2.3.1) und somit diese Mutante für die tatsächliche Identifizierung eines Virulenzgens ungeeignet erscheint. Stellvertretend für die Gruppe der elf Mutanten mit derselben Disruptionsstelle wurde die Mutante AT399 ausgewählt. Somit fällt die Auswahl für die mikroskopische Untersuchung des Infektionsverlaufs auf die Mutanten AT039, AT171 und AT399. Damit werden in dieser Analyse drei der vier ermittelten Disruptionseignisse berücksichtigt.

Zunächst wurde die Bildung der Infektionsstrukturen 4 dpi quantitativ erfasst (Abbildung 8A). Alle drei untersuchten Mutanten unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) vom Wildtyp durch eine deutlich reduzierte Penetrationsrate. Die Mutante AT399 zeigt darüber hinaus signifikante Unterschiede zum Wildtyp durch eine reduzierte Keimrate und eine geringe Appressorienbildungsrate. Damit ist die Mutante AT399 fast nicht mehr in der Lage, Appressorien zu bilden. Die übrigen Bildungsraten der Mutanten AT039, AT171 und AT399 unterscheiden sich nicht signifikant von denen des Wildtyps ($p > 0,05$).

Leicht verwundete Maisblätter ermöglichen dem Pilz eine Besiedlung des Wirtsgewebes ohne eine Appressorium-vermittelte Penetration. Eine Inokulation verwundeter Blätter mit Konidien zeigte, dass die drei Mutanten das Blattgewebe ähnlich effizient wie der Wildtyp besiedeln konnten (Abbildung 8B). Auch qualitativ wurden in der Ausbildung invasiver

Hyphen keine Unterschiede festgestellt. Somit kann eine Einschränkung des invasiven Wachstums ausgeschlossen werden. Für die Mutanten AT039 und AT171 ist im Infektionsverlauf folglich nur die Penetration der hemmende Schritt, der zu der beobachteten verminderten Virulenz führt. Die verringerten Penetrationsraten genügen dennoch der Ausbildung von Symptomen auf unverwundeten Maisblättern, wenn auch in geschwächerter Ausprägung (Abbildung 4). Der Pathogenitätsdefekt der Mutante AT399 hat zwei Ursachen. Einerseits ist er auf die marginal vorhandene Fähigkeit, Appressorien zu bilden, zurückzuführen und wird andererseits durch die sehr geringe Penetrationskompetenz der Appressorien verstärkt. Das bedeutet, dass die ohnehin sehr geringe Zahl an gebildeten Appressorien darüber hinaus nur zu einem marginalen Anteil das Pflanzengewebe penetrieren kann. Das führt zum beobachteten Symptomverlust (Abbildung 4).

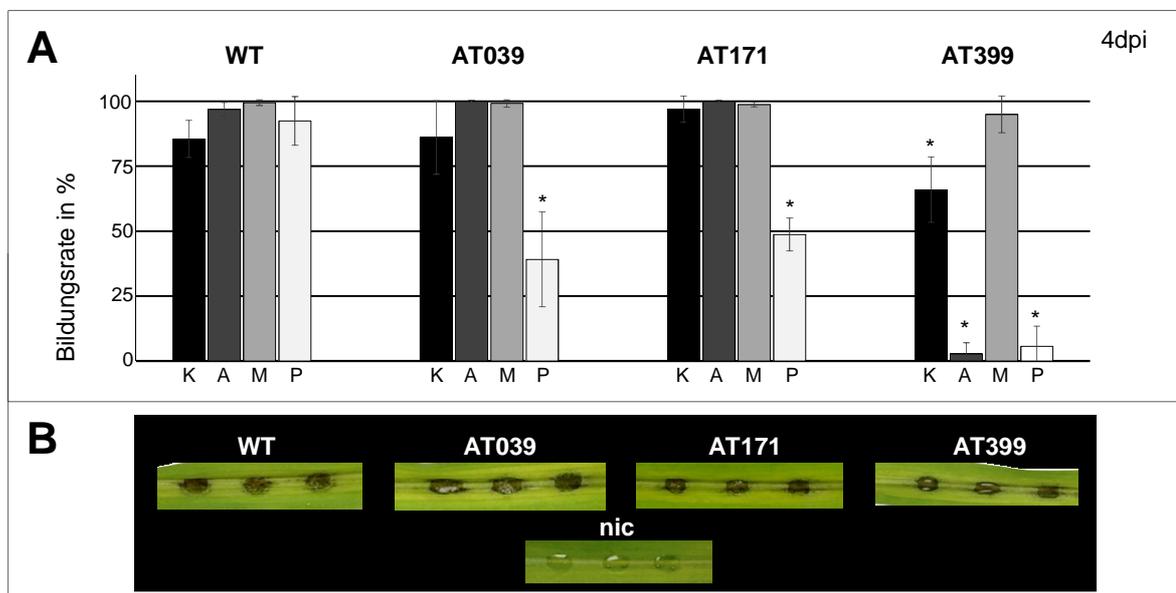


Abbildung 8: Bildung von Infektionsstrukturen. (A) Bildungskraten der Infektionsstrukturen von *C. graminicola* auf unverwundeten Maisblättern sind als prozentualer Anteil der vorherigen Struktur angegeben (\pm SD). Ein Stern markiert einen signifikanten Unterschied zum entsprechenden Wert des Wildtyps ($p < 0,05$). K – Keimschlauch, A – Appressorium, M – melanisiertes Appressorium, P – Penetrationshyphne, WT – Wildtyp. Zeitpunkt der Analyse war 4 dpi. (Münch et al., 2011) (B) Symptomausbildung nach Inokulation verwundeter Maisblätter. Symptomaufnahme 3 dpi. nic – Wasserkontrolle.

Die morphologische Analyse der gebildeten Infektionsstrukturen des Wildtyps und der Mutanten ergab keine Unterschiede. Formen und Größen der Strukturen entsprechen alle denen des Wildtyps. Die Fotografien in Abbildung 9 dokumentieren dieses Ergebnis. Zusätzlich belegen diese Bilder die in Abbildung 8A dargestellten quantitativen Unterschiede. Der Wildtyp hat einen Tag nach Inokulation Appressorien ausgebildet, beginnt bereits mit der Penetration und zeigt schon drei Tage nach Inokulation ein weit verzweigtes und dichtes Netz an Sekundärhyphen, die die Pflanze sichtlich zu zerstören beginnen. Dagegen sind bei

den Mutanten AT039 und AT171 Appressorien erst nach zwei Tagen vollständig ausgebildet. Nach drei Tagen penetrieren auch die Mutanten AT039 und AT171 das Pflanzengewebe, jedoch mit einer geringeren Penetrationsrate und nach vier Tagen werden Sekundärhyphen sichtbar. Die Penetrationsrate erhöht sich auch nicht am fünften und sechsten Tag nach Inokulation. Die Bilder zur Mutante AT399 verdeutlichen die geringe Fähigkeit, Appressorien zu bilden. Auch vier Tage nach Inokulation sind nur wenige Appressorien vorhanden, Penetrationsereignisse sind sehr selten zu beobachten.

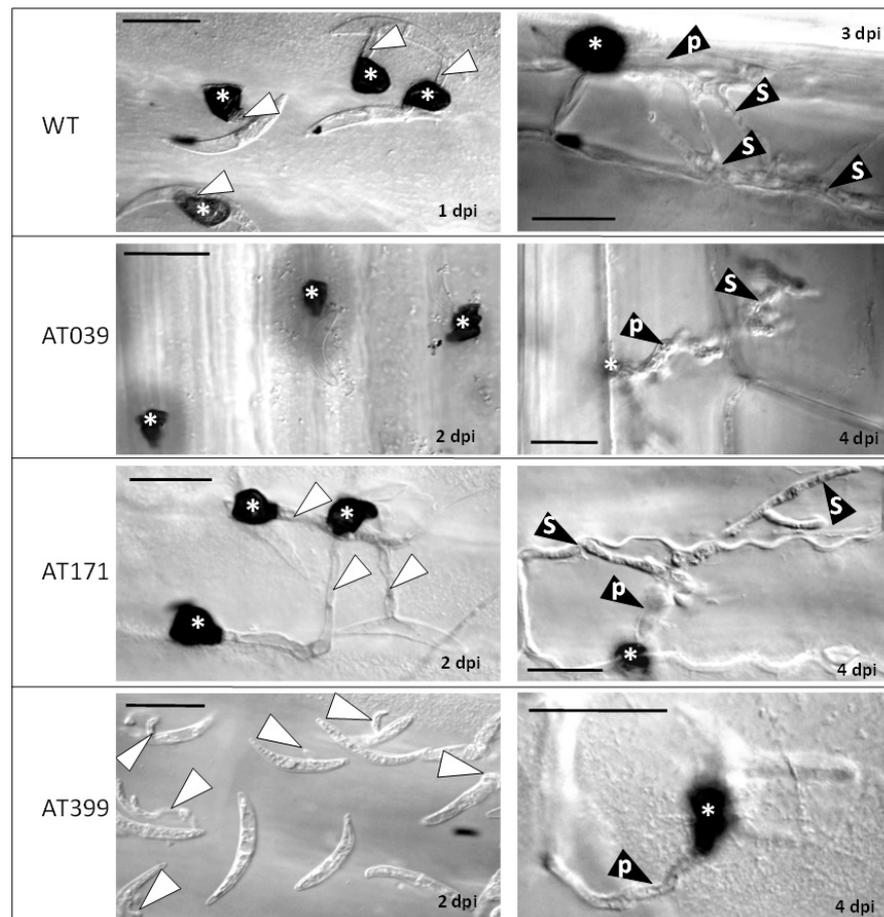


Abbildung 9: Bildung der Infektionsstrukturen von *C. graminicola* Wildtyp und Mutanten. Die Fotos zeigen gebildete Infektionsstrukturen auf und in Maisblättern zu den Zeitpunkten 1 dpi und 3 dpi für den virulenten Wildtyp (WT) und 2 dpi und 4 dpi für die Virulenzmutanten. Weiße Pfeilspitzen zeigen auf Keimschläuche; Schwarze Pfeilspitzen zeigen *in planta* ausgebildete Hyphen; p – Primärhyphen, s – Sekundärhyphen. * - Appressorium. Abbildung aus Münch et al. (2011).

D.2.4.2 Untersuchung des Turgordrucks in Appressorien

Der Turgordruck in Appressorien spielt eine entscheidende Rolle für die Penetrationskompetenz. Die verringerten Penetrationsraten der Appressorien der Mutanten AT039, AT171 und AT399 könnten dementsprechend durch einen geringeren Turgordruck

hervorgerufen werden. Zur Aufklärung wurde ein Zytorrhizie-Experiment durchgeführt. Auf einer Plastikfolie gebildete Appressorien des Wildtyps und der Mutanten wurden bei verschiedenen Glycerol-Konzentrationen inkubiert. Glycerol als Osmolyt schafft eine hyperosmolare Umgebung, wobei Glycerol nicht in die Appressorien eindringen kann. Ein Konzentrationsausgleich erfolgt nur über appressorialen Wasserverlust in die Umgebung, der bei hinreichend großem osmotischem Potenzial zu einem Kollaps des Appressoriums führt. Dabei klappen Zellwand und Zellmembran nach innen. Durch diese Einstülpung wird eine dunkle Falte sichtbar. Je höher der Innendruck und damit die Osmolytkonzentration in einem Appressorium ist, desto höher muss die Konzentration des Osmolyts der Inkubationslösung sein, um bei 50 % der Appressorien den Kollaps herbeizuführen. Mikroskopische Aufnahmen kollabierter und nicht kollabierter Appressorien der genannten Mutanten und des Wildtyps sind in Abbildung 10A dargestellt.

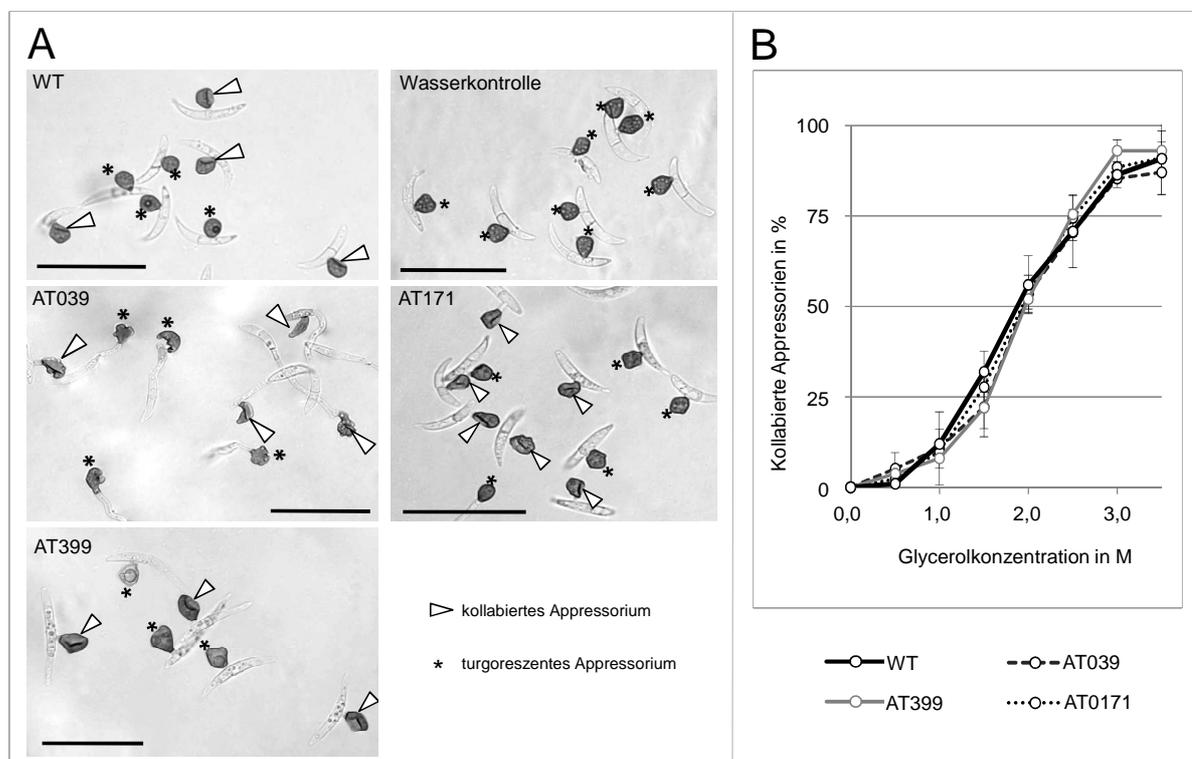


Abbildung 10: Untersuchung des Turgordrucks in Appressorien durch Zytorrhizie. (A) Die Fotos zeigen Appressorien nach Inkubation in 2 M Glycerol. Durch Hyperosmolarität des Mediums kollabierte Appressorien (durch Pfeilspitzen markiert) besitzen eine Falte in ihrer Zellwand. Turgoreszente Appressorien sind mit einem Stern markiert. Im Kontrollansatz ohne Glycerol (Wasserkontrolle) waren alle Appressorien turgoreszent. Größenstandard = 20 μm . **(B)** Die Appressorien der Mutanten und des Wildtyps (WT) zeigen vergleichbare Raten der Zytorrhizie bei steigenden Osmolytkonzentrationen ($\pm\text{SD}$).

Mit steigender Glycerolkonzentration steigt für alle Kandidaten in gleichem Maße der Anteil kollabierter Appressorien (Abbildung 10B). Bei einer Konzentration von 2,0 M Glycerol ist

etwa die Hälfte der Appressorien des Wildtyps ($56,0 \% \pm 8,0 \%$) kollabiert. Dasselbe trifft für die Mutanten AT039 ($53,2 \% \pm 2,2 \%$), AT171 ($53,5 \% \pm 5,1 \%$) und AT399 ($52,0 \% \pm 2,7 \%$) zu. Ab einer Konzentration von 3,0 M Glycerol erreicht die Zytorrhizie ihre Sättigung und steigt auch bei einer höheren Konzentration (3,5 M) kaum noch an. Die gleichen Raten der Zytorrhizie bei Appressorien der untersuchten Mutanten und des Wildtyps suggerieren vergleichbare Turgordrücke in den Appressorien der vier Kandidaten. Entsprechend kann ein reduzierter Turgordruck in den Mutanten AT039, AT171 und AT399 als Grund für ihre herabgesetzten Penetrationsraten ausgeschlossen werden.

D.2.4.3 Analyse der pflanzlichen Abwehr in AT039-infizierten Maisblättern

Die Abwehrreaktionen der Pflanze in AT039-, AT171-, AT399- und Wildtyp-infizierten Maisblättern wurden genauer untersucht. Einerseits wurde nach einer hypersensitiven Reaktion (HR) der Pflanze geschaut und andererseits wurde die Papillenbildung durch die Pflanze analysiert. Unter UV-Bestrahlung konnten in dem infizierten Pflanzengewebe für keinen Kandidaten mikroskopische Bereiche lokalisiert werden, in denen pflanzliche Zellen hell aufleuchten und sich von anderen Zellen deutlich absetzen. Hinweise für eine HR wurden also nicht gefunden (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurden die Proben unter UV-Bestrahlung nach Papillen untersucht. Für die Mutanten AT171 und AT399 konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Für die Mutante AT039 hingegen ist eine signifikant verstärkte Papillenbildung beobachtet worden (Abbildung 11). Während der Wildtyp eine Papillenbildung an $2,9 \% \pm 1,0 \%$ seiner Appressorien hervorruft, werden unter $16,4 \% \pm 2,9 \%$ der Appressorien der Mutante AT039 Papillen gebildet. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mutante AT039 im Vergleich zum Wildtyp bei einer Infektion von Maisblättern entweder eine stärkere Pflanzenabwehrreaktion eliciert oder weniger effektiv Pflanzenabwehr unterdrückt.

In der Mutante AT039 erfolgte die T-DNA Integration upstream des Gens GLRG_04446.1 (siehe Abschnitt D.2.3.1). Vorgreifend soll erwähnt werden, dass das Protein dieses Gens Ähnlichkeiten zu einem Assembly Faktor der vakuolären H^+ -ATPase (V-ATPase) besitzt (siehe Abschnitt D.3.2). Für eine einheitliche Bezeichnung soll das Gen bereits ab hier mit *CgAAF1* (*C. graminicola* V-ATPase Assembly Faktor) benannt werden.

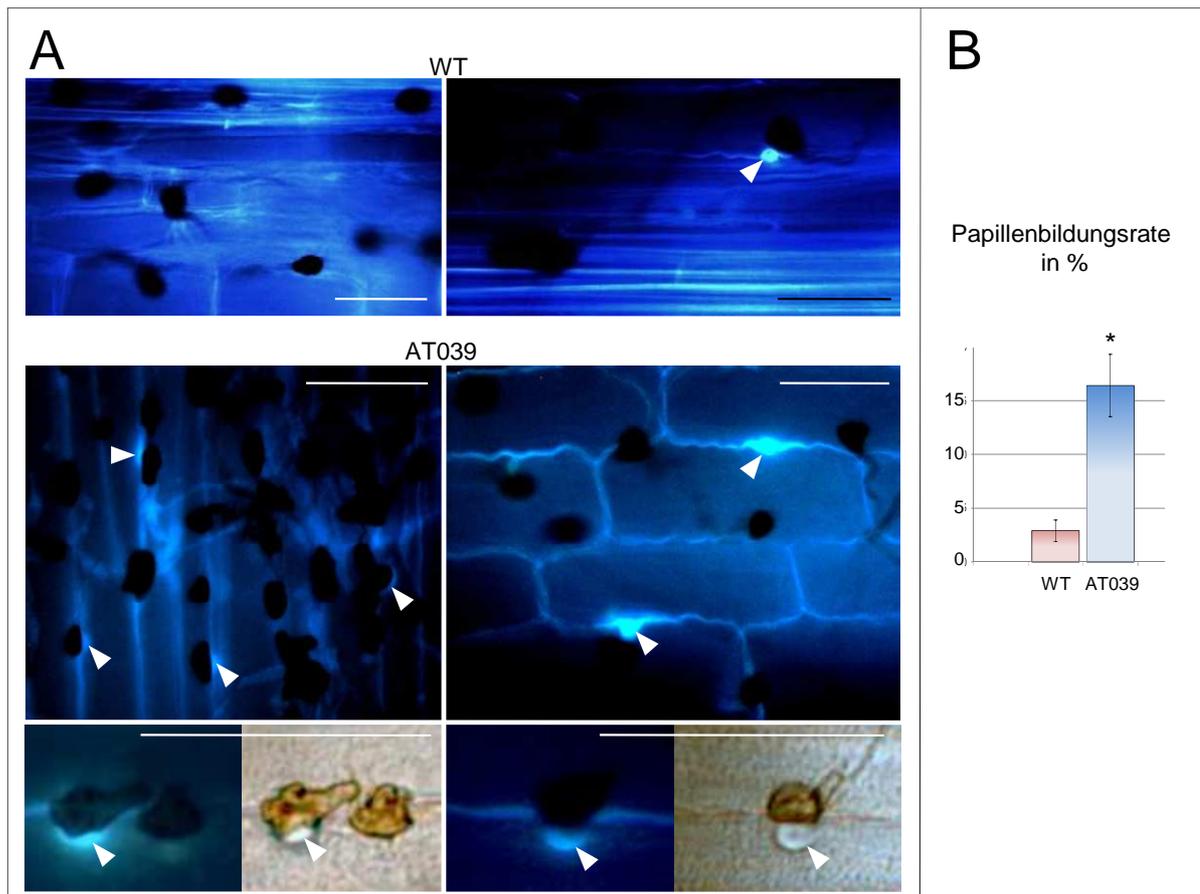


Abbildung 11: Papillenbildung in infiziertem Maisblattgewebe bei AT039- und Wildtyp-Infektion. (A) In infizierten Blattbereichen leuchten Papillen unter UV-Licht hell auf. Papillen sind mit einer weißen Pfeilspitze markiert. Appressorien erscheinen als schwarze rundliche Strukturen. Im Durchlichtbild sind Appressorien bräunlich, Papillen erscheinen unter dem Appressorium als helle Struktur. Größenstandard = 50 μm (B) Papillenbildungsraten der Mutante AT039 u. des Wildtyps ($\pm\text{SD}$), der Stern markiert die Signifikanz ($p < 0,05$).

D.2.4.4 Nachweis von *CgAAF1*-Transkripten während der Infektion von Mais

Die Disruption in der Mutante AT039 wurde 450 bp upstream von *CgAAF1* und somit vermutlich in der Promotorenregion dieses Gens lokalisiert. Damit sollte das Gen *CgAAF1* für den Virulenzphänotyp der Mutante AT039 verantwortlich sein. *CgAAF1* wäre folglich ein viel versprechendes Gen für weitere Untersuchungen. Zunächst muss aber die Frage geklärt werden, ob Transkripte von *CgAAF1* während der Wildtyp-Infektionen gebildet werden.

Transkripte von *CgAAF1* konnten während der Infektion von Mais durch den Wildtyp nachgewiesen werden. Zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 hpi wurden dritte Blätter von infizierten intakten Maispflanzen geerntet und die darin enthaltene Transkriptmenge an *CgAAF1* per qRT-PCR bestimmt. In der qRT-PCR wurde ein 137 bp-langes Fragment aus dem ORF von *CgAAF1* und zur Normalisierung ein 100 bp-langes Fragment aus dem ORF

des konstitutiv exprimierten Histon H3-Gens amplifiziert und quantifiziert. Durch die gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente konnte die Amplifikation der richtigen Fragmente nachgewiesen werden. Im Wildtyp sind während des Infektionsverlaufs zwischen 24 und 96 hpi Transkripte von *CgAAF1* konstitutiv vorhanden (Abbildung 12, schwarze Balken). Vergleiche von *CgAAF1*-Transkriptmengen des Wildtyps untereinander ergeben keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

Zusätzlich wurden Pflanzen mit Konidien der Mutante AT039 inokuliert und die gleiche Quantifizierung mit Hilfe der qRT-PCR vorgenommen. Auch in diesem infizierten Pflanzenmaterial wurden Transkripte von *CgAAF1* nachgewiesen (Abbildung 12, graue Balken). Die Menge der Transkripte zu den vier Zeitpunkten ist untereinander ebenfalls nahezu gleich und unterscheidet sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$). Vergleicht man jedoch die Transkriptmenge eines einzelnen Zeitpunktes mit dem entsprechenden Wert des Wildtyps, erkennt man für alle Zeitpunkte ein generelles und signifikant geringeres Vorkommen an *CgAAF1*-Transkripten in der Mutante AT039 ($p < 0,05$). In der Mutante steht während der Infektion von Mais nur etwa ein Viertel der *CgAAF1*-Transkriptmenge, die im Wildtyp nachgewiesen wurde, zur Verfügung. Die Tatsache der veränderten *CgAAF1*-Transkriptmenge liefert ein bedeutendes Argument für die Annahme, dass die Disruption von *CgAAF1* tatsächlich Ursache der verringerten Virulenz ist und *CgAAF1* damit ein Virulenzgen in *C. graminicola* sein könnte.

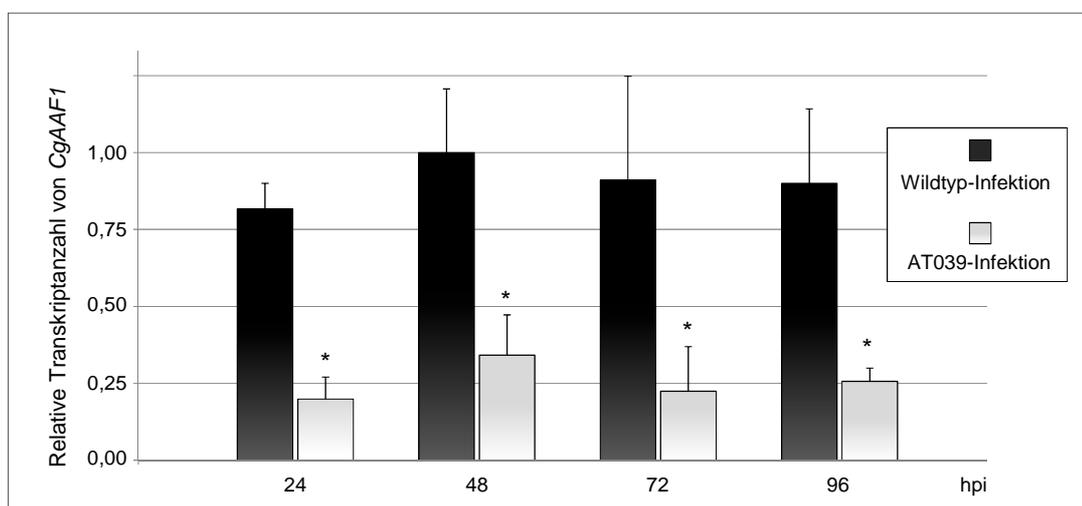


Abbildung 12: Relative Transkriptmenge von *CgAAF1* während des Infektionsverlaufs in Maisblättern. Durchschnittliche relative *CgAAF1*-Transkriptmengen in infizierten Maisblättern 24 bis 96 hpi (+SD). Jede Transkriptanzahl in der Mutante AT039 unterscheidet sich signifikant vom jeweils zugehörigen Wert im Wildtyp ($p < 0,05$). Die Transkriptmengen des Wildtyps unterscheiden sich untereinander nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$), gleiches gilt für die Transkriptmengen der Mutante AT039.

Zur Absicherung der Daten wurden mehrere Kontrollen mitgeführt. Ansätze, bei denen im Verlauf der qRT-PCR der Schritt der reversen Transkription ausgelassen wurde, generierten keine Fragmente. Somit kann eine fälschliche Amplifikation auf Basis von vorhandenen Resten genomischer DNA als Template in den RNA-Proben ausgeschlossen werden. Zusätzlich überspannen die Primer zur Amplifikation des Histon H3-Fragments ein Intron, so dass bei einer Amplifikation ausgehend von genomischer DNA nicht ein 100 bp sondern ein 152 bp-langes Fragment entstehen würde. Ein solches Fragment wurde aber nicht detektiert. Um eine Amplifikation durch Mais DNA oder RNA bzw. cDNA als Template auszuschließen, wurde RNA aus gleichbehandelten aber nicht inokulierten Pflanzen in der qRT-PCR untersucht. Hier wurden keine Fragmente amplifiziert, diese Fehlerquelle ist also auch auszuschließen.

D.3 Untersuchung der Bedeutung des V-ATPase Assembly Faktors CgAAF1 für die Virulenz von *C. graminicola*

Aus den drei putativen Virulenzfaktoren V-ATPase Assembly Faktor, Allantoicase und dem hypothetischen Protein wurde für weitergehende Charakterisierungen der V-ATPase Assembly Faktor ausgewählt. Folgende Argumente sprechen hierbei für diese Auswahl. 1. Die T-DNA Integration erfolgte 450 bp vor *CgAAF1* und somit in einen Bereich, der zum Promotorenbereich des Gens gehören könnte. 2. Die Virulenz der zugehörigen Mutante AT039 ist deutlich herabgesetzt. 3. Die *CgAAF1*-Transkriptmenge ist während der Infektion durch die Disruptionsmutante deutlich herabgesetzt. 4. Eine verstärkte Papillenbildungsrate wurde beobachtet. Nach der Sequenzierung und einer *in silico* Analyse soll *CgAAF1* zur eindeutigen Identifizierung als Virulenzgen gezielt inaktiviert und die Deletionsmutante $\Delta Cgaa1$ hinsichtlich ihrer Virulenz detailliert charakterisiert werden.

