

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften

(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Reinhold Jahn)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

(Dekan: Prof. Dr. Peter Wycisk)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Fachgebiet: Phytopathologie und Pflanzenschutz

Penetrationskompetenz pflanzenpathogener Pilze

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor agriculturarum (Dr. agr.)

von

Diplomagraringeneurin Nancy Ludwig

Halle/Saale 2012

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Reinhold Jahn)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Prof. Dr. Peter Wycisk)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Penetrationskompetenz pflanzenpathogener Pilze

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Diplomagraringenieurin Nancy Ludwig

geb. am 06.02.1980 in Halle/Saale

Gutachter:

Prof. Dr. H. B. Deising

Prof. Dr. K. Pillen

Prof. Dr. E. Kothe

Verteidigung am: 02.07.2012

Halle/Saale 2012

für Holger und Annika

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. B. Deising für die Bereitstellung des interessanten Themas und der sehr guten Betreuung während der Durchführung des Projektes. Weiterhin möchte ich mich für das stets positive Arbeitsumfeld und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an meine Kooperationspartner vom Fraunhofer-Institut für Werkstoffmechanik Halle/Saale, allen voran Dr. Andreas Kiesow, Stefan Küster und Jens Hoffmann, für die gute Zusammenarbeit und die vielen Hilfestellungen. Ein weiterer Dank geht an Herrn Andreas Cismak für die Unterstützung bei der Durchführung der Elektronenmikroskopie.

Herrn Dr. Ulrich Schaffrath (RWTH Aachen) danke ich für die Bereitstellung von Pilzisolaten und Sporen.

Für die stets sehr gute Zusammenarbeit und die Hilfe im Labor- und Gewächshausalltag geht mein Dank an Andrea Beutel, Elke Vollmer und Doris Jany.

Liebe Eva, an dich ein besonderer Dank für deine Freundschaft und Unterstützung. Du hattest immer ein offenes Ohr und genau die richtigen Antworten.

Allen weiteren Mitarbeitern, seien es Post-Docs, Doktoranden, Diplomanden und HiWis, mit denen ich während meiner Zeit in der AG Phytopathologie und Pflanzenschutz zusammenarbeiten durfte, möchte ich an dieser Stelle für das freundliche und anregende Arbeitsumfeld danken.

Ohne die Unterstützung meiner Familie wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit zu beenden. Daher möchte ich mich auf diesem Weg für ihren Glauben an mich, ihre Geduld und den stetigen Rückhalt bedanken.

Inhalt

1	Einleitung	8
1.1	Pflanzenpathogene Pilze	8
1.1.1	Obligat biotrophe Pilze	9
1.1.2	Hemibiotrophe Pilze	10
1.2	Bedeutung und Charakterisierung von Pathogenitätsgenen	23
1.2.1	Definition und Charakterisierung	23
1.2.2	Identifizierung von Pathogenitätsgenen	24
1.3	Artifizielle Membranen	25
1.3.1	Einsatzmöglichkeiten	25
1.3.2	Herstellung	26
1.4	Ziel der Arbeit	28
2	Material und Methoden	30
2.1	Biologische Materialien	30
2.1.1	Pilze	30
2.1.2	Pflanzen	31
2.2	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelte Transformation (ATMT)	32
2.2.2	Präparation genomischer DNA	35
2.2.3	<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	36
2.2.4	Gelelektrophorese und Färbung der DNA	38
2.3	Wachstums- und Infektionstests	38
2.3.1	Wachstums der ATMT-Einzelsporisolate auf PDA	38
2.3.2	Blattsegmenttest	39
2.3.3	Zwiebelepidermen	40
2.3.4	Artifizielle Materialien	40
2.4	Cytorrhizie	45
2.4.1	Bestimmung der Zellkollapsraten von <i>Colletotrichum graminicola</i> WT-Isolat und $\Delta Cgpk1$	45
2.4.2	Bestimmung der Zellkollapsrate von <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	46
2.5	Mikroskopie	46
2.5.1	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	46

Inhalt

2.5.2	Inverse Mikroskopie	47
2.5.3	Elektronenmikroskopie.....	48
2.6	Dokumentation.....	48
2.6.1	Makroskopische Dokumentation.....	48
2.6.2	Mikroskopische Dokumentation	48
2.7	Statistische Auswertung.....	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	ATMT von <i>Colletotrichum graminicola</i>	50
3.1.1	Sensitivität gegenüber Hygromycin B.....	50
3.1.2	Transformationseffizienz.....	50
3.2	Charakterisierung der ATMT-Einzelsporisolate.....	51
3.2.1	Wachstum auf PDA	51
3.2.2	Blattsegmenttest	52
3.2.3	Nachweis der T-DNA mittels spezifischer Primer	55
3.2.4	Charakterisierung der Entwicklung ausgewählter ESI.....	56
3.3	Entwicklung eines Inokulationssystems für artifizielle Dünnschichten.....	65
3.3.1	Metalldünnschichten.....	65
3.3.2	Polymerschichten	68
3.4	Bestimmung des osmotischen Druckes in Appressorien mittels Cytorrhizie.....	79
3.4.1	<i>Colletotrichum graminicola</i> (WT-Isolat und $\Delta Cgpk5$).....	79
3.4.2	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	79
4	Diskussion	82
4.1	Erstellung einer <i>Colletotrichum graminicola</i> Transformantenbank für die Suche nach Pathogenitäts- bzw. Virulenz-defizienten Mutanten.....	82
4.1.1	Hygromycinphosphotransferase-Gen als Selektionsmarker.....	82
4.1.2	Möglichkeiten der Transformation filamentöser Pilze.....	83
4.1.3	Integration der T-DNA	84
4.1.4	T-DNA Insertion in das Genom von Hefen und filamentösen Pilzen.....	85
4.1.5	Einfluss verschiedener Faktoren auf den Transformationserfolg durch ATMT	86
4.2	Mutantenscreening.....	90

Inhalt

4.3	Artifizielle Membranen und ihre Eignung für ein Screening auf Penetrationskompetenz	95
4.4	Die Rolle von Melanin und des Turgordruckes für die Penetrationskompetenz bei <i>Colletotrichum graminicola</i>	99
5	Zusammenfassung/Summary	103
5.1	Zusammenfassung	103
5.2	Summary	104
6	Literaturverzeichnis	106
7	Anhang	123
7.1	Tabellenverzeichnis	123
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	123
7.3	Tabellen und Abbildungen im Anhang.....	125
7.4	Verwendete Chemikalien, Lösungen und Medien.....	128
7.4.1	Chemikalien.....	128
7.4.2	Lösungen	128
7.4.3	Medien	129
7.5	Anmerkungen zur Schreibweise	132
7.6	Abkürzungsverzeichnis.....	133

1 Einleitung

1.1 Pflanzenpathogene Pilze

Bedingt durch Krankheitserreger, Schädlinge und Unkräuter gehen ca. ein Drittel der Welt-ernte verloren, die Ausgaben für Pestizide belaufen sich auf jährlich ca. 32 Mrd. \$US (Stand 1998; <http://www.bspp.org.uk/icpp98/4/1GF.html>). Der Anteil der Verluste, der durch Pflanzenkrankheiten verursacht wird, liegt bei ungefähr 10 % (<http://www.bspp.org.uk/icpp98/4/1GF.html>). Am Beispiel der USA sind allein pflanzenpathogene Pilze jährlich für Verluste in Höhe von 200 Mrd. \$US verantwortlich, die Ausgaben für Fungizide belaufen sich im Agrarbereich auf ca. 600 Millionen \$US (BIRREN ET AL., 2003). Neben den Auswirkungen auf die Versorgung der Weltbevölkerung mit Nahrung stellen einige Substanzen (z. B. Mykotoxine), die von Pilzen gebildet und mit der Nahrung aufgenommen werden, eine Gefahr für die menschliche und tierische Gesundheit dar (MULLINS & KANG, 2001).

Das Verständnis pilzlicher Infektionsstrategien und des Sekundärmetabolismus auf der molekularen Ebene könnte dazu beitragen, neue Strategien zu entwickeln, um durch Pilze verursachte Krankheiten an Kulturpflanzen zu kontrollieren (HORBACH ET AL., 2011).

Nach MENDGEN & HAHN (2002) kann bei Pilzen nach der Invasion des Wirtes generell zwischen nekrotrophen, biotrophen und hemibiotrophen Ernährungsstrategien unterschieden werden. Während nekrotrophe Pilze, wie z. B. *Cochliobolus carbonum* und *Botrytis cinerea*, das Wirtsgewebe schnell abtöten und im Anschluss saprophytisch leben (MENDGEN & HAHN, 2002; VAN KAN, 2006), charakterisieren sich biotrophe Pilze durch die Infektion der Wirtspflanze ohne für einen gewissen Zeitraum deren Tod zu verursachen (PERFECT & GREEN, 2001). Bei biotrophen Pilzen kann weiterhin zwischen vier Spezialfällen unterschieden werden. Neben mutualistischen Formen (vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza) gibt es die obligat biotrophen Pathogene, bei denen eine *in vitro* Kultivierung nicht oder nur begrenzt möglich ist, die also auf einen lebenden Organismus angewiesen sind (z. B. Echte und Falsche Mehltaupilze, Rostpilze). Fakultativ biotrophe Pilze können saprophytisch wachsen, benötigen aber für die Vollendung ihres Lebenszyklus ihre Wirtspflanze (z. B. *Ustilago maydis*). Bei hemibiotrophen Pilzen kommt es nach einer anfänglichen biotrophen Phase zur nekrotrophen Vollendung des Wirtsbefalles (Einteilung nach PERFECT & GREEN, 2001). Im Folgenden wird auf die obligat biotrophe und die hemibiotrophe Lebensweise genauer eingegangen.

1.1.1 Obligat biotrophe Pilze

Während dieser Arbeit wurde der Erreger des Sojabohnenrostes (*Phakopsora pachyrhizi*), ein obligat biotropher Rostpilz, für Infektionsversuche verwendet. Seinen Ursprung in Asien nehmend hat sich der Sojabohnenrost mittlerweile in allen großen Soja-produzierenden Staaten etabliert (VAN DEN MOERTEL, ET AL., 2007). Der Lebenszyklus wird durch TREMBLAY ET AL. (2010) wie folgt beschrieben (siehe auch Abbildung 1 A): Luftverbreitete Uredosporen keimen mit einem Keimschlauch (GT) auf der Oberfläche ihrer Wirtspflanze aus. Trifft der Keimschlauch auf eine geeignete Oberfläche wird ein Appressorium (AP) gebildet. Im Gegensatz zu anderen Rostpilzen erfolgt die Penetration der Wirtsoberfläche direkt und nur selten über Stomata. Etwa 20 Stunden (h) nach der Sporenlandung wächst eine Penetrationshyph (PH) ausgehend vom Appressorium durch die Kutikula und erscheint im Interzellularraum (HAHN, 2000).

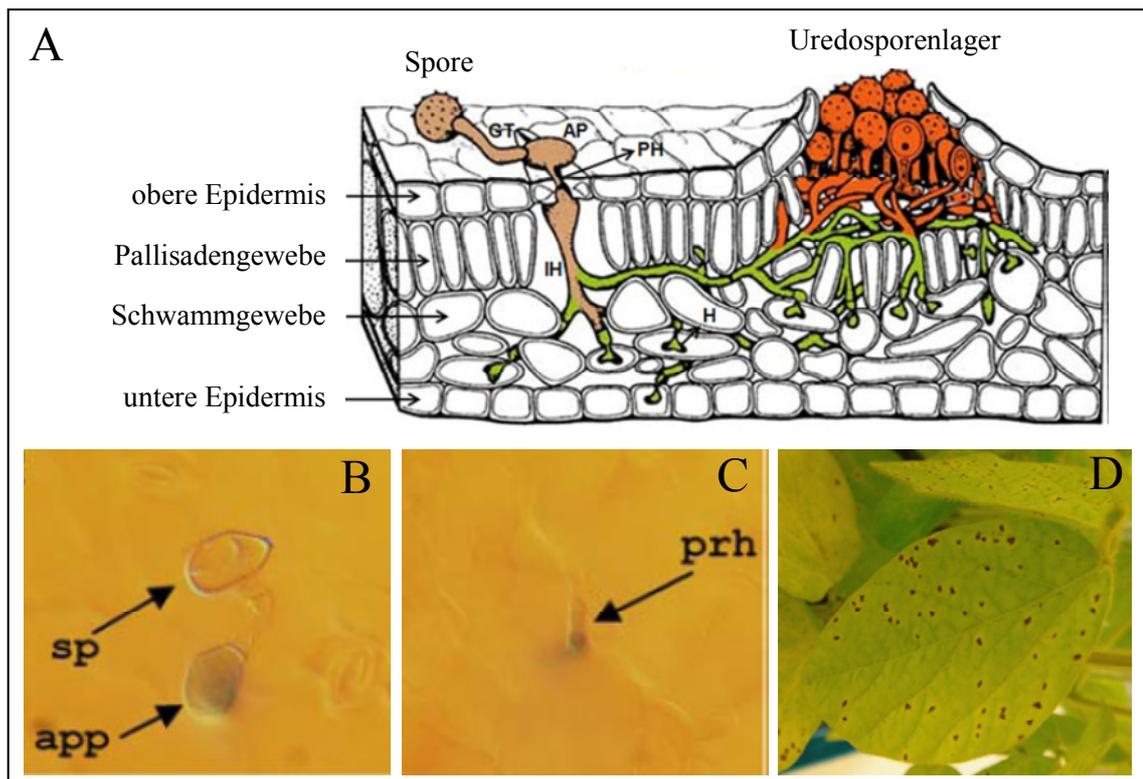


Abbildung 1: Pathogenese von *Phakopsora pachyrhizi*

A: Schematische Darstellung der Infektionsstrukturen eines Rostpilzes in einem dikotylen Blatt; verändert nach TREMBLAY ET AL., 2010.

B + C: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Infektionsstrukturen (app = Appressorium; prh = Primärhyph; sp = (Uredo-)Spore), Quelle: LOEHRER ET AL., 2009; D: Symptomentwicklung von *P. pachyrhizi* auf Sojabohne 21 dpi; Quelle: TREMBLAY ET AL., 2010.

Durch Bildung eines Septum wird die Penetrationshyph von der primären Infektionshyph (IH) getrennt. Diese wächst nun zwischen den Pallisadenzellen, bis sie das Mesophyll erreicht und ein Haustorium (H) ausbildet (etwa vier Tage nach der Sporenlandung). Nach Etablierung dieses ersten Abschnittes bildet das Pathogen weitere Hyphen und Haustorien. Etwa sechs Tage nach Infektionsbeginn werden erste Symptome sichtbar (siehe Abbildung 1 B - D). Die Hyphen im Mesophyll aggregieren und bilden Uredosporenlager.

1.1.2 Hemibiotrophe Pilze

Für die während dieser Arbeit verwendeten Pathogene *Colletotrichum graminicola* und *Magnaporthe oryzae* wurde eine hemibiotrophe Lebensweise beschrieben. Während es bei *Colletotrichum* ssp. im Anschluss an eine transiente, biotrophe und symptomlose Post-Penetrationsphase zu einer destruktiven Nekrotrophie mit Symptomentwicklung und Bildung von Konidien kommt (LATUNDE-DADA, 2001), charakterisiert sich die hemibiotrophe Entwicklung von *M. oryzae* anders. KANKANALA ET AL. (2007) beschrieben, dass die aufeinanderfolgende Invasion der Pflanzenzellen biotroph abläuft. Wächst der Pilz von einer Zelle zur nächsten, ist die verlassene Zelle jedoch nicht mehr lebensfähig. Die Autoren konnten jedoch den genauen Übergang von biotroph zu nekrotroph nicht charakterisieren. Bei den *Colletotrichum* ssp. muss zwischen zwei Formen der Hemibiotrophie unterschieden werden (PERFECT & GREEN, 2001). Als Einteilungskriterium dient hierbei, ob die biotrophe Phase der Pilze in nur einer Zelle oder in mehreren Zellen aufgebaut werden kann. Die biotrophe Phase bei *C. lindemuthianum* und *C. orbiculare*, z. B., ist durch ein intrazelluläres, primäres Myzelium charakterisiert. Biotrophie kann in mehreren Wirtszellen reetabliert werden. Bei anderen *Colletotrichum* ssp., z. B. *C. destructivum*, beschränkt sich das Wachstum der biotrophen Strukturen auf die erste befallene Zelle (PERFECT & GREEN, 2001). Im nächsten Kapitel wird auf das Pathogen *Colletotrichum graminicola* und die Pathogenese der hemibiotrophen Pilze genauer eingegangen.