D.3.1 Sequenzierung von *CgAAF1* und seines Transkripts

CgAAF1 wurde sequenziert. Die genomische Sequenz wurde anhand eines PCR-Fragments, welches mit den Primern ELP_F10 und ELP_R10 generiert wurde, mit den Sequenzierprimern ELP_Gen03 und ELP_P150Fr2rev ermittelt (Abbildung 13). Diese Sequenz stimmt genau mit der durch das Broad Institute (Cambridge, USA) veröffentlichten Sequenz GLRG_04446.1 überein (www.broadinstitute.org). Zusätzlich wurde die Sequenz der zugehörigen mRNA bestimmt. Über einen RT-Schritt wurde die gesamte RNA aus fünf Tage altem Myzel einer Flüssigkultur in cDNA umgeschrieben. Mit den Primern ELP_GDK_fw und ELP_GDK_rev wurde ein PCR Fragment erzeugt, das mit denselben Primern sequenziert wurde. Die Sequenz der mRNA entspricht der genomischen Sequenz von *CgAAF1*. Diese Ergebnisse zeigen: 1. die veröffentlichte Sequenz von *CgAAF1* ist korrekt, 2. *CgAAF1* besitzt keine Introns und 3. *CgAAF1* hat eine Länge von 558 bp, das Protein besteht aus 185 Aminosäuren.

```

1 ATGGCGTCCT TCATAACCAA CCTCTGGGAG TCAATTTTTG TCCCTGGCCC GACCCCGACC
61 CTCGTTTCGCG CCGCGAACGG AGCCTTCGCC TCCCTTCAGG TCCTCCTCAC CATCCTTCTC
121 TTAGCGACCT GGAGCATCCA CTTCGTTATC CTCTCCTTCC TCAGCGGFTC CCTCTGGTTC
181 GCCATAAACT GGTTCGTCAA CGAGCTCGCT GTCCACGCCG AGCAGGAGGC TAGGAAGGCC
241 GAGGCCTCTT CCTCCGGGGT CGGCGGCCGC GGCAACATCC AGACGACCGA TGATAGTGAC
301 ACCGAGGTCG AGGGTGTCGC CGGCGGCCGC GTAGGTGTAG GAAAGAAGGG TGCCGCCGTA
361 GGGAGCAGTC AGGTCGAGAC GCCAGAGCAG CAGCGGGCCG CCGACTTGAA GCGTCGGACC
421 GCCGCAGCCG CCGCAGCCGC AGCAGTAGCA GCCGAATCCG GTCCCAGGA CGCCACAAAC
481 GGGGGTACGC AGTCGAGTGT CAGCACCCGAG GACGAATGGG AGAAGGTGTC TGGGAACGAG
541 AACGAGAAGG ACAAATGA

```

Abbildung 13: Sequenz von *CgAAF1* mit 558 bp

D.3.2 *In silico* Analysen zur Struktur und Funktion von CgAAF1

Vergleiche der CgAAF1 Proteinsequenz mit veröffentlichten Proteinsequenzen anderer Pilze mit Hilfe des Programms BLASTX 2.2.26 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) zeigten u. a. Ähnlichkeiten zu Sequenzen von *M. oryzae*, *N. crassa* und *S. cerevisiae*. Die Vergleichswerte und die Beschreibung der zugehörigen Proteine sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Suche nach CgAAF1-ähnlichen Sequenzen mit dem Programm BLASTX.

Organismus	E-Wert	Name des Proteins	Name des N-terminalen Teils des Proteins	Länge des Gens / des Proteins
<i>Magnaporthe oryzae</i>	$1 \cdot e^{-24}$	hypoth. Protein MGG_04740	1-73 aa, ER-Protein PKR1	510 bp / 170 aa
<i>Neurospora crassa</i>	$2 \cdot e^{-35}$	hypoth. Protein NCU00506	1-75 aa, ER-Protein PKR1	504 bp / 168 aa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$9 \cdot e^{-8}$	PKR1, YMR123W,	1-76 aa, ER-Protein PKR1	369 bp / 123 aa

In *S. cerevisiae* wurde das Protein PKR1 als ein Assembly Faktor der vakuolären H⁺-ATPase beschrieben und in der ER-Membran lokalisiert. Eine Überexpression von *PKR1* in Hefe führte zu einer *Pichia farnosia* Killertoxin Resistenz, was der Namensgebung diente (Davis-Kaplan et al., 2006). Ein Alignment der Proteinsequenzen wurde mit dem CLUSTAL 2.0.12 Multiple Sequence Alignment Programm (<http://www.ebi.ac.uk>) durchgeführt und ist in Abbildung 14 dargestellt. Zwischen den Proteinen GLRG_04446.1 (CgAAF1), MGG_04740 (*M. oryzae*), NCU00506 (*N. crassa*) und YMR123W (*S. cerevisiae*) ergibt sich eine Sequenzübereinstimmung von 11 %. Betrachtet man nicht nur übereinstimmende Aminosäuren sondern auch Positionen mit ähnlichen Aminosäuren (in Abbildung 14 mit einem Doppelpunkt oder Punkt gekennzeichnet), ergibt sich für alle vier Sequenzen eine Übereinstimmung von 25 %. Vergleicht man CgAAF1 mit nur einer anderen Sequenz, so ergibt sich für den Vergleich mit *M. oryzae* ein Anteil völlig konservierter Aminosäuren von 43 %, betrachtet man erneut nicht nur übereinstimmende sondern auch ähnliche Aminosäuren an einer Position, steigt dieser Wert auf 75 %. Für Vergleiche mit *N. crassa* ergeben sich entsprechende Werte von 53 % und 79 %, für *S. cerevisiae* 27 % und 58 %. Auffallend ist, dass vor allem im N-terminalen Bereich eine hohe Übereinstimmungsquote vorliegt. Vergleicht man beispielsweise nur die ersten 75 Aminosäuren von CgAAF1 einzeln mit MGG_04740 (*M. oryzae*), NCU00506 (*N. crassa*) und YMR123W (*S. cerevisiae*), ergeben sich Werte genauer Übereinstimmung von 60 %, 66 % und 41 %. Neben den genannten Ergebnissen verdeutlicht die Abbildung 14 vor allem im Bereich der ersten 75 Aminosäuren für alle vier Sequenzen eine hohe Übereinstimmung und ein Vorkommen von fast ausschließlich hydrophoben (in rot) und polaren Aminosäuren (in grün). Diese

Resultate decken sich mit der Funktionsbeschreibung der Proteine (Tabelle 1), denn für alle vier Proteine ist für den Bereich von Aminosäure 1 bis ca. 75 die Beschreibung ER-Protein PKR1 gleichsam angegeben. Die funktionell wirksame PKR1-Domäne liegt damit wahrscheinlich in diesem N-terminalen Bereich des Proteins. Die Vorhersageprogramme für die Topologie von Proteinen

TopPred0.01 (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred>)

TMHMM v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) und

SOUSI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)

bestimmen für diesen Bereich transmembranale Domänen. Bei allen vier untersuchten Proteinen scheint der N-terminale Bereich in eine Membran integriert zu sein. Die Positionen der transmembranalen Domänen sind für die Proteine aus *C. graminicola*, *M. oryzae*, *N. crassa* und *S. cerevisiae* im Alignment in Abbildung 14 markiert. Für CgAAF1 berechnet

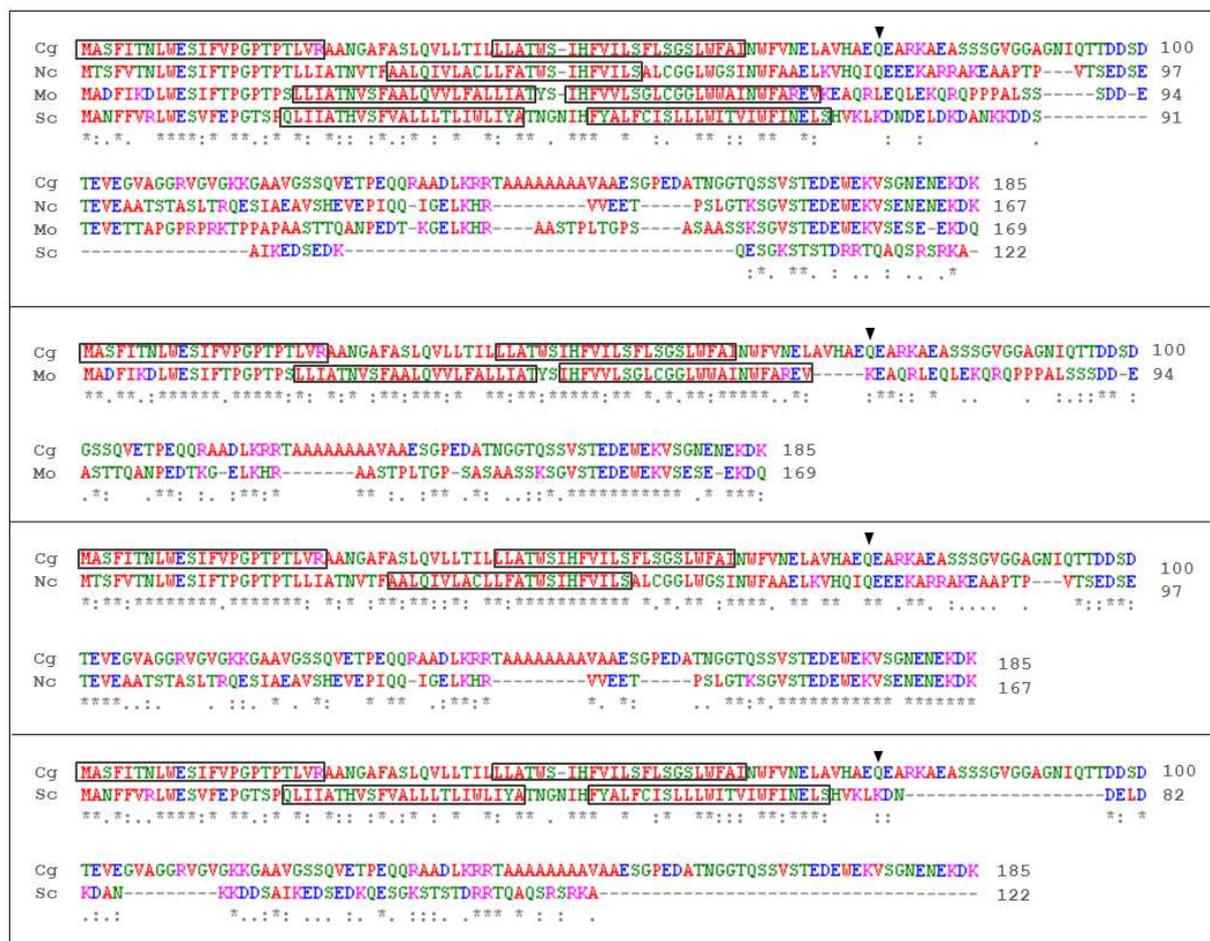


Abbildung 14: Alignment der CgAAF1-Sequenz mit entsprechenden Sequenzen anderer Ascomycota. Cg – *Colletotrichum graminicola*, Nc – *Neurospora crassa*, Mo – *Magnaporthe oryzae*, Sc – *Saccharomyces cerevisiae*, Stern – Position mit vollständig konservierter Aminosäure, Doppelpunkt – konservierte Position mit Aminosäuren stark ähnlicher Eigenschaften, Punkt – konservierte Position mit Aminosäuren schwach ähnlicher Eigenschaften, schwarzes Dreieck – 75. Aminosäure in Cg-Sequenz, Transmembranale Domänen (Berechnung mit dem Programm SOUSI) sind eingetrahmt.

das Analyseprogramm SOUSI (Hirokawa et al., 1998) eine transmembranale Domäne von der ersten bis zur 23. Aminosäure, darauf folgt eine kurze cytoplasmatische Schleife von 16 Aminosäuren gefolgt von einer zweiten transmembranalen Domäne von der 40. bis zur 62. Aminosäure. Damit sind beide transmembranalen Bereiche 23 Aminosäuren lang. Der C-terminale Bereich befindet sich extrazellulär, er ist hydrophob und besitzt deutlich mehr negativ geladene Aminosäuren als der N-terminale Bereich, in dem sich nur eine negativ geladene Aminosäure befindet. Die berechnete Struktur von CgAAF1 ist in Abbildung 15 dargestellt.

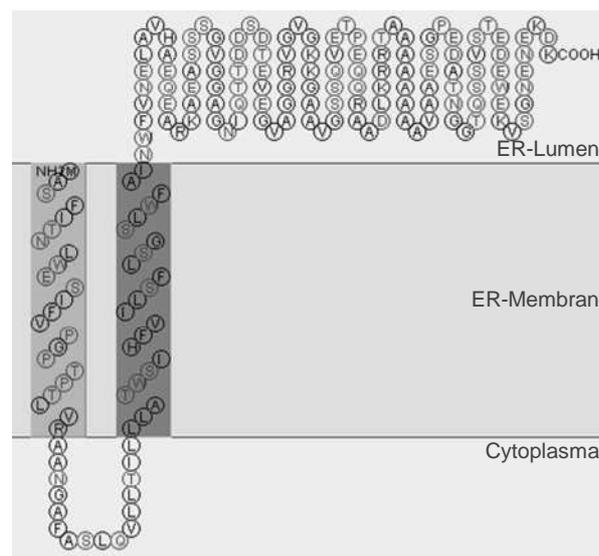


Abbildung 15: Topologie von CgAAF1. Die Analyse mit SOUSI berechnet zwei transmembranale Helices von jeweils 23 Aminosäuren am N-Terminus getrennt durch eine cytoplasmatische Schleife von 16 Aminosäuren.

Die bis hier dargestellten Ähnlichkeiten der verglichenen Proteinsequenzen suggerieren für CgAAF1 eine Funktion als V-ATPase Assembly Faktor mit Lokalisierung in der ER-Membran. Da die Disruption in der Virulenzmutante AT039 upstream von CgAAF1 erfolgte, ist der V-ATPase Assembly Faktor ein putativer Virulenzfaktor in *C. graminicola*.

D.3.3 Komplementation eines *PKR1*-defizienten Hefestammes mit *CgAAF1*

Aufgrund der Ähnlichkeit von CgAAF1 zu PKR1 sollte getestet werden, ob CgAAF1 aus *C. graminicola* die Deletion von *PKR1* in der Hefemutante Δ pkr1 (Accession No. Y16564) komplementieren kann. Dazu wurde CgAAF1 vollständig amplifiziert und in den Transformationsvektor pAG300 ligiert. Dieses Konstrukt wurde in *S. cerevisiae* Δ pkr1 transformiert. Mehrere Transformanten wurden erzeugt, die auf dem Selektionsmedium ohne Uracil wachsen können. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Transformanten mit dem

Transformationsvektor pAG300, der nicht *CgAAF1* enthält, erstellt (TpAG300). Dudley et al. (2005) beschreiben für $\Delta pkr1$ einen starken Wachstumsdefekt auf YPD, das 0,7 M CaCl_2 enthält. Daher wurde die Komplementationsanalyse auf YPD mit 0,7 M CaCl_2 (YPD- CaCl_2) durchgeführt. Der Stamm $\Delta pkr1$ kann auf YPD- CaCl_2 erwartungsgemäß fast nicht wachsen. Dasselbe gilt für die Transformante TpAG300, die der Mutante $\Delta pkr1$ mit pAG300 ohne *CgAAF1* entspricht. Die komplementierten Isolate AAF1, AAF2 und AAF3 hingegen können auf YPD- CaCl_2 ebenso gut wachsen wie der Referenz-Hefestamm BY4742. Dieses Ergebnis zeigt, dass *CgAAF1* die fehlende Funktion von des V-ATPase Assembly Faktors PKR1 ersetzen kann. Zur Kontrolle wurde das Wachstum auf dem Vollmedium YPD und auf dem Selektionsmedium SC Ura- analysiert. Auf YPD wachsen alle mit pAG300 erstellten Transformanten wie der Referenzstamm BY4742 und wie die Deletionsmutante $\Delta pkr1$. Das zeigt die Wachstumsfähigkeit aller Isolate. Auf SC Ura- wachsen nur AAF1, AAF2, AAF3 und TpAG300, die nicht transformierten Stämme BY4742 und $\Delta pkr1$ können nicht wachsen. Die Selektivität von pAG300 gegenüber SC ohne Uracil ist also vorhanden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.



Abbildung 16: Komplementation einer *PKR1*-defizienten Hefemutante ($\Delta pkr1$) mit *CgAAF1*. BY4742 – Referenzstamm *S. cerevisiae*; $\Delta pkr1$ – *PKR1*-defiziente Hefemutante; AAF1, AAF2 und AAF3 – durch *CgAAF1* komplementierte $\Delta pkr1$ -Isolate; TpAG300 - $\Delta pkr1$ -Isolat mit dem Transformationsvektor pAG300 ohne *CgAAF1*.

Im Folgenden soll die gezielte Inaktivierung von *CgAAF1* in *C. graminicola* den Beweis liefern, dass dieses Gen ein Virulenzgen in *C. graminicola* ist.

D.3.4 Deletion von *CgAAF1* in *C. graminicola*

Zur Deletion von *CgAAF1* in *C. graminicola* wurde ein Bereich von 609 bp, der den kompletten ORF von *CgAAF1* einschließt, durch eine Nourseothricin Resistenzkassette mit einer Länge von 2.164 bp ersetzt. Dazu wurde eine Deletionskassette einer Länge von 4.252 bp hergestellt. Diese umfasst homologe Bereiche zum Promotorenbereich bzw. Terminatorenbereich von *CgAAF1* als linke und rechte Flanke sowie die Resistenzkassette

bestehend aus dem Nourseothricin Acetyltransferase Gen *nat* mit einem konstitutiven *oliC* Promotor aus *Aspergillus nidulans* und einem *tub1* Terminator aus *B. cinerea*. Die Transformation der Deletionskassette in *C. graminicola* führt durch homologe Rekombination in den Bereichen der Flanken zur Integration der Resistenzkassette an die Stelle von *CgAAF1*. Nach der Erstellung von Einzelsporisolaten der Transformanten und deren Kultivierung auf Nourseothricin-haltigem Medium wurde die erfolgreiche Deletion mit einer Southern Hybridisierung untersucht, bei der die Sonden *aaf* und *nat* (Abbildung 17A) gleichzeitig eingesetzt wurden. Bei *HindIII*-geschnittener DNA sollte für den Wildtyp eine Hybridisierungsbande bei 2,3 kb und für die Deletionsmutanten bei 3,6 kb sichtbar sein, bei *XhoI*-geschnittener DNA entsprechend 5,3 kb und 6,9 kb (Abbildung 17A). Drei bestätigte Deletionsmutanten (Δ Cgaaf1-1 bis -3) mit den richtigen Bandengrößen sind in Abbildung 17B dargestellt.

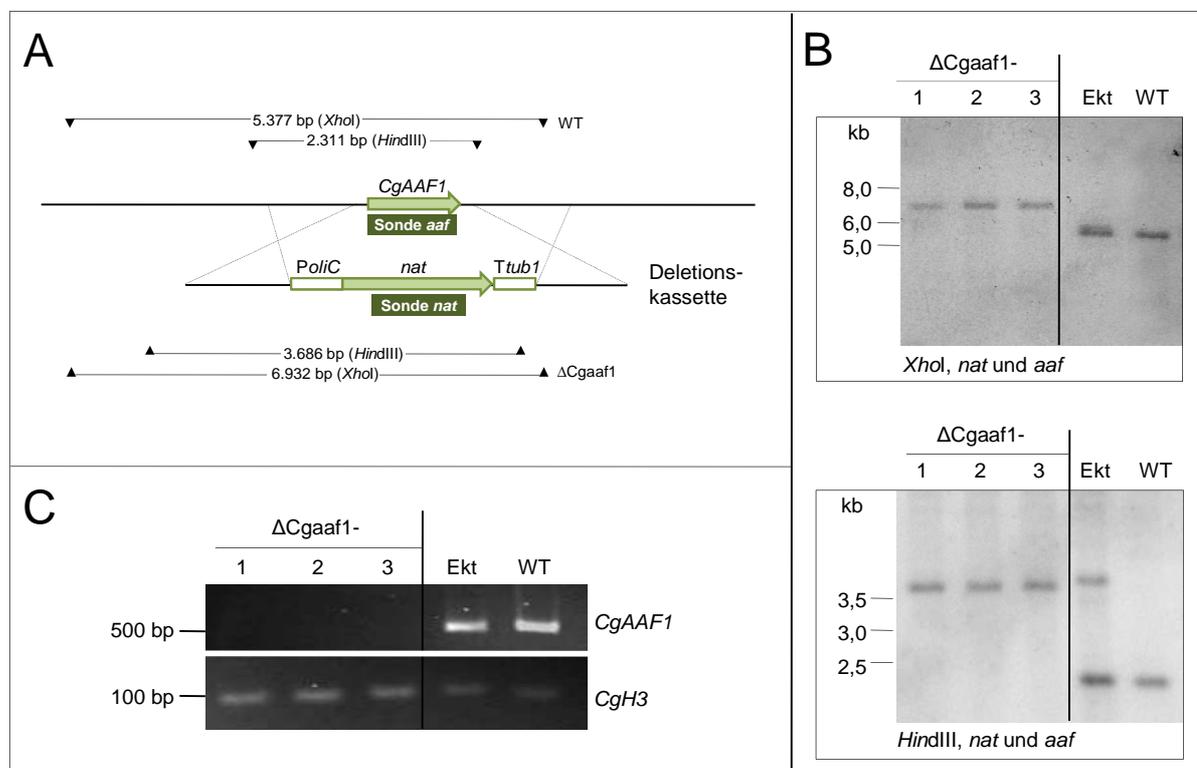


Abbildung 17: Deletion von *CgAAF1* (A) Schematische Darstellung der Deletion von *CgAAF1* durch homologe Rekombination. Δ Cgaaf1 enthält die Resistenzkassette, mit Resistenzgen (*nat*), Promotor (*oliC*) und Terminator (*tub1*). Entstehende Fragmentgrößen bei Restriktion der genomischen DNA des Wildtyps (WT) und Δ Cgaaf1 mit *HindIII* bzw. *XhoI* sind angegeben. Die Bindestellen der Sonden *aaf* und *nat* sind ebenfalls dargestellt. (B) Southern Hybridisierungsbilder nach *HindIII*- bzw. *XhoI*-Restriktion. Bei jeder Hybridisierung wurden beide Sonden gleichzeitig verwendet. (B) und (C) Δ Cgaaf1-1 bis -3: Deletionsmutanten; Ekt: Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette, WT: Wildtyp. (C) RT-PCR, Amplifikation eines 537 bp-Fragments auf *CgAAF1* und als Kontrolle eines 100 bp-Fragments des Gens für das Histon H3 (*CgH3*)

Zusätzlich erzeugte die Transformation Transformanten mit einer ektopisch in das Genom integrierten Resistenzkassette. Diese Mutanten enthalten neben der Resistenzkassette,

welche an eine zufällige Stelle nicht homolog im Genom integriert wurde, weiterhin das Wildtyp-Gen *CgAAF1*. Eine solche Transformante wurde ausgewählt (Ekt in Abbildung 17) und als Kontrolle in nachfolgenden Experimenten mitgeführt. Mit ihr kann im Vergleich zu den Deletionsmutanten ausgeschlossen werden, dass beobachtete Effekte auf die Anwesenheit des Resistenzgens und nicht auf die Abwesenheit des Gens *CgAAF1* zurückzuführen sind. Darüber hinaus wurden in einer RT-PCR Transkripte von *CgAAF1* im Wildtyp und in der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette nachgewiesen. Für die drei Deletionsmutanten wurden hingegen keine *CgAAF1*-Transkripte nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden Transkripte des konstitutiv exprimierten Histon H3-Gens überprüft. In allen Kandidaten konnten ausgehend von mRNA bzw. cDNA des Histon H3-Gens Fragmente mit einer Länge von 100 bp amplifiziert werden. Genomische DNA hingegen hätte zur Amplifizierung eines 152 bp langen Fragments geführt, da in diesem Bereich in der genomischen Sequenz ein Intron lokalisiert ist.

Die Ergebnisse der Southern Blot Hybridisierung und der RT-PCR belegen, dass in $\Delta Cgaa1-1$ bis 3 das Gen *CgAAF1* deletiert wurde.

D.3.5 Virulenz von *CgAAF1* defizienten Mutanten

Mit den Mutanten $\Delta Cgaa1-1$, $\Delta Cgaa1-2$ und $\Delta Cgaa1-3$ lagen nun drei Kandidaten vor, in denen das Gen *CgAAF1* deletiert wurde. Sollte nun die verringerte Virulenz der Mutante AT039 auf die Disruption im *CgAAF1*-Promotorenbereich und einer damit verbundenen reduzierten Proteinmenge von *CgAAF1* zurückzuführen sein, wäre ein vergleichbarer Virulenzdefekt bei den Deletionsmutanten zu erwarten.

D.3.5.1 Makroskopische Symptomanalyse

In Virulenztests mit allen Kandidaten wurde dies überprüft. Zur Inokulation der Pflanze wurden Konidien der Kandidaten verwendet, die in axenischen Kulturen auf Haferflockenagar (OMA) gebildet wurden (Abbildung 18 oben). Neben den Deletionsmutanten und der Disruptionsmutante AT039 wurde zum Vergleich und als Kontrolle in allen Experimenten auch der Wildtyp, die Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette (Ekt) und eine nicht inokulierte Wasserkontrolle (nic) untersucht. Die Tests wurden einerseits mit lebenden intakten Maispflanzen durchgeführt. Hierbei wurden die Pflanzen wahlweise mit der Sporensuspension des Kandidaten eingesprüht oder die Sporensuspensionen wurden als Tropfen auf die Blattoberflächen gebracht. Andererseits wurden Tests auf abgetrennten Maisblättern durchgeführt, die

Integrität der gesamten Pflanze liegt hier nicht mehr vor und die Seneszenz setzt schneller ein. In diesen Ansätzen wurden die Sporensuspensionen auf die Blattoberflächen aufgetropft. In Abbildung 18 ist die Symptomausbildung und Symptomstärke an 5 und 7 dpi für die beschriebenen Testvarianten dargestellt.

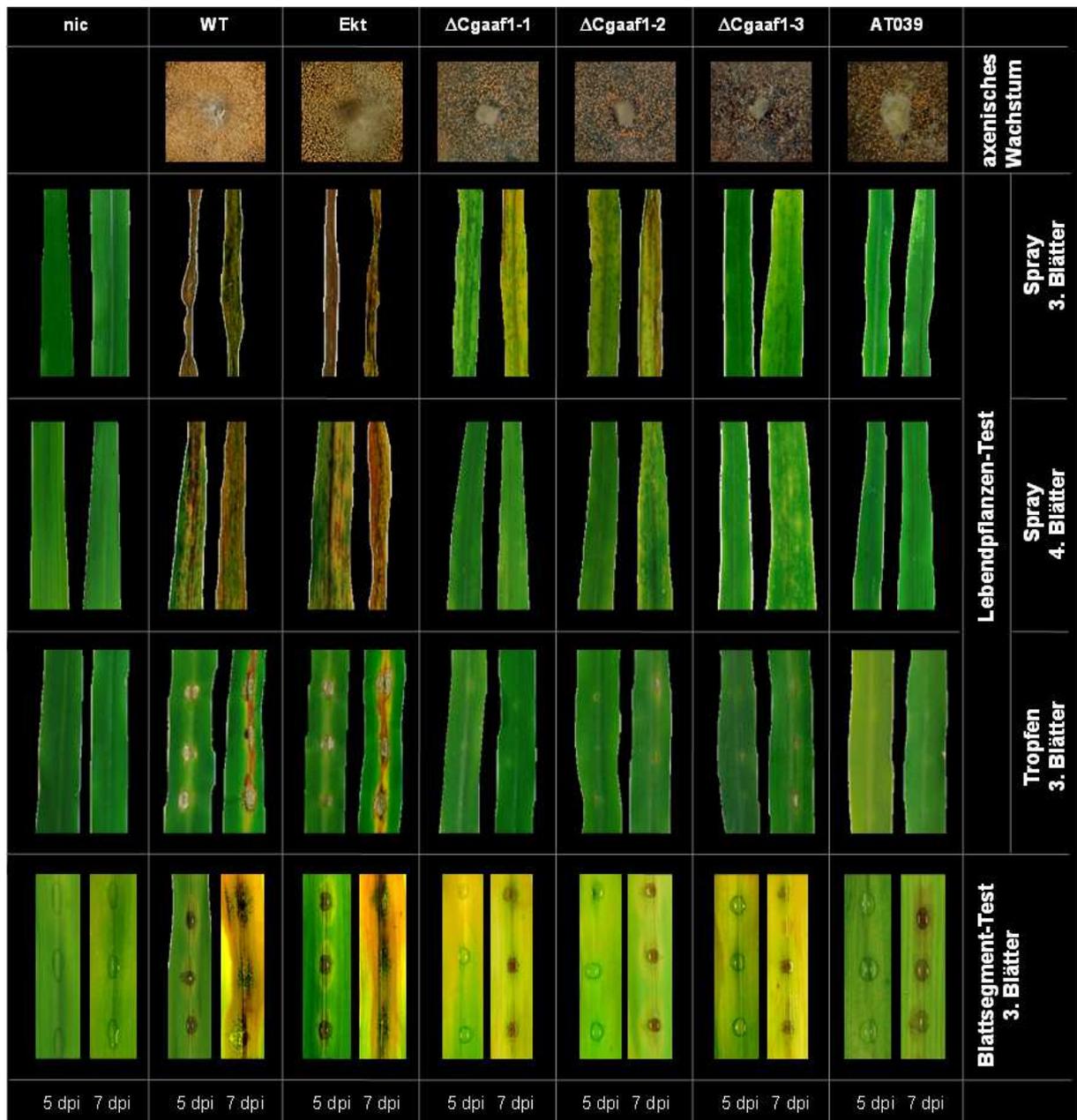


Abbildung 18: Virulenztest der Deletionsmutanten Δ Cgaaf1-1 bis -3 und der Disruptionsmutante AT039 im Vergleich zum Wildtyp und zur Transformante mit ektopischer Integration. Bei Lebendpflanzen-Tests wurden intakte lebende Pflanzen mit Sporen der Kandidaten inokuliert (sowohl durch Aufsprühen als auch durch Auftropfen). Beim Blattsegment-Test wurde die Sporensuspension auf abgetrennte Blätter aufgetropft. Makroskopische Symptome auf den Blättern sind 5 dpi und 7 dpi dargestellt. Die Mutanten zeigen eine deutlich reduzierte Virulenz im Vergleich zum Wildtyp (WT) und zur Transformante mit ektopischer Integration (Ekt). nic – Wasserkontrolle. Axenisches Wachstum – Phänotyp auf OMA-Medium.