1.1.2.1 Das Pathogen *Colletotrichum graminicola*

Colletotrichum ssp. sind weltweit verbreitet und verursachen im Feld Schäden u. a. an Getreide, Leguminosen, Kaffee und Kautschuk. Die größte ökonomische Bedeutung kommt ihnen aber als Fruchtfäuleerreger im Nacherntebereich an tropischen und subtropischen Früchten,

wie z. B. Banane (*Musa* ssp.), Papaya (*Carica papaya*), Mango (*Mangifera indica*) und Avocado (*Persea americana*), zu. Auch an heimischen Obstsorten kann die Nacherntefruchtfäule von Bedeutung sein. Als Beispiel sei hier der *Gloeosporium*-Fruchtfäule-Komplex am Apfel genannt. Während es sich bei *Colletotrichum* ssp. um die imperfekten Stadien handelt, stellt *Glomerella* die sexuelle Form dar (LATUNDE-DADA, 2001).

Die taxonomische Einteilung der Spezies erfolgte aufgrund von Konidienmorphologie, Differenzierung, Art der Infektionshyphen, der Affinität zu monoklonalen Antikörpern (z. B. UB20) und zum Lectin BPA und vor allem aufgrund der rDNA Sequenz (siehe u. a. SHERRIFF ET AL., 1994; BAILEY ET AL., 1996; MORIWAKI ET AL., 2002; CROUCH ET AL., 2006).

Anthraknose Blattflecken (ALB; *anthracnose leaf blight*) und Stängelfäule (ASR; *anthracnose stalk rot*) werden durch *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils. verursacht und sind an Mais (*Zea mays*) von weltweiter Bedeutung. Der Pilz befällt alle Pflanzenteile und kann während der gesamten Vegetationsperiode zur Erkrankung führen. Seit den 1970er Jahren ist die Krankheit vor allem in Nordamerika ein ernst zu nehmendes Problem. Das Auftreten hochvirulenter Rassen, die Verlagerung hin zu anfälligeren Wirtsgenotypen, das Auftreten günstiger Klimabedingungen und Veränderungen der landwirtschaftlichen Praxis führten in den 1970er Jahren zu massiven Problemen (BERGSTROM & NICHOLSON, 1999). Für ASR konnte weiterhin eine Verbindung zwischen Schäden, verursacht durch den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*), und einem nachfolgenden Befall mit dem Krankheitserreger nachgewiesen werden (KELLER ET AL., 1986). Eintrittswunden von *Ostrinia nubilalis* am Stängel dienen als Eintrittspforten für *C. graminicola*. ASR führt an Mais aufgrund der Reduktion des Korngewichts, einem vorzeitigen Absterben der Pflanzen und/oder Halmbruch, welcher zu einer Ernteerschweren führt, zu Ernteverlusten. Allerdings wurde durch MUIMBA-KANKOLONGO & BERGSTROM (1992) postuliert, dass nur Inokulationen sofort nach erfolgter Verwundung deutliche Symptome hervorbringen. Bei späterer Inokulation reduzierte die einsetzende Wundheilung, verbunden mit aktiven Resistenzmechanismen an und in der Nähe der Verwundung, den Infektionserfolg.

Der Pilz ist ein aggressives Pathogen auf der lebenden Pflanze, kann aber als fakultativer Saprophyt auf Pflanzenrückständen überdauern. BERGSTROM & NICHOLSON (1999) gliederten den Lebenszyklus von *C. graminicola* in fünf Abschnitte:

- Produktion und Verbreitung des primären Inokulum,
- Keimlingsfäule,

Einleitung

- ALB durch sekundäres Inokulum,
- Systematische Kolonisierung mit resultierender Stängelfäule (ASR),
- Saprophytische Überdauerung.

Als Reservoir für das primäre Inokulum dienen befallene Pflanzenrückstände auf der Feldoberfläche. Auf ihnen bilden sich Acervuli, aus denen in großen Mengen Sporen freigesetzt und über Regenswasserspritzer auf auflaufende Keimlinge transportiert werden. Auf den Blättern bilden sich die typischen Symptome (siehe Abbildung 2 A + B).

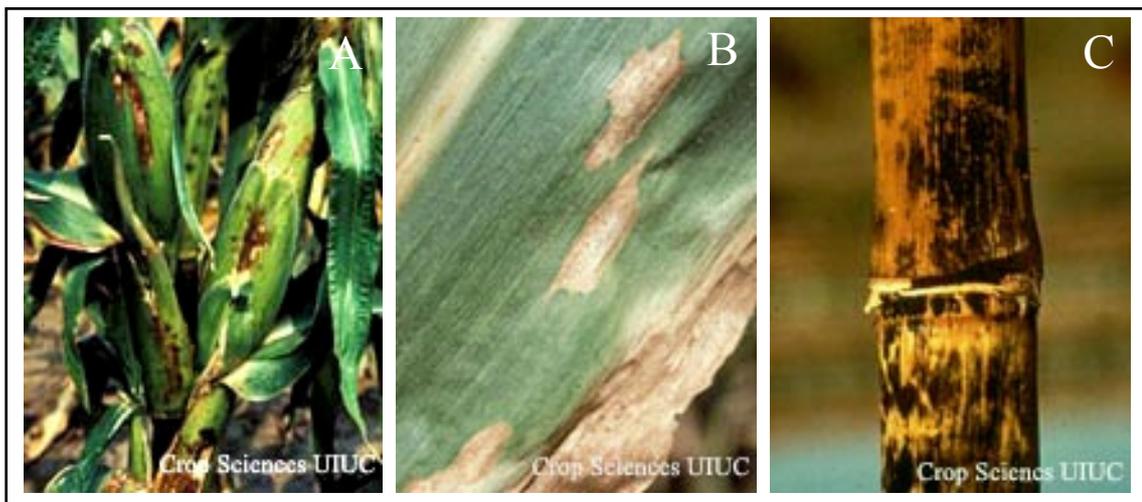


Abbildung 2: Anthraknose-Symptome an Mais

Anthraknose Blattflecken (A und B) und Anthraknose Stängelfäule (C) an Mais. Quelle:
<http://cropdisease.cropsci.illinois.edu/corn/>

Anfällige Maissorten zeigen grau-grün gefärbte, ovale Läsionen auf der Blattober- und Unterseite, die konzentrische Wachstumszonen erkennen lassen (NICHOLSON & WARREN, 1976). NICHOLSON & WARREN (1976) beschrieben die Pathogenese wie folgt: Ausgehend von den Blattflecken verbreitet sich sekundäres Inokulum durch Regenspritzer auf höhere Blattetagen. Wird der Stängel befallen, kommt es hier zu einer systemischen Ausbreitung. Anschließend an die Vegetationsperiode erfolgt die saprophytische Überdauerung auf infizierten Pflanzenrückständen. Eine Einarbeitung dieses Materials in den Boden kann einer epidemischen Ausbreitung entgegenwirken (BERGSTROM & NICHOLSON, 1999).

1.1.2.2 Die Pathogenese hemibiotropher Pilze

In den nachfolgenden Abschnitten wird auf die hemibiotrophe Entwicklung von *Colletotrichum* ssp., mit besonderem Augenmerk auf *C. graminicola*, eingegangen.

Sporenmatrix

Colletotrichum ssp. produzieren unterschiedliche extrazelluläre Matrices zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Entwicklung (PAIN ET AL., 1996). Sporen von *C. graminicola* sind von einer extrazellulären, schleimigen Matrix umgeben (BERGSTROM & NICHOLSON, 1999). Neben hochmolekularen Glycoproteinen (RAMADOSS ET AL., 1985) und diversen Enzymen (u. a. Invertase, nicht-spezifische Esterasen, Kutinasen, DNasen und RNasen, Details siehe BERGSTROM & NICHOLSON, 1999) enthält diese Matrix auch einen Keiminhistor namens Mycosporin-Alanin (LEITE & NICHOLSON, 1992). Keiminhistorien sind ein weitverbreitetes Phänomen bei den *Colletotrichum* ssp. (LEITE & NICHOLSON, 1992). LEITE UND NICHOLSON (1992) konnten den Keiminhistor von *C. graminicola* isolieren und charakterisieren. Es handelt sich um eine niedermolekulare, wasserlösliche Verbindung, die in Konzentrationen bis 4 mM nachgewiesen wurde. Das Vorhandensein des Inhibitors verhindert das Auskeimen der Sporen im Acervulus. Erst bei einer Konzentration $< 0,5$ mM, was z. B. durch Vermischung der Sporen mit Wasser erlangt werden kann, wird der Inhibitor ineffektiv und die Sporen beginnen zu keimen (BERGSTROM & NICHOLSON, 1999). Weiterhin konnten hochmolekulare Glycoproteine als eine der Hauptkomponenten der Sporenmatrix von *C. graminicola* identifiziert werden (RAMADOSS ET AL., 1985). Sie bestehen aus über Sauerstoffbrücken verbundenen Oligomeren von Mannose, Rhamnose, Galactose und Glucose und hohen Mengen an hydrophoben und hydroxylierten Aminosäuren. Als enzymatische Komponente tritt β -Glucosidase auf.

Die Matrix enthält weiterhin hohe Mengen an Prolin (NICHOLSON ET AL., 1986). Für Proteine und Polypeptide mit einem hohen Prolingehalt ist ihre hohe Affinität zu Tannin, einem natürlich vorkommenden Polyphenol, charakteristisch (HAGERMAN & BUTLER, 1981). Pflanzen produzieren phenolische Substanzen, die toxisch für Mikroorganismen, Tiere und andere Pflanzen sind (NICHOLSON ET AL., 1986). Einige werden konstitutiv, andere als Antwort auf einen Pathogenbefall gebildet (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Ihre Toxizität beruht auf ihrem Vermögen, Proteine zu binden und zu präzipitieren (HAGERMAN & BUTLER, 1981). Nach NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT (1992) scheint die defensive Strategie von Pflanzen in

zwei Phasen abzulaufen. Zuerst kommt es zu einer schnellen Akkumulation von Phenolen an der Infektionsstelle, später, in der sekundären Phase, werden Substanzen (wie z. B. Phytoalexine) *de novo* synthetisiert. Als mögliche Abfolge der Abwehr nannten die Autoren zuerst den Wirtszelltod (HR) und Nekrosen, die Akkumulation von Phenolen, die Modifikation von Zellwänden durch phenolische Substituenten oder physikalische Barrieren (z. B. Papillen). Erst später kommt es zur Neusynthese von spezifischen Antibiotika, wie den Phytoalexinen. Phenole gelten als wichtige Komponenten der Wirtsabwehr. Auch in Maispflanzen konnte nach Infektion mit *Colletotrichum graminicola* ein Anstieg des Gesamtphenolgehaltes nachgewiesen werden (HAMMERSCHMIDT & NICHOLSON, 1977).

Neben den bisher aufgeführten Aufgaben schützt die Sporenmatrix die Konidien auch vor Austrocknung (NICHOLSON & MORAES, 1980). Die Lebensfähigkeit der Sporen bleibt in der eingetrockneten Matrix erhalten, während Laborversuche von NICHOLSON & MORAES (1980) zeigten, dass das Entfernen der Sporenmatrix und die anschließende 24-stündige Lagerung der Sporen unter verschiedenen Bedingungen zu einer Reduktion der Sporenvitalität führte. Eingetrocknete Sporenmassen können im Feld als Inokulum dienen und werden durch den Wind im Bestand verbreitet.

Arbeiten von BERGSTROM & NICHOLSON (1977) und ANTHENILL & NICHOLSON (1978) zeigten weiterhin das Vorhandensein von unspezifischen Hydrolasen und Invertasen. Invertasen dienen der Versorgung der keimenden Spore mit Kohlenhydraten, Hydrolasen könnten am Abbau der Kutikula beteiligt sein (NICHOLSON & MORAES, 1980). So wurden vier Kutinasen der Serin-Esterase-Klasse der Hydrolasen in der Sporenmatrix von *C. graminicola* nachgewiesen (PASCHOLATI ET AL., 1993). Das Vorhandensein dieser Enzyme in der Sporenmatrix zeigt, dass sie während der Sporulation gebildet werden und konstitutionelle Komponenten der Matrix sind (PASCHOLATI ET AL., 1993). Für das Pathosystem *Uromyces viciae-fabae/Vicia faba* (Ackerbohne) erwiesen sich eine Kutinase und zwei nicht-spezifische Esterasen, die in der Sporenmatrix des Pilzes gefunden wurden, als essenzielle Komponenten des Adhäsionsvorganges (DEISING ET AL., 1992). Auch für das System *Blumeria graminis/Hordeum vulgare* (Gerste) wurde ein Zusammenhang zwischen der Sekretion einer esteresehaltigen Flüssigkeit aus den Konidien des Pilzes und der Adhäsion diskutiert (KUNOH ET AL., 1990).

Adhäsion der Sporen

Unterschiedliche Faktoren können Einfluss auf die Adhäsion der Sporen von *Colletotrichum* ssp. nehmen. Da Sporen sich sowohl an der Oberfläche der Wirtspflanze als auch an artifiziellen Oberflächen befestigen können (MERCURE ET AL., 1994; YOUNG & KRAUSS, 1984), wurde durch YOUNG & KRAUSS (1984) geschlussfolgert, dass die Adhäsion nur auf physikalischen Oberflächeneigenschaften zu beruhen scheint. Größer als der Einfluss der chemischen Beschaffenheit des Substrates (biologisch oder artifiziell) scheint seine Hydrophobizität zu sein. So konnte für *C. graminicola* (MERCURE ET AL., 1994) und *C. musae* (SELA-BUURLAGE ET AL., 1991) eine bessere Adhäsion auf hydrophoben als auf hydrophilen Oberflächen nachgewiesen werden.

Kontroverse Ergebnisse gab es für den Einfluss der metabolischen Aktivität der Sporen auf den Adhäsionserfolg. Während bei *C. lindemuthianum* die Adhäsion durch Zugabe von Atmungsinhibitoren (Sodiumazid und Antimycin A) gehemmt werden konnte (YOUNG & KRAUSS, 1984), hatten beide Substanzen keinen Einfluss auf die Adhäsion von *C. graminicola* (MERCURE ET AL., 1994). Jedoch konnten MERCURE ET AL. (1994) nachweisen, dass Inhibitoren des Glycoproteintransportes (Brefeldin A) und der Proteinsynthese (Cycloheximid) die Sporenadhäsion verringerten. Dies ließ darauf schließen, dass die Synthese von Glycoproteinen an der Adhäsion ungekeimter Konidien beteiligt ist. Die durch die Konidien von *C. graminicola* sekretierte Matrix enthält Glycoproteine, die zum Teil glycosiliert sind. Mannose konnte als vorherrschender Zucker identifiziert werden (SUGUI ET AL., 1998).

Keimung

Nachdem sich die ungekeimte und noch unseptierte Konidie an der Wirtsoberfläche befestigt hat, beginnt sie zu keimen. Für die Initialisierung der Keimung sind bestimmte Reize nötig. Neben dem Einfluss von Ethylen und anderen flüchtigen Substanzen (FLAISHMAN & KOLATTUKUDY, 1994) und der Zusammensetzung von Oberflächenwachsen (HWANG & KOLATTUKUDY, 1995) konnten bei *C. gloeosporioides* Gene identifiziert werden, die durch Kontakt mit harten Oberflächen induziert werden. Entsprechend ihrer Aufgaben wurden sie als CHIP-Gene (*Colletotrichum hard-surface induced proteins*) bezeichnet (LIU & KOLATTUKUDY, 1998).

Sporen von *C. graminicola* sind sichelförmig oder oval (PANACCIONE ET AL., 1989) und besitzen, vor Beginn der Keimung, einen Zellkern. Nach Kontakt mit einer induktiven Oberfläche kommt es zur mitotischen Zellteilung und der anschließenden Septierung der zwei Tochterzel-

len (POLITIS & WHEELER, 1973). In den meisten Fällen geht der Keimung die Septierung der Spore voraus.

Den sich bildenden Keimschlauch umgibt bei *C. lindemuthianum* eine fibrilläre Ummantelung, die basische Proteine, α -D-Mannose und α -D-Galactose enthält (PAIN ET AL., 1996). Eine solche Ummantelung ist auch von anderen *Colletotrichum* ssp. bekannt, u. a. *C. graminicola* (KOZAR & NETOLITZKY, 1978) und *C. truncatum* (VAN DYKE & MIMS, 1991). Als Funktionen haben O'CONNELL ET AL. (1996) die Beteiligung an der Adhäsion, Schutz vor Austrocknung und die Aufrechterhaltung der extrazellulären Ionenbalance genannt. Hat der Keimschlauch von *C. graminicola* ausreichenden Kontakt mit der Oberfläche des darunterliegenden Substrates, wird die Bildung eines Appressoriums induziert. In Keimversuchen konnte eine Länge von 4,5 μ m als ausreichend induktive Kontaktfläche zwischen Keimschlauch und Oberfläche festgestellt werden (APOGA ET AL., 2004).

Appressorienbildung und Penetration

Appressorien sind hochspezialisierte Infektionsstrukturen, die es Pilzen erlauben, in ihren Wirt einzudringen und so Zugang zu den Nährstoffen der Pflanzenzellen zu erlangen (DEISING ET AL., 2000). Traditionell werden als Appressorien nur Strukturen bezeichnet, die ausgehend von einem Keimschlauch gebildet werden, während Hyphopodien an Hyphen entstehen (EMMET & PARBERRY, 1975). Die Induzierung der Appressorienbildung erfolgt bei verschiedenen Pilzen durch unterschiedliche Signale. Die bereits im vorherigen Abschnitt beschriebene Induktion der Keimung bei *C. gloeosporioides* durch Oberflächenwachse und flüchtige chemische Substanzen (FLAISHMAN & KOLATTUKUDY, 1994; HWANG & KOLATTUKUDY, 1995) induziert auch die Bildung von Appressorien. Bei *M. grisea* ist vor allem die Hydrophobizität der Unterlage (LEE & DEAN, 1994), der Oberflächenkontakt und das Vorhandensein von Licht entscheidend (JELITTO ET AL., 1994). Die Reize der Oberfläche werden über Rezeptoren erkannt, in der pilzlichen Zelle weitergeleitet und resultieren schlussendlich in der Expression von Genen, die für die weitere Entwicklung benötigt werden. Der Review von DEISING ET AL. (2000) fasst die Signaltransduktion bei Pilzen wie folgt zusammen: Transmembranale Rezeptoren ändern nach Kontakt mit einem Signal ihre Konformation, wodurch die Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen möglich wird. Diese Proteine enthalten drei Untereinheiten (α , β und γ). Durch ein induzierendes Signal wird α von $\beta\gamma$ getrennt und entweder α oder $\beta\gamma$ können das Signal weiterleiten. Drei Signaltransduktionswege sind desweiteren bekannt, die alle Proteinkinasen enthalten: Der Phospholipase

C-, der Adenylylzyklase- und der MAP-Kinase-Weg. Die Proteinkinasen phosphorylieren Transkriptionsfaktoren und führen so zur Expression spezifischer Gene (siehe DEISING ET AL., 2000 und darin enthaltene Referenzen). Für *C. trifolii* konnte die Abhängigkeit der Appressorienbildung von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und cAMP-abhängigen Proteinkinasen (YANG & DICKMAN, 1997) und, bei *C. lindemuthianum*, von Ca^{2+} /Calmodulin (WARWAR & DICKMAN, 1996) gezeigt werden.

Die Appressorienbildung beginnt mit dem Anschwellen der Hyphenspitze und der anschließenden Differenzierung und Reifung des Appressoriums (O'CONNELL ET AL., 1996). Während der Reifung wird bei *Colletotrichum* ssp. eine Melaninschicht in die appressoriale Zellwand eingelagert und eine extrazelluläre Matrix sekretiert (O'CONNELL ET AL., 1996). Die extrazelluläre Matrix, sekretiert durch Keimschläuche und Appressorien von *C. lindemuthianum*, unterscheidet sich von der Matrix, die die Sporen des Pilzes umgibt. Beide enthalten Glycoproteine, aber diese werden von unterschiedlichen Antikörpern gebunden (PAIN ET AL., 1996). Die Matrices von Keimschlauch und Appressorien zeigten eine hohe Ähnlichkeit, sie enthalten Fimbriae, basische Proteine und Reste von Mannose, Glucose und N-Acetylamin (PAIN ET AL., 1996). Auch hier ist die Befestigung des Appressoriums auf der Oberfläche eine wichtige Funktion der sekretierten Matrix. Für *M. grisea* wurde die Zusammensetzung der appressorialen Klebersubstanz beschrieben (EBATA ET AL., 1998). Hauptkomponenten sind Lipide (29 %, v. a. Hexa- und Oktadekansäuren), Proteine (12,2 %, v. a. Glycin, Glutaminsäure und Serin), Kohlenhydrate (7,6 %, v. a. Glukose, Xylose und Mannose), Wasser (26,5 %) und andere Bestandteile (24,7 %). Die Befestigung der Appressorien ist essenziell für die Erfüllung ihrer Hauptaufgabe, der Penetration des Wirtsgewebes (DEISING ET AL., 2000). Die extrazelluläre Matrix bedeckt den kuppelartigen Teil der Appressorien und bildet außerdem einen dicken Ring um die Basis (BAILEY ET AL., 1992). Bei *C. graminicola* werden die Zellen des Keimschlauches und des Appressoriums durch ein Septum voneinander getrennt, die Konidie erscheint anschließend leer und hyalin (KHAN & HSIANG, 2003). Die Appressorien enthalten Fettkörperchen, Mitochondrien, Ribosomen, Glycogen und einen Zellkern (POLITIS & WHEELER, 1973).

Die Zellwand reifer Appressorien bei *Colletotrichum* ssp. und *M. grisea* ist, mit Ausnahme der Penetrationspore, melanisiert. Der Durchmesser der Penetrationspore kann von 0,5 μm für *C. sublineolum*, ca. 1 μm für *M. grisea* und bis 2 μm für *C. graminicola* reichen (LATUNDE-DADA, 2001). Die Pore hat eine dünne, unmelanisierte Wand und direkten Kontakt zur Wirtskutikula (BOURETT & HOWARD, 1990; PERFECT ET AL., 1999). In Abbildung 3 B und C

sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der Appressorienbasis mit Penetrationspore (B) und eine Penetrationshyphe im Querschnitt (C) zu sehen.

Für Melanin wird die Beteiligung am Aufbau eines hohen Turgordruckes und damit der Penetration postuliert (HOWARD & FERRARI, 1989). Weiterhin führt die Melanisierung zu einer Reduzierung des Durchmessers der Zellwandporen des Appessoriums (HOWARD ET AL., 1991). Dies führt zu einer selektiven Permeabilität der Zellwand für Moleküle mit geringer Größe (z. B. Wasser), während größere Moleküle (z. B. Glycerol) die Zellwand nicht passiv passieren können. Nach dem Prinzip der Pfeffer'schen Zelle kommt es durch die Akkumulation osmotisch aktiver Substanzen im Inneren des Appessoriums (z. B. Glycerol) zum passiven Einstrom von Wasser. Die steigende Wassermenge im Appessorium führt zum Anstieg des Turgordruckes (siehe Abbildung 3 A).

Nach BASTMEYER ET AL. (2002) wird zwischen direkten und indirekten Methoden zur Bestimmung von Turgordruck und daraus resultierender Kraft unterschieden. Indirekte Methoden für die Bestimmung des Turgordruckes sind Plasmolyse, Cytorrhizie, Kavitation und Schmelzpunktsmometrie, direkte Methoden stellen *pressure probe* und die optischen Wellenleiter dar. Für die Bestimmung des erreichten Druckes auf eine Oberfläche können Agar- und Membranpenetrationsexperimente durchgeführt werden (indirekte Methoden) bzw. Dehnungsmessstreifen (*strain gauge*) oder Hohlleiter-Mikroskopie (*waveguide microscopy*) (direkte Methoden). Die Bestimmung des Turgordruckes in Appressorien von *M. grisea* (ca. 8 MPa) erfolgte mittels Cytorrhizie (HOWARD ET AL., 1991). Für *C. graminicola* konnte die durch die Penetrationshyphe ausgeübte Kraft mittels der Wellenleiter-Mikroskopie direkt bestimmt werden, sie lag bei 16,8 μN (BECHINGER ET AL., 1999).

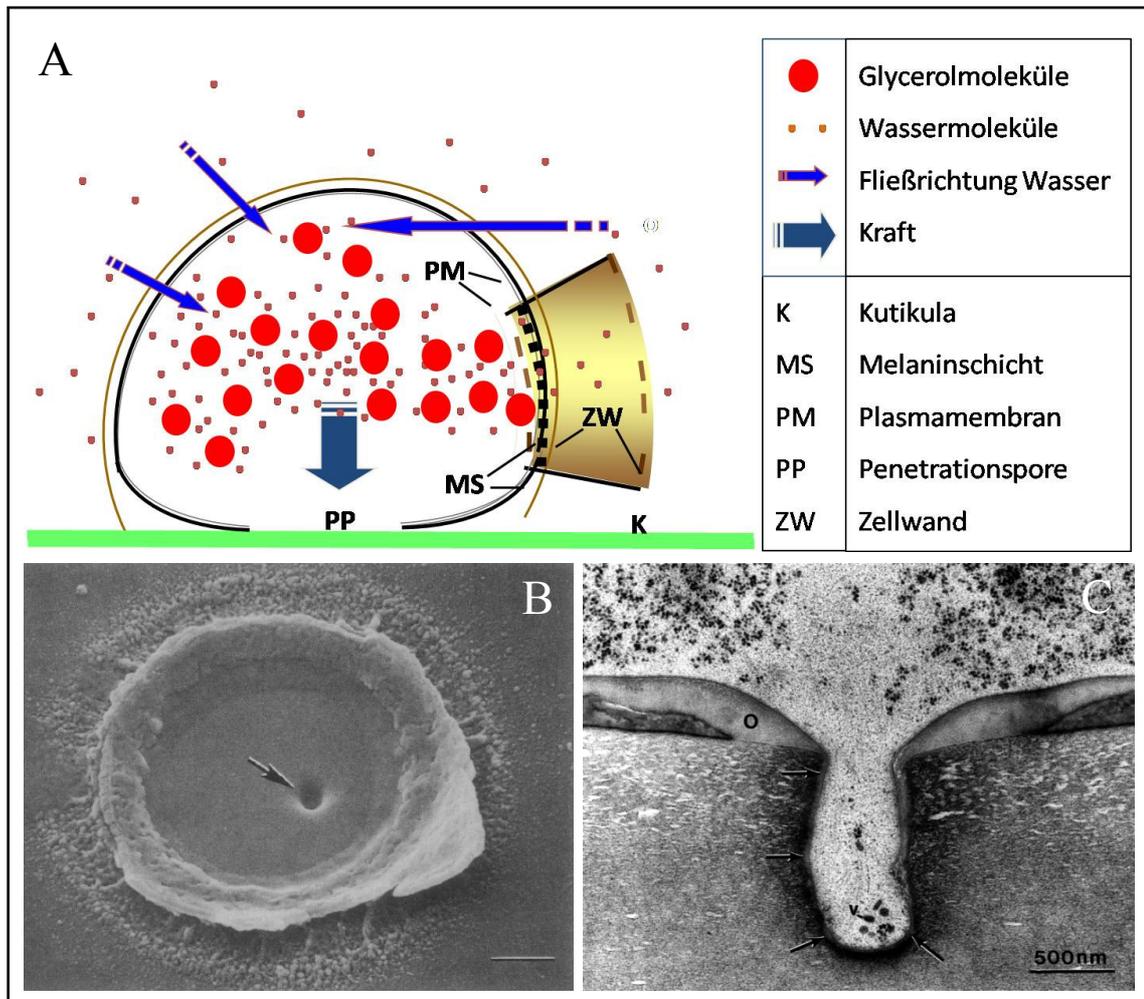


Abbildung 3: Aufbau und Funktionsweise eines melanisierten Appressoriums

A: Schematische Darstellung des Aufbaus eines melanisierten Appressoriums und des Penetrationsmechanismus, Abbildung von Prof. Dr. H. B. Deising.

B: SEM-Aufnahme einer Appressorienbasis mit Penetrationspore von *M. grisea*; Quelle: HOWARD ET AL., 1991.

C: Querschnitt durch eine Penetrationshypha von *M. grisea*; Quelle: HOWARD & VALENT, 1996.

Die Entwicklung der Infektionshypha beginnt bei *C. sublineolum* mit der Bildung einer weiteren Wandschicht zwischen innerer Appressorienwandschicht und Plasmamembran, diese bildet einen dicker werdenden Ring um die Penetrationspore (WHARTON ET AL., 2001). Durch KHAN & HSIANG (2003) wurde der Infektionsverlauf von *C. graminicola* auf Gräser-Isolaten untersucht. Es wurde beobachtet, dass die meisten Penetrationen an der antiklinalen Wandposition zwischen Epidermiszellen stattfanden.

Entwicklung in der Pflanze – biotrophe Phase

Nach der Penetration durch hemibiotrophe *Colletotrichum* ssp. kann die weitere Entwicklung über zwei unterschiedliche Wege erfolgen (siehe Abbildung 4).

Pilze, die ein primäres Myzel bilden und ihre biotrophe Phase in mehreren Zellen etablieren können, sind z. B. *C. lindemuthianum*, *C. graminicola* und *C. sublineolum*. In der befallenen Epidermiszelle kommt es zur Bildung eines großen, globulären Infektionsvesikels, aus dem dicke Primärhyphen auswachsen und ein intrazelluläres Myzel bilden (O'CONNELL ET AL., 1985), das nur in Epidermis-, Sklerenchym- und Mesophyllzellen zu finden ist (WHARTON ET AL., 2001). Die biotrophen Strukturen sind dabei von der Wirtsplasmamembran umgeben (O'CONNELL, 1987). Für *C. lindemuthianum* konnte eine Grenzflächenmatrix (*interfacial matrix*) beschrieben werden, die sich zwischen der pilzlichen Zellwand und der pflanzlichen Plasmamembran befindet und ein Produkt von Pilz und Pflanze ist. Sie ist reich an Polysacchariden (O'CONNELL, 1987). Bei der Interaktion *C. sublineolum/Sorghum bicolor* (Hirse) konnte keine solche Matrix gefunden werden (WHARTON ET AL., 2001). Im Gegensatz zu den aus obligat biotrophen Interaktionen bekannten Interphasen (haustoriale Matrix) ist sie weniger spezialisiert (O'CONNELL, 1987). Interphasen biotropher Symbiosen dienen hauptsächlich dem Nährstofftransfer (SMITH & SMITH, 1990). Nach der biotrophen Besiedlung einer weiteren Epidermiszelle wird die vorher besiedelte Zelle seneszent und stirbt ab. Circa 4 dpi ist die Bildung dünner Sekundärhyphen zu beobachten und somit der Eintritt in die nekrotrophe Phase eingeleitet (O'CONNELL ET AL., 1985).

C. sublineolum und *C. graminicola* sind eng verwandt und wurden erst 1980 durch SUTTON, später auch durch VAILLANCOURT & HANAU (1992), als zwei unterschiedliche Spezies beschrieben. Der zeitliche Ablauf der Infektion von Mais mit *C. graminicola* wurde wie folgt von SUGUI & DEISING (2002) beschrieben: 24 hpi waren reife Appressorien vorhanden, die im Folgenden die Pflanzenoberfläche penetrierten und 48 hpi Infektionsvesikel und Primärhyphen gebildet hatten. 72 hpi konnte durch das Vorhandensein von Sekundärhyphen die nekrotrophe Phase nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4 A - D).