Betrachtet wurden in der Regel Blätter der dritten Blattetage, einzig beim Lebendpflanzen-Test mit aufgesprühten Konidien wurden zusätzlich vierte Blätter untersucht. In allen Tests zeigt sich, dass der Wildtyp bereits nach fünf Tagen starke Symptome hervorruft und die entsprechenden Blätter stark nekrotisiert sind. Zwei Tage später ist die Intensität noch stärker. Das Symptombild der Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette ist vergleichbar mit dem des Wildtyps. Die ektopische Integration der Nourseothricin-Resistenzkassette in das Genom von *C. graminicola* hat also keinen Einfluss auf die Virulenz. Die drei Deletionsmutanten zeigen ein deutlich reduziertes Schadbild verglichen mit dem Wildtyp, es liegt aber kein vollständiger Pathogenitätsverlust vor. Am deutlichsten ist dies auf den dritten Blättern des Lebendpflanzen-Tests und des Blattsegment-Tests zu erkennen. Auch die Disruptionsmutante AT039 zeigt die beschriebene Reduktion der Virulenz, ohne jedoch die Pathogenität vollständig zu verlieren. Vergleicht man die dritten Blätter mit den vierten Blättern des Lebendpflanzen-Tests mit aufgesprühten Konidien, zeigen durchweg die älteren dritten Blätter stärkere Symptome als die jüngeren vierten Blätter. Die Ansätze der Wasserkontrolle zeigen wie erwartet keine Symptome. Die Virulenztests bestätigen für die drei Deletionsmutanten den Phänotyp der Mutante AT039. Die Virulenz ist verglichen mit der des Wildtyps deutlich herabgesetzt. *CgAAF1* kann somit als Virulenzgen in *C. graminicola* bezeichnet werden.

D.3.5.2 Mikroskopische Analyse der Infektionsstrukturen

Eine mikroskopische Analyse von infizierten Blättern soll nun die Stufen im Infektionsprozess herausstellen, die zur verringerten Virulenz führen. Dazu wurden die Schritte der Infektion anhand von Bildungsraten der zugehörigen Infektionsstrukturen untersucht. Betrachtet wurde 1. die Keimung der Konidien auf der Blattoberfläche, 2. die Appressorienbildung, 3. die Melanisierung der Appressorien und 4. die Fähigkeit der Appressorien, das Pflanzengewebe zu penetrieren.

Maisblattsegmente wurden mit Sporensuspensionen des Wildtyps, der Deletionsmutanten und der Transformante mit ektopischer Integration inokuliert und 1 bis 4 dpi geerntet und mikroskopiert. Die Quantifizierung der Infektionsstrukturen 4 dpi zeigt für die Deletionsmutanten eine klare und signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Penetrationsrate um fast die Hälfte verglichen mit dem Wildtyp; die Keimungsraten, die Appressorienbildungsraten und die Melanisierungsraten sind hingegen ähnlich wie bei einer Wildtyp-Infektion (Abbildung 19A, $p > 0,05$). Konkret betragen die Penetrationsraten von Appressorien der $\Delta Cgaaf1-1$, $\Delta Cgaaf1-2$ und $\Delta Cgaaf1-3$ nach 4 dpi 52,2 % ($\pm 9,5$ %), 54,6 % ($\pm 18,1$ %) und 46,5 % ($\pm 12,5$ %), die Appressorien des Wildtyps penetrieren das

Blattgewebe zu diesem Zeitpunkt mit 92,1 % (\pm 9,6 %). Da, wie bereits erwähnt, die der Penetration vorhergehenden Strukturen mit ähnlicher Effizienz gebildet werden wie bei einer Wildtyp-Infektion, wirkt sich lediglich die geringere Penetrationsrate reduzierend auf die absolute Zahl an primären Hyphen in Δ Cgaaf1-infizierten Blättern aus. Bei Inokulation mit derselben Anzahl an Konidien ist in Δ Cgaaf1-infizierten Blättern 4 dpi also nur die Hälfte der Anzahl an primären Hyphen im Vergleich zur Wildtyp-Infektion vorhanden. Zu diesem quantitativen Effekt kommt noch ein zeitlicher Effekt hinzu. Die Analysen ergaben, dass der Wildtyp bereits nach zwei Tagen eine hohe Penetrationsrate von 78,9 % (\pm 9,2 %) erreicht. Die Deletionsmutanten hingegen zeigen 2 dpi mit 21,5 % (\pm 8,5 %), 28,8 % (\pm 8,5 %) und 21,1 % (\pm 7,5 %) nur etwa die Hälfte des Wertes ihrer maximalen Penetrationsrate, die nach 4 dpi erreicht wird. Abbildung 19B stellt die Progression der Penetrationsraten im Vergleich dar.

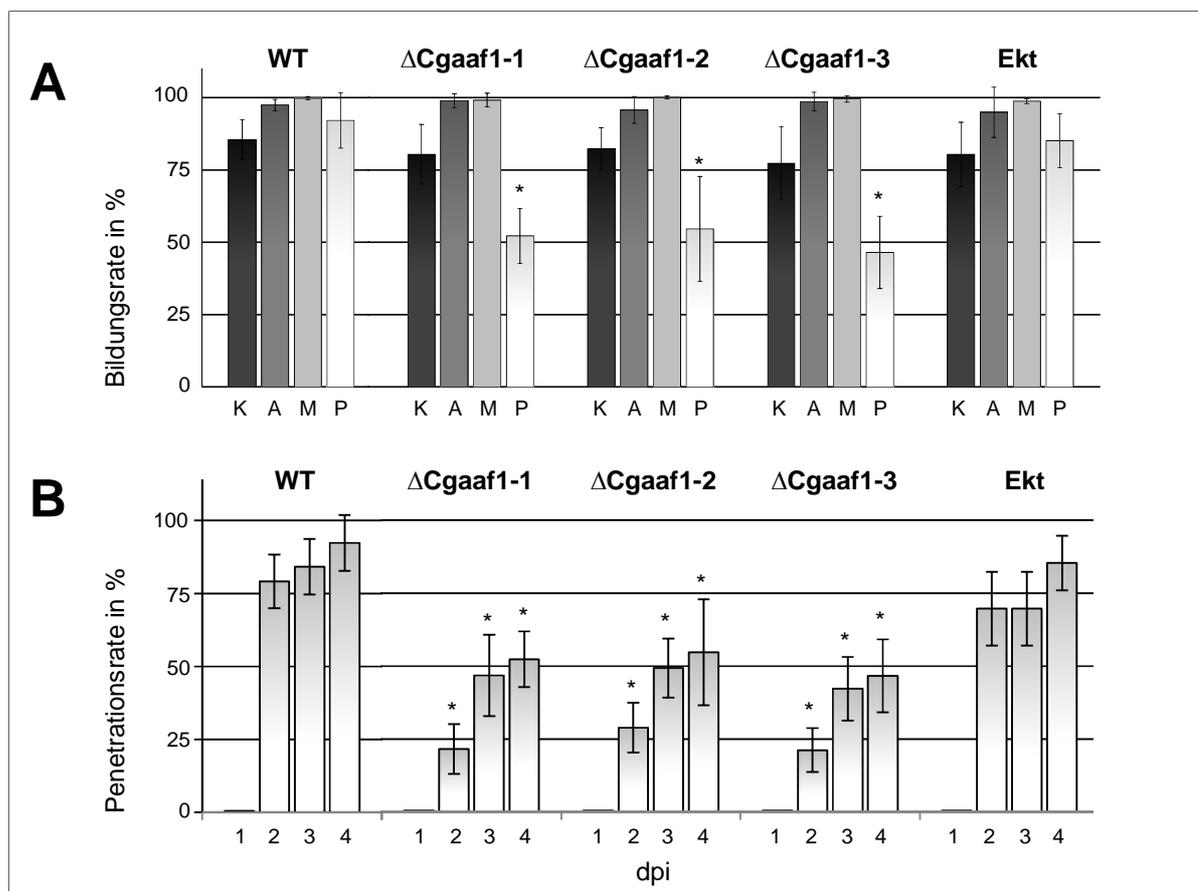


Abbildung 19: Quantifizierung der Infektionsstrukturen auf Mais. (A) Bildungsrate der Infektionsstrukturen des Wildtyps (WT), der Deletionsmutanten und der Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette (Ekt) auf Maisblättern. Die Bildungsrate ist als prozentualer Anteil der vorhergehenden Struktur angegeben (\pm SD). K – Keimschlauch, A – Appressorium, M – melanisiertes Appressorium, P – Penetrationshyph. Dargestellt ist der Zeitpunkt 4 dpi. **(B)** Penetrationsrate von 1 dpi bis 4 dpi (\pm SD). **(A) und (B)** Signifikante Unterschiede zum entsprechenden Wert des Wildtyps sind mit einem Stern markiert ($p < 0,05$).

In planta vollzieht sich die Entwicklung der Deletionsmutanten in Folge verzögerter Penetration zeitlich versetzt. Der Wildtyp hat nach zwei Tagen bereits deutlich erkennbare und ausgeprägte Primärhyphen entwickelt, die sich bereits verzweigen und beginnen, Sekundärhyphen zu bilden (Abbildung 20). Einen Tag später sind sehr viele Pflanzenzellen bereits von einem dichten und gepackten Netz an Sekundärhyphen ausgefüllt und der Pilz beginnt mit der Sporulation und Ausbildung von Acervuli. Zu diesem Zeitpunkt beendet der Wildtyp bereits seinen Lebenszyklus. Die Deletionsmutanten haben zwei Tage nach Inokulation deutlich weniger und kürzere Primärhyphen ausgebildet. Nach vier Tagen sind auch Sekundärhyphen, die sich verzweigen und ausbreiten, zu erkennen (Abbildung 20). Sie sind aber nicht so zahlreich vorhanden wie schon einen Tag zuvor in Wildtyp-infizierten Blättern und haben das Pflanzengewebe deutlich schwächer besiedelt als der Wildtyp. Acervuli sind 4 dpi noch nicht zu erkennen, sie entwickeln sich aber im weiteren Verlauf der Infektion. Ungeachtet der zeitlichen Verschiebung der Blattbesiedlung und der quantitativen Unterschiede haben die Untersuchungen keine qualitativen Unterschiede herausgestellt. Die Appressorien sowie die Primär- und Sekundärhyphen unterscheiden sich morphologisch nicht von denen des Wildtyps.

Die Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette wurde wie alle anderen hier beschriebenen Kandidaten analysiert. Qualitativ, quantitativ und zeitlich sind keine Unterschiede zur Bildung der Infektionsstrukturen und zum Infektionsverlauf des Wildtyps festgestellt worden.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Deletion von *CgAAF1* zu einer geringeren und zeitlich verzögerten Penetration des Pflanzengewebes führt und schwächere Symptome hervorruft.

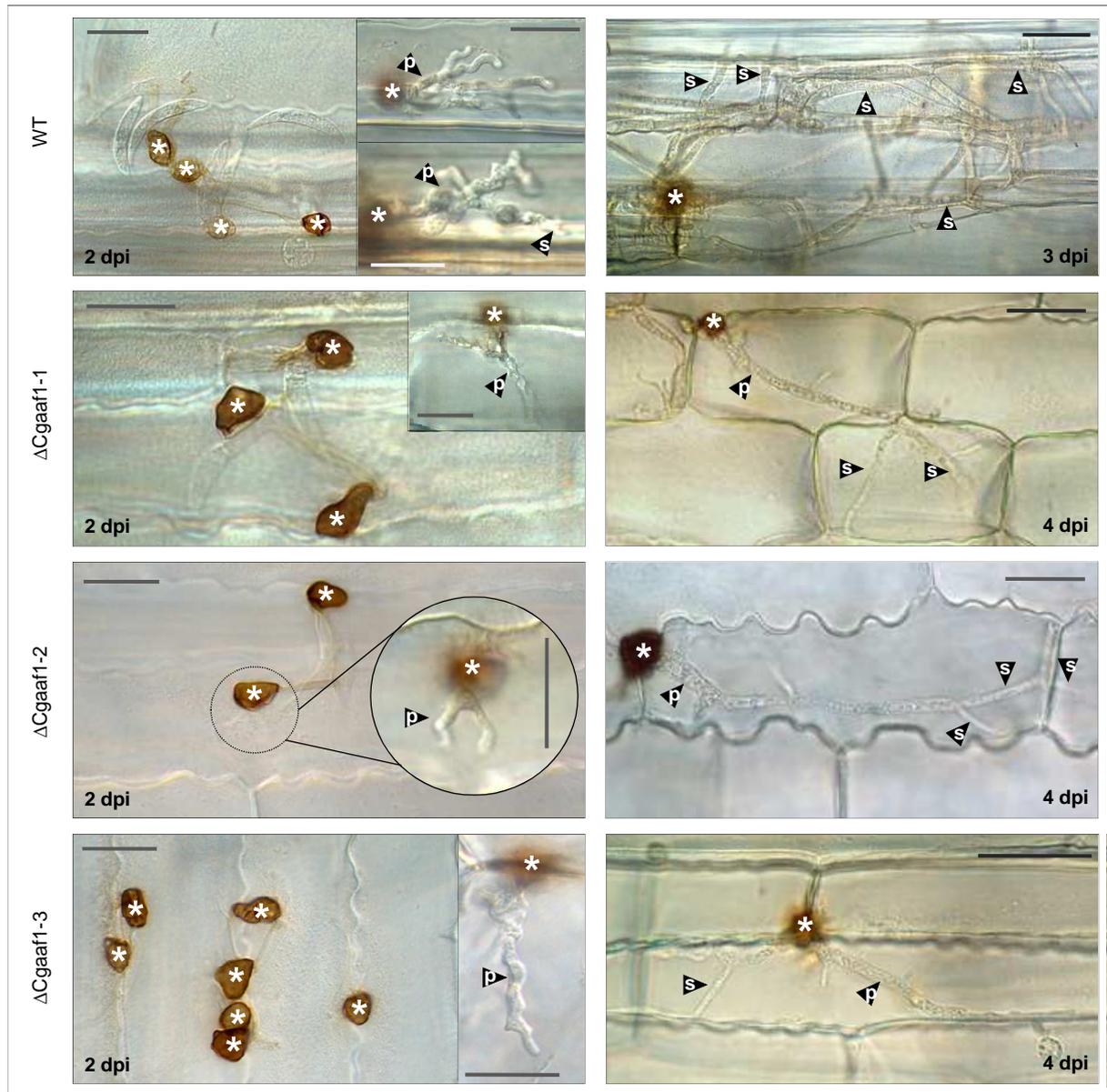


Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahmen der Infektionsstrukturen von *C. graminicola* Wildtyp und der Deletionsmutanten in Maisblättern. Infektionsstrukturen des virulenten Wildtyps (WT) sind zu den Zeitpunkten 2 dpi und 3 dpi und der virulenzreduzierten Mutanten 2 dpi und 4 dpi abgebildet. Appressorien sind mit einem weißen Stern markiert. Schwarze Pfeilspitzen zeigen *in planta* ausgebildete Hyphen; p und s kennzeichnen primäre und sekundäre Hyphen; Größenstandard = 20 μ m.

D.3.5.3 Analyse der Papillenbildung als pflanzliche Abwehrreaktion

Für die Mutante AT039 wurde eine verstärkte Papillenbildung durch Mais unmittelbar unter den Appressorien beobachtet (siehe Abschnitt D.2.4.3). Eine ähnlich erhöhte Papillenbildungsrate wurde auch bei den Deletionsmutanten beobachtet (Abbildung 21A). Unter UV-Licht konnten in infizierten Maisblättern für Δ Cgaaf1-1, Δ Cgaaf1-2 und Δ Cgaaf1-3

Papillenbildungsraten von 15,3 % ($\pm 6,0$ %), 14,0 % ($\pm 3,8$ %) und 13,3 % ($\pm 5,2$ %) ermittelt werden, der Wildtyp zeigte eine Rate von 4,6 % ($\pm 3,1$ %) (Abbildung 21B).

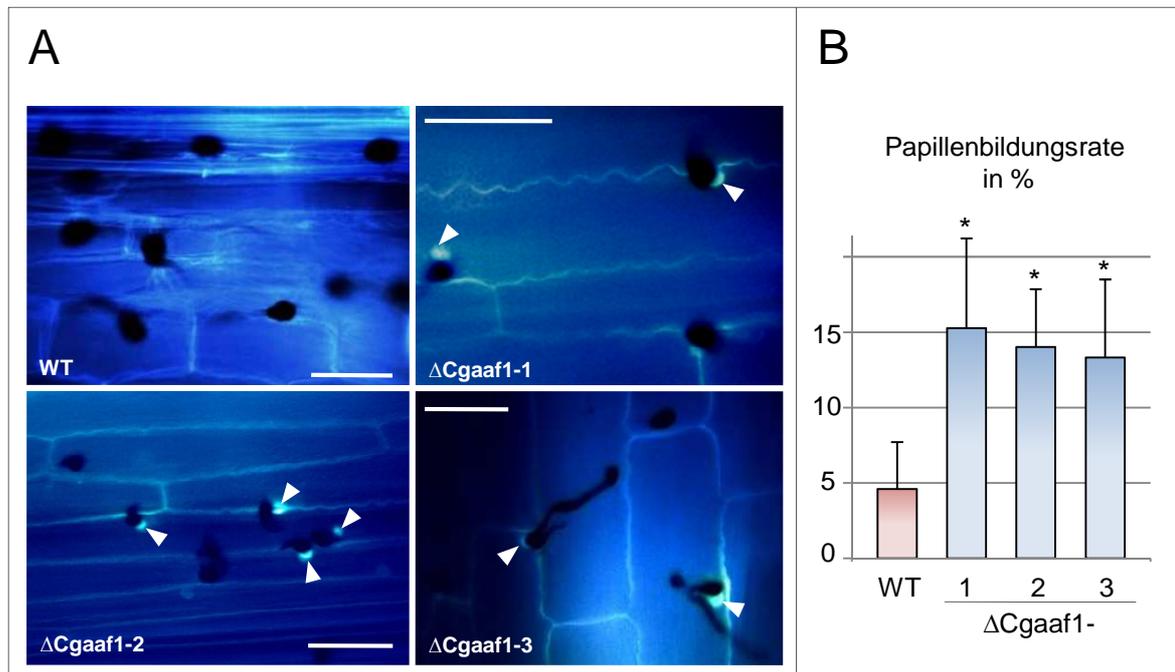


Abbildung 21: Papillenbildung in infizierten Maisblättern 3 dpi. (A) Mikroskopische Aufnahmen Anilinblau-gefärbter infizierter Maisblätter. Appressorien erscheinen schwarz und rundlich. Papillen, die unterhalb der Appressorien gebildet werden, leuchten unter UV-Licht hell auf und sind mit weißen Pfeilspitzen markiert. Größenstandard = 50 μm **(B)** Papillenbildungsraten (+SD) sind die Anteile der Appressorien, unter denen eine Papille gebildet wurde, an der Gesamtzahl gebildeter Appressorien. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp markiert ein Stern ($p < 0,05$)

D.3.5.4 Symptomanalyse auf verwundeten Maisblättern

In Abschnitt D.3.5.2 wurde festgestellt, dass die Deletionsmutanten eine zeitlich verzögerte Penetration und eine verringerte Penetrationsrate auf Maisblättern zeigen (vgl. Abbildung 19). Das bedeutet, dass zunächst weniger Hyphen in die Pflanze eindringen. Obwohl sich anschließend primäre und sekundäre Hyphen entwickeln (vgl. Abbildung 20), kann über eine möglicherweise zusätzliche Virulenzreduktion durch eine beeinträchtigte Entwicklung invasiver Hyphen *in planta* noch keine Aussage getroffen werden. Experimente mit Maisblättern, die vor der Inokulation an den entsprechenden Inokulationsstellen leicht verwundet wurden, können Hinweise hierzu liefern. In diesem Virulenztest wurden abgetrennte dritte Maisblätter mit fünf leichten Nadeleinstichen je Inokulationspunkt verwundet und mit 2.000 Sporen je Tropfen inokuliert. Wieder wurden die Symptome der drei Deletionsmutanten, der Disruptionsmutante, des Wildtyps, der Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette und der Wasserkontrolle miteinander

verglichen. Die Symptomentwicklung erfolgte wesentlich schneller als im Virulenztest mit unverwundeten Blattsegmenten oder mit lebenden Pflanzen (vgl. Abbildung 18). Bereits drei Tage nach der Inokulation ist eine starke Symptomausprägung erkennbar. Ein Unterschied zwischen allen Kandidaten und dem Wildtyp in der Symptomstärke ist nicht zu erkennen (Abbildung 22). Alle Kandidaten haben das Blatt gleichermaßen besiedelt und ihren Lebenszyklus vollendet. Die Wasserkontrolle hingegen zeigt ein Blattsegment ohne Symptome.

Dieses Resultat suggeriert für die Deletionsmutanten und die Disruptionsmutante, dass bei der Umgehung der Penetration intakter Oberflächen aufgrund der Blattverwundung die postpenetrative Entwicklung und das Wachstum der Hyphen im Blattgewebe wie beim Wildtyp erfolgen kann. Mit den Ergebnissen der Virulenztests auf verwundeten und unverwundeten Maisblättern kann geschlussfolgert werden, dass die verringerte Virulenz der Mutanten durch eine reduzierte Penetrationsrate und durch die damit verbundene geringere Anzahl an Hyphen im Blatt verursacht wird. Eine veränderte oder langsamere Entwicklung der invasiven Hyphen im Blatt kann als Grund für die Virulenzreduktion ausgeschlossen werden.

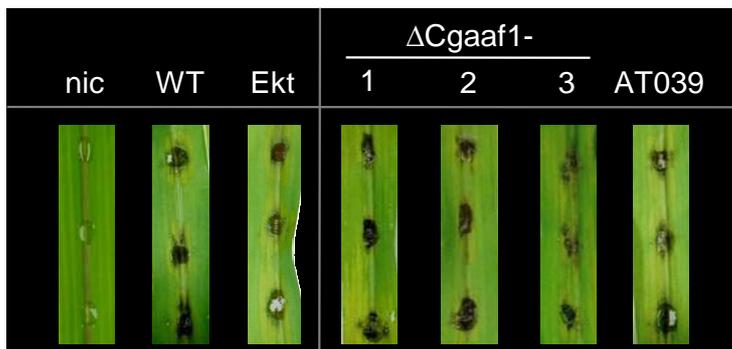


Abbildung 22: Virulenztest auf verwundeten Maisblattsegmenten.

Dargestellt ist das Schadbild auf verwundeten dritten Blättern von zwei Wochen alten Maispflanzen drei Tage nach Inokulation. nic – nicht inokulierte Kontrolle; WT – Wildtyp; Ekt – Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette

D.3.5.5 Untersuchung des Turgordrucks in Appressorien von *CgAAF1* defizienten Mutanten

Der Turgordruck in Appressorien der Mutante AT039 wurde bereits in Abschnitt D.2.4.2 untersucht. Es wurde kein Unterschied zu Appressorien des Wildtyps festgestellt und somit wurde ein veränderter Druck als Ursache für die Reduktion der Penetrationsrate der Mutante AT039 ausgeschlossen. Da gleichsam für die Deletionsmutanten $\Delta Cgaaf1$ -1 bis -3 eine verringerte Penetrationsrate der Appressorien beschrieben wurde, soll nun auch für diese Mutanten der Turgordruck in Appressorien als mögliche Ursache untersucht werden. Der experimentelle Ablauf ist dem in Abschnitt D.2.4.2 gleich.

In einer 2,0 molaren Glycerol-Lösung kollabierten mit 54,8% ($\pm 8,5\%$) bzw. 48,0% ($\pm 9,5\%$) etwa Hälfte der Appressorien des Wildtyps bzw. der Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette. Die Appressorien der drei Deletionsmutanten zeigten vergleichbare Raten. Bei einer Molarität von 2,0 kollabierten ebenfalls etwa die Hälfte aller Appressorien (47,2% $\pm 6,6\%$; 56,0% $\pm 5,8\%$; 56,0% $\pm 13,1\%$). Abbildung 23 zeigt Aufnahmen der Appressorien nach einer Inkubation in 2,0 M Glycerol und die grafische Auswertung aller Messdaten. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass die im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Penetrationskompetenz der Appressorien der Δ Cgaaf1-Mutanten nicht auf einen reduzierten appressorialen Turgordruck zurückzuführen ist.

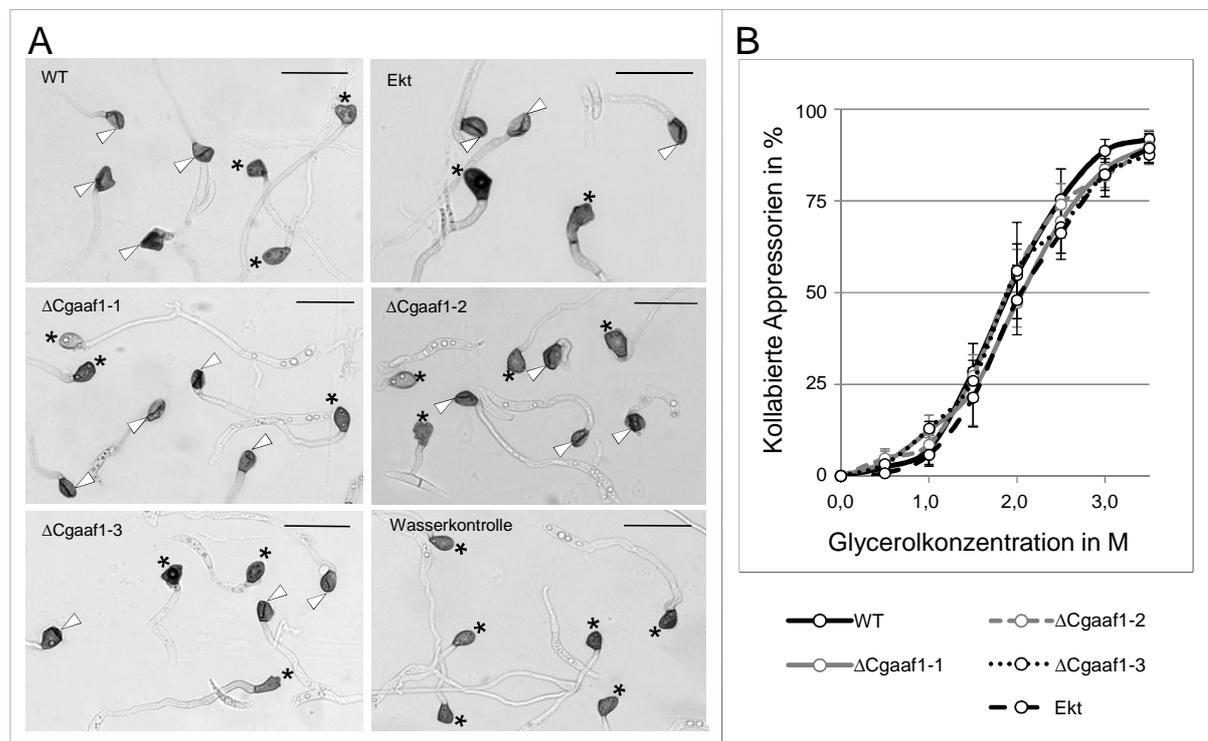


Abbildung 23: Untersuchung des Turgordrucks in Appressorien durch Zytorrhizie. (A) Die Fotos zeigen Appressorien in 2,0 M Glycerol. Appressorien, die durch Hyperosmolarität der Glycerollösung kollabiert sind, besitzen eine Falte in ihrer Zellwand (durch weiße Pfeilspitze markiert). Im Kontrollansatz ohne Glycerol (Wasserkontrolle) waren alle Appressorien turgoreszent. WT – Wildtyp, Ekt – Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette, Größenstandard = 20 μ m. **(B)** Appressorien aller untersuchten Isolate zeigen zueinander vergleichbare Raten der Zytorrhizie bei steigender Osmolytkonzentration (\pm SD).

D.3.5.6 Quantifizierung der Kolonialisierung der Pflanze als Maß der Virulenz

Eine quantitative Abschätzung des Besiedlungserfolgs des Wirtes durch Δ Cgaaf1 als Maß der Virulenz liefern die bisher generierten Daten der Virulenztests nicht. Auch das quantitative Erfassen reduzierter Bildungsraten von Infektionsstrukturen lässt eine direkte

quantitative Abschätzung der Virulenzreduktion nicht zu. Durch die Bestimmung der Myzelmenge im Wildtyp-infizierten und im Δ Cgaaf1-infizierten Blattgewebe kann hingegen eine solche Quantifizierung erfolgen. Hierbei dient die Myzelmenge im Wirtsgewebe als Maß für den Besiedlungserfolg und damit als Maß für Virulenz. Es sollen die Isolate Δ Cgaaf1-1 und AT039 mit dem Wildtyp, der Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette und der Wasserkontrolle verglichen werden. Maisblattsegmente wurden tropfenweise inokuliert und nach vier Tagen wurden die Inokulationsstellen als Scheiben mit einem Durchmesser von 8 mm aus dem Maisblatt gestanzt. Es wurden fünf biologische Wiederholungen durchgeführt, jede Wiederholung umfasste acht Blattscheiben. Vor Beginn der DNA-Isolation wurden in jeden Ansatz genau 50 pg des Plasmids pUC18 hinzugegeben. Material und damit genomische DNA, die während der Isolation verloren geht, geht in gleichem Anteil an pUC18 verloren. Somit kann pUC18 in der qPCR zum Vergleich der Isolationsverluste zwischen verschiedenen Ansätzen dienen. In der qPCR wurde einerseits ein Fragment der *ITS2* Region aus *C. graminicola* und andererseits ein Fragment auf pUC18 amplifiziert. Aus den Messungen der qPCR wurden die initialen Fluoreszenzwert (F0) bestimmt. Die pUC18-F0 Werte dienen der Normalisierung der *ITS2* Messwerte. Aus den normalisierten *ITS2* F0-Werten der biologischen Wiederholungen wurde jeweils der Mittelwert bestimmt. Relativ zueinander betrachtet, geben diese Werte für die verschiedenen Kandidaten Auskunft über Virulenzunterschiede (Abbildung 24). Für den Zeitpunkt 4 dpi zeigt Δ Cgaaf1-1 nur 10,9 % (\pm 3,6 %) der Virulenz des Wildtyps. Die Mutante AT039 zeigt 8,2 % (\pm 3,3 %) der Virulenz des Wildtyps. Die beschriebenen Unterschiede sind signifikant ($p < 0,05$). Die Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette zeigt mit 106,8 % (\pm 12,6 %) ungefähr dieselbe Virulenz wie der Wildtyp ($p > 0,05$). Die Wasserkontrolle (nic) zeigt kein Pilzwachstum.