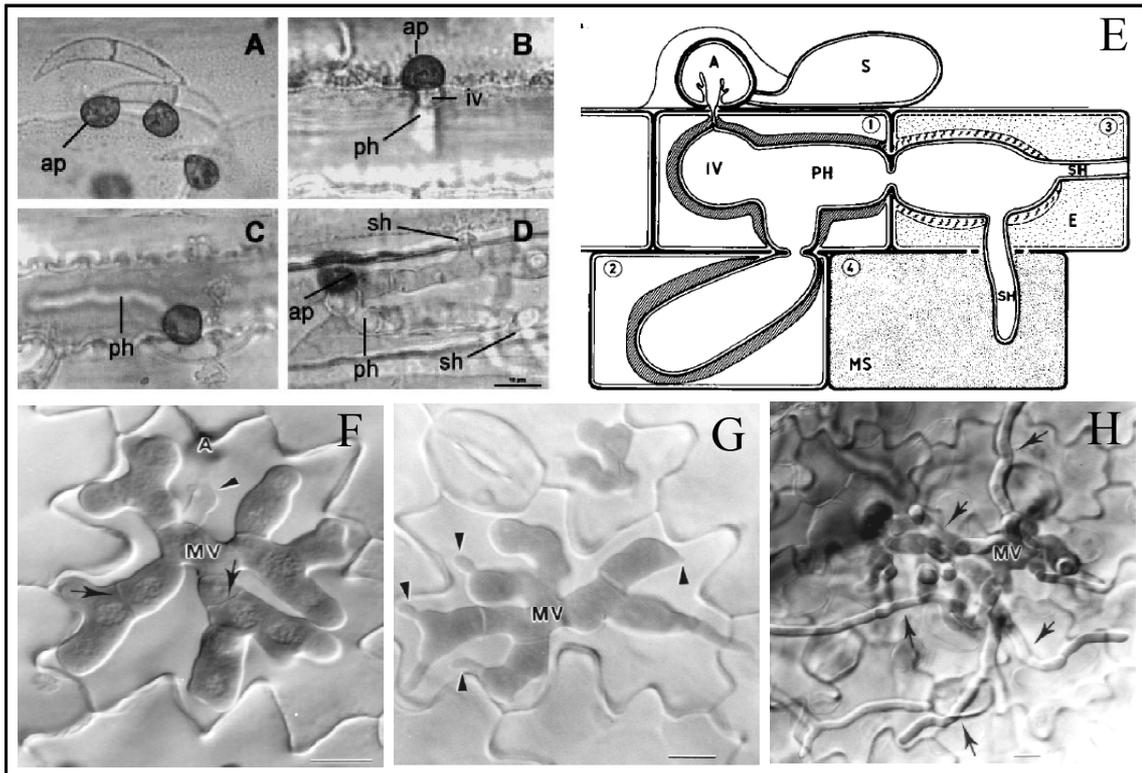


Abbildung 4: Infektionsverlauf bei *Colletotrichum* ssp.

A - D: Infektionsverlauf von *C. graminicola* auf Mais; ap = Appressorium, iv = Infektionsvesikel, ph = Primärhypha, sh = Sekundärhypha; Quelle: SUGUI & DEISING (2002).

E: Schematische Darstellung des Infektionsverlaufs von *C. lindemuthianum* auf Bohne. Zelle 1 + 2: biotrophe Phase; Zelle 3 + 4: nekrotrophe Phase. S = Spore, A = Appressorium, IV = Infektionsvesikel, PH = Primärhypha, SH = Sekundärhypha, E = Epidermiszelle, MS = Mesophyllzelle; Quelle: PERFECT ET AL. (1999).

F - H: *C. destructivum* auf Luzerne. F: Biotrophe Phase, MV = vielfach verzweigtes Infektionsvesikel (*multilobed vesicle*), 48 hpi. G: Beginn nekrotrophe Phase, Pfeile zeigen kurze Sekundärhyphen, 60 hpi. H: Nekrotrophe Phase mit Sekundärhyphen (Pfeile). Maßstab = 10 µm. Quelle: LATUNDE-DADA ET AL (1997).

Eine abweichende biotrophe Entwicklung wurde durch LATUNDE-DADA ET AL. (1997) für *C. destructivum* auf Luzerne beschrieben (siehe Abbildung 4 F - H). Nach der Penetration der Wirtsoberfläche bildet der Pilz ein großes, vielfach verzweigtes, septiertes Infektionsvesikel mit verlängerter Halsregion, das für ca. 48 h in der infizierten Zelle verbleibt (biotrophe Phase). Anschließend wachsen invasive Sekundärhyphen aus, die zu einer schnellen Kolonisierung des Wirtsgewebes und der Entstehung von Symptomen führen. 96 hpi können Acervuli auf der Pflanzenoberfläche gefunden werden.

Während der biotrophen Phase ist die Unterdrückung der Wirtsabwehr wichtig. Hierbei kann es entweder zur Maskierung von Hyphen kommen oder die Pflanzenabwehr aktiv unterdrückt

werden. Untersuchungen zu einer Hyphenmaskierung *in planta* wurden durch EL GUEDDARI ET AL. (2002) u. a. an *C. graminicola* durchgeführt. Nach der Penetration wird das Chitin der pilzlichen Zellwand zu Chitosan de-N-acetyliert. Dies verhindert, dass pflanzliche Chitinasen die Pilzhyphen angreifen können. Auch die Sekretion von Proteinen zur Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr (z. B. einer Hypersensitiven Reaktion) wurde bei *C. gloeosporioides* diskutiert (STEPHENSON ET AL., 2000). Bereits 1866 wurde durch DE BARY beschrieben, dass pflanzenparasitische Pilze die Morphologie ihrer Hyphen in Abhängigkeit von strukturellen und physikalischen Beschaffenheiten der Wirtsoberfläche verändern. So wurden bis heute eine Vielzahl von Hyphentypen bei pflanzenpathogenen Pilzen in Abhängigkeit von ihrer Lebens- und Ernährungsweise beschrieben (siehe Review MENDGEN & HAHN, 2002). Befallene Wirtszellen behalten während der biotrophen Phase ihre Membranfunktionen und Ultrastruktur, ähnlich wie dies auch bei obligat biotrophen Pilzen der Fall ist (O'CONNELL ET AL., 1985). Dies sichert eine Nährstoffversorgung des Pilzes *in planta*.

Entwicklung in der Pflanze – nekrotrophe Phase

Der Zeitpunkt des Auftretens sekundärer Hyphen variiert je nach Interaktion. Während bei *C. graminicola/Zea mays* (Mais) 72 hpi Sekundärhyphen auftraten (SUGUI & DEISING, 2002) konnten diese bei *C. sublineolum/Sorghum bicolor* (Hirse) erst 6 dpi beobachtet werden (WHARTON ET AL., 2001). Ihr Auftreten ist auf tote Zellen beschränkt. Mit Beginn der nekrotrophen Phase nimmt auch die Sekretion zellwandabbauender Enzyme zu (MENDGEN & HAHN, 2002). So konnte in *C. lindemuthianum* die Expression von Endopolygalacturonasen sowohl *in vitro* (durch Zugabe von Pektin) als auch in der Pflanze spezifisch während der nekrotrophen Phase nachgewiesen werden (CENTIS ET AL., 1997).

Bereits durch WIJESUNDERA ET AL. (1989) wurde die Aktivität von Pektinlyasen, α - und β -Galactopyranosidasen und α -Arabinofuranosidasen in infiziertem Gewebe gezeigt. Neben Depolymerasen spielen bei der raschen Abtötung des Wirtsgewebes auch Toxine (Colletotrichine bei *C. nicotina*, siehe Review THINES ET AL., 2006) und ROS (reaktive Sauerstoffspezies) eine Rolle. Neue Ergebnisse zeigen, dass auch *C. graminicola* Toxine benötigen könnte, um Anthraknose-Symptome auf seiner Wirtspflanze Mais ausbilden zu können. So konnten PPTase-defiziente Mutanten von *C. graminicola* das Wirtsgewebe durchwachsen; Symptome, die erst während des nekrotrophen Wachstums entstehen, blieben jedoch aus (HORBACH ET AL., 2009).

Zur Bildung charakteristischer Acervuli kam es bei *C. lindemuthianum/Sorghum bicolor* 114 hpi und wurde wie folgt durch WHARTON ET AL. (2001) beschrieben: Acervuli bilden sich ausgehend von einem dichten Hyphenstroma in der Epidermis. Die Penetration von Hyphen durch die epidermale Zellwand erfolgte lokal durch dünne Penetrationshyphen, anschließend bildeten sich Konidiophoren und Setae zwischen Zellwand und Kutikula. Erst durch die Expansion der Strukturen kam es zur Durchbrechung der Kutikula. Diese Art der Acervulibildung ist charakteristisch für *Colletotrichum* ssp. auf *Gramineen*. Setae sind stets melanisiert, septiert und von einer dicken Wand umgeben (WHARTON ET AL.; 2001). Ihre Funktion ist bisher unbekannt.

Die Auswahl von *P. pachyrhizi*, *M. oryzae* und *C. graminicola* für die im Rahmen dieser Arbeit geplanten Inokulationsversuche erfolgte aufgrund ihrer Fähigkeit, pflanzliche Oberflächen mit Hilfe eines Appressoriums direkt zu penetrieren. Während *M. oryzae* und *C. graminicola* melanisierte Appressorien bilden, sind die des Sojarost-Erregers nicht-melanisiert.

1.2 Bedeutung und Charakterisierung von Pathogenitätsgenen

1.2.1 Definition und Charakterisierung

Ein Pathogen zeichnet sich generell durch die Fähigkeit aus die Wirtsabwehr zu umgehen und sich so eine Nische für Wachstum und Reproduktion zu schaffen, nur unter 10 % der Pilze ist dies gelungen (HAMER & HOLDEN, 1997). Die Begriffe Pathogenität und Virulenz beschreiben das Vermögen eines Pathogenes eine Krankheit hervorzurufen qualitativ und quantitativ. Kann sich das Pathogen erfolgreich auf einer Wirtspflanze etablieren und den Entwicklungszyklus vollenden, spricht man von einer kompatiblen Interaktion (MÜNCH ET AL., 2008).

Pathogenitätsgene sind für die Krankheitsentwicklung notwendig, sie sind jedoch nicht essenziell für die Vollendung des Lebenszyklus *in vitro* (OLIVER & OSBOURN, 1995; IDNURM & HOWLETT, 2001). Nicht zutreffend ist diese Definition für obligat biotrophe Pilze (OLIVER & OSBOURN, 1995). Die Identifizierung von Pathogenitäts-relevanten Genen dient dem besseren Verständnis von Infektionsstrategien und kann Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Fungizide bieten (IDNURM & HOWLETT, 2001). Der Typ Gen, der für die Pathogenese essenziell ist, ist abhängig vom Infektionsprozess des Pilzes. Auf dieser Grundlage kann die Einteilung von Pathogenitätsgenen aufgrund ihrer Funktion, z. B. der Bildung von Infektionsstrukturen,

dem Abbau von Kutikula und Zellwand, der Produktion von Toxinen und/oder Komponenten der Signalkaskaden, erfolgen (IDNURM & HOWLETT, 2001). Es wird angenommen, dass ein pflanzliches Pathogen zwischen 60 und 360 Pathogenitätsgene besitzt (IDNURM & HOWLETT, 2001).

Über die unterschiedlichen Strategien, die zur Auffindung von Pathogenitäts-relevanten Genen in Pilzen verfolgt werden können, gibt der nächste Abschnitt Auskunft.

1.2.2 Identifizierung von Pathogenitätsgenen

Mit Beginn der Molekularbiologie wurde das Klonieren von Genen mittels reverser Genetik oder über die Komplementierung von Mutanten mit interessantem Phänotyp, die entweder natürlich oder durch Einsatz von Chemikalien oder Strahlung (z. B. UV-Licht, Details siehe CHUMLEY & VALENT, 1990; ZHU ET AL., 1996) erstellt wurden, eingeführt (MAIER & Schäfer, 1999). Generell stehen Methoden zur zufälligen und zur gezielten Mutagenese zur Verfügung. Während es bei der zufälligen Mutagenese zur heterologen Integration in das Zielgenom kommt, sind für die gezielte Mutagenese Sequenzinformationen nötig. Eine bekannte Sequenz, z. B. ein Pathogenitätsgen, wird durch Integration eines Selektionsmarkers über homologe Rekombination disruptiert (MULLINS & KANG, 2001). 1979 wurde die erste Transformation eines Pilzes (*Neurospora crassa*) mit einem Transformationsvektor ohne Sequenzhomologie beschrieben, der zufällig ins Genom integrierte (CASE ET AL., 1979). Die erste geglückte Erstellung von Mutanten mittels zufälliger Insertionsmutagenese bei einem pflanzenpathogenen Pilz (*Cochliobolus heterostrophus*) gelang TURGEON ET AL. (1987).

Zufällige Insertionsmutagenese

Soll Fremd-DNA ohne die Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* in das pilzliche Genom übertragen werden, ist entweder die vorherige Protoplastierung der Zellen nötig oder es müssen biolistische Methoden eingesetzt werden. Bei der ATMT, der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation, kann auf die Protoplastierung der zu transformierenden Zellen verzichtet werden, auch Restriktionsenzyme werden nicht benötigt.

Agrobacterium tumefaciens ist ein gram-negatives Bodenbakterium, welches Tumore (*crown galls*) an Wundstellen seiner Wirte hervorrufen kann (BUNDOCK ET AL., 1995). Dazu überträgt es einen Teil seines Tumor-induzierenden Plasmids (Ti-Plasmid), die T-DNA, mit Hilfe von Virulenzgenen (*vir* Gene) (BUNDOCK ET AL., 1995).

A. tumefaciens befällt in der Natur vor allem dikotyle Pflanzen. Im Labor gelang auch der Transfer der T-DNA auf Monokotyle (z. B. Reis, HIEI ET AL., 1994) und Pilze, z. B. *Saccharomyces cerevisiae* (BUNDOCK ET AL., 1995), *Aspergillus awamori* (DE GROOT ET AL., 1998), *Fusarium circinatum* (COVERT ET AL., 2001) und *C. graminicola* (FLOWERS & VAILLANCOURT, 2005). Da der Bereich zwischen den Grenzen der T-DNA keinen Einfluss auf den Transfer hat, eignet sich dieses System hervorragend als Vektor für einen Selektionsmarker bzw. eine Knock Out-Kassette (SHENG & CITOVSKY, 1996).

Die ATMT konnte für eine Vielzahl an Pilzen etabliert werden, z. B. *Fusarium circinatum* (COVERT ET AL., 2001), *F. oxysporum* (MULLINS ET AL., 2001), *M. grisea* (RHO ET AL., 2001) und *Helminthosporium turcicum* (DEGEFU & HANIF, 2003). Das Screening einer mittels ATMT erstellten Transformantenbank bei *C. lindemuthianum* führte so z. B. zur Identifizierung von *CLSTE12*, einem Transkriptionsfaktor, der für die Produktion von Zelloberflächenproteinen und zellwandabbauenden Enzymen benötigt wird (HOI ET AL., 2007).

1.3 Artificielle Membranen

Neben dem Wachstum auf ihren Wirtspflanzen sind viele Pflanzenpathogene auch in der Lage, auf artifiziellen Unterlagen Infektionsstrukturen zu bilden. Diese können aus Glas, Metall oder Kunststoff sein. So konnte die Bildung von Appressorien auf einer Vielzahl von artifiziellen Oberflächen beobachtet werden (BOURETT & HOWARD, 1990; LEE & DEAN, 1994). Ein Vorteil der Verwendung artifizieller Oberflächen statt der Wirtspflanze liegt in der Umgehung der komplexen Beeinflussungen durch den Wirt (BOURETT & HOWARD, 1990). Weiterhin sind die artifiziellen Materialien besser definiert und weniger variabel als eine pflanzliche Oberfläche.

1.3.1 Einsatzmöglichkeiten

Bereits 1895 wurde durch MIYOSHI die Penetration von Goldblättchen durch Pilzhyphen von *Botrytis cinerea* beschrieben. Der Hintergrund der Verwendung von Gold war dessen Inertheit gegenüber pilzlichen Sekreten (MIYOSHI, 1895). Seitdem wurden artificielle Membranen hauptsächlich für die mikroskopische Analyse von Sporenkeimung, Appressorienentwicklung und Penetration genutzt. Im Folgenden verdeutlichen Beispiele aus der Literatur die Bandbreite der eingesetzten Membranen und getesteten Pilze. Goldfolie bzw. mit Gold

beschichtetes Zellophan wurde neben Glas, Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon), Polyethylen-terephthalat (PET, Mylar), Surlyn (neutralisiertes Ko-Polymer der Polyethylenmetacrylsäure), Polymethylmetacrylat (PMMA), Polyethylen (PE) und p-Phenylenterephthalamid (Kevlar) für Penetrationstests bei *M. grisea* verwendet (HOWARD ET AL., 1991). Weiterhin wurde bei *M. grisea* der Einfluss von hydrophiler und hydrophober Oberfläche auf die Keimung und Appressorienentwicklung mit Hilfe von GelBond-Membranen, die über eine hydrophile und eine hydrophobe Seite verfügen, getestet (MITCHELL & DEAN, 1995; EILBERT ET AL., 1999; ZHAO ET AL., 2005; ZHENG, ET AL., 2007). Auch Deckgläschen aus Kunststoff (*plastic cover slips*) wurden für Untersuchungen bei *M. grisea*, u. a. über den Einfluss von Stimulatoren der Keimung und Appressorienbildung (z. B. cAMP, IBMX), routinemäßig eingesetzt (XU ET AL., 1997; WEBER ET AL., 2001; ZHAO ET AL., 2005). Bei Rostpilzen kamen unterschiedliche artifizielle Membranen [z. B. Mylar und Teflon (DEISING ET AL., 1992) und PE (DEISING ET AL., 1995)] zum Einsatz. Neben inerten Membranen, die nicht enzymatisch abbaubar sind, können auch biologisch abbaubare Membranen verwendet werden. So konnten u. a. *P. pachyrhizi*, *C. lagenarium*, *E. graminis* und *M. grisea* auf Nitrozellulosemembranen erfolgreich inkubiert werden (KOCH & HOPPE, 1988; KUBO ET AL., 1982; DICKINSON, 1979; HOWARD & FERRARI, 1989).

1.3.2 Herstellung

Die während dieser Arbeit durch das Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik Halle/Saale hergestellten Polymer- und Metaldünnschichten wurden, im Fall von PTFE und Gold, durch Hochfrequenz-Magnetron-Sputtern hergestellt. Bereits seit den 1970er Jahren werden dünne Polymerschichten (auch als Plasmapolymerschichten bezeichnet) mittels der HF-Technik (Hochfrequenz-Sputtern) abgeschieden (BIEDERMAN, 2000), wobei zwischen gesputterten und plasmapolymersierten Schichten unterschieden wird. Die Bezeichnung „Hochfrequenz“ geht auf die Verwendung von Anregungsfrequenzen zwischen 100 kHz bis 30 MHz zur Erzeugung des Plasmas während des Sputterprozesses zurück. Die chemische Struktur von gesputtertem PTFE weist eine im Vergleich zum Ausgangsmaterial deutlich ungeordnetere und höher vernetzte Struktur auf (BIEDERMAN ET AL., 2001). KÜSTER ET AL. (2008) verglichen mit Hilfe von FTIR-Spektroskopie (Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie) und XPS (Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie) die chemische Struktur des gesputterten Schichtmaterials mit der des Targetmaterials. Im Vergleich zum Target konnten in der gesputterten Schicht nur noch Reste der Dipol-Struktur gefunden werden. Auch hinsichtlich der Bindungen gab es Unter-

Einleitung

schiede. Während im Target die - CF₂ - CF₂ - Struktur vorherrscht, gibt es in der gesputterten Schicht unterschiedliche Bindungstypen. Die gesputterten Schichten werden daher auch als PTFE-ähnlich bezeichnet. Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen, durch die KÜSTER ET AL. (2008) Rückschlüsse auf die Hydrophobizität unterschiedlicher Materialien ziehen konnten, sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessung unterschiedlicher Substrate

Substrat	Kontaktwinkel	Quelle
Reisblatt	136,4° ± 1,0°	KÜSTER ET AL., 2008
Maisblatt	122,0° ± 0,6°	KÜSTER ET AL., 2008
Gesputterte Goldfolie	70,4° ± 0,8°	KÜSTER ET AL., 2008
PTFE (Target)	101,0° ± 0,3°	KÜSTER ET AL., 2008
PTFE gesputtert (110 nm)	107,9° ± 0,8°	KÜSTER ET AL., 2008
PTFE gesputtert (160 nm)	114,7° ± 0,3°	KÜSTER ET AL., 2008
PTFE gesputtert (1000 nm)	121,6° ± 0,7°	KÜSTER ET AL., 2008
PMMA (Spin-Coating, 120 nm)	65,1° ± 0,9°	WILLERS, 2007

Während Reis- und Maisblätter sowie die PTFE-Schichten im hydrophoben Bereich angesiedelt sind, konnte WILLERS (2007) Ergebnisse für eine 120 nm PMMA-Schicht präsentieren, die den hydrophilen Charakter dieses Substrates abbildet. Auch die gesputterten Goldschichten sind als hydrophil zu charakterisieren.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Versorgung der stetig wachsenden Weltbevölkerung (2012 ca. sieben Milliarden; [HTTP://WWW.BAYERCROPSCIENCE.COM/BCSWEB/CROPPROTECTION.NSF/ID/DE_ERNAEHRUNGSSICHERUNG](http://www.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf/id/de_ernaehrungssicherung)) muss auch in Zukunft gesichert werden. Neben des erwarteten Rückganges der pro Kopf verfügbaren landwirtschaftliche Fläche (bis 2050 um ca. 30 %; [HTTP://WWW.BAYERCROPSCIENCE.COM/BCSWEB/CROPPROTECTION.NSF/ID/DE_ERNAEHRUNGSSICHERUNG](http://www.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf/id/de_ernaehrungssicherung)) sind auch die Ernteverluste durch abiotische und biotische Stressfaktoren nicht außer Acht zu lassen. Die Verluste der Welternte durch Krankheitserreger, Schädlinge und Unkräuter wird auf ca. ein Drittel geschätzt, wobei alleine die Krankheitserreger die Ernten um ca. 10 % schrumpfen lassen ([WWW.ISPPWEB.ORG/FOODSECURITY_BACKGROUND.ASP](http://www.isppweb.org/foodsecurity_background.asp)).

Um ein besseres Verständnis der Pathogenese pflanzenpathogener Pilze zu erlangen, ist es nötig, Determinanten zu identifizieren, die für den Befall der Wirtspflanze essenziell sind. Es sollen zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden, die neue Erkenntnisse hinsichtlich des Infektionsverlaufes, und hier im Besonderen der Penetrationskompetenz, einer Auswahl an pflanzenpathogenen Pilzen bringen könnten. Die verwendeten Pathogene bilden melanisierte (*Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum graminicola*) bzw. nicht-melanisierte (*Phakopsora pachyrhizi*) Appressorien, die es den Pilzen ermöglichen, mittels Druckpenetration in ihre Wirtspflanzen einzuwachsen. Für das Maispathogen *Colletotrichum graminicola* soll mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation (ATMT) eine Transformantenbank erstellt und nachfolgend, durch Überprüfung des Phänotyps auf der Wirtspflanze Mais, auf Virulenz- bzw. Pathogenitäts-defiziente Mutanten gescreent werden. Das disruptierte Gen dieser Mutanten könnte in einem nachfolgenden Projekt charakterisiert werden und somit neue Erkenntnisse hinsichtlich der Gene, die für die Entwicklung auf der Pflanze nötig sind, geben.

Ein zweiter Ansatz soll zur Etablierung eines Inokulationssystems artifizieller Membranen führen. Artificielle Membranen wurden bereits in der Vergangenheit als Substrate für pflanzenpathogene Pilze verwendet. Während dieser Arbeit werden durch das Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik Halle/Saale Dünnschichten mit reproduzierbaren Eigenschaften (z. B. Schichtdicke) hergestellt. Durch die Entwicklung eines standardisierten Inokulations- und Dokumentationssystems könnte dieser Ansatz das Screening von Transformantenbanken zukünftig erleichtern. Ist die Methode etabliert, sollen pflanzenpathogene Pilze

Einleitung

mit melanisierten und nicht-melanisierten Appressorien hinsichtlich ihrer Penetrationskompetenz untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Biologische Materialien

2.1.1 Pilze

2.1.1.1 Verwendete Isolate

In Tabelle 2 sind die während dieser Arbeit verwendeten Pilzisolat und ihre Herkunft bzw. Quelle aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Pilzisolat

Pilz	Isolat	Quelle/Herkunft
<i>Colletotrichum graminicola</i>	M2	PANACCIONE ET AL., 1988
	$\Delta Cgpk1$ (KO und ECT)	HORBACH, 2010
<i>Magnaporthe grisea</i>	ERA1-GFP	U. Schaffrath (RWTH Aachen)
<i>Magnaporthe oryzae</i>	TH6772	U. Schaffrath (RWTH Aachen)
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>		U. Schaffrath (RWTH Aachen)

2.1.1.2 Kultivierung

Colletotrichum graminicola

Für die hier beschriebenen Arbeiten wurde das *C. graminicola* Isolat M2 verwendet. Die Anzucht erfolgte auf *oat meal agar* (OMA; siehe Abschnitt 7.4.3) bei 23 °C und Schwarzlicht (Sylvania Blacklight-Blue F 8 W/BLB-T5, Osram, Deutschland) in einem Inkubationsschrank (BOD 400, Uni Equip, Martinsried, Deutschland). Für Inokulationen wurden 14 Tage alte Platten verwendet. Die Anzuchtbedingungen der mittels ATMT erzeugten Einzelsporisolate unterschied sich nicht von der des Wildtyp-Isolates.

Die Integration einer Hygromycin B-Resistenzkassette in den ORF von PKS1 resultierte in der Deletion des Genes (Details siehe HORBACH, 2010). Die Anzucht von $\Delta Cgpk1$ erfolgte analog der des Wildtyp-Isolates.

Magnaporthe grisea/oryzae

M. oryzae gehört zum *M. grisea* Spezies Komplex (COUCH & KOHN, 2002). Die *M. grisea* und *M. oryzae* Isolate ERA1-GFP und TH6772 wurden von Dr. U. Schaffrath (Institut für Biologie III, Pflanzenphysiologie, RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt. Für die Gewinnung von Konidien wurden die Isolate auf *potato dextrose agar* (PDA; siehe Abschnitt 7.4.3) angezogen. Nach der Übertragung von Myzelsegmenten auf frische PDA-Platten wurden diese zunächst für zwei Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die anschließende Inkubation unterschied sich nicht von der für *C. graminicola* beschriebenen Methode. Nach erkennbarer Dunkelfärbung des Myzels auf den Kulturplatten wurden die Sporen mit 0,01 % Tween 20/H₂O_{dest} und unter Zuhilfenahme eines Drigalski-Spatels suspendiert. Die Sporensuspension wurde vor der Verwendung als Inokulum durch eine Lage Miracloth Tissue (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) filtriert um eventuell vorhandenes Myzel zu entfernen. Für die Inokulation von PTFE-Schichten wurde dem Inokulum 3-Isobutyl-Methylxanthin (IBMX; 2,5 mM) zugesetzt. So konnte die Bildung von Appressorien stimuliert werden (LEE & DEAN, 1993).

Phakopsora pachyrhizi

Uredosporen von *Phakopsora pachyrhizi*, dem Erreger des Sojarostes, wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. U. Schaffrath (Institut für Biologie III, Pflanzenphysiologie, RWTH Aachen) frisch zur Verfügung gestellt. Die Lagerung der Sporen erfolgte bei Raumtemperatur und Dunkelheit, so konnte eine Keimfähigkeit der Sporen für ca. 14 Tage gewährleistet werden. Eine Inkubation der Sporen in Wasser für ca. 4 Stunden vor der Inokulation brachte die besten Ergebnisse hinsichtlich Keimrate und Appressorienbildung (mündliche Absprache mit Dr. U. Schaffrath).

2.1.2 Pflanzen

2.1.2.1 Verwendete Sorte

Für die Inokulationsversuche mit *Colletotrichum graminicola* wurde die Maissorte Nathan verwendet. Es handelt sich hierbei um einen mittelfrüh reifenden Silomais der KWS Saat AG (Einbeck, Deutschland).

2.1.2.2 Anzucht

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus in Töpfen mit einem Durchmesser von 9 cm mit maximal sechs Pflanzen je Topf. Als Substrat diente gedämpfte Komposterde und Einheitserde ED73 (Hochmoortorf, Naturton und NPK Düngung) im Verhältnis 5:1, auf eine Düngung wurde verzichtet. Die Temperatur während der Anzucht lag, je nach Tages- und Jahreszeit, bei 22 - 30 °C (SERFLING ET AL., 2007 B). Als Lichtquellen dienten Hochdruck-Metallhalogendampf-Lampen (HRI[®]-BT 400 W/daylight E 40, Radium Lampenwerk GmbH, Wipperfürth, Leuchtmittel Master HPI-TPlus 400W, Philips). Für die Inokulation von Blattsegmenten wurden 14 Tage alte Pflanzen verwendet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (ATMT)

2.2.1.1 Prüfung der Sensitivität des *C. graminicola* WT-Isolates auf Hygromycin B

Zur Überprüfung der Hygromycin B-Sensitivität wurde *C. graminicola* unterschiedlichen Hygromycin B-Konzentrationen in Selektionsmediumplatten (SM; siehe Abschnitt 7.4.3) ausgesetzt. Hierfür wurden Myzelstücken von OMA-Platten auf die vorbereiteten Nährmediumplatten inokuliert und bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ergebnis (siehe Abschnitt 3.1.1) wurde für die Auswahl der geeigneten Hygromycin B-Konzentration für die Selektion putativer Transformanten verwendet.

2.2.1.2 Verwendeter *Agrobacterium tumefaciens* Stamm und dessen Anzucht

Für die Transformation wurde der *A. tumefaciens* Stamm LBA1100/pPK2 verwendet. Stamm LBA1100 wurde durch Prof. Dr. P. J. J. Hooykaas (Leiden University, Institute of Molecular Plant Sciences, Niederlande) zur Verfügung gestellt, das Plasmid pPK2 durch Prof. Dr. P. Tudzynski (Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Lehrstuhl für Allgemeine Botanik/Mikrobiologie, Deutschland). Wie von BEIJERSBERGEN ET AL. (1992) beschrieben, trägt der verwendete Stamm ein Helferplasmid (pAL1100) mit den *vir*-Genen und einer Spektinomycin-Resistenzkassette. Die Transformation von LBA1100 mit pPK2 wurde im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (FLOSS, 2004), der transformierte Stamm lag als Kryokultur

vor. Abbildung 5 zeigt die Vektorkarte von LBA1100/pPK2. Bei pPK2 handelt es sich um ein binäres Vektorsystem. Die T-DNA trägt das Gen für die Hygromycin B-Resistenz (Hygromycin-Phosphotransferasegen) unter Kontrolle des *Aspergillus nidulans gpd* Promotors und des *trpC* Terminators.

Aufgrund der auf der T-DNA enthaltenen Hygromycin-Resistenzkassette, der Kanamycin-Resistenzkassette (KanR) von pPK2 und der Spektinomycin-Resistenzkassette des Helferplasmides erfolgte die Anzucht von LBA1100/pPK2 in Luria Broth-Medium (LB; siehe Abschnitt 7.4.3) mit je 50 µg/ml Kanamycin und Spektinomycin. Zu Beginn der Transformation wurde LB-Medium mit den o. g. Antibiotika mit LBA1100/pPK2 angeimpft und bei 28 °C und 110 rpm über Nacht im Kulturschüttler (Classic C25, New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA) kultiviert. Die OD₆₆₀ der Übernachtskultur wurde mittels Spektrophotometrie (Uvikon 933 Double Beam UV/VIS Spektrophotometer; Kontron Instruments, Mailand, Italien) bestimmt. Die Zellen der Übernachtskultur wurden mit Induktionsmedium (IM; siehe Abschnitt 7.4.3) auf eine OD₆₆₀ von ca. 0,15 verdünnt, wobei das Gesamtvolumen der Kultur 20 ml nicht überschreiten sollte. Diese Bakteriensuspension wurde bis zu einer OD₆₆₀ zwischen 0,6 und 0,8 unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Bis zur Verwendung der Bakteriensuspension wurden die Zellen auf Eis gelagert.

2.2.1.3 Co-Kultivierung

Für die Transformation von *C. graminicola* eignet sich die Verwendung von Sporen, da diese durch eine Anzucht des Pilzes auf OMA in hoher Dichte gebildet werden. Optimal ist die Verwendung von Sporen einer 14 Tage alten Kultur. Die Konidien wurden mit IM von der Platte abgespült und die Sporendichte auf 10⁶/ml eingestellt.

Um den Bakterien die Gelegenheit zur Übertragung der T-DNA auf die Sporen zu geben, wurden Sporen und Bakterien co-kultiviert. Je 100 µl Sporen- und Bakterienlösung wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gemischt und auf einen auf einer IMAS-Platte (siehe Abschnitt 7.4.3) liegenden Cellulosefilter aufgetropft. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln für drei Tage inkubiert. Anschließend wurde das Filterpapier auf PDA-Platten mit 100 µg/ml Hygromycin B und 200 µg/ml Cefotaxim übertragen. Die weitere Inkubation fand bei Raumtemperatur und Licht statt. Nach ca. 14 Tagen wurde das Filterpapier entfernt und Kolonien resistenter Pilztransformanten waren auf dem Medium gewachsen.

2.2.1.4 Bestimmung der Transformationseffizienz

Für die Co-Kultivierung wurden je 100 µl Sporensuspension von *C. graminicola* mit 100 µl Bakteriensuspension gemischt, das gesamte Volumen auf einen auf einer IMAS-Platte liegenden Cellulosefilter aufgetropft und für drei Tage bei Raumtemperatur inokuliert. Der Filter wurde anschließend auf SM-Medium mit Hygromycin B (100 µg/ml) und Cefotaxim (200 µg/ml) übertragen.