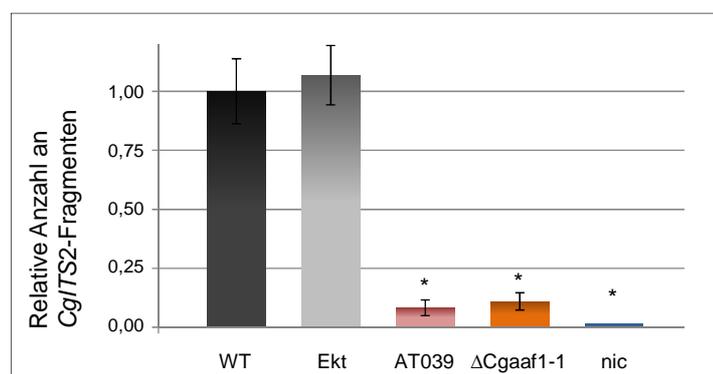


Abbildung 24: Quantifizierung der Virulenz durch qPCR, 4 dpi. Dargestellt ist die relative Anzahl an *C. graminicola* *ITS2*-Fragmenten in einem definierten Areal infizierten Blattgewebes (\pm SD). Unterschiede entsprechen einer unterschiedlich starken Wirtsbesiedlung durch den Wildtyp (WT), die Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette (Ekt) und die Mutanten AT039 und Δ Cgaaf1-1 und sind somit Ausdruck der Virulenzunterschiede. nic – Wasserkontrolle. * - Signifikanter Unterschied zum Wildtyp ($p < 0,05$).

D.3.6 Axenisches Wachstum der *CgAAF1* defizienten Mutanten

Die Virulenztests stellten heraus, dass die Deletionsmutanten unter anderem eine zeitlich verzögerte pathogene Entwicklung aufweisen. So wurde im Vergleich zum Wildtyp die nahezu maximale Bildungsrate an Appressorien erst einen Tag später erreicht. Neben dieser Beeinträchtigung während der Pathogenese ergibt sich die Frage nach generellen Wachstumsdefekten auch in axenischen Kulturen. Diese Frage soll mit einem Wachstumstest auf Minimalmedien mit Zugabe von jeweils einem einzigen Zucker als C-Quelle beantwortet werden. Insgesamt wurde mit sechs unterschiedlichen Zuckern getestet. Dabei wurden sowohl die niedermolekularen Kohlenhydrate Glukose, Saccharose, Maltose und Raffinose als auch die Polysaccharide Pektin und Cellulose verwendet. Zusätzlich wurde das Wachstum auf den Komplettnmedien OMA und SCM sowie auf einem Medium ohne C-Quelle untersucht. Von den Deletionsmutanten wurde exemplarisch $\Delta Cgaa1-1$ im Vergleich zum Wildtyp, zur Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette und zur Mutante AT039 betrachtet. Vom dritten bis zum zehnten Tag nach Animpfen der Kulturen wurde täglich der radiale Durchmesser der Kolonien gemessen. Aus diesen Werten wurde eine durchschnittliche tägliche Wachstumsrate für den benannten Zeitraum ermittelt. In der Abbildung 25A sind Fotos der Kulturen und in Abbildung 25B sind die täglichen Wachstumsraten dargestellt. Die Morphologie von $\Delta Cgaa1-1$ und der Mutante AT039 unterscheiden sich etwas von der des Wildtyps und der Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette. Einerseits bilden die Mutanten im Bereich der Animpfzone etwas mehr weißes Luftmyzel und andererseits ist die Färbung des Myzels auf vielen Platten rötlicher. Dieser Effekt ist bei der Mutante AT039 nur schwach ausgeprägt, bei $\Delta Cgaa1-1$ ist er deutlicher erkennbar. Der Wildtyp und die Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette zeigen eine einheitlich gleiche Morphologie. Auch alle Wachstumsraten auf den Platten des Wildtyps und der Transformante mit ektopischer Integration sind nahezu gleich. Die Mutante $\Delta Cgaa1-1$ und die Mutante AT039 unterscheiden sich dagegen vom Wildtyp. Deutlich schwächeres Wachstum der Mutante $\Delta Cgaa1-1$ ist auf den Medien mit Saccharose, Maltose und Pektin zu erkennen, hier liegen die täglichen Wachstumsraten bei nur etwa der Hälfte der Werte des Wildtyps. Auf den Medien mit Glukose, Raffinose, Cellulose und den Komplettnmedien OMA und SCM zeigt $\Delta Cgaa1-1$ eine moderatere Wachstumsreduktion um maximal ein Viertel. Für die Mutante AT039 wurden geringere oder keine Wachstumsdefekte festgestellt. Reduziertes Wachstum wurde auf Saccharose, Raffinose, OMA und SCM beobachtet, wobei die Reduktion etwas schwächer ist als bei der Mutante $\Delta Cgaa1-1$. Medien mit Glucose und Pektin ermöglichen der Disruptionsmutante ein mit dem Wildtyp ungefähr vergleichbares Wachstum. Auf Maltose- und Cellulose-haltigem Medium ist das Wachstum sogar etwas schneller. Alle Wachstumsraten, die sich signifikant vom entsprechenden Wert des Wildtyps unterscheiden, sind in Abbildung 25 markiert.

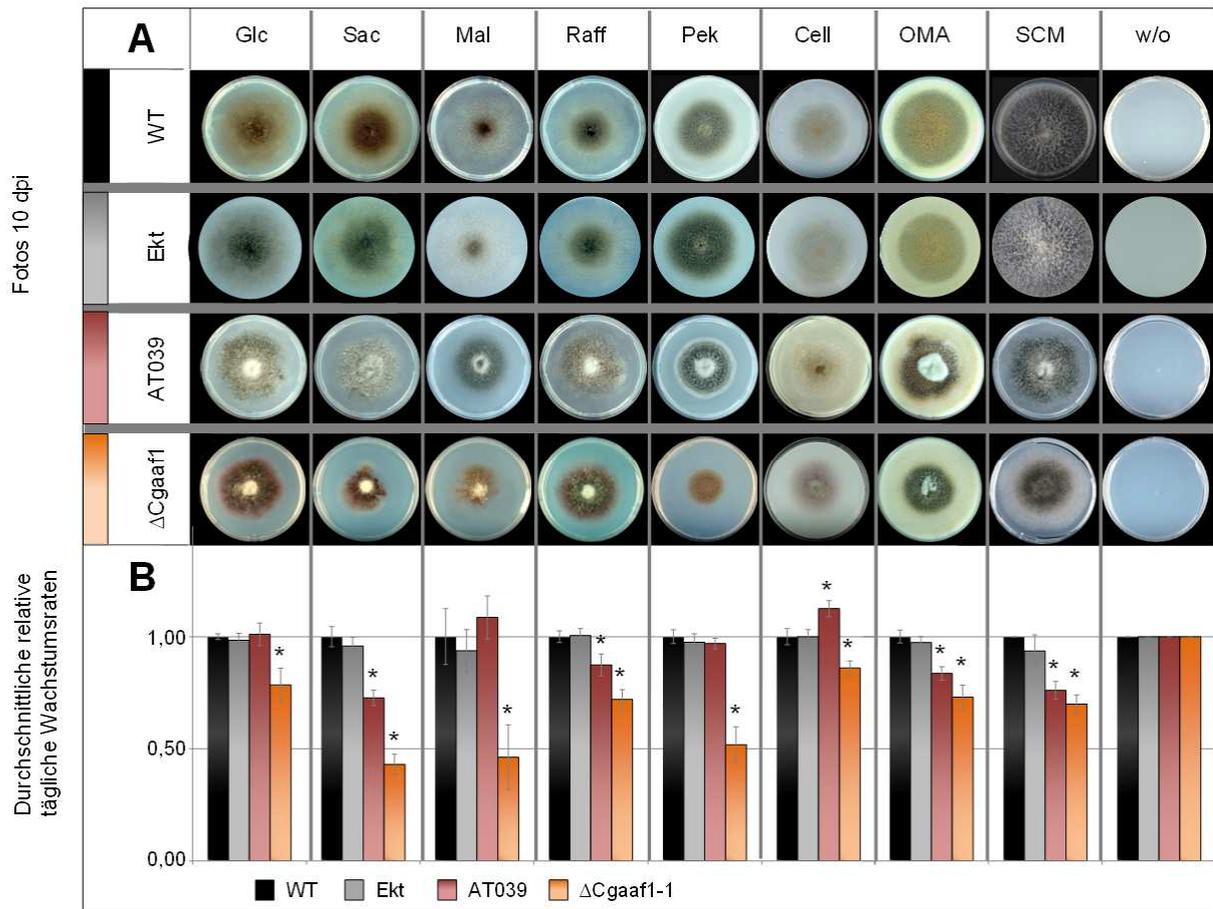


Abbildung 25: Wachstumsraten auf Minimalmedien mit verschiedenen C-Quellen. Glc – Glukose, Sac – Saccharose, Mal – Maltose, Raff – Raffinose, Pek – Pektin, Cell – Cellulose, OMA – Haferflockenagar, SCM – Saccharose Komplettmedium, w/o – ohne C-Quelle, WT – Wildtyp, Ekt – Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette. **(A)** Fotos der Kandidaten nach zehn Tagen Kultivierung. **(B)** Die durchschnittlichen täglichen Wachstumsraten zwischen drei und zehn Tagen nach Animpfen sind relativ zu den Wachstumsraten des Wildtyps dargestellt (\pm SD). Signifikante Unterschiede zum entsprechenden Wert des Wildtyps ($p < 0,05$) sind markiert (*).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass sich die Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette in ihrem Wachstum nicht vom Wildtyp unterscheidet. Die Deletionskassette mit dem Resistenzgen *nat* hat als Konstrukt also keine Auswirkungen auf das Wachstum. Obwohl die Deletionsmutante Δ Cgaaf1-1 auch auf allen Medien wachsen kann, zeigt sie gegenüber dem Wildtyp einen erkennbaren Wachstumsdefekt. Da sich dieser Defekt auf alle Medien bezieht, kann er als generell bezeichnet werden.

D.3.7 Lokalisierung von CgAAF1

Die Vorhersage von transmembranalen Domänen in CgAAF1, die Komplementation des deletierten Gens des V-ATPase Assembly Faktors PKR1 in *S. cerevisiae* durch CgAAF1 und die Lokalisierung von PKR1 im ER suggerieren für CgAAF1 eine gleiche zelluläre

Lokalisierung in *C. graminicola*. Deswegen soll untersucht werden, ob CgAAF1 tatsächlich ER lokalisiert ist. Dazu wurde CgAAF1 durch eine Fusion aus CgAAF1 und eGFP unter dem konstitutiv exprimierten Promotor *toxB* aus *Pyrenophora tritici-repentis* in *C. graminicola* ersetzt. Als Selektionsmarker wurde die Hygromycin-Resistenz gewählt. Die Transformationskassette (Abbildung 26A) wurde in die Deletionsmutante Δ Cgaaf1-1 transformiert. Generierte Transformanten wurden auf Hygromycin B kultiviert und einzelsporisoliert. Per PCR wurden sie auf die erfolgreiche Integration der Transformationskassette am richtigen Ort untersucht. Für die Isolate AGF1 (CgAAF1-eGFP-Fusion-1), AGF2, AGF3 und für den Wildtyp wurde ein Fragment mit 537 bp des ORFs von CgAAF1 amplifiziert. In der Deletionsmutante wurde kein Fragment generiert. Ein Fragment aus dem Nourseothricin Acetyltransferasegen von 558 bp konnte nur in der Deletionsmutante erstellt werden. Mit einem Primer, der auf CgAAF1 liegt, und einem zweiten, der auf eGFP bindet, wurde lediglich für die Isolate AGF1, AGF2 und AGF3 ein 730 bp langes Fragment amplifiziert, für den Wildtyp und die Deletionsmutante entstand kein Fragment (Abbildung 26B). Diese PCR Ergebnisse belegen: 1. im Gegensatz zur Mutante Δ Cgaaf1 tragen die AGF-Isolate CgAAF1, 2. das Nourseothricin Acetyltransferasegen ist lediglich in Δ Cgaaf1 vorhanden, die Isolate AGF1 bis 3 tragen dieses Gen nicht mehr, 3. eGFP ist erfolgreich in die Isolate AGF1 bis 3 eingebracht worden und 4. eGFP ist an CgAAF1 gekoppelt. Ein weiteres Argument liefert die Fähigkeit der Isolate AGF1 bis 3, auf Hygromycin-haltigem Medium nicht aber auf Nourseothricin-haltigem Medium wachsen zu können. Δ Cgaaf1 verhält sich genau umgekehrt und der Wildtyp wächst auf keinem der beiden Medien (Abbildung 26B). Diese Nachweise lassen den Schluss zu, dass in den Isolaten AGF1 bis 3 die Transformationskassette an den Ort der Nourseothricin-Resistenzkassette im Genom von Δ Cgaaf1 und damit an den ursprünglichen Ort von CgAAF1 integriert wurde. Die Isolate AGT1 bis 3 tragen damit am originären CgAAF1-Locus das Fusionskonstrukt CgAAF1:eGFP unter dem Promotor *toxB* und eine Hygromycin-Resistenzkassette.

Virulenztests mit AGF1 bis 3 sollen belegen, dass entgegen der Deletion von CgAAF1 dessen Fusion mit eGFP keine Auswirkungen auf die Virulenz hat. In Abbildung 26C sind infizierte dritte Maisblätter aus einem Lebenpflanzentest und Blattsegmenttest 5 dpi dargestellt. Die Symptomentwicklung ist deutlich zu erkennen und in ihrer Stärke vergleichbar mit der des Wildtyps. Zum Vergleich dient auch das schwache Symptombild auf Δ Cgaaf1-infizierten Blättern und auf Wasser-inokulierten Blättern. Diese Daten belegen, dass die reduzierte Virulenz von Δ Cgaaf1 in den Isolaten AGF1 bis 3 komplementiert wurde, obwohl nicht das native CgAAF1 sondern das Fusionskonstrukt CgAAF1:eGFP in Δ Cgaaf1 rekombiniert wurde. Bezogen auf die Virulenz hat die Fusion mit eGFP also keine Auswirkung auf die Funktion von CgAAF1.

Neben der normalen pathogenen Entwicklung wurde in einem Wachstumstest auch eine normale vegetative Entwicklung festgestellt. Der Test auf Komplexmedien und auf Minimalmedien, die mit verschiedenen Zuckern als C-Quelle komplementiert wurden, wurde wie in Abschnitt D.3.6 durchgeführt. Die durchschnittlichen täglichen Wachstumsraten des Isolats AGF1 zwischen drei und zehn Tagen nach Animpfen sind in Abbildung 26D relativ zum jeweiligen Wert des Wildtyps dargestellt. Aus diesen Daten geht hervor, dass sich die Wachstumsrate des Isolats AGF1 nicht maßgeblich von der des Wildtyps unterscheidet.

Die hier dargestellte Charakterisierung der Isolate AGF1, AGF2 und AGF3 zeigt, dass sich ihr Phänotyp nicht von dem des Wildtyps unterscheidet. Daher können die AGF-Isolate zur zellulären Lokalisierung von CgAAF1 verwendet werden.

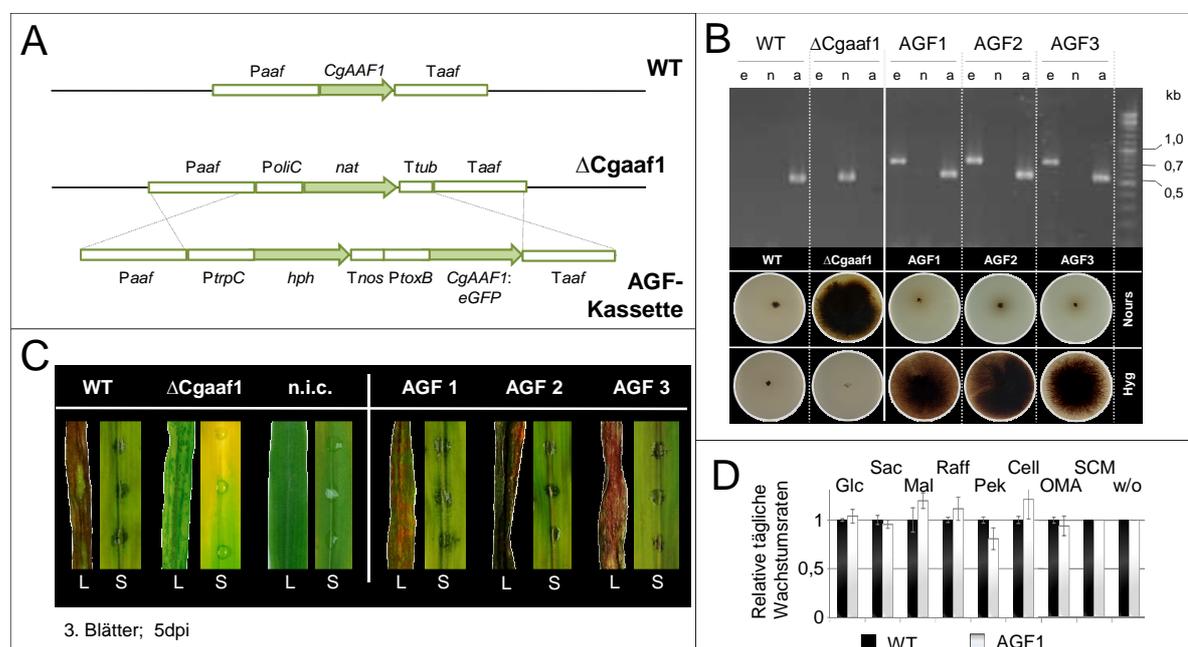


Abbildung 26: Konstruktion und Charakterisierung der Mutanten mit CgAAF1:eGFP. (A) Darstellung der CgAAF1-Region im Wildtyp (WT) und in $\Delta Cgaaf1$ sowie der AGF-Transformationskassette mit dem CgAAF1:eGFP-Fusionskonstrukt für die Mutagenese. Homologe Flanken für die homologe Rekombination sind durch Kreuze einander zugeordnet. *nat* – Nourseothricin Acetyltransferasegen, *hph* – Hygromycin Phosphotransferasegen. (B) Amplifikation von Fragmenten der Gene CgAAF1:eGFP (e), *nat* (n) und CgAAF1 (a) in den Mutanten AGF1 bis 3, in $\Delta Cgaaf1$ und im Wildtyp (WT). Platten mit PDA mit Nourseothricin (Nours) und mit Hygromycin (Hyg) zeigen in der Box darunter selektives Wachstum. (C) Virulenztest auf intakten lebenden Pflanzen (L) und Maisblattsegmenten (S). Abgebildet sind dritte Maisblätter 5 dpi. nic – Wasserkontrolle. (D) Durchschnittliche relative tägliche Wachstumsraten im Zeitraum 3 dpi bis 10 dpi des Wildtyps (WT) und der Mutante AGF1 auf mit verschiedenen Zuckern komplementierten Minimalmedien, auf den Komplettmedien OMA und SCM sowie auf Minimalmedium ohne C-Quelle (w/o). Alle Werte für die Mutante AGF1 sind relativ zum entsprechenden Wert des Wildtyps dargestellt (\pm SD). Glc – Glukose, Sac – Saccharose, Mal – Maltose, Raff – Raffinose, Pek – Pektin, Cell – Cellulose.

Der Dapoxyl-Farbstoff "ER-Tracker Blue-White DPX" von Invitrogen (Eugene, USA) bindet permanent und hochselektiv an das ER. Er hat ein Anregungsspektrum von 300 nm bis 440 nm und ein breites Emissionsspektrum von 430 nm bis über 700 nm. Zur Visualisierung des ER in *C. graminicola* wurden Hyphen aus drei Tage alten Flüssigkulturen verwendet und entsprechend gefärbt. Zur ER-Lokalisierung wurden gefärbte Hyphen unter einem Laserscanning Mikroskop mit einer Wellenlänge von 408 nm angeregt und die Emission bei 650 nm aufgenommen. In Abbildung 27 ist das ER in gefärbten Hyphen des Isolats AGF1 und des Wildtyps deutlich erkennbar. Obwohl im gesamten Bereich der Hyphen Lichtemission zu sehen ist, gibt es Bereiche stärkerer und schwächerer Emission. Das ER scheint im Wildtyp von *C. graminicola* und im Isolat AGF1 in der gesamten Hyphe verteilt zu sein und kommt in einigen Bereichen verstärkt vor. Ungefärbte Hyphen des Isolats AGF1 und des Wildtyps zeigen keine Signale bei gleicher Anregung.

Das Protein eGFP hat ein Anregungsspektrum von 350 nm bis 525 nm und ein Emissionsspektrum von 475 nm bis 600 nm. Um das Fusionsprotein CgAAF1:eGFP zu lokalisieren, wurden die Hyphen mit 488 nm angeregt und die Emission bei 515 nm aufgenommen. Abbildung 27 zeigt die zugehörigen Bilder für den Wildtyp und das Isolat AGF1. Sowohl bei ER-gefärbten als auch ungefärbten Proben ist das Fusionsprotein durch das grüne Leuchten in AGF1-Hyphen zu erkennen. Aus Hyphen des Wildtyps emittiert kein Licht, was kohärent mit dem Fehlen des Fusionsproteins ist. Diese Bilder belegen, dass das Fusionsprotein CgAAF1:eGFP zur Lichtemission fähig ist. Die Verteilung der grünen Lichtemission in den Hyphen zeigt das räumliche Vorkommen des Fusionsproteins in den Hyphen an und lokalisiert damit CgAAF1.

Überlagerungsbilder aus den ER-Lokalisierungsbildern und CgAAF1:eGFP-Lokalisierungsbildern belegen, dass das Fusionsprotein mit dem ER colokalisiert (Abbildung 27). Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass CgAAF1 in *C. graminicola* als V-ATPase Assembly Faktor an die ER-Membran gekoppelt ist.

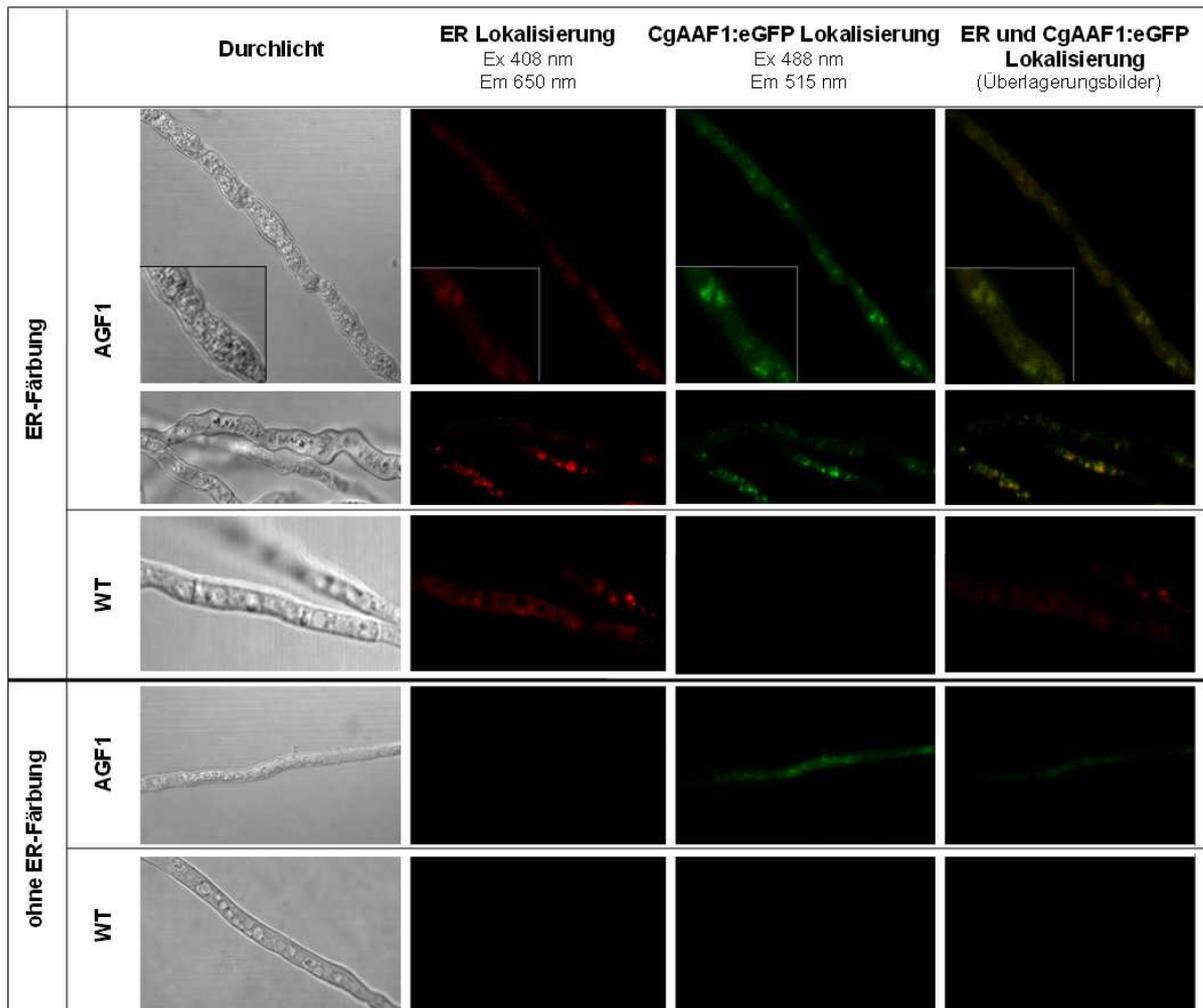


Abbildung 27: Lokalisierung von CgAAF1 in *C. graminicola* durch Fluoreszenz des eGFP-markierten CgAAF1 und durch ER spezifische Färbung. Mikroskopische Durchlichtbilder und Laserfluoreszenzmikroskopische Bilder von ER-gefärbten und ER-ungefärbten Hyphen von *C. graminicola* Wildtyp und des Isolats AGF1. Absorptions- (Ex) und Emissionsbedingungen (Em) zur Lokalisierung des spezifisch angefärbten ER und zur Lokalisierung des CgAAF1:eGFP Fusionsproteins sind angegeben. Zusätzlich ist ein Überlagerungsbild der beiden zusammengehörigen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen abgebildet.

D.3.8 Komplementation der Mutante Δ Cgaaf1 mit CgAAF1

Komplementationsmutanten dienen der Kontrolle von Deletionsmutanten. Die Komplementation einer definierten Gendeletion mit dem Wildtyp-Gen sollte den Phänotyp des Wildtyps wieder herstellen. Die Mutante Δ Cgaaf1-1 wurde mit CgAAF1 komplementiert. Die gesamte Komplementationskassette umfasste auf einer Länge von 5.613 bp CgAAF1 und *hph*. Durch homologe Rekombination wurde die Nourseothricin Resistenzkassette in der Mutante Δ Cgaaf1-1 durch einen Teil der Komplementationskassette ersetzt (Abbildung 28A). Anstelle des originalen CgAAF1-Bereichs von 575 bp im Wildtyp befand sich in der Komplementationsmutante also wieder CgAAF1 – aber zusammen mit *hph* und damit auf

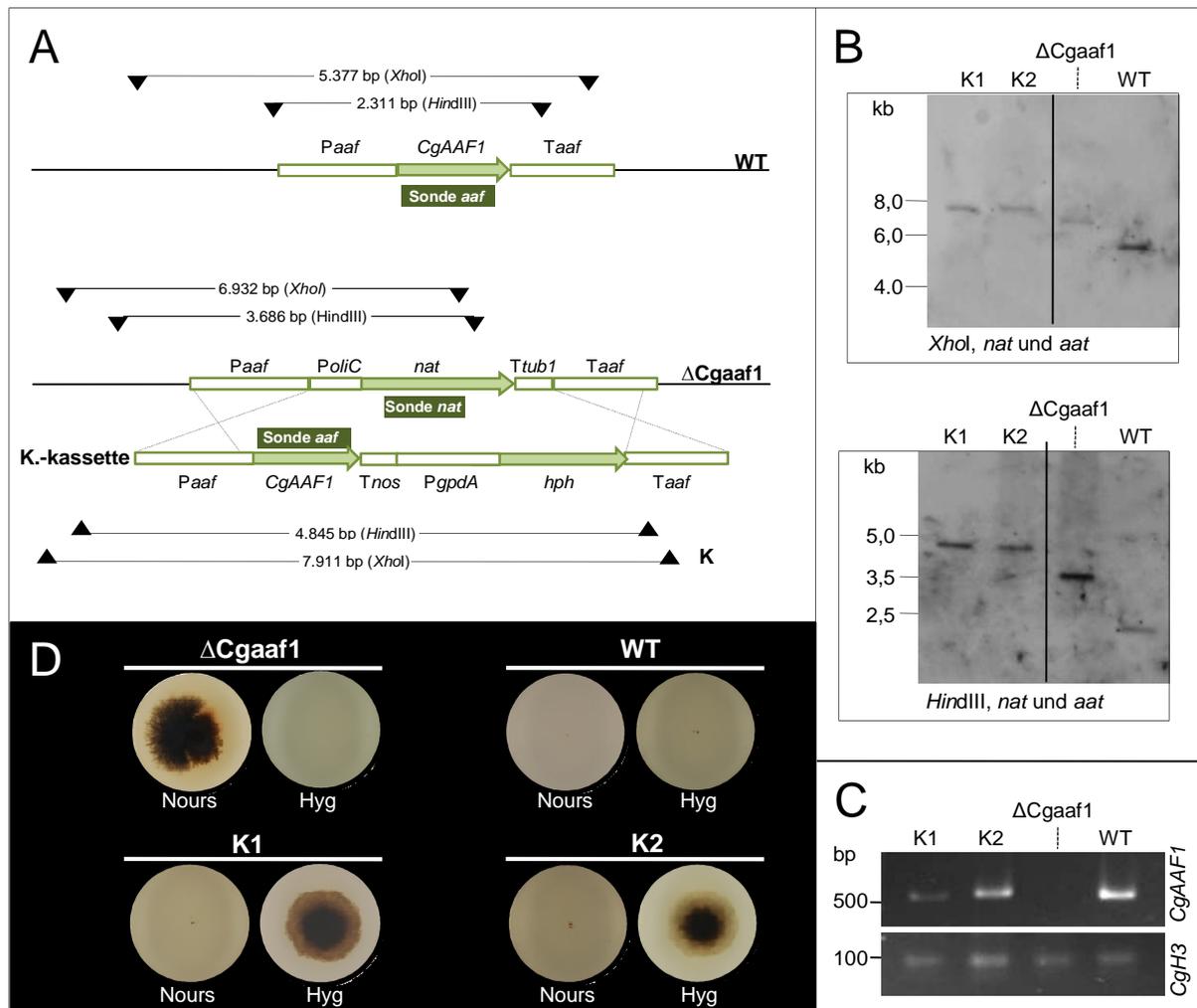


Abbildung 28: Komplementation von $\Delta Cgaaf1$ mit *CgAAF1*. (A) Schematische Darstellung der Komplementation durch homologe Rekombination. Ein komplementiertes Isolat (K) enthält die Komplementationskassette mit *CgAAF1* und *hph* verbunden mit den Promotoren *PgpDA* und *Paaf* sowie den Terminatoren *Tnos* und *Taaf*. *Paaf* und *Taaf* dienen gleichzeitig als Flanken zur homologen Integration in $\Delta Cgaaf1$. Entstehende Fragmentgrößen bei Restriktion mit *XhoI* bzw. *HindIII* sind angegeben. Die Bindestellen der Sonden *aaf* und *nat* sind ebenfalls dargestellt. (B) Southern Hybridisierungsbilder nach *XhoI*- bzw. *HindIII*-Restriktion. Bei jeder Hybridisierung wurden beide Sonden gleichzeitig eingesetzt. K1 und K2: komplementierte Isolate. (C) RT-PCR, Amplifikation eines 537 bp-Fragments von *CgAAF1* und eines 100 bp-Fragments von *CgH3*. (D) Wachstumstest auf Nourseothricin- (Nours) und Hygromycin B-haltigem (Hyg) Medium. K1 und K2 können nur auf Hyg wachsen und nicht mehr auf Nours.

einer Länge von 3.143 bp. Nach der Einzelsporisolation der Transformanten konnte in einem Southern Blot sowohl mit *XhoI*- als auch mit *HindIII*-geschnittener genomischer DNA die exakte Komplementation bestätigt werden (Abbildung 28B). Ausgehend von isolierter RNA aus Flüssigkulturen wurden *CgAAF1*-Transkripte für die komplementierten Isolate K1 und K2 sowie für den Wildtyp per RT-PCR nachgewiesen. Für $\Delta Cgaaf1$ -1 waren erwartungsgemäß keine *CgAAF1*-Transkripte nachweisbar. Weiterhin zeigte die Amplifikation eines 100 bp-Fragments des Histon H3-Transkripts, dass RNA bzw. cDNA und nicht DNA als Template in

den RT-PCRs diene. Wäre das Fragment anhand genomischer DNA erzeugt worden, hätte sich aufgrund eines Introns eine Fragmentgröße von 152 bp ergeben (Abbildung 28B).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass die komplementierten Isolate K1 und K2 nicht mehr auf PDA mit Nourseothricin wachsen können, wohl aber auf PDA mit Hygromycin B. Erwartungsgemäß verhält sich die Deletionsmutante umgekehrt während der Wildtyp auf keinem selektiven Medium wachsen kann (Abbildung 28D). Die Ergebnisse der Southern Hybridisierung, der RT-PCR und des Wachstumstests zeigen klar, dass K1 und K2 nicht mehr die Nourseothricin-Kassette der Deletionsmutante enthalten sondern an dieser Stelle *CgAAF1* und die Hygromycin-Kassette integriert haben.

Im Folgenden wird das komplementierte Isolat K1 näher charakterisiert. Sein saprophytisches Wachstum und die Pathogenese sollen im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. Zeigt das komplementierte Isolat K1 wieder den Phänotypen des Wildtyps, so ist das ein Beweis für die Deletion von *CgAAF1* als einzige Ursache für die Virulenzreduktion in der Deletionsmutante.

D.3.8.1 Virulenz der Komplementationsmutante

Im Lebendpflanzen-Test und im Blattsegment-Test verläuft die Symptomentwicklung auf K1- und Wildtyp-infizierten Blättern gleich. K1 entwickelt ein ausgeprägtes Symptombild. In Abbildung 29A sind die Symptome an 5 dpi und 7 dpi dargestellt. Auch die Bildungsrate der Infektionsstrukturen von K1 sind mit denen des Wildtyps vergleichbar (Abbildung 29B; $p > 0,05$). Im Unterschied zu den reduzierten Penetrationsraten der Deletionsmutanten $\Delta Cgaa1-1$ bis $\Delta Cgaa1-3$, zeigt die das komplementierte Isolat K1 wieder eine Penetrationsrate, die der des Wildtyps entspricht.

Mit Hilfe einer quantitativen PCR Analyse wurde zusätzlich die Menge des Pilzmaterials in einer definierten infizierten Blattgewebsfläche als Maß der Virulenz bestimmt. Diese Untersuchung wurde, wie in Abschnitt D.3.5.6 und C.6.4.6 beschrieben, durchgeführt. Die ermittelte Anzahl an *CgITS2*-Fragmenten in Wildtyp-infiziertem Blattmaterial 4 dpi wurde auf 100,0 % definiert. Im Vergleich hierzu betrug der ermittelte Wert aus K1-infizierten Maisblättern 90,6 % ($\pm 19,5$ %) (Abbildung 29C). Entgegen Infektionen mit $\Delta Cgaa1-1$, ist der Wert für die das komplementierte Isolat K1 wieder vergleichbar mit dem Wert des Wildtyps. Für $\Delta Cgaa1-1$ betrug der Wert lediglich lediglich 10,9 % ($\pm 3,6$ %) (siehe Abschnitt D.3.5.6.). Damit wurde eindeutig gezeigt, dass die Besiedelung der Maisblätter durch den Wildtyp und das komplementierte Isolat 4 dpi ein etwa gleiches Maß annimmt und somit die Virulenz beider Kandidaten als gleich einzuschätzen ist.

Die Daten dieses Abschnitts belegen in qualitativer und quantitativer Form, dass die reduzierte Virulenz der *CgAAF1*-Deletionsmutanten durch die Komplementation mit *CgAAF1* wieder zur vollständigen Virulenz erhöht wurde.

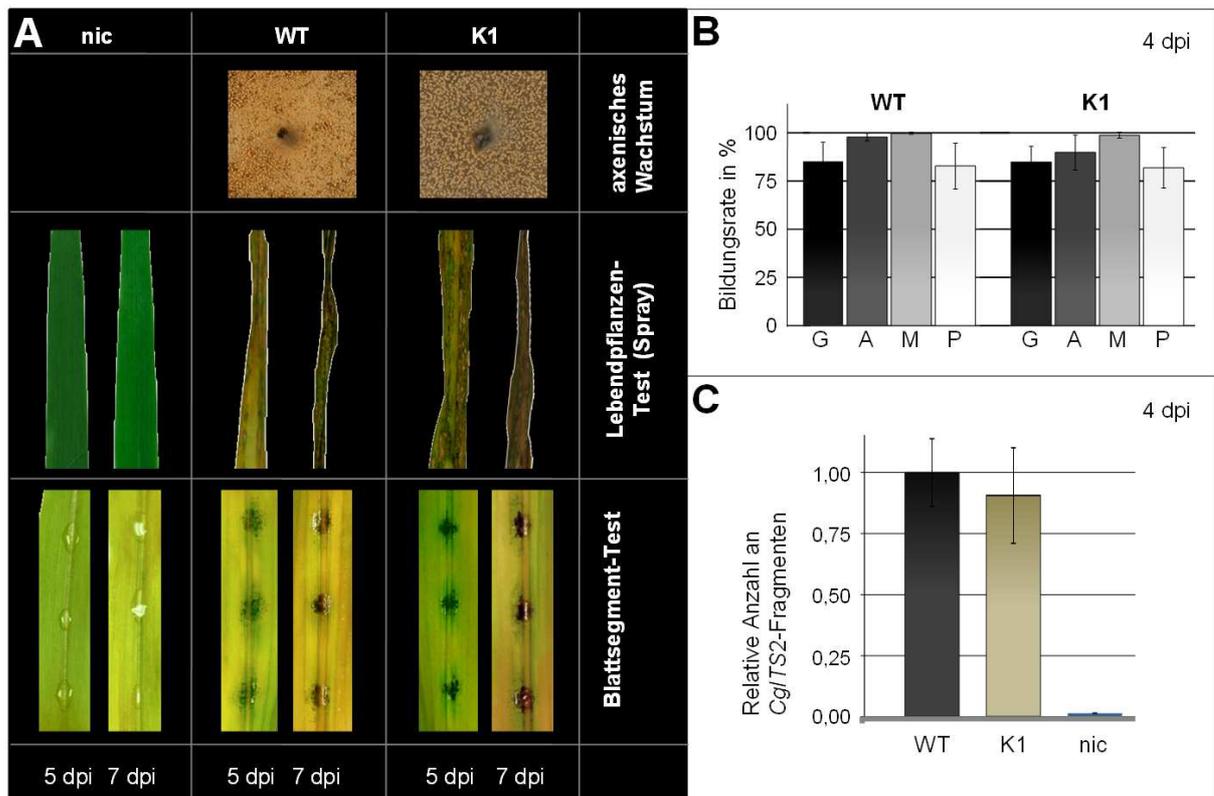


Abbildung 29: Virulenz des komplementierten Isolats K1 im Vergleich zum Wildtyp. (A) Dargestellt ist das Wachstum des Wildtyps und des komplementierten Isolats K1 auf OMA Medium und die Symptomausprägung auf dritten Maisblättern zum Zeitpunkt 5 und 7 dpi im Lebendpflanzen- und im Blattsegment-Test. nic – Wasserkontrolle (B) Die Bildungsrate der Infektionsstrukturen vom Wildtyp und vom komplementierten Isolat K1 wurden 4 dpi bestimmt (\pm SD). Die einzelnen Raten von K1 unterscheiden sich nicht signifikant vom zugehörigen Wert des Wildtyps ($p > 0,05$). G – Keimschlauch, A – Appressorium, M – melanisiertes Appressorium, P – Penetrationshyphe. (C) Relative Quantifizierung des gebildeten Myzels in infizierten Blättern 4 dpi per qPCR (\pm SD). Es besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

D.3.8.2 Axenisches Wachstum des komplementierten Isolats

Der Wachstumstest zum Vergleich der Wachstumsraten des komplementierten Isolats K1 mit denen des Wildtyps wurde in gleicher Weise wie in Abschnitt D.3.6 durchgeführt. Die Morphologie der Hyphen des komplementierten Isolats K1 und des Wildtyps auf den Nährmedien gleicht einander (Abbildung 30A). Auch die Wachstumsraten auf Medien mit unterschiedlichen C-Quellen und auf komplexen Medien unterscheiden sich über die Gesamtheit des Tests gesehen nur minimal (Abbildung 30B). Somit kann davon

ausgegangen werden, dass die Komplementation die Reduktion der Wachstumsraten bei $\Delta Cgaaf1$ aufgehoben hat und der Phänotyp des Wildtyps wieder hergestellt wurde.

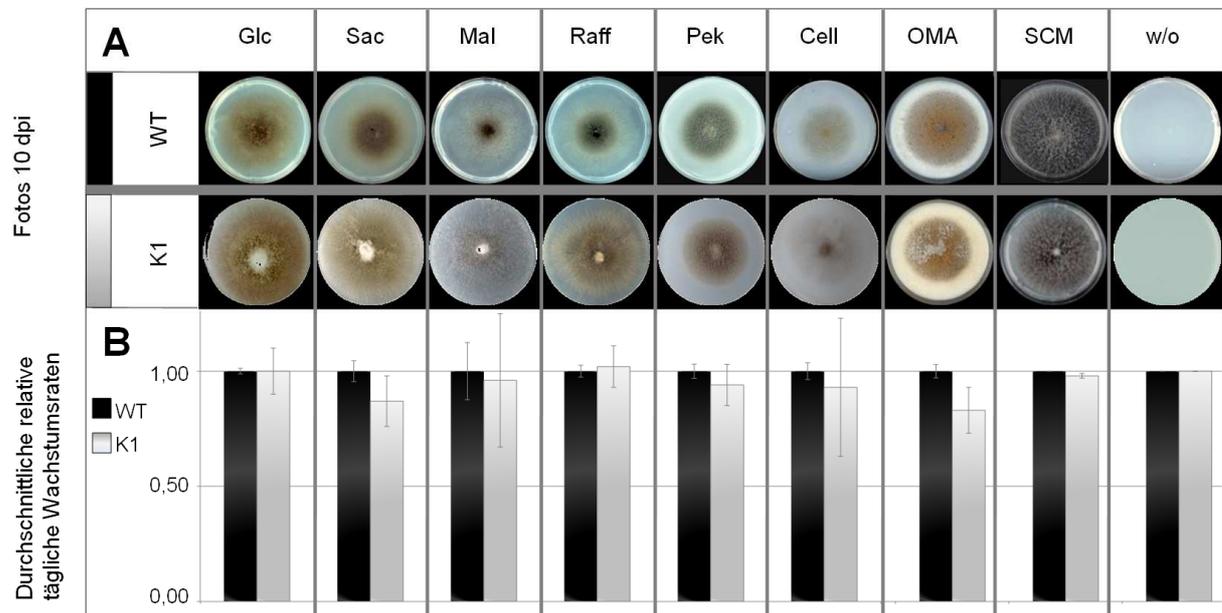


Abbildung 30: Wachstum des komplementierten Isolats K1 auf Minimalmedien mit verschiedenen C-Quellen im Vergleich zum Wildtyp. (A) Kolonien auf verschiedenen Medien nach zehn Tagen Kultivierung. Glc – Glukose, Sac – Saccharose, Mal – Maltose, Raff – Raffinose, Pek – Pektin, Cell – Cellulose, OMA – Haferflockenagar, SCM – Saccharose Komplettmedium, w/o – ohne C-Quelle. **(B)** Die durchschnittlichen täglichen Wachstumsraten zwischen drei und zehn Tagen nach Animpfen sind relativ zu den Wachstumsraten des Wildtyps dargestellt (\pm SD).

Die gesamte Untersuchung der komplementierten Transformante K1 zeigt, dass die Komplementation von $\Delta Cgaaf1-1$ mit *CgAAF1* den Phänotyp des Wildtyps wieder herstellt. Daraus ergibt sich der Schluss, dass in den Deletionsmutanten $\Delta Cgaaf1$ ausschließlich die Deletion von *CgAAF1* zur Reduktion der Virulenz und der Wachstumsraten geführt hat.

E Diskussion

E.1 ATMT als Methode zur Markierung und Identifizierung von Genen filamentöser Pilze

Die ATMT ist eine Zufallsmutagenese-strategie, mit der in Pflanzen und Pilzen erfolgreich Gene markiert und identifiziert werden. Eine Integration der T-DNA in das Genom ruft eine Disruption an der entsprechenden Stelle hervor. Liegt diese Stelle in der codierenden Sequenz eines Gens oder in dessen Promotorenbereich, wird die Aktivität dieses Gens beeinflusst und der Phänotyp der Mutante kann dann auf die Disruption zurückgeführt werden. ATMT wurde schon oft zur Identifizierung von Genen eingesetzt, die in pathogene Interaktionen von Pilzen mit Pflanzen, Insekten, Säugetieren oder mit anderen Pilzen involviert sind (Covert et al., 2001; Fitzgerald et al., 2003; Leclerque et al., 2004; Mullins et al., 2001; Rho et al., 2001; Sugui et al., 2005; Talhinas et al., 2008; Tsuji et al., 2003a; White & Chen, 2006). Die Häufigkeit und der Modus der T-DNA Integration in das pilzliche Genom sind die entscheidenden Kriterien für eine nachfolgende Identifizierung der betroffenen Gene. In Pflanzen ist z. B. bekannt, dass die T-DNA mit mehreren Kopien an einen einzelnen Locus integrieren kann, was die anschließende Lokalisierung enorm erschwert. Übergänge mit mindestens einer RB wurden hierbei mehrheitlich gefunden (De Neve et al., 1997). Darüber hinaus zeigten Ülker et al. (2008), dass sogar chromosomale Abschnitte von *A. tumefaciens* in *Arabidopsis thaliana* als Empfänger während der Transformation übertragen werden können. Solche Ereignisse rufen unmarkierte Mutationen hervor und erhöhen die Zahl an Transformanten, deren markierte genomische Stellen letztendlich nicht für den Phänotyp verantwortlich sind. Kürzlich wurde anhand einer Bibliothek von *M. oryzae* Transformanten erstmals in großem Umfang das Integrationsmuster der T-DNA bei filamentösen Pilzen systematisch analysiert (Choi et al., 2007; Li et al., 2007; Meng et al., 2007). Mehrheitlich integrierte die T-DNA mit einer Kopie in das Genom von *M. oryzae*. Nur ca. 11 % der untersuchten Transformanten zeigten illegitime Integrationen wie tandemartige T-DNA Integrationen mit Kopf-Schwanz-Verknüpfungen, Integrationen einer T-DNA in eine andere, Integrationen des gesamten Ti-Plasmids oder erhebliche Verkürzungen der RB- oder LB-Seite der T-DNA. Chromosomale Translokationen wurden sehr selten beobachtet. Gesamtheitlich erkennen Li et al. (2007) ein wesentlich einfacheres Integrationsmuster bei *M. oryzae* als bei Pflanzen. Die Zufälligkeit der Integrationen in *M. oryzae* musste jedoch eingeschränkt werden. Es wurden häufiger Promotorenbereiche als offene Leserahmen disruptiert, auch single copy-Regionen wurden sehr viel häufiger getroffen als multi copy-Regionen. Gleichsam wurde eine ungleiche

Verteilung der Insertionen zwischen den Chromosomen beobachtet (Meng et al., 2007). Da die genannten Unzulänglichkeiten nur in geringem Maße auftreten, wurde die ATMT für *M. oryzae* als eine geeignete Methode zur zufälligen Mutagenisierung eingeschätzt. Weniger extensive Untersuchungen bei einer Vielzahl anderer phytopathogener Pilze, inklusive mehrerer *Colletotrichum*-Arten, zeigten auch für diese Pathogene eine effektive Anwendbarkeit der ATMT als Mutagenesestrategie (de Groot et al., 1998; Maruthachalam et al., 2008; Mullins et al., 2001; O'Connell et al., 2004; Talhinhos et al., 2008; Tsuji et al., 2003a). Für *C. graminicola* hingegen schätzten Flowers und Vaillancourt (2005) die ATMT als ungeeignet ein, um den Pilz effizient und zufällig zu mutagenisieren.

E.2 Effizienz der ATMT in *C. graminicola*

Flowers und Vaillancourt (2005) untersuchten die ATMT auf ihre Effizienz zum Markieren und Identifizieren von Genen in *C. graminicola*. Dabei verwendeten sie die *A. tumefaciens* Stämme AGL-1 und C58C1 sowie die Ti-Plasmide pBin-GFP-hph und pJF1. Beide Plasmide enthielten das Kanamycin-Resistenzgen zur bakteriellen Selektion und im Bereich der T-DNA das Gen für die Hygromycin Phosphotransferase zur pilzlichen Selektion. Nach der Untersuchung von erzeugten Transformanten kamen sie – entgegen der Einschätzungen für andere filamentöse Pilze und für andere *Colletotrichum*-Arten – zu dem Schluss, dass die ATMT keine geeignete Methode für die zufällige Mutagenisierung von *C. graminicola* darstellt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Bibliothek an *C. graminicola* Transformanten untersucht, die nach einem modifizierten ATMT Protokoll erstellt wurde. Anders als bei Flowers und Vaillancourt (2005) wurde hier der *A. tumefaciens* Stamm LBA1100 verwendet (Beijersbergen et al., 1992). Als Ti-Plasmid wurde in diesen Stamm pPK2 eingebracht, das aber ebenfalls mit dem Kanamycin-Resistenzgen und dem Hygromycin Phosphotransferasegen ausgestattet ist (Covert et al., 2001). Ein weiterer Unterschied zu der Methode von Flowers und Vaillancourt (2005) ist der Zeitpunkt der Zugabe des Induktors Acetosyringon (AS), der die *vir*-Gene aktiviert. In unseren Experimenten kommt AS erst zu Beginn der Co-Kultivierung von Konidien und Bakterien zum Einsatz. Flowers und Vaillancourt (2005) setzten AS schon während der letzten Vorkultivierungspassage von *A. tumefaciens* in flüssigem Medium, also bereits 6 bis 7 Stunden vor Beginn der Co-Kultivierung des Bakteriums mit *C. graminicola*, ein. Die Co-Kultivierungszeit selbst betrug in dieser und in der Arbeit von Flowers und Vaillancourt (2005) stets drei Tage. Die weiteren experimentellen Schritte in der vorliegenden Arbeit erfolgten in gleicher Weise wie bei Flowers und Vaillancourt (2005) beschrieben.

E.2.1 Transformationseffizienz

In unseren Experimenten unter Verwendung von LBA1100 und pPK2 konnten innerhalb von drei Tagen der Co-Kultivierung in einem Ansatz ca. 30 Transformanten pro 10^5 Konidien generiert werden. Flowers und Vaillancourt (2005) erreichten mit der Kombination aus dem Stamm AGL-1 und dem Ti-Plasmid pBin-GFP-hph eine mehr als 10-fach höhere Transformationseffizienz. Trotz der geringeren Ausbeute an Transformanten in der vorliegenden Arbeit sind 30 generierte Transformanten pro Transformationsansatz eine Zahl, die zur Erstellung einer großen Transformanten-Sammlung vollkommen hinreichend ist. Da in einem Experiment viele Transformationsansätze parallel erstellt werden können, ist auch bei Ausbeuten von nur ca. 30 Transformanten pro Ansatz das Limitierende zur Erstellung einer großen Bibliothek nicht die Transformationseffizienz sondern die sich anschließende Bearbeitung der Transformanten, wie deren Isolierung, Vereinzelung, Kultivierung und Charakterisierung. Für *Colletotrichum higginsianum* wurde eine ATMT-Effizienz von 25 Transformanten und für *C. gloeosporioides* von 13 Transformanten pro 10^5 Konidien ermittelt (de Groot et al., 1998; O'Connell et al., 2004). Diese Werte von zwei anderen *Colletotrichum*-Arten sind mit dem hier ermittelten Wert für *C. graminicola* vergleichbar und werden ebenfalls als hinreichend zur Erstellung von Transformationsbibliotheken der genannten Pilze interpretiert.

E.2.2 Integrationsfrequenz und Integrationsmuster

Am stärksten ist die Effizienz der gesamten Methode zur Identifizierung von Genen jedoch von der Häufigkeit sowie vom Modus der T-DNA Integration abhängig. Sie beeinflusst maßgeblich die Möglichkeit zur Identifizierung der Insertionsstelle über die angrenzenden genomischen Flanken. In unseren Experimenten stellten wir einen Anteil von 69,5 % an Transformanten mit einer einzigen T-DNA Integrationsstelle fest. Aufgrund eines komplexeren Integrationsmusters bei Flowers und Vaillancourt (2005) konnten sie nur eine unexakt definierte Rate in einem Bereich zwischen 16 % und 64 % bei Verwendung des Stammes AGL-1 angeben. Damit liefert unsere modifizierte ATMT Methode einen höheren und unter Umständen sogar einen deutlich höheren Anteil an Transformanten mit einer einzigen T-DNA Integrationsstelle verglichen mit Flowers und Vaillancourt (2005). Dieser Anteil liegt in dem Bereich, der auch für *C. acutatum* (65 %), *C. falcatum* (65 %) oder *M. grisea* (60 %) ermittelt wurde (Maruthachalam et al., 2008; Rho et al., 2001). Ungünstig für die Identifizierung der Integrationsstellen sind die bei Flowers und Vaillancourt (2005) auftretenden tandemartigen Integrationsmuster. Bei 30 % aller Transformanten wurde per genomischer Southern Blot Analyse die Integration von mehreren T-DNA Kopien

hintereinander in eine genomische Stelle festgestellt. Die Integration von gesamten Ti-Plasmiden in mehrfacher Anordnung als Tandems erfolgte sogar bei 70 % aller Transformanten, wobei sich die genannten Anteile teilweise überlagern. Durch diese Muster wird die Identifizierung der genomischen Flanken bei fast allen Transformanten enorm erschwert. Maßgeblich aus diesem Grund resümierten Flowers und Vaillancourt (2005), dass die ATMT mit den von ihnen verwendeten Bedingungen als effiziente Methode zur randomisierten Identifizierung von Genen in *C. graminicola* nicht geeignet ist. Die Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit lassen hingegen per genomischer Southern Blot Analyse zunächst für keine der untersuchten Transformanten eine tandemartige T-DNA Integration erkennen. Dennoch liegt in den Mutanten AT395, AT399 und AT425, die wahrscheinlich aus ein und demselben Transformationsereignis hervorgegangen sind (siehe Abschnitt E.3.1.1), ein illegitimes T-DNA Integrationsmuster vor, das erst durch Sequenzdaten erfasst wurde. Trotzdem war es aber möglich, die Integrationsstellen in diesen Transformanten zu ermitteln. Für alle anderen untersuchten Virulenzmutanten wurden mit Hilfe der Sequenzierdaten keine T-DNA Tandems nachgewiesen. Aus diesen Gründen kann geschlossen werden, dass das Auftreten von T-DNA Tandems in der hier angewandten ATMT Methode kein maßgebliches Problem darstellte. Eine tandemartige Integration des gesamten Ti-Plasmids, wie sie bei Flowers und Vaillancourt (2005) beobachtet wurde, tritt laut genomischem Southern Blot bei unserer ATMT Methode mit einer maximalen Rate von nur 3,8 % auf. Dieser Wert ist vernachlässigbar gering und hat auf die Effizienz der Disruptionsstellen-Identifizierung keinen Einfluss.

Ein hoher Anteil an Einzelintegrationsereignissen und ein sehr geringer Anteil mit tandemartigen Integrationen der T-DNA und von gesamten Ti-Plasmiden sind die Argumente, die aus Sicht der Integrationsweisen für die Anwendbarkeit der ATMT bei *C. graminicola* sprechen.

E.2.3 Einfluss des Bakterienstammes und des Ti-Plasmids

Großen Einfluss auf die T-DNA Integrationsfrequenz und den Modus der Integration hat die Auswahl des *A. tumefaciens* Stammes und des Ti-Plasmids. Der Stamm AGL-1 zeigt stets eine höhere Ausbeute an Transformanten als die Stämme C58C1 (Flowers & Vaillancourt, 2005) und LBA1100 (Münch et al., 2011). Bei der Transformation anderer Pilze wie *Fusarium oxysporum* (Mullins et al., 2001), *Helminthosporium turcicum* (Defegu & Hanif 2003) oder *Verticillium dahliae* (Dobinson et al., 2004) wurden unter Verwendung des Stammes AGL-1 wesentlich weniger Transformanten als bei *C. graminicola* erzeugt. Das bedeutet, dass die Virulenz des Bakterienstammes ein Faktor ist, die vom zu mutagenisierenden Pilz abhängt.

Eine hohe Virulenz, also eine hoch effiziente Übertragung von DNA in den Pilz und eine effiziente Integration in sein Genom, bietet den Vorteil, dass schnell eine große Zahl an Transformanten erzeugt werden kann. Gleichzeitig scheint diese Eigenschaft aber auch den Nachteil von vielfachen und illegitimen Integrationen einzuschließen. Es ist vorstellbar, dass bei Flowers und Vaillancourt (2005) die hohe Virulenz von AGL-1 für Integrationen von gesamten Ti-Plasmiden oder mehrfachen T-DNA-Tandems verantwortlich ist. Im Umkehrschluss führt also eine schwächere Virulenz des Bakterienstammes zu einfacheren Integrationsmustern und somit zu einem höheren Anteil an Transformanten mit einer singulären T-DNA Integration. Also scheint gerade die schwächere Virulenz des Stammes LBA1100 gegenüber AGL-1 die Eigenschaft zu sein, die ihn für seine Verwendung zur Mutagenisierung von *C. graminicola* hervorhebt.

Die Verwendung des Ti-Plasmids pBin-GFP-hph generiert – unabhängig vom *A. tumefaciens* Stamm – konstant deutlich mehr Transformanten als beispielsweise pJF1 (Flowers & Vaillancourt, 2005). Obwohl solche Effekte in der Literatur bereits beschrieben wurden, ist bis heute unzureichend geklärt, welche konkreten Eigenschaften des Plasmids dafür verantwortlich sind (Flowers & Vaillancourt, 2005; Mullins et al., 2001). Es gilt also, empirisch für den jeweiligen Pilz eine effiziente Kombination aus Bakterienstamm und Ti-Plasmid zu finden, wobei Ergebnisse zu einem Pilz nicht zwangsläufig auf einen anderen Pilz übertragbar sind (Michielse et al., 2005). Flowers und Vaillancourt (Flowers & Vaillancourt, 2005) hatten mit ihren verwendeten Stämmen (AGL-1 und C58C1) und Plasmiden (pBin-GFP-hph und pJF1) eine ungünstige Wahl getroffen. Hingegen wurde in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, dass *A. tumefaciens* LBA1100 und das Ti-Plasmid pPK2 eine geeignete Kombination zur effizienten Markierung und Identifizierung von Genen in *C. graminicola* darstellen.

E.2.4 Einfluss des Induktors Acetosyringon

Der Zeitpunkt der Zugabe des phenolischen Induktors AS zur Aktivierung des T-DNA Übertragungsprozesses hat ebenfalls Einfluss auf die Transformation (Michielse et al., 2005). Die frühe Zugabe von AS in die Vorkultur von *A. tumefaciens* erhöht die Transformationsausbeute. Eine spätere Zugabe, zu Beginn der Co-Kultivierung von Bakterien und Konidien auf festem Medium, ergibt für viele phytopathogene Pilze weniger Transformanten (Leclerque et al., 2004; Mullins et al., 2001; Rho et al., 2001). Dieser Effekt ergibt sich aus der späteren Induktion der *vir*-Gene und einer später einsetzenden DNA-Übertragung. Möglicherweise wirkt AS darüber hinaus im festen Co-Kultivierungsmedium und in Gegenwart des Pilzes weniger aktivierend als im flüssigen Medium der bakteriellen

Vorkultur. Die zeitliche Verzögerung und die veränderte Aktivität führen z. B. bei der Transformation von *F. oxysporum* mit späterer Zugabe von AS zu einer erhöhten Rate an T-DNA Einzelintegrations-Ereignissen (80 %). Ist AS bereits in der Vorkultur, sinkt die Rate auf 53 % (Mullins et al., 2001). Diese Ergebnisse zeigen sehr klar, dass das längere Einwirken von AS zwar die Transformationsausbeute erhöht, aber gleichzeitig den Anteil an effizient untersuchbaren Transformanten senkt. Daher sollten Transformationsbedingungen so gewählt werden, dass das Ziel der Generierung einer genügenden Anzahl an Transformanten erreicht wird, aber gleichzeitig eine zu starke Mutagenisierung, die mehrere T-DNA Integrationen und illegitime Integrationsmuster erzeugt, noch hinreichend verhindert wird. Die späte Zugabe von AS in unseren Experimenten scheint genau die beschriebenen Auswirkungen zu haben. Mit einer Rate an Einzelintegrationsereignissen von 69,5 %, einer beschriebenen hinreichenden Anzahl an Transformanten und einem geringen Anteil mit illegitimen Integrationsmustern beinhaltet das hier präsentierte Protokoll diese Optimierung.