2.2.1.5 Selektion putativer Transformanten und die Erzeugung von Einzelsporisolaten

Als putative Transformanten wurden im Folgenden Kolonien angesehen, die auf Hygromycin B-haltigem Medium wachsen konnten. Diese wurden isoliert und auf SM-Platten übertragen. Nach einer ca. 14-tägigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und Tageslicht wurden OMA-Platten mit Myzelstücken der Transformanten angeimpft und bei 23 °C und Schwarzlicht inkubiert. Dieser Schritt war nötig, um Konidien für die Einzelsporisation zu erzeugen. Einzelsporisolate sind Kolonien, die auf eine einzelne Spore zurückgehen und somit genetisch homogen sind. Dies ist für die Charakterisierung der Transformanten mit dem Ziel, Pathogenitäts- bzw. Virulenzgene zu identifizieren, unabdingbar.

Von jeder Transformante wurde eine Sporensuspension mit 10^6 Sporen/ml hergestellt. Von dieser Suspension wurden Verdünnungen angefertigt (1:100, 1:1.000) und jeweils ein Aliquot (25 µl) mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf Selektionsmedium ausgebracht. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und Tageslicht für drei Tage. Einzelne Kolonien konnten isoliert und auf PDA/HygB-Platten übertragen werden. Die Bezeichnung der ESI (Einzelsporisolate) erfolgte durch fortlaufende Nummerierung mit dem Vorzeichen „AT“.

2.2.1.6 Lagerung

Von jedem angefertigten Einzelsporisolat lagern Kryokulturen bei -80 °C. Für die Anfertigung der Kulturen wurden je zwei sterile Filterpapierstreifen (ca. 0,5 x 2 cm) auf eine OMA-Platte gelegt und diese anschließend mit einem Myzelstück inokuliert. Nach 14 Tagen konnten diese nun mit Myzel überwachsenen Streifen von den Platten entfernt und in 50 % Glycerol (steril) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gelagert werden.

Weiterhin wurden die Einzelsporisolate, die für makroskopische und mikroskopische Untersuchungen verwendet wurden, bei 4 °C auf PDA/HygB-Platten gelagert. Ausgehend von diesen Platten konnten OMA-Platten angeimpft werden.

2.2.2 Präparation genomischer DNA

2.2.2.1 Anzucht der Einzelsporisolate

Der Nachweis der Integration der T-DNA in das Genom von *C. graminicola* erfolgte auf zwei Wegen:

- Wachstumstest auf Hygromycin B-haltigem Medium (siehe Abschnitt 3.1.1),
- Nachweis der Hygromycin B-Resistenzkassette mittels spezifischer Primer (PCR, siehe Abschnitt 3.2.3).

Nach dem Selektionsschritt auf Hygromycin B-haltigem Medium erfolgte der Nachweis der integrierten Hygromycin B-Resistenzkassette mittels PCR für einige ausgewählte ESI. Für die Isolation genomischer DNA aus Myzel wurden Myzelstücken aus OMA-Medium ausgeschnitten und in flüssiges CM überführt. Im Erlenmeyerkolben erfolgte die Inkubation bei 23 °C und 120 rpm für sieben Tage in einem Inkubationsschüttler (Infors Uvitron, Bottmingen, Schweiz).

2.2.2.2 Isolation genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA aus Einzelsporisolaten erfolgte nach dem Protokoll von DÖBBELING ET AL. (1997). Das in CM gewachsene Myzel wurde filtriert und überschüssiges Medium mittels Filterpapier aufgenommen. In flüssigem Stickstoff wurden ca. 500 mg Myzel mit Mörser und Pistill aufgeschlossen und das entstandene Pulver in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 800 µl Extraktionspuffer (7 M Harnstoff, 2 % (w/v) SDS, 5 mM EDTA pH 8,0) und 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1; AquaPhenol™ *water saturated*, Qbiogene, Heidelberg, Deutschland) wurde durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland) für 5 min und 20000 g bei 4 °C eine Phasentrennung erreicht. Die obere Phase wurde isoliert, mit 1 Volumen Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Die Zugabe von 1 Volumen Isopropanol führte zur Fällung der DNA. Durch den anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min bei 6800 g und 4 °C) bildete sich ein Pellet, welches in

700 µl Tris-EDTA-Puffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0) aufgenommen wurde. Vorhandene RNA wurde durch die Zugabe von 3,5 µl DNase freier RNase A (10 mg/ml, 10 min bei 95 °C; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und Inkubation bei 37 °C für 30 min abgebaut. Die enzymatische Reaktion wurde mittels Zugabe von 17,5 µl 20 % SDS gestoppt. Anschließend erfolgte ein Proteinase K-Verdau (10 µl einer 14 - 22 mg/ml Proteinase K-Lösung; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bei 60 °C für 60 min. Eine erneute Extraktion der Proben mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (10 min bei 20000 g und 4 °C) und die anschließende Fällung der DNA mit Isopropanol (1 Volumen) schlossen sich an. Das nun sichtbare DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (5 min bei 20000 g). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung

Für die nach obigem Protokoll extrahierte genomische DNA wurde die Konzentration der Nukleinsäure und die Reinheit bestimmt.

Die Konzentration an genomischer DNA ergibt sich aus der mittels Photometrie bestimmten Extinktion (E) der wässrigen Lösung, wobei folgender Zusammenhang gilt:

$$E_{260} = 1 \text{ entspricht } 50 \text{ } \mu\text{g/ml an dsDNA.}$$

2.2.3 *Polymerase chain reaction (PCR)*

Der interessante Bereich der DNA bei den ATMT Einzelsporisolen ist die integrierte T-DNA mit der Hygromycin B-Resistenzkassette. Da dieses DNA-Stück nur in den ESI und nicht im Wildtyp-Isolat vorhanden ist, eignet es sich hervorragend, die vorangegangene Selektion auf Hygromycin B-haltigem Medium molekular zu bestätigen. Während der Arbeit von FLOSS (2004) wurden Primer abgeleitet, die zum einen im Bereich des Hygromycin B-Genes (Hyg1; *reverse*), zum anderen im Promotorbereich des Genes (Gpd; *forward*) liegen (siehe

Abbildung 5). Die Basenabfolge der Primer zeigt Tabelle 8 im Anhang. Das durch beide Primer amplifizierte DNA-Stück hat eine Größe von 1000 bp.

Material und Methoden

Die Zusammensetzung eines 20 µl PCR-Ansatzes ist in Tabelle 3 aufgezeigt, der Ablauf des verwendeten PCR-Programmes (Biometra Thermocycler, T-Personal, Göttingen, Deutschland) in Tabelle 4.

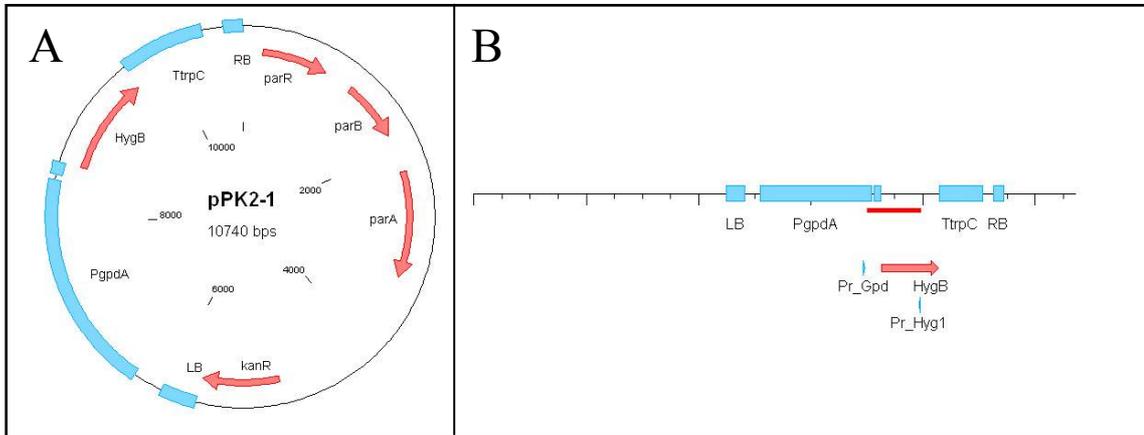


Abbildung 5: Vektor pPK2

A: Vektorkarte pPK2 ; B: Primerbindestellen. LB = *left border*; RB = *right border*; Pgpda = Promotor; TtrpC = Terminator; Pr_Gpd = Bindestelle Primer Gpd; Pr_Hyg1 = Bindestelle Primer Hyg1. Der rote Balken (Abb. B) zeigt den zu amplifizierenden Bereich.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines 20 µl PCR-Ansatzes

Komponente	Endkonzentration im Ansatz	Eingesetzte Menge
H ₂ O _{bidest}	/	12,3 µl
Puffer	1 x	1 µl
MgCl ₂	1,5 mM	1,2 µl
dNTP's	je 0,2 mM	0,5 µl (Gemisch)
Primer (<i>forward, reverse</i>)	je 0,5 µM	je 1 µl
Taq	/	1 µl der 1:50 Verdünnung
Template DNA	10 ng	1 µl

Tabelle 4: Ablauf des verwendeten PCR-Programmes

Schritt 1	Initiale Denaturierung	7 min	95 °C
Schritt 2	Denaturierung	30 s	95 °C
Schritt 3	Annealing	45 s	T _{opt} (58 °C)
Schritt 4	Elongation	50 s	72 °C
Wiederholung der Schritte 2 bis 4 (Anzahl Zyklen 40)			
Schritt 5	Abschließende Elongation	10 min	72 °C
Schritt 6	Abkühlen	∞	4 °C
Ende			

2.2.4 Gelelektrophorese und Färbung der DNA

Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. 0,8 % Agarose (w/v; Seakem LE-Agarose; Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) wurden in 50 ml TAE-Puffer [40 mM Tris (pH 8,3), 2 mM EDTA, 20 mM Na-Acetat] durch Aufkochen gelöst und zum Aushärten in einen Gelschlitten gegossen. Zu 10 µl des PCR-Ansatzes wurden 0,2 Volumen Ladepuffer [30 % (v/v) Glycerin, 5 x TAE-Puffer, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau] hinzugefügt und die Probe in eine Tasche des Geles pipettiert. In die flankierenden Taschen der aufgetragenen Proben wurde ein DNA-Größenstandard (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) aufgetragen. Als Kammerpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 80 V. Anschließend wurde das Gel 10 – 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert. Zur Dokumentation der Fluoreszenz wurde das Gel auf einem UV-Tisch (Multimage Light Cabinet, Alpha Innotec Corporation, San Leandro, USA) mit einer Wellenlänge von 320 nm bestrahlt, der mit einer Videodokumentationsanlage (AlphaImager, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) gekoppelt war.

2.3 Wachstums- und Infektionstests

2.3.1 Wachstums der ATMT-Einzelsporisolate auf PDA

PDA- und PDA/HygB-Platten wurden mit Myzelstücken exakter Größe (Durchmesser 0,5 cm), die von 14 Tage alten PDA-Platten der ESI und des WT-Isolates stammten, inokuliert. Für jedes Isolat wurden drei Wiederholungen auf jedem Medium angesetzt. Die Inkuba-

tion erfolgte bei 23 °C und Schwarzlicht. Im zwei Tage Rhythmus wurde der Durchmesser der Kolonien gemessen. Außerdem wurde die Entwicklung der Kolonien fotografisch dokumentiert.

2.3.2 Blattsegmenttest

Neben der Inokulation intakter Maispflanzen ist auch die Inokulation von Blattsegmenten möglich. Der Vorteil dieser Methode für das Screening einer großen Anzahl von Pathogenitätsmutanten liegt in der einfacheren Handhabung und der Platzersparnis im Gegensatz zu einem Ganzpflanzentest.

Für alle Blattsegmenttests, die während dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde das dritte Blatt 14 Tage alter Maispflanzen verwendet. Um Variationen in der Symptomausprägung zwischen zwei unterschiedlichen Pflanzen ausgleichen zu können, wurden Blätter von drei verschiedenen Maispflanzen verwendet. Die Inokulation erfolgte mit einer Sporensuspension, die Sporendichte variierte je nach Verwendungszweck des Ansatzes. Für einen makroskopischen Symptomtest wurde eine Sporendichte von 10^6 Sporen/ml verwendet, sollten hingegen Infektionsstrukturen ausgezählt werden, reichte eine 1:10 Verdünnung des Ansatzes aus. Die Sporenkonzentration wurde mit Hilfe einer Thoma-Kammer ermittelt.

Um eine 100%ige Luftfeuchte zu gewährleisten, die für die Keimung der Pilzsporen notwendig ist, wurden die Blattsegmente nach der Inokulation in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Ober- und Unterseite der Glasschale wurde mit Filterpapier versehen, das Filterpapier in der oberen Glasschale mit Wasser angefeuchtet. An dem unteren Filterpapier wurden die Blattsegmente mit Klebeband befestigt und mit Tropfen einer Sporensuspension (10 µl) inokuliert. Zur Vermeidung der Austrocknung wurden die Glasschalen mit Parafilm verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 23 °C und indirektem Licht in einem Inkubationsschrank (BOD 400, Uni Equip, Martinsried). Die makroskopische und mikroskopische Dokumentation des Infektionsverlaufs und der eventuell vorhandenen Symptome erfolgte nach vier und sechs Tagen.

Die Inokulation von Blattsegmenten für die Mikroskopie erfolgte zum größten Teil analog der eben beschriebenen Methode. Es wurde jeweils der Mittelteil der dritten Blätter 14 Tage alter Pflanzen verwendet, die Mittelrippe wurde vorsichtig mit einer Rasierklinge entfernt und das Blatt anschließend in ca. 2 cm lange Segmente unterteilt. Diese wurden mit je 2 x 10 µl Ino-

kulum (ca. $1 - 2 \times 10^5$ Sporen) inokuliert und in mit Wasseragar (siehe Abschnitt 7.4.3) gefüllte Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gelegt. Die Schalen wurden anschließend mit Parafilm verschlossen.

2.3.3 Zwiebelepidermen

Für die Inokulation von Zwiebelepidermen mit *C. graminicola* wurden handelsübliche Zwiebeln geschält, geviertelt und die Epidermis vorsichtig abgezogen. Diese wurden auf Wasseragar (siehe Abschnitt 7.4.3) gelegt und konnten anschließend mit einer Sporensuspension, analog dem Verfahren bei Blattsegmenten (siehe Abschnitt 2.3.2), inokuliert werden.

2.3.4 Artificielle Materialien

2.3.4.1 Metall- und Polymerdünnschichten

2.3.4.1.1 Herstellung der Dünnschichten

Die Herstellung der Metall- und Polymerdünnschichten wurde von den an diesem Projekt beteiligten Mitarbeitern des Fraunhofer Instituts für Werkstoffmechanik Halle/Saale übernommen. Detaillierte Angaben der materialwissenschaftlichen Aspekte, z. B. der Herstellung und Charakterisierung der Dünnschichten, werden von HOFFMANN (2005), WILLERS (2007) und KÜSTER ET AL. (2008) gemacht. Über die für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Herstellungsverfahren gibt Tabelle 5 Auskunft.

Tabelle 5: Material und Herstellungsverfahren der Dünnschichten

Material	Formel	Herstellungsverfahren
Aluminium	Al	Sputtern
Gold	Au	Sputtern
Kupfer	Cu	Sputtern
PTFE		Sputtern
PMMA		Spin-Coating

Im Folgenden sollen die beiden zur Schichtenherstellung verwendeten Verfahren (Sputtern, Spin-Coating) vorgestellt werden.

Die Herstellung der PTFE-Schichten erfolgte mittels Hochfrequenz-Magnetron-Sputtern (RF-Generator und Match Box RFX-600 von Advanced Energy Industries GmbH, Filderstadt-Bonlanden, Deutschland; Magnetron ION'X von Thin Film Consulting, Grafenberg, Deutschland). Der schematische Aufbau einer solchen Anlage ist in Abbildung 6 A dargestellt. Als Arbeitsgas wurde Argon verwendet, die Erzeugung des Plasmas erfolgte durch Anlegen eines hochfrequenten Wechselfeldes ($f = 13,56 \text{ MHz}$) (HOFFMANN, 2005). Die Dicke der entstehenden Schicht konnte durch die Länge des Sputterprozesses bei gleichbleibender Leistung (500 W) gesteuert werden. Die Dicke der hergestellten Schichten wurde mittels eines Profilometers (Dektak 3030 ST, Veeco Germany, Mannheim, Deutschland) überprüft. Für diese Messungen wurden unbeschichtete Glasobjektträger den eigentlichen Substraten beim Sputterprozess beigefügt. Anschließend wurden Schicht und Substrat eingeritzt. Durch profilometrische Bestimmung der Höhenunterschiede von Substrat und Schicht im Bereich des Kratzers konnte auf die Schichtdicke geschlossen werden (HOFFMANN, 2005).

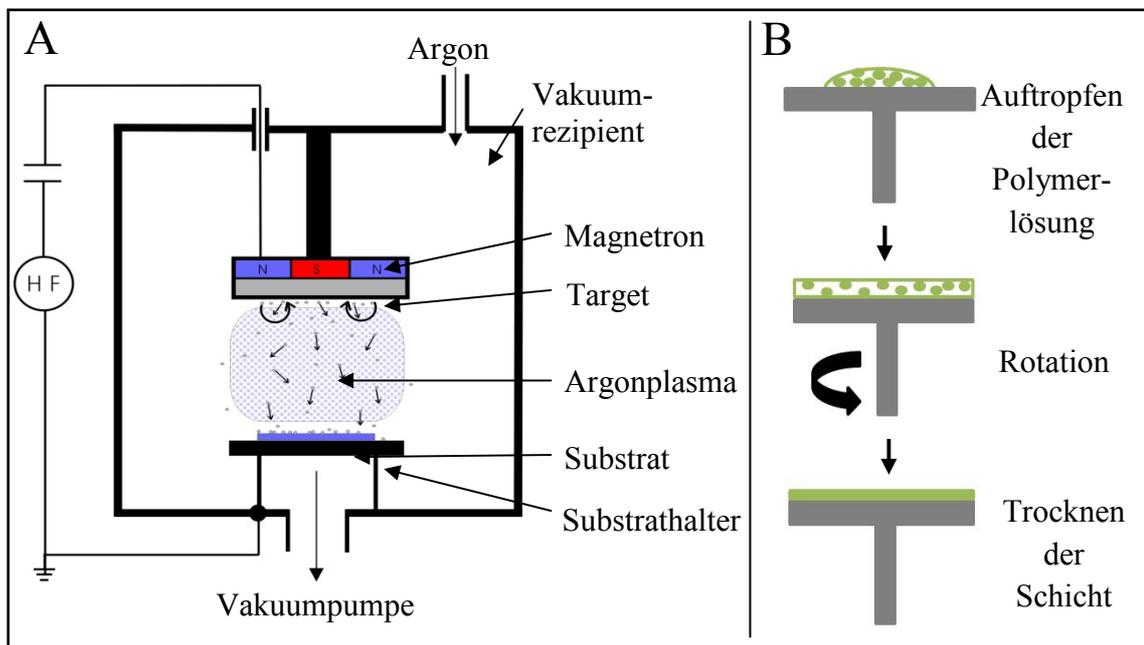


Abbildung 6: Schichtenherstellung (Schema)

A: Quelle: HOFFMANN, 2005.

B: Quelle: [HTTP://MATERIALS.WEB.PSI.CH/RESEARCH/THIN-FILMS/METHODS/IMAGES/SPIN.JPG](http://materials.web.psi.ch/research/thin-films/methods/images/spin.jpg).

Das Spin-Coating (Abbildung 6 B) ist eine geläufige Methode zur Produktion dünner, unifo-rmer Polymerschichten. Diese Methode wird vor allem in der Mikroelektronikindustrie zur Herstellung von Fotolacken eingesetzt. Ein polymerenthaltendes Lösungsmittel wird hierbei auf ein Substrat aufgebracht und durch die Wirkung von Zentrifugalkräften sternförmig ver-teilt (HALL ET AL., 1998). Im Folgenden wird die Schicht so lange dünner, bis eine Gleichge-wichtsdicke erreicht ist oder die Schicht aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels zu-nehmend viskoser wird (HALL ET AL., 1998). Der lockere Verbund der Polymermoleküle setzt sich während des Trocknens ab und bildet so die Dünnschicht. Die Dicke ist abhängig vom Gehalt an Polymer im Lösungsmittel und von der Rotationsgeschwindigkeit (HALL ET AL., 1998). Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Schichten wurde 2-Butanon als Lösungsmittel verwendet, mit einem Gehalt von max. 3 % (w/w) PMMA in der Lösung. Op-timale Rotationsgeschwindigkeiten lagen zwischen 3000 und 6000 U/min (WILLERS, 2007).

Die durchgeführten Arbeiten ließen sich in drei Bereiche gliedern: Die Herstellung der Schichten (siehe Abschnitt 2.3.4.1.1), die anschließende Inokulation mit Sporen unterschied-licher Pilze (siehe Abschnitt 2.3.4.1.2) und die mikroskopische Auswertung der Entwicklung von Infektionsstrukturen (siehe Abschnitt 2.5), siehe Abbildung 7.



Abbildung 7: Schema - Schichtenherstellung, Inokulation und Auswertung (nach HOFF-MANN, 2005)

2.3.4.1.2 Inokulation artifiziieller Schichten

Lagerung

Die Metall- bzw. Polymerdünnschichten wurden nicht direkt auf einen Objektträger aufge-bracht. Zwischen der Glasoberfläche und der Schicht befand sich eine ca. 100 nm dicke Kali-umbromidschicht (KBr), so dass sich die darauf befindliche Dünnschicht bei Kontakt mit

Wasser vom Objektträger lösen konnte. Die Lagerung der Schichten bis zur Verwendung erfolgte daher in einem mit Silikat (Silica Gel Orange, Carl Roth GmbH) gefüllten Exsikkator.

Vorbereitung der Schichten

Zu Beginn der Arbeit wurden unterschiedliche Metallschichten (siehe Tabelle 5) auf ihre Anwendbarkeit für die Beurteilung von Pilzwachstum getestet. Hierfür wurden Objektträger entweder komplett oder unter Verwendung einer Maske (HOFFMANN, 2005) mit Metallen besputtert. Abbildung 8 B zeigt schematisch einen Objektträger, nachdem eine Goldschicht mit Hilfe einer Maske aufgebracht wurde. Die Inokulation dieser Schichten erfolgte noch abweichend von dem in Abbildung 9 gezeigten Schema. Durch Eintauchen der beschichteten Objektträger lösten sich die Metallschichten vom Glas und schwammen freitragend auf der Wasseroberfläche (Abbildung 8 A). Die Schichten wurden entweder direkt oder nach Abfischen mit einem TEM-Netz (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) durch Aufpipettieren einer Sporenlösung inokuliert.

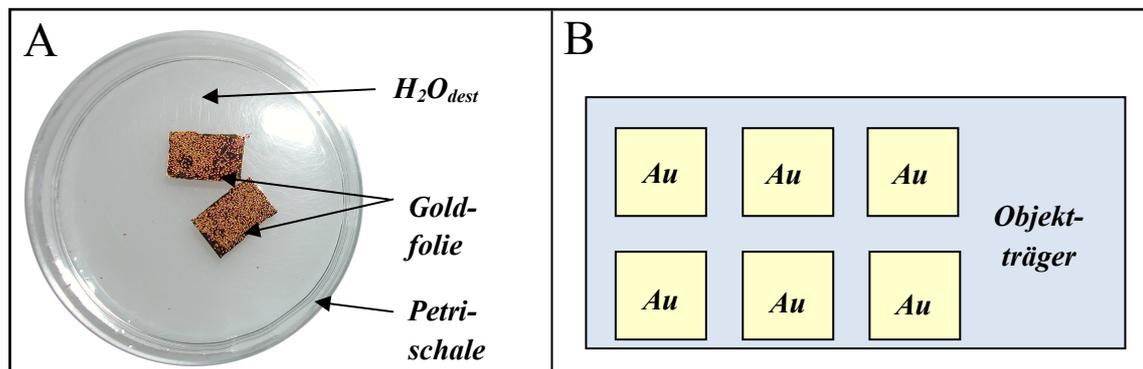


Abbildung 8: Herstellung und Präparation von Goldschichten

A: abgelöste Goldschichten auf H_2O_{dest} .

B: gesputterte Goldschichten bei Verwendung einer Maske (Schema); Au = Goldschicht.

Vor der Applikation der Sporenlösung auf Polymerschichten wurden die Schichten an den Rändern mit einer Rasierklinge eingeritzt, um das Ablösen der Schichten nach Wasserzugabe zu erleichtern.

Inokulation

Die Inokulation von Dünnschichten erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden. Zu Beginn der Arbeiten wurde die Sporensuspension auf bereits schwimmende Schichten

aufpipettiert (Tropfengröße ca. 5 μ l). Später erfolgte die Umstellung auf die in Abbildung 9 gezeigte Sprühinokulation. Mittels eines Sprühhapplikators wurde eine Sporensuspension mit ca. 10^6 Sporen/ml auf die Schicht aufgesprüht. Anschließend wurde durch Zugabe von Wasser an den Rand des Objektträgers die Schicht abgelöst. Für die Zeit der Inkubation verblieb die Schicht schwimmend auf der Wasseroberfläche. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 23 °C für drei Tage.

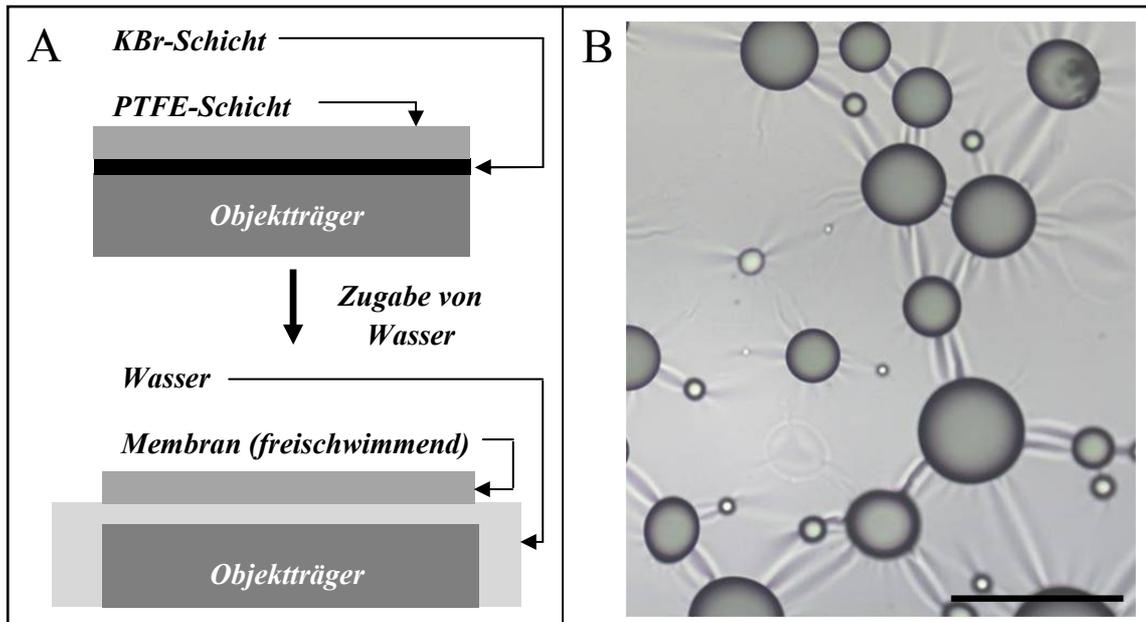


Abbildung 9: Sprühinokulation von Polymerschichten

A: Schematischer Ablauf der Ablösung von Polymerschichten (nach KÜSTER ET AL., 2008).

B: Inokulumtropfen auf einer frei schwimmenden Polymerschicht nach Sprühinokulation, Maßstab = 200 μ m.

2.3.4.2 PET-Folie und Glas

Eine weitere Möglichkeit, die Differenzierung von Infektionsstrukturen vergleichend zu beurteilen, bietet die Inokulation von PET-Folie (Overhead Folien, Avery Zweckform Nr. 3558) bzw. Glas-Deckgläschen (18 x 18 mm). Nach der Reinigung mit 70%igem Alkohol konnten Folienstücke (ca. 1 x 1 cm) bzw. Deckgläser nach der in Abschnitt 2.3.4.1.2 beschriebenen Methode inokuliert werden. Wurde zur Verbesserung der Keimfähigkeit dem Inokulum Maisblattextrakt (MBE; siehe Abschnitt 7.4.2) zugesetzt, wird an gegebener Stelle im Ergebnisteil darauf hingewiesen.

2.3.4.2.1 Inokulation von PET-Folien mit *Colletotrichum graminicola*

Die Bestimmung der Keim- und Appressorienbildungsraten der $\Delta Cgpk1$ Mutanten (KO1 und KO2) und der Mutante mit einer ektopischen Integration des KO-Konstruktes (ECT) im Vergleich zum WT-Isolat erfolgte auf PET-Folie zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (24, 48, 72 hpi). Neben der Keimrate wurde auch die Rate gebildeter Appressorien und der Anteil an Appressorien mit lateraler Keimung bestimmt.

2.3.4.2.2 Inokulation von Glas mit *Phakopsora pachyrhizi*

Für die Anzucht von *P. pachyrhizi* wurden Sporen in H_2O_{dest} aufgenommen und für ca. vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Abschnitt 2.1.1.2). Anschließend wurden 10 μl Inokulum auf Glasobjektträger aufgebracht und in einer feuchten Kammer bei 23 °C inkubiert.

2.4 Cytorrhizie

2.4.1 Bestimmung der Zellkollapsraten von *Colletotrichum graminicola* WT-Isolat und $\Delta Cgpk1$

Es gibt mehrere Möglichkeiten den Turgordruck von Zellen indirekt zu bestimmen. Für die vergleichende Bestimmung des Zellinnendruckes von melanisierten (WT, $\Delta Cgpk1$ ECT) und nicht-melanisierten ($\Delta Cgpk1$ KO) Appressorien von *C. graminicola* wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methode der Cytorrhizie gewählt. Hierbei wird die Molekülgröße des verwendeten Osmotikums so gewählt, dass eine Passage durch die Zellwand nicht möglich ist. Es kommt zum Flüssigkeitsaustritt aus der Zelle, die im Folgenden kollabiert (MONEY ET AL., 1998). Ein kollabiertes Appressorium ist an einer charakteristischen Einfaltung zu erkennen.

Als Osmotikum wurde ein Polyethylenglykol mit einer mittleren Molekülmasse von 6000 als wässrige Lösung mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,5 g/ml verwendet. Der osmotische Druck der verwendeten PEG-Lösungen konnte mit Hilfe folgender Gleichung berechnet werden:

$$\Pi = \alpha * C + \beta * C^2 \quad (\text{MONEY, 1989})$$

Der osmotische Druck Π (angegeben in MPa) ist eine Funktion der Molarität C und der Koeffizienten α und β . Die Werte für α und β sind spezifisch für die Molekülmasse der verwendeten PEG-Lösung (MONEY, 1989). Der externe osmotische Druck, der den Kollaps von 50 % der gezählten Appressorien induziert, kann dem Turgordruck im Appressorium in Wasser gleichgesetzt werden (HOWARD ET AL., 1991). Um die mikroskopische Auswertung der Zellkollapsversuche zu erleichtern, wurden Sporen in 10%igem MBE auf Glas-Deckgläschen inkubiert und die Kollapsraten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24, 48, 72 hpi) ausgezählt. Die Deckgläser wurden vor der mikroskopischen Auswertung mit der jeweils zu verwendenden PEG 6000 Lösung gespült und anschließend in einem frischen Tropfen der Lösung für 10 min inkubiert (HOWARD ET AL., 1991). Die Zählung von mindestens 50 Appressorien erfolgte auf drei Deckgläschen je Pilz.

2.4.2 Bestimmung der Zellkollapsrate von *Phakopsora pachyrhizi*

Die Bestimmung des osmotischen Druckes in den Appressorien von *P. pachyrhizi* wurde analog den Untersuchungen bei *C. graminicola* durchgeführt. Es erfolgte keine Zugabe von MBE zum Inokulum. Die Zählung der kollabierten Appressorien erfolgte 24 hpi.

2.5 Mikroskopie

2.5.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die Licht- und Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem Nikon Eclipse E600 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt. Vor der lichtmikroskopischen Untersuchung inokulierter Dünnschichten wurde ein Deckglas auf die Schicht aufgelegt. Als Hilfsmittel fungierte eine Einmalspritze, auf die eine Kanüle mit Gummisauger aufgesteckt wurde. Mit Hilfe eines 40x Objektivs (Plan Fluor, 40x/0.75/DIC M ∞ /0.17 WD 0.72; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) konnte die Entwicklung von Infektionsstrukturen auf und unter den Dünnschichten analysiert werden. Ein eindeutiger Vorteil der Polymerschichten, ihre Durchsichtigkeit, erlaubte die Auswertung mit einem Durchlicht-Mikroskop.