E.3 Identifizierung von *C. graminicola* Virulenzmutanten durch ATMT

Wie bereits erwähnt, erfolgt bei der ATMT die Integration der T-DNA häufig nicht vollkommen zufällig in das Genom des Rezipienten (siehe Abschnitt E.1). Daher musste zunächst der grundsätzliche Nachweis erfolgen, dass mit dieser Mutagenese-Strategie Virulenzgene von *C. graminicola* markiert werden können. Aus der vorhandenen Sammlung von 2.000 Transformanten wurden 500 ausgewählt und in Virulenztests untersucht. Es wurden 19 Virulenzmutanten mit klaren und reproduzierbaren Virulenzdefekten identifiziert. Davon zeigen 16 Kandidaten sogar einen kompletten Pathogenitätsverlust. Dieses Ergebnis ist konform mit Untersuchungen bei anderen phytopathogenen Pilzen wie z. B. *M. grisea*, *C. acutatum* oder *C. lagenarium* (Jeon et al., 2007; Talhinhas et al., 2008; Tsuji et al., 2003a) bei denen mit der ATMT ebenfalls Virulenzgene markiert werden konnten.

E.3.1 Untersuchung der T-DNA Integrationen in den Virulenzmutanten

E.3.1.1 T-DNA Integrationsmuster

Southern Blot Analysen zeigten für die 19 Virulenzmutanten lediglich neun voneinander verschiedene Disruptionsmuster. Diese Minimierung kommt durch die Integration der T-DNA an dieselbe Stelle bzw. Stellen in mehreren Mutanten zustande. Elf Mutanten haben die T-DNA an ein und dieselbe genomische Stelle integriert, wobei zwei von ihnen zusätzlich noch eine zweite Disruptionsstelle aufweisen. Eine doppelte Analyse mit zwei Southern Blot Hybridisierungen unter Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme beweist dieses Muster. Alle elf Mutanten stammen aus einem Transformationsansatz und wuchsen gemeinsam auf einer Transformationsplatte. Möglicherweise sind die Mutanten Klone einer einzigen erzeugten Transformante, wobei in einen Klon dieser Transformante zusätzlich eine zweite T-DNA Integration erfolgt sein könnte, aus der letztendlich die beiden Klone mit zwei T-DNA Integrationen hervorgegangen sind. Innerhalb der 19 identifizierten Virulenzmutanten gibt es noch eine Gruppe von zwei Mutanten mit einem identischen Integrationsmuster. Die Mutanten AT390 und AT717 tragen gemäß Southern Blot Analyse die gleichen Disruptionsstellen. Diese zwei Mutanten können nicht auf ein Transformationsereignis zurückgeführt werden, da sie nicht aus einem Transformationsansatz stammen. Die Markierung der genomischen Stellen muss in beiden Mutanten unabhängig voneinander erfolgt sein.

Analysen weiterer Transformanten aus der ATMT-Bibliothek von *C. graminicola* untermauern die gewonnenen Erkenntnisse. Kittler (2010) und Sode (2011) untersuchten weitere 500 *C. graminicola* Transformanten auf ihre Virulenz. Hier konnten 14 Transformanten mit reduzierter Virulenz identifiziert werden. Unter ihnen trat ebenfalls ein Integrationsmuster mehrfach auf, so dass insgesamt nur 11 verschiedene Integrationsmuster identifiziert wurden. Die vier gleichen Transformanten stammen jedoch nicht aus einem Transformationsansatz und müssen unabhängig voneinander entstanden sein. In einer dritten Untersuchung ermittelte Baumann (unveröffentlichte Daten) aus weiteren 486 *C. graminicola* Transformanten 13 virulenzreduzierte Transformanten mit 10 unterschiedlichen Integrationsmustern. Die vier Kandidaten mit derselben Integrationsstelle sind hingegen in einem Transformationsansatz erzeugt worden, so dass sie möglicherweise Klone voneinander sein könnten. Die eigenen Analysen und die Untersuchungen von Kittler (2010), Sode (2011) und Baumann (unveröffentlichte Daten) zeigen, dass einerseits unabhängige T-DNA Integrationen an dieselben genomischen Stellen erfolgten. Andererseits besteht die Möglichkeit einer Isolierung von Klonen, die aus einem einzigen Transformationsereignis hervorgegangen sind.

E.3.1.2 Zufälligkeit der T-DNA Integration

Die beschriebene unabhängige Markierung von identischen Stellen im Genom bei unterschiedlichen Transformanten deutet auf bevorzugte Integrationsstellen im Genom hin und liefert ein Argument dafür, dass die T-DNA Integration auch bei *C. graminicola* nicht zufällig erfolgt. Zwei der vier ermittelten Integrationsstellen der T-DNA liegen vor dem codierenden Genbereich und vermutlich im Promotorenbereich eines Gens, eine Integrationsstelle befindet sich in einem offenen Leserahmen (ORF) eines Gens und eine Stelle befindet sich in einer intergenischen Region. Auch für andere Pilze ist bereits gezeigt worden, dass die T-DNA Integration häufiger in Promotorenregionen als in ORFs oder Terminatorenregionen integrieren (Choi et al., 2007). Damit sind die Ergebnisse für T-DNA Integrationen bei *C. graminicola* kohärent mit den Ergebnissen für andere Pilze.

Diese Erkenntnisse zeigen eine Einschränkung der grundlegenden Idee einer Zufallsmutagenese, jede beliebige Stelle im Genom mutagenisieren zu können. Die hier angewandte ATMT Methode mutagenisiert keimende Konidien von *C. graminicola*. Genomische Bereiche, die beispielsweise Gene für den Keimungsprozess und für frühe Entwicklungsstadien beinhalten, sollten während der Transformation aktiv sein, für die T-DNA zugänglich sein und können disruptiert werden. So könnte erklärt werden, dass vorrangig Virulenzmutanten identifiziert wurden, die in der frühen bzw. präpenetrativen pathogenen Entwicklung Defekte aufweisen. Für die Mutagenese von Virulenzgenen der postpenetrativen Phasen wäre daher ein Zeitpunkt während der Pathogenese ideal und nicht während der Keimung von Konidien. Hier würden Virulenzgene transkribiert werden und deren genomische Bereiche sollten besser zugänglich sein als in der Phase der Konidienkeimung. Dünne PMMA- oder PTFE-Membranen, die Oberflächen-Eigenschaften von Maisblättern aufweisen, können mit Konidien inokuliert und von *C. graminicola* penetriert werden. Die Penetrationshyphen durchwachsen die künstliche Membran und gelangen so auf die andere Seite der Membran (Kuster et al., 2008). Dieses System kann genutzt werden, um gezielt Penetrationshyphen mittels ATMT zu mutagenisieren. Kummer (2010) führte dazu erste Tests durch und einige Transformanten konnten bereits generiert werden. Das System bedarf aber noch einiger Modifikationen, da Verunreinigungen Probleme bereiten. Zusätzlich scheint die T-DNA in die Genome einiger Transformanten nicht stabil integriert worden zu sein (Kummer und Münch, unveröffentlichte Daten).

Unabhängig der Einschränkung in der Zufälligkeit der Mutagenisierung von *C. graminicola* durch ATMT zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass mit der angewandten Methode unterschiedliche Virulenzgene markiert und auch identifiziert werden können.

E.3.1.3 Effizienz der Markierung von virulenzrelevanten genomischen Bereichen

Mit Blick auf die Einschätzung der Effizienz der ATMT, Virulenzgene zu identifizieren, ist die Anzahl an voneinander unterschiedlichen Virulenzmutanten die entscheidende Variable. Aus 500 Transformanten wurden in dieser Arbeit neun voneinander verschiedene virulenzdefiziente Mutanten identifiziert, was einem Anteil von 1,8 % entspricht. Ähnliche Anteile von 2,2 % und 2,1 % wurden in den Experimenten von Kittler (2010), Sode (2011) und Baumann (unveröffentlichte Daten) für *C. graminicola* ermittelt. Diese Anteile von ca. 2 % sind für das Ziel der effizienten Identifizierung von Virulenzgenen in *C. graminicola* ausreichend. Mit geringem zeitlichem Aufwand kann eine hinreichend große Anzahl an virulenzreduzierten Kandidaten generiert und selektiert werden.

E.3.1.4 Identifizierung von Virulenzgenen

Mit einer modifizierten PCR-basierten Methode nach Liu und Baird (2001) konnte für die Virulenzmutanten AT039, AT158 und AT171 sowie für die Gruppe der elf Mutanten mit derselben T-DNA Integrationsstelle der disruptierte Locus ermittelt werden. In den verbleibenden Mutanten AT147, AT285, AT390 und AT391 wurden bisher die Integrationsorte noch nicht ermittelt. Für die Identifizierung der Disruptionsstelle ist die Amplifizierung von Fragmenten, die den Übergang von der T-DNA zur genomischen Flanke enthalten, der entscheidende Schritt. Zur Amplifizierung werden ein spezifischer Primer zur T-DNA und ein degenerierter Primer zur unbekanntem genomischen Flanke verwendet. Nach Anpassung der degenerierten Primer an den Restriktionsschnittstellen-Überhang und an den oligo-C Anhang (Liu & Baird, 2001) war eine Amplifizierung von Fragmenten, die sequenziert werden sollen, erfolgreich. Durch die unabhängige Verwendung von drei verschiedenen degenerierten Primern konnten Schwierigkeiten in der Amplifizierung geeigneter Fragmente kompensiert werden. Auch für andere pflanzenpathogene Pilze sind Probleme mit PCR-basierten Lokalisierungsmethoden (TAIL-PCR, Thermal Asymmetric Interlaced PCR) beschrieben. Auch für ATMT-Transformanten von *C. lagenarium*, *M. oryzae* und *Ascochyta rabiei* konnten für einen Teil der Transformanten keine T-DNA Flanken per TAIL-PCR ermittelt werden (Li et al., 2007; Liu et al., 1995; Tsuji et al., 2003a; White & Chen, 2006). Die TAIL-PCR in unterschiedlichen abgewandelten Formen wird bei vielen Pilzen trotzdem angewendet. Choi et al. (2007) konnten mit dieser Methode in ihrer Untersuchung die T-DNA zwar bei 11 % der untersuchten *M. oryzae* Transformanten nicht lokalisieren, trotzdem genügt die Quote von 89 % einer effizienten Untersuchung großer Transformantenbanken. Das führte dazu, dass auch Chen et al. (2011) eine TAIL-PCR Methode bei der Untersuchung ihrer Bibliothek von 70.000 Transformanten von *M. oryzae* verwenden.

Mit Kenntnis der vier identifizierten T-DNA Integrationsstellen und deren angrenzenden genomischen Bereiche konnten drei putative Virulenzgene ermittelt werden. Das erste Gen GLRG_04446.1 codiert für ein V-ATPase Assembly Faktor. Ein weiteres putatives Virulenzgen (GLRG_07310.1) codiert für eine Allantoicase. Die Funktion des dritten identifizierten Virulenzgens ist hingegen unbekannt. Die drei Virulenzmutanten, in denen die genannten Gene durch die T-DNA Integration disruptiert wurden, wurden genauer charakterisiert. Die vierte Virulenzmutante, in der die T-DNA in eine intergenische Region integrierte, wird für weitere Charakterisierungen nicht berücksichtigt, da ein Einfluss der T-DNA Integration auf die sehr weit entfernten flankierenden Gene unwahrscheinlich ist. Somit liefert diese Mutante keine Information über putative Virulenzgene.

Die präsentierten Ergebnisse belegen, dass mit der hier vorgestellten ATMT Methode Virulenzgene in *C. graminicola* identifiziert werden können. Damit bietet die ATMT für *C. graminicola* durch die Identifizierung unbekannter Virulenzgene ein hohes Potenzial zur weiteren Aufklärung der Mechanismen der Pathogenese.

E.4 Charakterisierung von Virulenzmutanten

E.4.1 Die Allantoicase als Virulenzdeterminante in *C. graminicola*

Die Mutante AT171 zeigt in Virulenztests auf der Wirtspflanze eine deutlich reduzierte Penetrationsrate von nur 48,7 %. Im Vergleich dazu penetrieren 92,4 % der Appressorien des Wildtyps das Blattgewebe von Mais. Zytorrhizie-Experimente mit Appressorien der Mutante lassen den Schluss zu, dass ein verringerter Druck in den Appressorien als Grund für die reduzierte Penetrationskompetenz der Mutante ausgeschlossen werden kann. Das Wachstum nach einer erfolgreichen Penetration *in planta* mit Primär- und Sekundärhyphen ist jedoch nicht verändert. In Experimenten, bei denen verwundete Blätter mit Konidien der Mutante inokuliert wurden und somit das Eindringen des Pilzes in das Pflanzengewebe ohne Penetration erfolgen kann, wurde eine mit dem Wildtyp vergleichbare Besiedlung des Blattgewebes beobachtet. Die Keimungsrate der Konidien auf der Blattoberfläche, die Appressorienbildungsrate und die Melanisierungsrate der Appressorien unterscheiden sich nicht von den jeweiligen Bildungsraten des Wildtyps. Zusammengefasst stellen die Ergebnisse der Virulenztests die reduzierte Penetrationsfähigkeit der Mutante AT171 als zentralen Defekt heraus, der zu der geringeren Virulenz führt.

Der beschriebene Virulenzdefekt scheint durch die T-DNA Integration in den Promotorbereich des Genes GLRG_07310.1 hervorgerufen zu werden. Dieses Gen codiert

für das Enzym Allantoicase, das auch in *N. crassa* und *M. grisea* beschrieben wurde (Dean et al., 2005; Lee et al., 1990). Vergleiche der Proteinsequenzen der Allantoicase aus *C. graminicola*, *N. crassa* und *M. oryzae* ergeben eine Homologie von 70 % (Münch et al., 2011). In filamentösen Pilzen können Purine über Allantoat durch die Allantoicase zu (S)-Ureidoglykolat umgesetzt werden. Am Ende dieses Stoffwechselweges entstehen Kohlenstoffdioxid und Ammonium, das als Stickstoffquelle für den Stoffwechsel genutzt werden kann (Abbildung 31; Reinert & Marzluf, 1975). Auch in Hefe wurde der Abbau von Purinen über Allantoat beschrieben (Yoo & Cooper, 1991; Yoo, 1985). In *M. oryzae* erhöht sich die Transkription der Gene des Allantoat Stoffwechselweges unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen deutlich (Donofrio et al., 2006). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Verfügbarkeit von Stickstoff die pilzliche Pathogenität beeinflusst (Talbot et al., 1997). In *M. oryzae* wurden beispielsweise mehrere Gene identifiziert, die einerseits in den Stickstoff-Stoffwechsel involviert sind und andererseits die Virulenz des Reispathogens beeinflussen (Donofrio et al., 2006). *SMP1*, ein Gen für eine vakuoläre Serin Protease in *M. oryzae*, wird beispielsweise für eine normale Sporulation und Appressorienbildung benötigt (Donofrio et al., 2006; Fukiya et al., 2002). Auch die Funktion der beiden regulatorischen Gene *NPR1* und *NPR2* (nitrogen pathogenicity regulation) ist in *M. oryzae* für die Pathogenität entscheidend. Die Deletion nur eines der beiden Gene führte zum Verlust der Fähigkeit auf verschiedenen Stickstoffquellen wachsen zu können und zum Verlust der Pathogenität (Lau & Hamer, 1996).

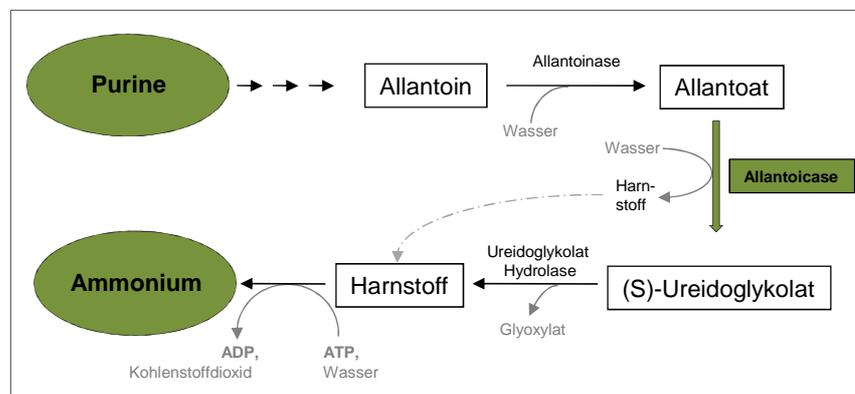


Abbildung 31: Purin Katabolismus. Unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen werden Purine zu Ammonium degradiert. Die Allantoicase baut Allantoat zu (S)-Ureidoglykolat um.

Vor allem während der Präpenetrationsphase ist Stickstoff für den Pilz kaum verfügbar (Solomon et al., 2003). Durch den Abbau von eigenen stickstoffhaltigen Verbindungen kann das Pathogen Stickstoff für neue wichtige Synthesen verfügbar machen. Beispielsweise dienen gespeicherte Proteine dem Gerstenpathogen *Blumeria graminis* zu Beginn der Pathogenese als Stickstoffquelle. Die Proteolyse liefert Aminosäuren und ein weiterer Abbau

niedermolekulare Stickstoffverbindungen (Thomas et al., 2001; Thomas et al., 2002). In ähnlicher Weise könnte *C. graminicola* über den Allantoicase Stoffwechselweg den Stickstoffmangel kompensieren und eine Disruption der Allantoicase würde zu der beobachteten reduzierten Virulenz führen.

Deletionen der Gene des Allantoat Stoffwechselwegs und die Untersuchung der Virulenz der Mutanten könnten die Bedeutung dieses Stoffwechselwegs für die Virulenz von *C. graminicola* belegen. Könnten darüber hinaus Virulenzdefekte der Mutanten durch Zugabe von Stickstoff-haltigen Verbindungen in das Inokulum kompensiert werden, würde die Annahme einer Versorgung des Pilzes mit Stickstoff durch den Allantoat Stoffwechselweg während der Präpenetrationsphase unterstützt werden. Auch wenn Stickstoffmangel in der ersten Phase der Pathogenese auftritt und die Allantoicase als putativer Virulenzfaktor wirkt, kann nicht per se allen Genen des Stickstoff-Stoffwechsels eine Virulenzfunktion zugeschrieben werden. Beispielsweise zeigen Deletionsmutanten von *Cladosporium fulvum*, *M. grisea* und *Stagonospora nodorum*, denen Gene des Nitratstoffwechsels fehlen, keine Virulenzveränderung auf ihren Wirten (Cutler et al., 1998; Lau & Hamer, 1996; Solomon et al., 2003).

Nach der Penetration des Wirtsgewebes und beim Wachstum *in planta* ist der Katabolismus von eigenen Stickstoff-haltigen Verbindungen zum Aufbau neuer benötigter Stickstoff-haltiger Verbindungen nicht länger erforderlich. Der Pilz ist dann auf die Wirtspflanze als Stickstoffquelle angewiesen (Abbildung 32). Im Apoplasten der Tomatenpflanze wurden außer Cystein und Tryptophan alle Aminosäuren nachgewiesen, die dem Tomatenpathogen *C. fulvum* damit als Aminosäure- und Stickstoffquelle zur Verfügung stehen. Im weiteren Verlauf der Infektion steigt der Gehalt der Aminosäuren im Apoplasten weiter an, was eine Umsteuerung des pflanzlichen Stoffwechsels durch den Pilz nahelegt und seine Versorgung mit Stickstoff sichert (Solomon et al., 2003).

Anhand der hier untersuchten Disruptionsmutante, kann das Gen für die Allantoicase als putatives Virulenzgen bezeichnet werden. Zum eindeutigen Beweis, dass die Allantoicase eine Virulenzdeterminante in *C. graminicola* darstellt, muss eine Deletions- oder Komplementationsmutante erzeugt und charakterisiert werden.

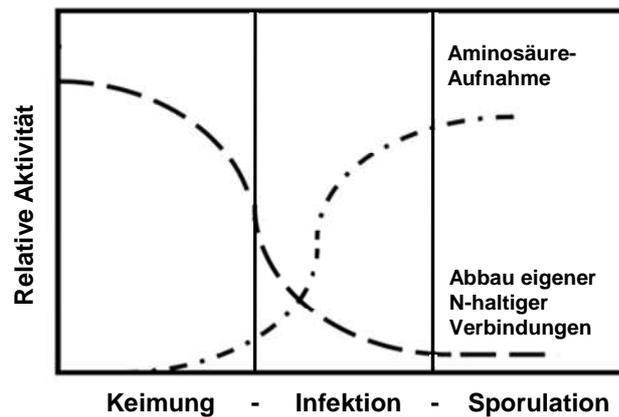


Abbildung 32: Stickstoffversorgung phytopathogener Pilze im Verlauf der Pathogenese (nach Solomon et al. 2003)

E.4.2 Ein hypothetisches Protein als Virulenzdeterminante in *C. graminicola*

Die Mutante AT399 und zehn weitere Mutanten tragen eine Kopie der T-DNA in einem Intron des Gens GLRG_05236.1, das für ein hypothetisches Protein codiert. Die T-DNA-Integration, die 239 Basenpaare nach dem Startcodon erfolgte, führt zu einer starken Virulenzreduktion. Die niedrige Appressorienbildungsrate und die geringe Penetrationskompetenz können als Gründe für die Virulenzreduktion angesehen werden. Zytorrhizie Experimente zeigten, dass der Druck in den Appressorien der Mutante AT399 ungefähr dem in den Appressorien des Wildtyps entspricht. Ein zu geringer appressorialer Druck ist also nicht die Ursache für die häufig ausbleibende Penetration. Die Melanisierungsrate der Appressorien zeigt keinen Unterschied zum Wildtyp und die Keimungsrate der Konidien auf Maisblättern ist, verglichen mit der Rate beim Wildtyp, moderat reduziert.

E.4.3 Ein V-ATPase Assembly Faktor als Virulenzdeterminante in *C. graminicola*

Die ATMT identifizierte einen weiteren Virulenzgenkandidaten in *C. graminicola*. In der Disruptionsmutante AT039 wurde das Gen *CgAAF1*, das für einen V-ATPase Assembly Faktor codiert, als Kandidatengen ermittelt. Die T-DNA Integration erfolgte im vermutlichen Promotorenbereich 450 bp vor der codierenden Gensequenz. Die Mutante AT039 zeigte eine reduzierte Virulenz durch Defekte in der Penetrationskompetenz der Appressorien und durch eine Konfrontation mit einer verstärkten Pflanzenabwehr in Form einer häufigeren Papillenbildung im infizierten Blattgewebe. Zur Bestätigung der Defekte in der Mutante AT039 und zur weiteren Aufklärung der Funktion des Gens *CgAAF1* während der Pathogenese von *C. graminicola* wurde *CgAAF1* gezielt deletiert und $\Delta CgAAF1$ -Mutanten

wurden charakterisiert. Die Kombination einer zunächst zufälligen Mutagenese zur Gewinnung von Kandidatengen und einer anschließenden gezielten Gendeletion ist eine etablierte Vorgehensweise zur Identifizierung und anschließenden Charakterisierung von Genen bzw. Virulenzgenen (Chen et al., 2011; Giaever et al., 2002; Michielse et al., 2005). Für phytopathogene Pilze wurde durch Deletionsmutagenesen eine Vielzahl an Virulenzgenen charakterisiert (Basse & Steinberg, 2004; Horbach et al., 2009; Idnurm & Howlett, 2001; Münch et al., 2008). In den folgenden Abschnitten sollen die veränderten Eigenschaften von $\Delta Cgaaf1$ dargestellt und bezüglich der Funktion von *CgAAF1* für die Virulenz von *C. graminicola* diskutiert werden.

E.4.3.1 Charakterisierung der reduzierten Virulenz in $\Delta Cgaaf1$

In Virulenztests wurde für alle untersuchten $\Delta Cgaaf1$ -Mutanten eine deutlich reduzierte Symptomentwicklung festgestellt. Die Virulenz beträgt nur ca. ein Zehntel der Virulenz des Wildtyps. Dieser Wert wurde anhand der pilzlichen DNA-Menge im infizierten Wirtsgewebe 4 dpi bestimmt, indem per qPCR *Cg/ITS2*-Fragmente quantifiziert wurden. Die Untersuchung des Infektionsprozesses stellte die Penetrationskompetenz der Appressorien als den entscheidenden Schritt heraus, der zu der Virulenzreduktion in $\Delta Cgaaf1$ führt. Die Penetrationsrate ist um fast die Hälfte reduziert. Der appressoriale Turgordruck ist entscheidend für eine erfolgreiche Penetration des Wirtsgewebes. Durch die Einlagerung von osmotisch aktiven Substanzen in das Appressorium und durch den Einstrom von Wasser kann im Appressorium dieser hohe Druck aufgebaut werden (Bechinger et al., 1999; Deising et al., 2000). Durch Zytorrhizie Experimente können Osmolytkonzentrationen in den Appressorien verglichen und Rückschlüsse auf die Turgordrücke gezogen werden (Pryce-Jones et al., 1999). Die Appressorien der $\Delta Cgaaf1$ -Mutanten unterschieden sich in diesem Experiment nicht von den Appressorien des Wildtyps oder der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette. Ein verminderter appressorialer Druck ist folglich als Ursache für die niedrige Penetrationskompetenz der $\Delta Cgaaf1$ -Mutanten auszuschließen.

Weitere mikroskopische Untersuchungen der Appressorien in infiziertem Blattgewebe zeigten unter den Appressorien der Deletionsmutanten eine mehr als dreifach häufigere Papillenbildung im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung verstärkter Papillenbildung unterhalb der Appressorien der Disruptionsmutante AT039. Diese pflanzliche Abwehrreaktion ist eine unspezifische Abwehr pilzlicher Pathogene. Die Papillenbildung in der Maispflanze beispielsweise wird nicht nur durch *C. graminicola* sondern auch durch andere phytopathogene Pilze wie z. B. *Helminthosporium maydis* ausgelöst (Bergstrom & Nicholson, 1999; Cadena-Gomez & Nicholson, 1987). Papillen sind

sehr komplexe Ablagerungen von Callose, phenolischen Verbindungen wie z. B. Lignin, Proteinen und mehreren anorganischen Komponenten an der pflanzlichen Zellwand, durch die Appressorien an der Penetration des Wirtes gehindert werden (Collinge, 2009; Zeyen R.J. et al., 2002). Vor allem die Polymere Lignin und Callose, die von Pilzen schwer abbaubar sind, bilden eine mechanische Barriere. Die molekularen Prozesse, die diese gezielte Pflanzenreaktion auslösen, sind ungeklärt (Collinge, 2009). Daher kann an dieser Stelle über den Grund für die erhöhte Papillenbildung in Maispflanzen, die mit $\Delta Cgaaf1$ inokuliert wurden, nur spekuliert werden. Die Deletion von *CgAAF1* könnte einerseits z. B. zu veränderten PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) führen, die in Mais eine stärkere Abwehr in Form einer verstärkten Papillenbildung elicieren. Andererseits könnte die Deletionsmutante auch weniger effektiv in der Suppression pflanzlicher Abwehrreaktionen sein, wodurch die Wirtspflanze mit einer erhöhten Papillenbildungsrate reagieren kann. Ein Vergleich der erhöhten Papillenbildungsrate mit der reduzierten Penetrationsrate in $\Delta Cgaaf1$ -Mutanten zeigt jedoch, dass die Papillenbildung die Reduktion der Penetrationsrate nicht allein in vollem Umfang verursachen kann. Etwa die Hälfte der Appressorien der Deletionsmutanten ist nicht in der Lage, Maisblätter zu penetrieren. Die erhöhte Papillenbildungsrate kann aber nur maximal 15 % der gebildeten Appressorien an der Penetration hindern. Der verbleibende Anteil der Appressorien von 35 %, der es nicht schafft, die Pflanze zu penetrieren, muss durch andere Ursachen an der Penetration gehindert werden. Die o. g. stärkere Elicitierung oder schwächere Suppression pflanzlicher Abwehr scheint also nicht nur die erhöhte Papillenbildung hervorzurufen. Ebenso könnten darüber hinaus weitere pleiotrope Effekte als Folge der Deletion von *CgAAF1* die Penetration behindern.

Die geringere Penetrationskompetenz bewirkt auch einen zeitlich verzögerten Effekt. Der Wildtyp zeigt bereits zwei Tage nach Inokulation der Maisblätter nahezu seine maximale Penetrationsrate, die Deletionsmutanten zeigen zu diesem Zeitpunkt erst ca. die Hälfte ihrer maximalen Rate. Das bedeutet, dass die Virulenzreduktion auch durch eine später einsetzende Besiedlung des Wirtsgewebes zustande kommt. Aus diesem Grund wurde 4 dpi mit qPCR Analysen eine Reduktion der Ausbreitung und der Pilzmenge von $\Delta Cgaaf1$ im Blatt auf ein Zehntel des Wertes des Wildtyps bestimmt, obwohl die Penetrationsrate 4 dpi nur auf die Hälfte reduziert ist. Innerhalb der folgenden ein bis zwei Tage sollte der Besiedlungsgrad von $\Delta Cgaaf1$ jedoch bis auf die Hälfte des Wertes, der die Ausbreitung des Wildtyps 4 dpi beschreibt, ansteigen. Vorstellbar ist diese Erhöhung aufgrund von zwei Ergebnissen: Erstens zeigte die mikroskopische Analyse 4 dpi eine Etablierung von $\Delta Cgaaf1$ im Blatt mit ersten sekundären Hyphen und erst ab diesem Stadium erfolgt die massenhafte Ausbreitung (Bergstrom & Nicholson, 1999; Münch et al., 2008). Zweitens zeigten Untersuchungen mit verwundeten Maisblättern, die vom kritischen Schritt der Penetration unabhängig sind (Tsuji

et al., 2003b), eine vergleichbare Entwicklung der Deletionsmutanten und des Wildtyps *in planta*. Somit ist auch nach der Penetration unverwundeter Blätter durch Δ Cgaaf1 keine veränderte oder langsamere Entwicklung invasiver Hyphen zu erwarten und 5 dpi bis 6 dpi sollte die Besiedlung des Wirtsgewebes zunehmen. Das Wachstum *in planta* trägt also nicht zur Virulenzreduktion der Deletionsmutanten bei.

Unter Betrachtung aller Ergebnisse zur Charakterisierung der Virulenz von Δ Cgaaf1 kann das Virulenzgen *CgAAF1* als entscheidend für die Penetrationskompetenz von *C. graminicola* beschrieben werden.

Neben den Mutanten Δ Cgaaf1, AT171 und AT399 wurde durch Sode (2011) eine weitere Mutante von *C. graminicola* mit einem Penetrationsdefekt charakterisiert. Aber auch in anderen *Colletotrichum*-Arten wurden Mutanten erzeugt, die Penetrationsdefekte zeigen und dadurch schwache oder keine Symptome ausbilden (Siriputthaiwan et al., 2005; Tsuji et al., 2003b; Veneault-Fourrey et al., 2005). Aus einer ATMT-Bibliothek von 21.070 Transformanten von *M. oryzae* wurden unter 559 Transformanten mit einem Virulenzdefekt 181 Transformanten mit einer verringerten Penetrationskompetenz der gebildeten Appressorien identifiziert (Jeon et al., 2007). Diese Zahlen zeigen, dass ein bedeutender Teil der Virulenzgene phytopathogener Pilze für die Penetrationskompetenz verantwortlich ist.

E.4.3.2 Genetische Komplementation der Deletion von *CgAAF1*

Komplementationen von Gendeletionsmutanten dienen als wichtige Kontrolle. Dabei wird das deletierte Gen in das Genom der Deletionsmutante an die ursprüngliche Stelle wieder eingefügt. Sollte sich durch die Komplementation der Phänotyp des Wildtyps wieder herstellen lassen, kann die Gendeletion als Ursache für die Unterschiede im Phänotyp der Deletionsmutante und des Wildtyps angesehen werden. Die Komplementation von Δ Cgaaf1 mit *CgAAF1* bewirkte eine Wiederherstellung des Phänotyps des Wildtyps. Die Virulenz und das Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen waren im komplementierten Isolat im Vergleich zum Wildtyp nicht mehr reduziert. Mikroskopische Untersuchungen zeigten eine gleiche Penetrationsrate auf dem Wirt, makroskopisch waren keine Unterschiede in der Symptomausprägung zu erkennen und qPCR Analysen bestätigen eine gleiche Besiedlungsstärke des Blattgewebes. Zusätzlich wurden wie im Wildtyp Transkripte von *CgAAF1* in den Hyphen nachgewiesen, die in Δ Cgaaf1 fehlten. Da die beobachteten Veränderungen in Δ Cgaaf1 durch die Insertion von *CgAAF1* komplementiert werden konnten, ist allein die Deletion von *CgAAF1* für den beschriebenen Phänotyp von Δ Cgaaf1 verantwortlich.

E.4.3.3 CgAAF1 komplementiert PKR1 in Hefe und lokalisiert in der ER-Membran

Eine *in silico* Analyse von CgAAF1 zeigte Ähnlichkeiten zu einem ER-Membran Protein aus *M. oryzae* und *N. crassa* sowie zu dem Protein PKR1 aus *S. cerevisiae*, das für einen V-ATPase Assembly Faktor codiert. Bisher wurde lediglich in *S. cerevisiae* das Protein näher charakterisiert und die entsprechende Gendeletionsmutante $\Delta pkr1$ untersucht (Davis-Kaplan et al., 2006). Zur Überprüfung einer funktionalen Übereinstimmung von PKR1 und CgAAF1 wurde *CgAAF1* in $\Delta pkr1$ transformiert. Die erzeugten Isolate stellten vollständig den Phänotyp des Hefereferenzstammes her.

Ein weiteres Argument für die Funktionsgleichheit ist dieselbe Lokalisierung von CgAAF1 in *C. graminicola* wie PKR1 in *S. cerevisiae* ist. PKR1 ist ein integrales Membranprotein mit zwei transmembranalen Domänen und lokalisiert im ER. In der ER-Membran assembliert PKR1 die V_0 -Domäne der V-ATPase (Davis-Kaplan et al., 2006). Eine Analyse von CgAAF1 sagte auch für dieses Protein zwei transmembranale Domänen voraus. Zur Lokalisierung des Proteins in *C. graminicola* wurde ein *CgAAF1:eGFP* Reporterkonstrukt unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors in $\Delta Cgaaf1$ transformiert. Defekte der Deletionsmutante $\Delta Cgaaf1$ wurden durch das Reporterkonstrukt komplementiert und die charakterisierten Transformanten konnten somit für die folgende fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von CgAAF1:eGFP verwendet werden. Das ER wurde in Hyphen von *C. graminicola* mit einem permanenten und hochselektiven Dapoxyl-Farbstoff gefärbt. In ER-gefärbten Hyphen konnte zwischen eGFP- und ER-Signalen genau unterschieden werden. Hyphen der Transformanten mit dem Fusionsprotein zeigten eine Co-Lokalisierung des Fusionsproteins CgAAF1:eGFP mit dem ER. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung der Inkorporierung von CgAAF1 in die ER-Membran. Somit weist nicht nur die erfolgreiche Komplementation von $\Delta pkr1$ durch *CgAAF1* sondern auch die Lokalisierung von CgAAF1 auf die Funktion als Assembly Faktor der V_0 -Domäne der V-ATPase hin. Weitere Assembly Faktoren für die V_0 -Domäne der V-ATPase wurden in Hefe identifiziert, die ebenfalls alle in der ER Membran lokalisiert sind (Hill & Stevens, 1995; Jackson & Stevens, 1997; Malkus et al., 2004). Diese Lokalisierung weiterer V_0 - Assembly Faktoren in der ER-Membran unterstreicht die Kombination aus Lokalisierung und Funktion für CgAAF1.

E.4.3.4 $\Delta Cgaaf1$ zeigt reduziertes Wachstum auf Medien mit definierten C-Quellen

Die Virulenz phytopathogener Pilze ist von der Sekretion ihrer Virulenzfaktoren und hydrolytischen Enzyme abhängig. Da die Funktion der V-ATPase u. a. für den

Sekretionsweg bedeutsam ist (siehe Abschnitte A.5.2 und E.4.3.5) und CgAAF1 als V-ATPase Assembly Faktor wirkt, wurde das saprophytische Wachstum von Δ Cgaaf1 als Maß für die Sekretionsleistung untersucht. Für *C. graminicola* wurden kürzlich Hexosetransporter (CgHXT1, CgHXT2, CgHXT3 und CgHXT5), ein Transporter mit einer Substratspezifität zu Melibiose und Raffinose (CgMBT1) sowie vier Transporter (CgAGT2, CgAGT3, CgAGT4 und CgAGT5), die Ähnlichkeiten zu einem Maltosetransporter aus *S. cerevisiae* besitzen, identifiziert (Lingner et al., 2011a; Lingner et al., 2011b). Zusätzlich wurden Invertasen, Pektinasen und Cellulasen für phytopathogene Pilze beschrieben (Lebeda et al., 2001; Nicholson et al., 1976). Alle genannten Transporter sowie die hydrolytischen Enzyme müssen sekretiert werden, um in die pilzliche Plasmamembran eingelagert oder aus der Pilzzelle transportiert zu werden. Eine vorstellbare Kompromittierung des Sekretionswegs in Δ Cgaaf1 würde einen effizienten Transport der Enzyme und Transporter an ihren Bestimmungsort beeinträchtigen. Daraus würden sich eine schlechtere Degradierungsrate von extrazellulären poly- und oligomeren Zuckern im Medium und eine schlechtere Transportleistung von Zuckern in die Zelle ergeben, was zu geringeren Wachstumsraten führen würde.

Der Einfluss der Deletion von *CgAAF1* auf die Fähigkeit zur Aufnahme und Verwertung unterschiedlicher Zucker als singuläre C-Quelle wurde betrachtet. Im Vergleich zum Wildtyp wuchs Δ Cgaaf1 auf den niedermolekularen Zuckern langsamer. Die relativen Wachstumsraten auf Medien mit Glukose, Saccharose, Maltose und Raffinose betragen im Vergleich zum Wildtyp nur (78 % \pm 8 %), (43 % \pm 5 %), (46 % \pm 14 %) bzw. (72 % \pm 4 %). Auf hochmolekularen Zuckern war die Wachstumsrate auf Pektin stärker reduziert (52 % \pm 8 %) als auf Cellulose (86 % \pm 3 %). Auf den Komplexmedien OMA und SCM wuchs die Deletionsmutante ebenfalls langsamer als der Wildtyp (73 % \pm 5 %) bzw. (70 % \pm 4 %). Aufgrund dieser reduzierten Wachstumsraten auf allen untersuchten C-Quellen und aufgrund der o. g. Funktion von *CgAAF1* kann für Δ Cgaaf1 eine reduzierte Sekretionsleistung vermutet werden.

Für die Disruptionsmutante AT039 zeigte sich eine schwächere oder keine Reduktion der Wachstumsraten. Während in Δ Cgaaf1 *CgAAF1*-Transkripte vollständig fehlen, sind in der Mutante AT039 diese Transkripte vorhanden – wenn auch in geringerer Menge als im Wildtyp. Die Reduktion der Sekretionsleistung scheint dadurch nicht so ausgeprägt wie in Δ Cgaaf1 zu sein und die Mutante AT039 kann besser saprophytisch wachsen als Δ Cgaaf1. Die Virulenz beider Mutanten ist hingegen in gleichem Maß reduziert und die pflanzliche Abwehr durch Papillen gleichermaßen erhöht. Während der Pathogenese reicht das *CgAAF1*-Transkriptniveau in der Mutante AT039 also nicht aus, um durch ein evtl.

geringeres Sekretionsdefizit Virulenzdefekte im Vergleich zu $\Delta Cgaaf1$ abzuschwächen und die pflanzliche Abwehr stärker zu inhibieren.

E.4.3.5 CgAAF1 ist vermutlich für die Sekretion bedeutsam

Da CgAAF1 in *C. graminicola* ein Assembly Faktor der V_0 -Domäne der V-ATPase ist, wird in $\Delta Cgaaf1$ die Effektivität und die Effizienz in der Assemblierung einer funktionalen V_0 -Domäne reduziert sein. Einerseits kann das zu einer Beeinträchtigung von Membranfusionsvorgängen und damit zu einer Behinderung der Sekretion führen (siehe Abschnitt A.5.2). Andererseits kann eine veränderte V_0 -Domäne Einfluss auf die Assemblierung des gesamten V-ATPase Komplexes, auf die Aktivität der V-ATPase als Protonenpumpe und somit auf die posttranslationale Modifizierung von Virulenzfaktoren haben (siehe Abschnitt A.5.2 und Davis-Kaplan et al., 2006; Strasser et al., 2011).

In Hefe führte eine Deletion des entsprechenden V_0 -Domänen Assembly Faktors PKR1 zu einer Beeinträchtigung der Protonenpumpaktivität der V-ATPase. Dadurch wurde eine deutlich schwächere Azidifizierung von Vakuolen beobachtet (Davis-Kaplan et al., 2006). Ähnlich könnten auch für $\Delta Cgaaf1$ Defizite in der Azidifizierung der Vakuole, des Golgi Systems und der sekretorischen Vesikel vorliegen. Erste Versuche zur Abschätzung der Azidifizierung dieser Kompartimente in $\Delta Cgaaf1$ wurden bereits durchgeführt (Münch und Sommerfeld, unveröffentlichte Daten). Mit einer Neutralrotfärbung von Konidien und Hyphen von $\Delta Cgaaf1$ konnte eine Azidifizierung von Vakuolen in $\Delta Cgaaf1$ festgestellt werden. Ein Unterschied zum Wildtyp lag nicht vor. In $\Delta Cgaaf1$ erfolgt also die Zusammensetzung der V_0 -Domäne und damit des gesamten V-ATPase Komplexes aus der V_0 - und V_1 -Domäne in einer Weise, die eine Protonenpumpaktivität gewährt. Die Neutralrotfärbung ist jedoch nicht sensibel genug, um geringe pH-Wert Unterschiede sichtbar zu machen. Daher ist ein leicht erhöhter pH-Wert in $\Delta Cgaaf1$ aufgrund einer etwas geringen Aktivität der Protonenpumpe in $\Delta Cgaaf1$ möglich. Eine daraus resultierende beeinflusste posttranslationale Modifikation von Virulenzfaktoren in den intrazellulären Kompartimenten der Mutante $\Delta Cgaaf1$ kann also als Ursache für die reduzierte Virulenz nicht völlig ausgeschlossen werden. Um Klarheit zu schaffen, könnte in Fortführung des Projekts der pH-Wert in den intrazellulären Kompartimenten mit einem fluoreszierenden pHluorin-Protein genau bestimmt werden. Nach genomischer Integration des zugehörigen Gens und dessen Expression kann durch die pH-Wert abhängige Fluoreszenzintensität des Proteins eine sehr detailliertere Abschätzung des pH-Wertes erfolgen (Bagar et al., 2009).

Strasser et al. (2011) konnten in Hefe zeigen, dass die Funktionalität der V-ATPase als Protonenpumpe nicht zwangsläufig mit ihrer Funktion als Membranfusions-Vermittler

zusammenhängt. Sie stellten Mutanten her, die durch Punktmutationen in den Untereinheiten des Proteolipid-Rings der V_0 -Domäne eine veränderte V_0 -Domäne besitzen. Einige Mutanten zeigten eine verringerte Protonenpumpaktivität verbunden mit einer reduzierten Membranfusionsaktivität. Darüber hinaus entstanden Mutanten mit einer normalen Protonenpumpaktivität der V-ATPase aber mit einer gestörten Membranfusionsaktivität. Das bedeutet prinzipiell, eine veränderte V_0 -Domäne kann auch eine Veränderung in Vorgängen der Membranfusion hervorrufen, ohne dass eine Beeinträchtigung der Azidifizierungsleistung eintritt. Daten über Membranfusionsvorgänge in $\Delta Cgaaf1$ liegen nicht vor. Daher kann über eine evtl. veränderte Membranfusionsaktivität in $\Delta Cgaaf1$ keine Aussage getroffen werden. Aufgrund der Ergebnisse von Strasser et al. (2011) ist es aber vorstellbar, dass eine fehlerhafte oder unzureichende Assemblierung der V_0 -Domäne in $\Delta Cgaaf1$ Membranfusions-Prozesse behindert und dass folglich die Sekretion von Proteinen weniger effektiv erfolgt. Der Phänotyp der Mutante $\Delta Cgaaf1$ wäre dann also eine Folge der reduzierten Sekretionsleistung von Virulenzfaktoren und Enzymen, die für eine erfolgreiche Penetration und damit für eine erste Etablierung des Pilzes im Pflanzengewebe nötig sind. In diese Argumentationslinie würden sich die Beobachtungen von $\Delta Cgaaf1$ einreihen, die eine reduzierte Wachstumsrate auf unterschiedlichen C-Quellen, eine reduzierte Virulenz und eine erhöhte pflanzliche Abwehr durch Papillen umfassen. Einen weiteren Hinweis liefern Transformanten des Wildtyps von *C. graminicola* und von $\Delta Cgaaf1$, in die ein Konstrukt aus *eGFP* verbunden mit einem Sekretionssignal im Genom an einer zufälligen Stelle integriert wurde (Münch, unveröffentlichte Daten). Geplant war, anhand der Sekretion von *eGFP* die Sekretionsleistung des Wildtyps mit der von $\Delta Cgaaf1$ zu vergleichen. Für den Wildtyp konnten Transformanten erzeugt, isoliert und kultiviert werden. Für $\Delta Cgaaf1$ wurden zwar auch Transformanten erzeugt und isoliert, diese wuchsen aber sehr langsam und waren nach wenigen Tagen nicht mehr lebensfähig. Aufgrund ihres vermuteten Sekretionsdefekts wirkt sich möglicherweise für die Transformanten von $\Delta Cgaaf1$ die massenhafte Sekretion von *eGFP* letal aus. Die Transformanten des Wildtyps können hingegen mit einer normalen Sekretionsleistung die Sekretion von *eGFP* durchführen und sind lebensfähig.

F Zusammenfassung

Zur Identifizierung von Virulenzgenen können mit einer vorwärts gerichteten Zufallsmutagenese-Strategie sehr schnell Mutanten mit Virulenz-reduziertem Phänotyp erzeugt werden. Das mutagenisierte Gen, das mit hoher Wahrscheinlichkeit für den Phänotyp verantwortlich ist, wird in einem nachfolgenden Schritt identifiziert. So können Virulenzgene in einem Pathogen sehr effizient ermittelt werden. Für *C. graminicola* wurde die Methode der ATMT (*Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation) erfolgreich verwendet. Mit der ATMT war es möglich, eine große Anzahl an Transformanten zu erzeugen. Southern Blot Analysen ergaben, dass in 69,5 % der Transformanten eine einzige T-DNA Integration im Genom erfolgte und somit nur eine genomische Stelle mutagenisiert wurde. Unter 500 Transformanten wurden 19 Mutanten mit einer reduzierten Virulenz identifiziert. In 14 Virulenzmutanten wurde der T-DNA Integrationsort bestimmt, wodurch die Gene für einen V-ATPase Assembly Faktor, eine Allantoicase und ein hypothetisches Protein als Virulenzgene identifiziert wurden. Die drei zugehörigen Disruptionsmutanten penetrieren die Wirtspflanze mit einer stark reduzierten Rate. Zusätzlich ist in der Mutante mit dem disruptierten hypothetischen Protein die Appressorienbildungsrate stark reduziert. Darüber hinaus wurde für alle drei Mutanten gezeigt, dass der appressoriale Turgordruck und das Wachstum *in planta* im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert ist und nicht zur Virulenzreduktion beiträgt.

Der V-ATPase Assembly Faktor (CgAAF1) wurde genauer charakterisiert. Anhand der CgAAF1-Proteinsequenz wurden zwei transmembranale Domänen vorhergesagt und experimentell konnte das Protein im ER lokalisiert werden. Darüber hinaus wurde eine Hefemutante, der das Gen für den V-ATPase Assembly Faktor PKR1 fehlt, durch *CgAAF1* komplementiert. CgAAF1 scheint also – wie PKR1 in Hefe – als Assembly Faktor der V_0 -Domäne der V-ATPase in die ER-Membran inkorporiert zu sein. Während der verschiedenen Phasen der Pathogenese zeigt *CgAAF1* unveränderte Transkriptabundanzen. Mutanten mit einer gezielten Deletion von *CgAAF1* zeigten einen Besiedlungsgrad des Maisblattes von nur einem Zehntel im Vergleich zum Wildtyp. Diese Verringerung ist auf die reduzierte und zeitlich verzögerte Penetration des Wirtsgewebes durch die Appressorien zurückzuführen. Appressorien der Deletionsmutanten und des Wildtyps wurden mit denselben Bildungsraten gebildet, waren normal melanisiert und zeigten zueinander keine Unterschiede im Turgordruck. Jedoch wurde im Vergleich zum Wildtyp unter den Appressorien der Deletionsmutanten eine erhöhte Papillenbildungsrate durch die Pflanze nachgewiesen, die einen Grund für die verringerte Penetrationskompetenz darstellen könnte. Die Deletion von *CgAAF1* hat neben dem Einfluss auf die Virulenz auch Auswirkungen auf das

saprophytische Wachstum. In axenischen Kulturen wurden reduzierte Wachstumsraten nachgewiesen.

Es wird vorgeschlagen, dass eine effiziente Zusammensetzung der V_0 -Domäne der V-ATPase durch CgAAF1 für die Virulenz von *C. graminicola* entscheidend ist. V-ATPasen azidifizieren intrazelluläre Kompartimente und vermitteln Membranfusionsvorgänge. Die reduzierte Virulenz und das verringerte saprophytische Wachstum bei einer Deletion von *CgAAF1* könnten einerseits aus einer reduzierten Azidifizierungsleistung der V-ATPase resultieren, was zu einer Kompromittierung der posttranslationalen Modifikation von Transportern, Enzymen und Virulenzfaktoren führt. Ein vollständiger Verlust der Protonenpumpaktivität der V-ATPase kann aber ausgeschlossen werden, da Vakuolen einer Deletionsmutante azidifiziert vorliegen. Andererseits könnte der Sekretionsweg durch beeinträchtigte Membranfusionsvorgänge gestört sein und zu einer reduzierten Sekretionsrate von o. g. Proteinen führen, die die Reduktion der Virulenz hervorruft.

G Literatur

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215** (3): 403-410.
- Anderson, D. W. & Nicholson, R. L.** (1996). Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* **88** (6): 996-1002.
- Bagar, T., Altenbach, K., Read, N. D. & Bencina, M.** (2009). Live-Cell imaging and measurement of intracellular pH in filamentous fungi using a genetically encoded ratiometric probe. *Eukaryot Cell* **8** (5): 703-712.
- Bailey, J. A.** (1991). Recognition events associated with specific interactions between plants and pathogenic fungi. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Pathogen Interactions*, 210-224, Smith, C. J. (eds.), Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Pring, R. J. & Nash, C.** (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, 88-120, Bailey, J. A. und Jeger, M. J. (eds.), Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Basse, C. W. & Steinberg, G.** (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol Plant Path* **5** (2): 83-92.
- Bechinger, C., Giebel, K. F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H. B. & Bastmeyer, M.** (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285** (5435): 1896-1899.
- Beijersbergen, A., den Dulk-Ras, A., Schilperoort, R. A. & Hooykaas, P. J.** (1992). Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* **256**: 1324-1327.
- Bergstrom, G. C. & Nicholson, R. L.** (1999). The biology of corn anthracnose. Knowledge to exploit for improved management. *Plant Dis* **83** (7): 596-608.
- Bertani, G.** (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* **186** (3): 595-600.
- Blair, D. E., Hekmat, O., Schuttelkopf, A. W., Shrestha, B., Tokuyasu, K., Withers, S. G. & van Aalten, D. M.** (2006). Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry* **45** (31): 9416-9426.
- Bölker, M., Böhnert, H. U., Braun, K. H., Görl, J. & Kahmann, R.** (1995). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**: 547-552.
- Bowman, B. J., Dschida, W. J., Harris, T. & Bowman, E. J.** (1989). The vacuolar ATPase of *Neurospora crassa* contains an F1-like structure. *J Biol Chem* **264** (26): 15606-15612.
- Bowman, E. J. & Bowman, B. J.** (2000). Cellular role of the V-ATPase in *Neurospora crassa*: analysis of mutants resistant to concanamycin or lacking the catalytic subunit A. *J Exp Biol* **203** (1): 97-106.
- Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. & Hooykaas, P. J.** (1995). Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14** (13): 3206-3214.

- Cadena-Gomez, G. & Nicholson, R. L.** (1987). Papilla Formation and Associated Peroxidase-Activity - a Nonspecific Response to Attempted Fungal Penetration of Maize. *Physiol Mol Plant Path* **31** (1): 51-67.
- Catanzariti, A. M., Dodds, P. N. & Ellis, J. G.** (2007). Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **269** (2): 181-188.
- Chaky, J., Anderson, K., Moss, M. & Vaillancourt, L.** (2001). Surface Hydrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore Germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **91**: 558-564.
- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., Guo, W. J., Kim, J. G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Somerville, S. C., Mudgett, M. B. & Frommer, W. B.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468** (7323): 527-534.
- Chen, X. L., Yang, J. & Peng, Y. L.** (2011). Large-scale insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Methods Mol Biol* **722**: 213-224.
- Choi, J., Park, J., Jeon, J., Chi, M. H., Goh, J., Yoo, S. Y., Park, J., Jung, K., Kim, H., Park, S. Y., Rho, H. S., Kim, S., Kim, B. R., Han, S. S., Kang, S. & Lee, Y. H.** (2007). Genome-wide analysis of T-DNA integration into the chromosomes of *Magnaporthe oryzae*. *Mol Microbiol* **66** (2): 371-382.
- Chumley, F. G. & Valent, B.** (1990). Genetic-Analysis of Melanin-Deficient, Nonpathogenic Mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **3** (3): 135-143.
- Collinge, D. B.** (2009). Cell wall appositions: the first line of defence. *J Exp Bot* **60** (2): 351-352.
- Conesa, A., Punt, P. J., van Luijk, N. & van den Hondel, C. A.** (2001). The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet Biol* **33** (3): 155-171.
- Covert, S. F., Kapoor, P., Lee, M., Briley, A. & Nairn, C. J.** (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol Res* **105**: 259-264.
- Cutler, S. B., Cooley, R. N. & Caten, C. E.** (1998). Cloning of the nitrate reductase gene of *Stagonospora (Septoria) nodorum* and its use as a selectable marker for targeted transformation. *Curr Genet* **34** (2): 128-137.
- Davis-Kaplan, S. R., Compton, M. A., Flannery, A. R., Ward, D. M., Kaplan, J., Stevens, T. H. & Graham, L. A.** (2006). *PKR1* encodes an assembly factor for the yeast V-type ATPase. *J Biol Chem* **281** (42): 32025-32035.
- de Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P. J. & Beijersbergen, A. G.** (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnol* **16** (9): 839-842.
- De Neve, M., De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M. & Depicker, A.** (1997). T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant J* **11** (1): 15-29.
- Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.-R., Pan, H., Read, N. D., Lee, Y.-H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y. Y., Donofrio, N., Jeong, J. S., Soanes, D. M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.-H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.-J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J. E. &**

- Birren, B. W.** (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**: 980-986.
- Defegu, Y. & Hanif, M.** (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leaf-blight fungus. *Arch Microbiol* **180**: 279-284.
- Deising, H., Frittrang, A. K., Kunz, S. & Mendgen, K.** (1995). Regulation of pectin methylesterase and polygalacturonate lyase activity during differentiation of infection structures in *Uromyces viciae-fabae*. *Microbiology* **141**: 561-571.
- Deising, H. B., Werner, S. & Wernitz, M.** (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microb Infect* **2**: 1631-1641.
- DeZwaan, T. M., Carroll, A. M., Valent, B. & Sweigard, J. A.** (1999). *Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* **11** (10): 2013-2030.
- Döbbeling, U., Böni, R., Häffner, A., Dummer, R. & Burg, G.** (1997). Method for simultaneous RNA and DNA isolation from biopsy material, culture cells, plants and bacteria. *Biotechniques* **22** (1): 88-90.
- Dobinson, K. F., Grant, S. J. & Kang, S.** (2004). Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Curr Genet* **45** (2): 104-110.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Ayliffe, M. A. & Ellis, J. G.** (2004). The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* **16** (3): 755-768.
- Doherty, R. D. & Kane, P. M.** (1993). Partial assembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase in mutants lacking one subunit of the enzyme. *J Biol Chem* **268** (22): 16845-16851.
- Donofrio, N. M., Oh, Y., Lundy, R., Pan, H., Brown, D. E., Jeong, J. S., Coughlan, S., Mitchell, T. K. & Dean, R. A.** (2006). Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* **43** (9): 605-617.
- Dudley, A. M., Janse, D. M., Tanay, A., Shamir, R. & Church, G. M.** (2005). A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Molecular Systems Biology* **1**: 1-11.
- Dufresne, M., Perfect, S., Pellier, A. L., Bailey, J. A. & Langin, T.** (2000). A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Plant Cell* **12** (9): 1579-1590.
- El Gueddari, N. E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B. M. & Deising, H. B.** (2002). Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytol* **156**: 103-112.
- Elble, R.** (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13** (1): 18-20.
- Escobar, M. A. & Dandekar, A. M.** (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci* **8** (8): 380-386.
- Fang, E. G. & Dean, R. A.** (2000). Site-directed mutagenesis of the magB gene affects growth and development in *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **13** (11): 1214-1227.

Fitzgerald, A. M., Mudge, A. M., Gleave, A. P. & Plummer, K. M. (2003). *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycol Res* **107** (7): 803-810.

Floß, D. (2004). Entwicklung eines *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformationssystems für das Mais-Pathogen *Colletotrichum graminicola* (CES.) WILS. Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).

Flowers, J. L. & Vaillancourt, L. (2005). Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. *Curr Genet* **48**: 380-388.

Forgac, M. (1989). Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev* **69** (3): 765-796.

Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Rev Mol Cell Biol* **8** (11): 917-929.

Fukiya, S., Kuge, T., Tanishima, T., Sone, T., Kamakura, T., Yamaguchi, I. & Tomita, F. (2002). Identification of a putative vacuolar serine protease gene in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66** (3): 663-666.

Ganem, S., Lu, S. W., Lee, B. N., Chou, D. Y., Hadar, R., Turgeon, B. G. & Horwitz, B. A. (2004). G-protein beta subunit of *Cochliobolus heterostrophus* involved in virulence, asexual and sexual reproductive ability, and morphogenesis. *Eukaryot Cell* **3** (6): 1653-1663.

Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* **67** (1): 16-37.

Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Luca-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C. Y., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y. H., Yen, G., Youngman, E., Yu, K. X., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W. & Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418** (6896): 387-391.

Gilbert, M. J., Thornton, C. R., Wakley, G. E. & Talbot, N. J. (2006). A P-type ATPase required for rice blast disease and induction of host resistance. *Nature* **440** (7083): 535-539.

Gonzalez-Ballester, D., de Montaigu, A., Galvan, A. & Fernandez, E. (2005). Restriction enzyme site-directed amplification PCR: a tool to identify regions flanking a marker DNA. *Anal Biochem* **340** (2): 330-335.

Govrin, E. M. & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* **10** (13): 751-757.

Guldener, U., Seong, K. Y., Boddur, J., Cho, S., Trail, F., Xu, J. R., Adam, G., Mewes, H. W., Muehlbauer, G. J. & Kistler, H. C. (2006). Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genet Biol* **43**: 316-325.

- Hamer, L., Adachi, K., Montenegro-Chamorro, M. V., Tanzer, M. M., Mahanty, S. K., Lo, C., Tarpey, R. W., Skalchunes, A. R., Heiniger, R. W., Frank, S. A., Darveaux, B. A., Lampe, D. J., Slater, T. M., Ramamurthy, L., DeZwaan, T. M., Nelson, G. H., Shuster, J. R., Woessner, J. & Hamer, J. E. (2001). Gene discovery and gene function assignment in filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (9): 5110-5115.
- Heiler, S., Mendgen, K. & Deising, H. (1993). Cellulolytic enzymes of the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae* are regulated differentiation-specifically. *Mycol Res* **97** (1): 77-85.
- Herbert, C., O'Connell, R., Gaulin, E., Salesses, V., Esquerre-Tugaye, M. T. & Dumas, B. (2004). Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genet Biol* **41** (2): 140-147.
- Hill, K. J. & Stevens, T. H. (1995). Vma22p is a novel endoplasmic reticulum-associated protein required for assembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase complex. *J Biol Chem* **270** (38): 22329-22336.
- Hinton, A., Bond, S. & Forgac, M. (2009). V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflugers Arch* **457** (3): 589-598.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. & Mitaku, S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14** (4): 378-379.
- Hooker, A. L. & White, D. G. (1976). Prevalence of corn stalk rot disease in Illinois. *Plant Disease Reporter* **60**: 1032-1034.
- Horbach, R., Graf, A., Weihmann, F., Antelo, L., Mathea, S., Liermann, J. C., Opatz, T., Thines, E., Aguirre, J. & Deising, H. B. (2009). Sfp-Type 4 '-Phosphopantetheinyl Transferase Is Indispensable for Fungal Pathogenicity. *Plant Cell* **21** (10): 3379-3396.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W. & Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *J Plant Physiol* **168** (1): 51-62.
- Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H. & Money, N. P. (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** (24): 11281-11284.
- Idnurm, A. & Howlett, B. J. (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol Plant Path* **2** (4): 241-255.
- Jackson, D. D. & Stevens, T. H. (1997). *VMA12* encodes a yeast endoplasmic reticulum protein required for vacuolar H⁺-ATPase assembly. *J Biol Chem* **272** (41): 25928-25934.
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A. & Maier, F. J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** (46): 16892-16897.
- Jeon, J., Park, S. Y., Chi, M. H., Choi, J., Park, J., Rho, H. S., Kim, S., Goh, J., Yoo, S., Choi, J., Park, J. Y., Yi, M., Yang, S., Kwon, M. J., Han, S. S., Kim, B. R., Khang, C. H., Park, B., Lim, S. E., Jung, K., Kong, S., Karunakaran, M., Oh, H. S., Kim, H., Kim, S., Park, J., Kang, S., Choi, W. B., Kang, S. & Lee, Y. H. (2007). Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nature Genet* **39** (4): 561-565.
- Jia, J. & Wheals, A. (2000). Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Curr Genet* **38** (5): 264-270.

- Kahmann, R. & Basse, C.** (1999). REMI (restriction enzyme mediated integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. *Eur J Plant Pathol* **105**: 221-229.
- Kahmann, R. & Basse, C.** (2001). Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. *Curr Opin Microbiol* **4**: 374-380.
- Kamoun, S.** (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* **44**: 41-60.
- Kamoun, S.** (2009). The Secretome of Plant-Associated Fungi and Oomycetes. In: *The Mycota V - Plant Relationships 2nd Edition*, 173-180, Deising, H. (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg.
- Kane, P. M., Yamashiro, C. T. & Stevens, T. H.** (1989). Biochemical characterization of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem* **264** (32): 19236-19244.
- Kane, P. M., Kuehn, M. C., Howald-Stevenson, I. & Stevens, T. H.** (1992). Assembly and targeting of peripheral and integral membrane subunits of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem* **267** (1): 447-454.
- Kane, P. M. & Stevens, T. H.** (1992). Subunit composition, biosynthesis, and assembly of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **24** (4): 383-393.
- Kane, P. M.** (2007). The long physiological reach of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **39** (5-6): 415-421.
- Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M. & Voegelé, R. T.** (2005). Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Mol Plant Microbe Interact* **18** (11): 1130-1139.
- Khang, C. H., Park, S. Y., Rho, H. S., Lee, Y. H. & Kang, S.** (2006). Filamentous Fungi (*Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*). *Methods Mol Biol* **344**: 403-420.
- Kim, Y. K., Li, D. X. & Kolattukudy, P. E.** (1998). Induction of Ca²⁺-calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. *J Bacteriol* **180** (19): 5144-5150.
- Kittler, J.** (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Colletotrichum graminicola* und Suche nach Mutanten mit reduzierter Virulenz oder Apathogenität. Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. & Winn, W. C.** (1997). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed. . Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, USA.
- Krijger, J. J., Horbach, R., Behr, M., Schweizer, P., Deising, H. B. & Wirsal, S. G.** (2008). The yeast signal sequence trap identifies secreted proteins of the hemibiotrophic corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant Microbe Interact* **21** (10): 1325-1336.
- Kubo, Y., Takano, Y., Tsuji, G., Horino, O. & Furusawa, I.** (2000). Regulation of melanin biosynthesis genes during appressorium formation by *Colletotrichum lagenarium*. In: *Colletotrichum. Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*, 99-113, Prusky, D., Freeman, S. und Dickman, M. B. (eds.), APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Kummer, W.** (2010). Identifizierung von Virulenzgenen im Maispathogen *Colletotrichum graminicola* via Zufallsmutagenese. Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).

- Kuster, S., Ludwig, N., Willers, G., Hoffmann, J., Deising, H. B. & Kiesow, A.** (2008). Thin PTFE-like membranes allow characterizing germination and mechanical penetration competence of pathogenic fungi. *Acta Biomaterialia* **4** (6): 1809-1818.
- Lau, G. & Hamer, J. E.** (1996). Regulatory Genes Controlling *MPG1* Expression and Pathogenicity in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8** (5): 771-781.
- Leach, J., Lang, B. R. & Yoder, O. C.** (1982). Methods for selection of mutants and *in vitro* culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *J Gen Microbiol* **128**: 1719-1729.
- Lebeda, A., Luhova, L., Sedlarova, M. & Jancova, D.** (2001). The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions - Review. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz - Journal of Plant Diseases and Protection* **108** (1): 89-111.
- Leclerque, A., Wan, H., Abschütz, A., Chen, S., Mitina, G. V., Zimmermann, G. & Schairer, H. U.** (2004). *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Curr Genet* **45** (2): 111 - 119.
- Lee, B. N., Kroken, S., Chou, D. Y., Robbertse, B., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G.** (2005). Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. *Eukaryot Cell* **4** (3): 545-555.
- Lee, H., Fu, Y. H. & Marzluf, G. A.** (1990). Nucleotide sequence and DNA recognition elements of *alc*, the structural gene which encodes allantoicase, a purine catabolic enzyme of *Neurospora crassa*. *Biochemistry* **29** (37): 8779-8787.
- Leite, B. & Nicholson, R. L.** (1992). Mycosporine-alanine: A self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Exp Mycol* **16**: 76-86.
- Leng, Y. & Zhong, S.** (2012). Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase is required for lysine synthesis, tolerance to oxidative stress and virulence in the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. *Mol Plant Path* **13** (4): 375-387.
- Li, G., Zhou, Z., Liu, G., Zheng, F. & He, C.** (2007). Characterization of T-DNA insertion patterns in the genome of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Curr Genet* **51** (4): 233-243.
- Lingner, U., Münch, S., Deising, H. B. & Sauer, N.** (2011a). Hexose Transporters of a Hemibiotrophic Plant Pathogen Functional Variations and Regulatory Differences at Different Stages of Infection. *J Biol Chem* **286** (23): 20913-20922.
- Lingner, U., Münch, S., Sode, B., Deising, H. B. & Sauer, N.** (2011b). Functional Characterization of a Eukaryotic Melibiose Transporter. *Plant Physiol* **156** (3): 1565-1576.
- Liu, W. & Saint, D. A.** (2002). Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* **294** (2): 347-353.
- Liu, X. & Baird, V.** (2001). Rapid Amplification of Genomic DNA Ends by *NlaIII* Partial Digestion and Polynucleotide Tailing. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 261-267.
- Liu, Y. G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. & Whittier, R. F.** (1995). Efficient Isolation and Mapping of Arabidopsis-Thaliana T-DNA Insert Junctions by Thermal Asymmetric Interlaced PCR. *Plant J* **8** (3): 457-463.
- Lu, S., Lyngholm, L., Yang, G., Bronson, C., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G.** (1994). Tagged mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12649-12653.

Lumbsch, H. T. & Huhndorf, S. M. (2007). Outline of Ascomycota - 2007. *Myconet* **13**: 1-58.

Lysøe, E., Klemsdal, S. S., Bone, K. R., Frandsen, R. J. N., Johansen, T., Thrane, U. & Giese, H. (2006). The *PKS4* gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. *Appl Environ Microbiol* **72** (6): 3924-3932.

Maier, F. J. & Schäfer, W. (1999). Mutagenesis via insertional - or restriction enzyme-mediated - integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. *Biol Chem* **380**: 855-864.

Malkus, P., Graham, L. A., Stevens, T. H. & Schekman, R. (2004). Role of Vma21p in assembly and transport of the yeast vacuolar ATPase. *Mol Biol Cell* **15** (11): 5075-5091.

Malonek, S. & Meinhardt, F. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morgani*. *Curr Genet* **40** (2): 152-155.

Malonek, S., Rojas, M. C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P. & Tudzynski, B. (2004). The NADPH-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. *J Biol Chem* **279** (24): 25075-25084.

Manolson, M. F., Wu, B. G., Proteau, D., Taillon, B. E., Roberts, B. T., Hoyt, M. A. & Jones, E. W. (1994). *Stv1* Gene Encodes Functional Homolog of 95-Kda Yeast Vacuolar H⁺-Atpase Subunit Vph1p. *J Biol Chem* **269** (19): 14064-14074.

Maruthachalam, K., Nair, V., Rho, H. S., Choi, J., Kim, S. & Lee, Y. H. (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. *J Microbiol Biotechnol* **18** (2): 234-241.

Mendgen, K. & Deising, H. (1993). Infection structures of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. *New Phytol* **124**: 193-213.

Mendgen, K., Hahn, M. (2002). Plant Infection and the Establishment of fungal Biotrophy. *Trends Plant Sci* **7** (8): 352-356.

Meng, Y., Patel, G., Heist, M., Betts, M. F., Tucker, S. L., Galadima, N., Donofrio, N. M., Brown, D., Mitchell, T. K., Li, L., Xu, J. R., Orbach, M., Thon, M., Dean, R. A. & Farman, M. L. (2007). A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* **44** (10): 1050-1064.

Mercure, E. W., Kunoh, H. & Nicholson, R. L. (1994). Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiol Mol Plant Path* **45**: 407-420.

Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., van den Hondel, C. A. & Ram, A. F. (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet* **48** (1): 1-17.

Mullins, E. D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D. M. & Kang, S. (2001). *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. *Phytopathology* **91** (2): 173-180.

Mullins, E. D. & Kang, S. (2001). Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cell Mol Life Sci* **58** (14): 2043-2052.

Münch, S., Lingner, U., Floss, D. S., Ludwig, N., Sauer, N. & Deising, H. B. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *J Plant Physiol* **165** (1): 41-51.

- Münch, S., Ludwig, N., Floss, D. S., Sugui, J. A., Koszucka, A. M., Voll, L. M., Sonnewald, U. & Deising, H. B.** (2011). Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Mol Plant Path* **12** (1): 43-55.
- Nicholson, R. L., Turpin, C. A. & Warren, H. L.** (1976). Role of pectic enzymes in susceptibility of living maize pith to *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathologische Zeitschrift* **87**: 324-336.
- Nicholson, R. L. & Moraes, W. B. C.** (1980). Survival of *Colletotrichum graminicola*: Importance of the spore matrix. *Phytopathology* **70**: 255-261.
- O'Connell, R., Herbert, C., Sreenivasaprasad, S., Khatib, M., Esquerré-Tugayé, M.-T. & Dumas, B.** (2004). A novel *Arabidopsis-Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **17** (3): 272-282.
- Oluwatosin, Y. E. & Kane, P. M.** (1997). Mutations in the *CYS4* gene provide evidence for regulation of the yeast vacuolar H⁺-ATPase by oxidation and reduction *in vivo*. *J Biol Chem* **272** (44): 28149-28157.
- Oluwatosin, Y. E. & Kane, P. M.** (1998). Mutations in the yeast *KEX2* gene cause a Vma(-)-like phenotype: a possible role for the Kex2 endoprotease in vacuolar acidification. *Mol Cell Biol* **18** (3): 1534-1543.
- Panaccione, D. G., McKiernan, M. & Hanau, R. M.** (1988). *Colletotrichum graminicola* transformed with homologous and heterologous benomyl-resistance genes retains expected pathogenicity to corn. *Mol Plant Microbe Interact* **1** (3): 113-120.
- Pascholati, S. F., Deising, H., Leite, B., Anderson, D. & Nicholson, R. L.** (1993). Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiol Mol Plant Path* **42**: 37-51.
- Perfect, S. E., O'Connell, R., Green, E. F., Doering-Saad, C. & Green, J. R.** (1998). Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum*-bean interface. *Plant J* **15** (2): 273-279.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J. & Green, J. R.** (1999). *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genet Biol* **27**: 186-198.
- Peters, C., Bayer, M. J., Buhler, S., Andersen, J. S., Mann, M. & Mayer, A.** (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* **409** (6820): 581-588.
- Pryce-Jones, E., Carver, T. & Gurr, S. J.** (1999). The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. *Physiol Mol Plant Path* **55** (3): 175-182.
- Reinert, W. R. & Marzluf, G. A.** (1975). Regulation of Purine Catabolic Enzymes in *Neurospora crassa*. *Arch Biochem Biophys* **166** (2): 565-574.
- Rho, H. S., Kang, S. & Lee, Y. H.** (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol Cells* **12** (3): 407-411.
- Rivas, S. & Thomas, C. M.** (2005). Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 395-436.

- Rolland, S., Jobic, C., Fèvre, M. & Bruel, C.** (2003). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Curr Genet* **44** (3): 164-171.
- Sanger, F., Nickler, S. & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Schäfer, W.** (1994). Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annu Rev Phytopathol* **32**: 461-477.
- Scott-Craig, J. S., Cheng, Y. Q., Cervone, F., De Lorenzo, G., Pitkin, J. W. & Walton, J. D.** (1998). Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. *Appl Environ Microbiol* **64** (4): 1497-1503.
- Scott, C. C., Bissig, C. & Gruenberg, J.** (2011). Duelling functions of the V-ATPase. *EMBO J* **30** (20): 4113-4115.
- Shen, W. F., Weng, H. B., Niu, B. L., He, L. H., Liu, Y., Qi, X. P. & Meng, Z. Q.** (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the pathogen of *Botrytis cinerea*. *Yi Chuan* **30** (4): 515-520.
- Siriputthaiwan, P., Jauneau, A., Herbert, C., Garcin, D. & Dumas, B.** (2005). Functional analysis of CLPT1, a Rab/GTPase required for protein secretion and pathogenesis in the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Cell Sci* **118** (2): 323-329.
- Sode, B.** (2011). Screening von ATMT-Banken von *Colletotrichum graminicola* auf Virulenz-Mutanten und Identifizierung der T-DNA Integrationsstellen. Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Solomon, P. S., Tan, K. C. & Oliver, R. P.** (2003). The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Mol Plant Path* **4** (3): 203-210.
- Sposato, P., Ahn, J. H. & Walton, J. D.** (1995). Characterization and Disruption of a Gene in the Maize Pathogen *Cochliobolus carbonum* Encoding a Cellulase Lacking a Cellulose-Binding Domain and Hinge Region. *Mol Plant Microbe Interact* **8** (4): 602-609.
- Stephenson, S. A., Hatfield, J., Rusu, A. G., Maclean, D. J. & Manners, J. M.** (2000). *CgDN3*: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. *Mol Plant Microbe Interact* **13** (9): 929-941.
- Stevens, T. H. & Forgac, M.** (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 779-808.
- Strasser, B., Iwaszkiewicz, J., Michielin, O. & Mayer, A.** (2011). The V-ATPase proteolipid cylinder promotes the lipid-mixing stage of SNARE-dependent fusion of yeast vacuoles. *EMBO J* **30** (20): 4126-4141.
- Sugui, J. A. & Deising, H. B.** (2002). Isolation of infection-specific sequence tags expressed during early stages of maize anthracnose disease development. *Mol Plant Path* **3** (4): 197-203.
- Sugui, J. A., Chang, Y. C. & Kwon-Chung, K. J.** (2005). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Appl Environ Microbiol* **71** (4): 1798-1802.

- Sweigard, J. A., Carroll, A. M., Farrall, L., Chumley, F. G. & Valent, B.** (1998). *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **11** (5): 404-412.
- Takano, Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J. E., Mise, K. & Furusawa, I.** (2000). The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **13** (4): 374-383.
- Takano, Y., Komeda, K., Kojima, K. & Okuno, T.** (2001). Proper regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase is required for growth, conidiation, and appressorium function in the anthracnose fungus *Colletotrichum lagenarium*. *Mol Plant Microbe Interact* **14** (10): 1149-1157.
- Talbot, N. J., McCafferty, H. R. K., Ma, M., Moore, K. & Hamer, J. E.** (1997). Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. *Physiol Mol Plant Path* **50** (3): 179-195.
- Talhinhas, P., Muthumeenakshi, S., Neves-Martins, J., Oliveira, H. & Sreenivasaprasad, S.** (2008). *Agrobacterium-mediated* transformation and insertional mutagenesis in *Colletotrichum acutatum* for investigating varied pathogenicity lifestyles. *Mol Biotechnol* **39** (1): 57-67.
- Thines, E., Aguirre, J., Foster, A. J. & Deising, H. B.** (2006). Secondary metabolites as virulence determinants of fungal plant pathogens. In: *Progress in Botany*, 67, 132-159, Esser, K., Lüttge, U. E., Beyschlag, W. und Murata, J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Thomas, S. W., Rasmussen, S. W., Glaring, M. A., Rouster, J. A., Christiansen, S. K. & Oliver, R. P.** (2001). Gene identification in the obligate fungal pathogen *Blumeria graminis* by expressed sequence tag analysis. *Fungal Genet Biol* **33**: 195-211.
- Thomas, S. W., Glaring, M. A., Rasmussen, S. W., Kinane, J. T. & Oliver, R. P.** (2002). Transcript profiling in the barley mildew pathogen *Blumeria graminis* by serial analysis of gene expression (SAGE). *Mol Plant Microbe Interact* **15** (8): 847-856.
- Thon, M. R., Nuckles, E. M. & Vaillancourt, L. J.** (2000). Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant Microbe Interact* **13** (12): 1356-1365.
- Thon, M. R., Nuckles, E. M., Takach, J. E. & Vaillancourt, L. J.** (2002). *CPR1*: a gene encoding a putative signal peptidase that functions in pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* to maize. *Mol Plant Microbe Interact* **15** (2): 120-128.
- Tomashek, J. J., Sonnenburg, J. L., Artimovich, J. M. & Klionsky, D. J.** (1996). Resolution of subunit interactions and cytoplasmic subcomplexes of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J Biol Chem* **271** (17): 10397-10404.
- Tonukari, N. J., Scott-Craig, J. S. & Walton, J. D.** (2000). The *Cochliobolus carbonum* *SNF1* gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* **12** (2): 237-248.
- Tsuji, G., Fujii, S., Fujihara, N., Hirose, C., Tsuge, S., Shiraishi, T. & Kubo, Y.** (2003a). *Agrobacterium tumefaciens-mediated* transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Journal of General Plant Pathology* **69** (4): 230-239.
- Tsuji, G., Fujii, S., Tsuge, S., Shiraishi, T. & Kubo, Y.** (2003b). The *Colletotrichum lagenarium* Ste12-like gene *CST1* is essential for appressorium penetration. *Mol Plant Microbe Interact* **16** (4): 315-325.

- Ülker, B., Li, Y., Rosso, M. G., Logemann, E., Somssich, I. E. & Weisshaar, B.** (2008). T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants. *Nature Biotechnol* **26** (9): 1015-1017.
- Van den Burg, H. A., Westerink, N., Francoijs, K., Roth, R., Woestenenk, E., Boeren, S., De Wit, P. J. G. M., Joosten, M. H. A. J. & Vervoort, J.** (2003). Natural Disulfide Bond-disrupted Mutants of AVR4 of the Tomato Pathogen *Cladosporium fulvum* Are Sensitive to Proteolysis, Circumvent Cf-4-mediated Resistance, but Retain Their Chitin Binding Ability. *J Biol Chem* **278**: 27340-27346.
- Venard, C. & Vaillancourt, L.** (2007). Penetration and colonization of unwounded maize tissues by the maize anthracnose pathogen *Colletotrichum graminicola* and the related nonpathogen *C. sublineolum*. *Mycologia* **99** (3): 368-377.
- Veneault-Fourrey, C., Laugé, R. & Langin, T.** (2005). Nonpathogenic strains of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger progressive bean defense responses during appressorium-mediated penetration. *Appl Environ Microbiol* **71** (8): 4761-4770.
- Vijn, I. & Govers, F.** (2003). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Path* **4** (6): 459-467.
- Voegelé, R. T., Struck, C., Hahn, M. & Mendgen, K.** (2001). The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (14): 8133-8138.
- Warren, L. H., Nicholson, R. L., Ullstrup, A. J. & Sharville, E. G.** (1973). Observations of *Colletotrichum graminicola* on sweet corn in Indiana. *Plant Disease Reporter* **57**: 143-144.
- Weiergang, I., Dunkle, L. D., Wood, K. V. & Nicholson, R. L.** (1996). Morphogenic regulation of pathotoxin synthesis in *Cochliobolus carbonum*. *Fungal Genet Biol* **20**: 74-78.
- Wernitz, M.** (2004). Isolierung des Proteinkinasegens *snf1* aus *Colletotrichum graminicola* und ihre Bedeutung für die Pathogenese. Diplomarbeit, Universität Konstanz, Konstanz.
- White, D. & Chen, W.** (2006). Genetic transformation of *Ascochyta rabiei* using *Agrobacterium*-mediated transformation. *Curr Genet* **49** (4): 272 - 280.
- Wijesundera, R. L. C., Bailey, J. A., Byrde, R. J. W. & Fielding, A. H.** (1989). Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiol Mol Plant Path* **34**: 403-413.
- Xu, J. R. & Hamer, J. E.** (1996). MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev* **10** (21): 2696-2706.
- Yang, Z. H. & Dickman, M. B.** (1999). *Colletotrichum trifolii* mutants disrupted in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase are nonpathogenic. *Mol Plant Microbe Interact* **12** (5): 430-439.
- Yoo, H. S. & Cooper, T. G.** (1991). Sequences of two adjacent genes, one (*DAL2*) encoding allantoicase and another (*DCG1*) sensitive to nitrogen-catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **104** (1): 55-62.
- Yoo, H. S., Genbauffe, F. S. & Cooper, T. G.** (1985). Identification of the ureidoglycolate hydrolase gene in the DAL gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5** (9): 2279-2288.

Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y. & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41** (11): 973-981.

Zeyen R.J., Carver T.L.W. & M.F., L. (2002). Epidermal cell papillae. In: *The powdery mildews: a comprehensive treatise*, 107–125, Belanger R.R. und W.R., B. (eds.), APS Press, St Paul, Minnesota, USA.

Zhao, X., Mehrabi, R. & Xu, J. R. (2007). Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryot Cell* **6** (10): 1701-1714.

H Anhang

ATMT-Protokoll für *C. graminicola*

Der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA1100, der pPK2 als Ti-Plasmid enthält, wurde in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 7 ml flüssigem LB-Medium, 50 µg/ml Kanamycin und 50 µg/ml Spectinomycin für 15 h bei 28°C und 100 rpm in einem Unitron Schüttelinkubator (Infors, Bottminden, Schweiz) kultiviert. Nach einer Bestimmung der OD₆₆₀ wurden die Zellen mit Induktionsmedium (Bundock et al., 1995) auf eine OD₆₆₀ von 0,15 verdünnt. Das maximale Volumen der neuen Kultur überschreitet nicht 20 ml. Nach einer Kultivierung von 4 bis 5 h unter denselben Bedingungen, die für die Vorkultur verwendet wurden, sollte die OD₆₆₀ zwischen 0,6 und 0,8 liegen. Nach Erreichen dieser OD₆₆₀ können die Bakterien zwischenzeitlich auf Eis gelagert werden. Konidien von *C. graminicola* (Wildtypisolat CgM2) wurden von 14 Tage altem OMA-Medium mit H₂O_{bidest} geschwemmt und die mit Induktionsmedium (s. o.) eine Suspension mit einer Konzentration von 10⁵ Konidien/ml hergestellt (siehe Abschnitt C.5.1.1).

Ein einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 100 µl der Bakteriensuspension mit 100 µl der Konidien suspension vorsichtig gemischt. Anschließend wurde das Gemisch komplett auf einem Cellulosefilter (595 Rundfilter, Durchmesser 90 mm; Schleicher & Schuell GmbH, Dassel), der zuvor autoklaviert wurde und auf festem Induktionsmedium (Bundock et al., 1995) mit 200 µM AS positioniert wurde, ausplattiert. Anschließend erfolgte eine Kultivierung für drei Tage bei 23°C im Dunkeln (Kultivierungsschrank KBW720; Binder, Tuttlingen).

Anschließend wurde der Cellulosefilter auf festes PDA-Medium mit 100 µg/ml Hygromycin B und 200 µg/ml Cefotaxim übertragen und für ca. 14 Tage bei 23°C im Dunkeln inkubiert. Transformanten von *C. graminicola* können durch Hygromycin B selektiert werden. Cefotaxim dient dem Abtöten der Bakterien. Nach 14 Tagen wurde der Filter verworfen und in dem festen Medium wachsende Transformanten wurden isoliert, einzeln auf festes PDA-Medium mit 100 mg/ml Hygromycin B übertragen und bei 23°C im Dunkeln kultiviert. Zur Sporengewinnung wurden von diesen Kulturen OMA-Platten beimpft, kultiviert und anschließend eine Einzelsporisolation vorgenommen (siehe Abschnitt C.6.8.3). Die weitere Kultivierung der einzelsporisierten Transformanten erfolgte stets auf PDA mit 100 µg/ml Hygromycin B. Dauerkulturen wurden erstellt und bei -80°C gelagert (siehe Abschnitt C.1.1).

Abbildungsnachweis

Abbildung 1: Infektion von *Zea mays* durch *Colletotrichum graminicola*.
(Bergstrom & Nicholson, 1999)

Abbildung 2: Modell der Zusammensetzung der V-ATPase.
(Stevens & Forgac, 1997)

Abbildung 33: Stickstoffversorgung phytopathogener Pilze im Verlauf der Pathogenese
(Solomon et al., 2003)

Erklärung

Ich erkläre, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrads bewerbe und die Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Außerdem bestätige ich, dass ich im Text alle aus anderen Arbeiten und Veröffentlichungen verwendeten Wortlaute, Erkenntnisse und Ergebnisse mit der entsprechenden Quelle markiert habe.

Halle (Saale),

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Deising recht herzlich bedanken. Durch sein Engagement für das Projekt sowohl bei der täglichen Arbeit als auch innerhalb der Forschergruppe FOR666, in die das Projekt implementiert war, konnte ich wachsen und viel lernen. Dafür danke ich sehr.

Bei den Gutachtern bedanke ich mich für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Für den regen Gedankenaustausch und für lebhaftes fachliche Diskussionen danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für Phytopathologie und Pflanzenschutz. Durch die konstruktive Kritik konnte ich meine Arbeit verbessern. Weiterhin möchte ich den technischen Assistentinnen und Assistenten für ihre Unterstützung danken. Andreas Leonhardt danke ich für seine zuverlässige Arbeit mit einem sehr breiten Methodenspektrum. Elke Vollmer möchte ich ganz herzlich für den ausgesprochen professionellen und vorrausschauenden Service im Gewächshaus danken. Andrea Beutel und Doris Jany danke ich für die Unterstützung im ersten Teil meiner Doktorarbeit.

Meiner Familie möchte ich von ganzem Herzen danken. Die wissenschaftliche Arbeit und das Schreiben der Dissertation haben sehr viel Zeit in Anspruch genommen, wodurch sich das Familienleben häufig auf ein Minimum reduzierte. Für ihre Geduld in dieser Situation bin ich meiner Frau außerordentlich dankbar. Ohne ihre Kraft hätte ich den nötigen Freiraum nicht zur Verfügung gehabt. Meinen Kindern danke ich für ihre ansteckende Lebensfreude.

Zusätzlich geht ein Dank an die Deutsche Forschungsgemeinschaft, durch die dieses und andere Projekte im Rahmen der Forschergruppe FOR666 gefördert wurden.

Lebenslauf

Steffen Münch
Malachitweg 12a
06120 Halle (Saale)

geb. am 08.02.1978 in Erfurt
verheiratet, 2 Kinder

Abschlüsse

- 2003 Diplom-Biologe
Examenspreis 2004 für das beste Examen der Biol.-Pharmaz. Fakultät
Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 1996 Abitur
Spezialschulteil für Mathematik und Naturwissenschaften am Albert-
Schweitzer-Gymnasium Erfurt

Ausbildung

- 2003 Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 2001-2002 Studium der Biologie, Université Montpellier II, Frankreich und
Praktikum am C.N.R.S., Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier
- 1999-2003 Stipendiat der Studienstiftung der Deutschen Wirtschaft
- 1997-2001 Studium der Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 1996-1997 Studium der Medizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- bis 1996 Schulausbildung, Spezialschulteil des Albert-Schweitzer-Gymnasiums Erfurt

Beruf

- 2006-2012 Doktorarbeit, Professur für Phytopathologie und Pflanzenschutz, Universität
Halle-Wittenberg
- 2004-2006 Wissenschaftliche Arbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Mikrobengenetik,
Universität Jena

Halle (Saale),

Eigene Publikationen

Münch, S., Lingner, U., Floss, D. S., Ludwig, N., Sauer, N. und Deising, H. B. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology* **165** (1): 41-51.

Münch, S., Ludwig, N., Floss, D. S., Sugui, J. A., Koszucka, A. M., Voll, L. M., Sonnewald, U. und Deising, H. B. (2011). Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Molecular Plant Pathology* **12** (1): 43-55.

Lingner, U., Münch, S., Deising, H. B. und Sauer, N. (2011a). Hexose Transporters of a Hemibiotrophic Plant Pathogen Functional Variations and Regulatory Differences at Different Stages of Infection. *Journal of Biological Chemistry* **286** (23): 20913-20922.

Lingner, U., Münch, S., Sode, B., Deising, H. B. und Sauer, N. (2011b). Functional Characterization of a Eukaryotic Melibiose Transporter. *Plant Physiology* **156** (3): 1565-1576.

Voll, L. M., Horst, R. J., Voitsik, A.-M., Zajic, D., Samans, B., Pons-Kühnemann, J., Doehlemann, G., Münch, S., Wahl, R., Molitor, A., Hofmann, J., Schmiedl, A., Waller, F., Deising, H., Kahmann, R., Kämper, J., Kogel, K.-H. und Sonnewald, U. (2011). Common motifs in the response of cereal primary metabolism to fungal pathogens are not based on similar transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science* **2** (39): 1-17.

Buchbeitrag:

Deising, H. B., Horbach, R., Ludwig, N., Münch, S., Schweizer, P. (2009). Mechanisms of fungal infection. In: *Crop plant resistance to biotic and abiotic factors*. S. 290-301. Feldmann, F., Alford, D. V., Furk, C. (Eds.), DPG, Braunschweig.