Für die Mikroskopie von Blattsegmenten erfolgte die Entfärbung (siehe Abschnitt 2.5.1.1) und Färbung (siehe Abschnitt 2.5.1.2) der Proben. Die Proben wurden anschließend mit einem Deckgläschen bedeckt. Für Aufnahmen der Infektionsstrukturen eignete sich die Ver-

wendung eines 100x Objektivs (Plan Fluor, 100x/1.30 Oil/DIC H ∞ /0.17 WD 0.20; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mit Ölimmersion.

2.5.1.1 Entfärben der Proben

In Vorbereitung auf das Färben der pilzlichen Infektionsstrukturen wurde das Chlorophyll der infizierten Blätter entfernt, so dass der Kontrast zwischen Infektionsstrukturen und pflanzlichem Material erhöht war. Hierfür wurden die Blattstücken für mindestens 24 Stunden in eine 3:1 Mischung aus vergälltem Ethanol und Chloroform gegeben (O'CONNELL ET AL., 2004). War das Ergebnis nach noch nicht zufriedenstellend, wurde die Entfärbelösung erneuert und die Proben für weitere 24 Stunden inkubiert.

2.5.1.2 Färbung von Infektionsstrukturen

Die Infektionsstrukturen von Pilzen können mit unterschiedlichen Farbstoffen angefärbt werden. Für die Färbung der oberflächlichen Strukturen und der Hyphen im Blattgewebe wurde in dieser Arbeit Anilinblau/Lactophenol verwendet (in Anlehnung an O'CONNELL ET AL., 2004). Die infizierten Blattbereiche wurden in der Färbelösung für drei Stunden bei 80 °C inkubiert, anschließend in Ethanol gespült, um überflüssige Färbelösung zu entfernen, und bis zum Zeitpunkt der Auswertung in 50 % Glycerol (HÜCKELHOVEN & KOGEL, 1998) bei 4 °C gelagert. Eine Stammlösung des Farbstoffes wurde 0,5%ig (w/v) angefertigt, die Verdünnung auf 0,025 % erfolgte mit Lactophenol.

Durch Zugabe des Chitin-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes Texas Red WGA (0,1 mg/ml in PBS mit 5 % BSA) zu der Flüssigkeit unter den inokulierten artifiziellen Membranen sollte die spezifische Färbung der Penetrationshyphen der Pilze erreicht werden. Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 min konnten die Proben mit dem entsprechenden Filterblock (TxRed, Ex: 540-580; DM: 595; BA: 600-660) ausgewertet werden.

2.5.2 Inverse Mikroskopie

Bei den undurchsichtigen Metallschichten wurde mit Hilfe eines inversen Mikroskopes (Axiovert 200M; Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 40x Objektiv nach Penetrationshyphen gesucht.

2.5.3 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Betrachtung von Infektionsstrukturen auf artifiziellen Membranen wurden mittels SEM [*scanning electron microscopy*, JSM 6700 (JEOL GmbH, Eching, Germany)] und ESEM [*environmental scanning electron microscopy*, ESEM E-3 (ElectroScan Hillsboro, OR, USA)] in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut Halle/Saale durchgeführt. Bei der Rasterelektronenmikroskopie wurden die mit einem TEM-Netz abgefischten Membranbereiche getrocknet und mit einem dünnen Karbonfilm beschichtet. Die Betrachtung der Proben erfolgte im Hochvakuum (1 - 20 kV) mit dem Everhart-Thornley-Detektor (ETD). Im ESEM wurden Proben ohne vorherige Trocknung und Beschichtung angesehen. Sie wurden entweder im Transmissionsmodus (STEM) oder mit einem GSED (*gaseous secondary electron detector*) betrachtet. Hier lagen die Werte für das Hochvakuum bei 5 - 30 kV.

2.6 Dokumentation

2.6.1 Makroskopische Dokumentation

Die makroskopische Dokumentation von Blattsegmenttests erfolgte mit einer digitalen Spiegelreflexkamera vom Typ Nikon D50 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Blattsegmente wurden direkt in den zur Inkubation verwendeten Glasschalen fotografiert, für die optimale Ausleuchtung der Proben sorgte ein Lichttisch (Prolite 5000, Kaiser Fototechnik, Buchen, Deutschland). Für die 20-fache Vergrößerung von Inokulationspunkten auf Blattsegmenten wurde ein Adapter (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) verwendet, der die Digitalkamera mit einem Binokular (SMZ 800, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) verband.

2.6.2 Mikroskopische Dokumentation

Für die Aufnahmen von Bildern mit dem Nikon Eclipse E60 wurde die Software NIS Elements (Nikon, Version 2.10) in Kombination mit einer Digitalkamera (Digital Sight DS-5M, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) verwendet.

2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der erhobene Daten wurde das Programm JMP 4 (SAS Institute Cary, NC, USA) genutzt. Mit Hilfe des paarweisen Mittelwertvergleichs (t-Test) wurden die ermittelten Werte verglichen und auf signifikante Unterschiede untersucht. Dabei wurde durchgängig ein Fehler von $\alpha = 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede wurden in den Diagrammen des Ergebnisteils entweder mit einem * gekennzeichnet oder mit ungleichen Buchstaben (Signifikanzklassen) versehen. Zusätzlich ist in den Diagrammen die Standardabweichung dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 ATMT von *Colletotrichum graminicola*

3.1.1 Sensitivität gegenüber Hygromycin B

Bei der Transformation von Pilzen mittels ATMT wird mit der T-DNA das Hygromycin B-Resistenzgen in das Genom des Pilzes übertragen, so dass Transformanten auf Hygromycin B-haltigem Medium wachsen können. Die toxische Wirkung von Hygromycin B beruht auf der Inhibierung der Proteinsynthese. Die Konzentration, die das Wachstum des WT-Isolates inhibiert, muss vor der Transformation ermittelt werden. Abbildung 10 zeigt das Wachstum des *C. graminicola* WT-Isolates auf unterschiedlichen Hygromycin B-Konzentrationen.

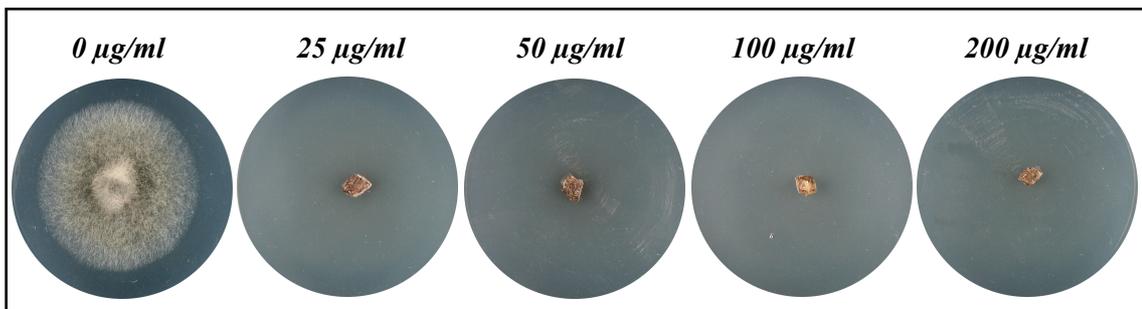


Abbildung 10: Sensitivitätstest von *C. graminicola* auf Hygromycin B

Wachstum des *C. graminicola* WT-Isolates auf Selektionsmedium (SM) mit unterschiedlichen Hygromycin B-Konzentrationen, Dokumentation nach sechs Tagen Inkubationszeit.

Nach sechs Tagen Inkubationszeit war es dem WT-Isolat nur möglich, auf Hygromycin B-freiem Medium zu wachsen. Die Zugabe von Hygromycin B in Konzentrationen von $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ inhibierte das Wachstum. Für die Selektion von Transformanten wurde den Platten $100 \mu\text{g/ml}$ Hygromycin B zugesetzt.

3.1.2 Transformationseffizienz

Die Transformationseffizienzen für drei unterschiedliche Transformationsansätze sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: Transformationseffizienzen

Spalte 1: Anzahl der Pilzsporen in der Co-Kultivierungssuspension; Spalte 2: Zelldichte der Bakteriensuspension; Spalte 3: Ergebnis von drei Transformationen in absoluten Zahlen (in Klammern der Mittelwert aus den drei Ansätzen).

Sporenkonzentration in der Co-Kultur	OD₆₀₀ LBA1100/pPK2	Erzielte Transformanten
100.000	0,64	0/30/50 (MW = 27)
130.000	0,58	24/19/19/16 (MW = 20)
150.000	0,64	13/52/43 (MW = 36)

Bei $1,5 \times 10^5$ eingesetzten Pilzsporen entstanden im Mittel 36 putative Transformanten je Transformationsansatz (200 μ l Sporen/Bakterien-Gemisch, siehe Punkt 2.2.1.4).

Nach der erfolgreichen Transformation und Selektion standen 500 Transformanten für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung. Die Anzucht von Kolonien jeder Transformante aus vereinzelt Sporen auf selektivem Medium führte zur Isolation von Einzelsporisolen (zwei je Transformante). Ein Teil dieser ESI wurde für die Inokulation von Maisblattsegmenten verwendet. Die Fähigkeit, Symptome auf Mais hervorzurufen, diente der Auswahl von ESI, bei denen ein Pathogenitäts- bzw. Virulenzdefekt vermutet wird. Mikroskopische Analysen des Infektionsverlaufs auf Mais könnten den Verdacht auf einen Defekt bestärken. Neben den während dieser Arbeit erzeugten ESI wurde ein ESI (AB.158) verwendet, das während der Arbeit von FLOSS (2004) entstand.

3.2 Charakterisierung der ATMT-Einzelsporisolate

3.2.1 Wachstum auf PDA

Im Gegensatz zum Wildtyp-Isolat ist es den Einzelsporisolaten möglich, auf Hygromycin B-haltigem Kulturmedium zu wachsen. Inwieweit sich die Zuwachsraten auf PDA und PDA/HygB unterscheiden, sollte ein Wachstumstest zeigen. Nach sechs Tagen Inkubationszeit hatte das WT-Isolat die Nährmediumplatte komplett bewachsen (siehe Abbildung 11 A). Bis auf AT.147, AT.391, AT.395 und AT.399 zeigten alle ESI ein signifikant langsames Wachstum. Verdeutlicht wird das Ergebnis der Messungen durch die Bilder der Platten (siehe Abbildung 11 B). Auf PDA/HygB konnte das WT-Isolat, wie erwartet, nicht wachsen. Alle

Ergebnisse

getesteten ESI zeigten ein signifikant erhöhtes Wachstum im Vergleich zum WT (siehe Tabelle 9 im Anhang).

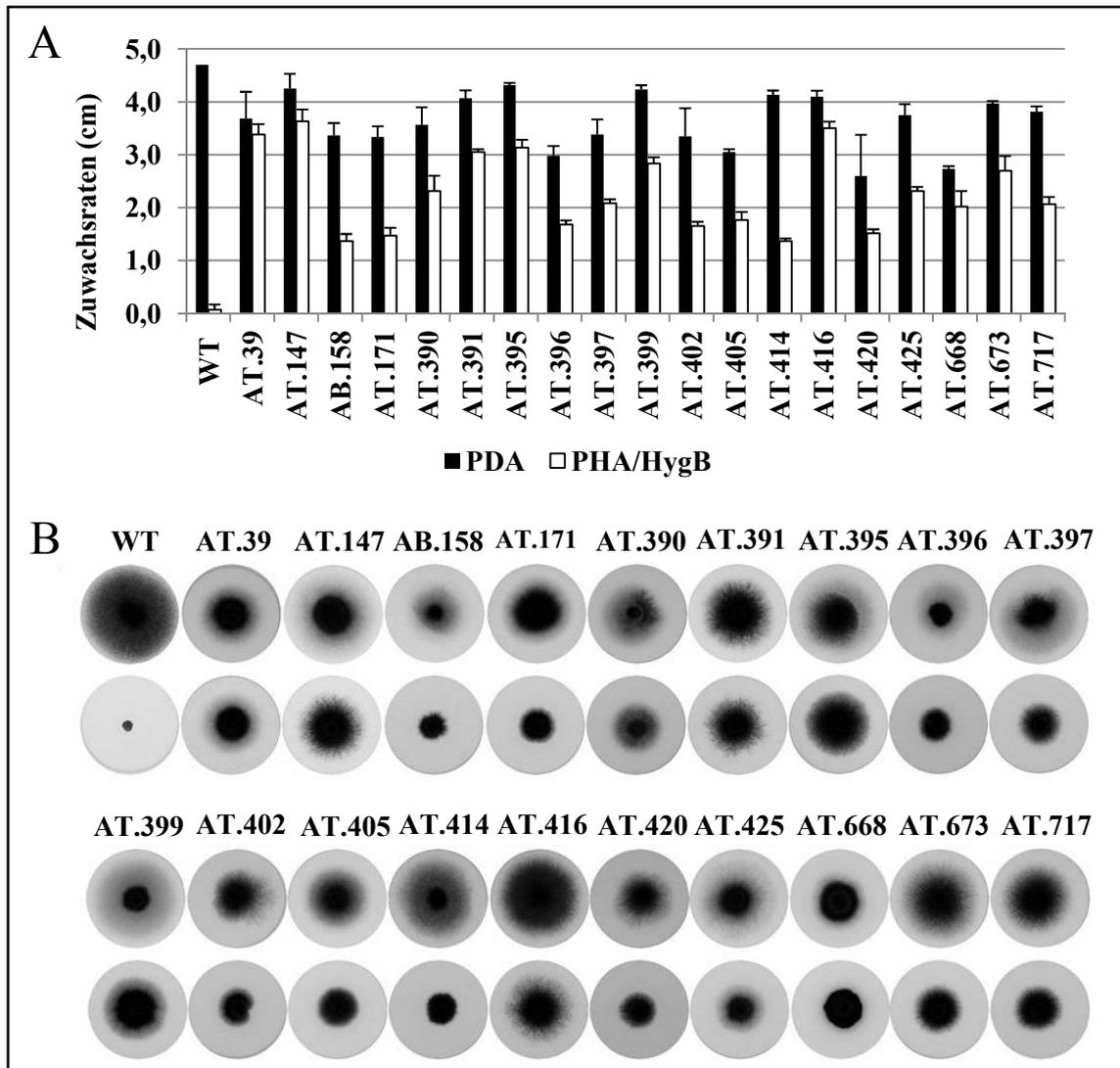


Abbildung 11: Wachstum des WT-Isolates und ATMT ESI auf PDA und PDA/HygB

A: Zuwachsraten der 19 ESI und des WT-Isolates auf PDA und PDA/HygB nach sechs Tagen Inkubationszeit.

B: Kolonien von 19 ESI und dem WT-Isolat auf PDA (jeweils obere Reihe) und PDA/HygB (jeweils untere Reihe) nach sechs Tagen Inkubationszeit.

3.2.2 Blattsegmenttest

Nach der Inokulation von Maisblattsegmenten mit ca. 400 Einzelsporisolen konnten diese aufgrund der durch sie verursachten Symptome kategorisiert werden. 60 ESI zeigten im Vergleich zum WT-Isolat keine oder nur geringe Symptomausprägungen und wurden anschließend als interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen eingestuft. Im Rahmen eines parallel

Ergebnisse

laufenden Projektes (S. Münch, DE 403/16-1) wurden diese nochmals auf Blattsegmenten und Ganzpflanzen getestet. Einzelsporisolate mit unzureichender Sporulation auf OMA konnten nicht berücksichtigt werden. Für 19 ESI zeigten sich sowohl auf Blattsegmenten als auch auf Ganzpflanzen klare Pathogenitäts- bzw. Virulenzeffekte. Die Ergebnisse der Wiederholung des Blattsegmenttests mit den 19 ESI im Rahmen dieser Arbeit und das phänotypische Erscheinungsbild auf Sporulationsmedium (OMA) sind in Abbildung 12 zusammengestellt.

Nach Inokulation mit dem Wildtyp-Isolat waren 4 dpi erste Nekrosen und 6 dpi ausgedehnte Verbräunungen mit melanisierten Appressorien und Acervuli zu erkennen. Die Bildung von Acervuli weist auf den abgeschlossenen Lebenszyklus hin. Auch bei AT.39, AT.391 und AT.395 konnten Nekrosen und Acervuli beobachtet werden, jedoch in abgeschwächter Form. AT.171 nekrotisierte das Gewebe erfolgreich, es konnten aber keine Acervuli beobachtet werden. Der Großteil der untersuchten ESI führte zu keiner oder nur geringer Symptomausprägung.

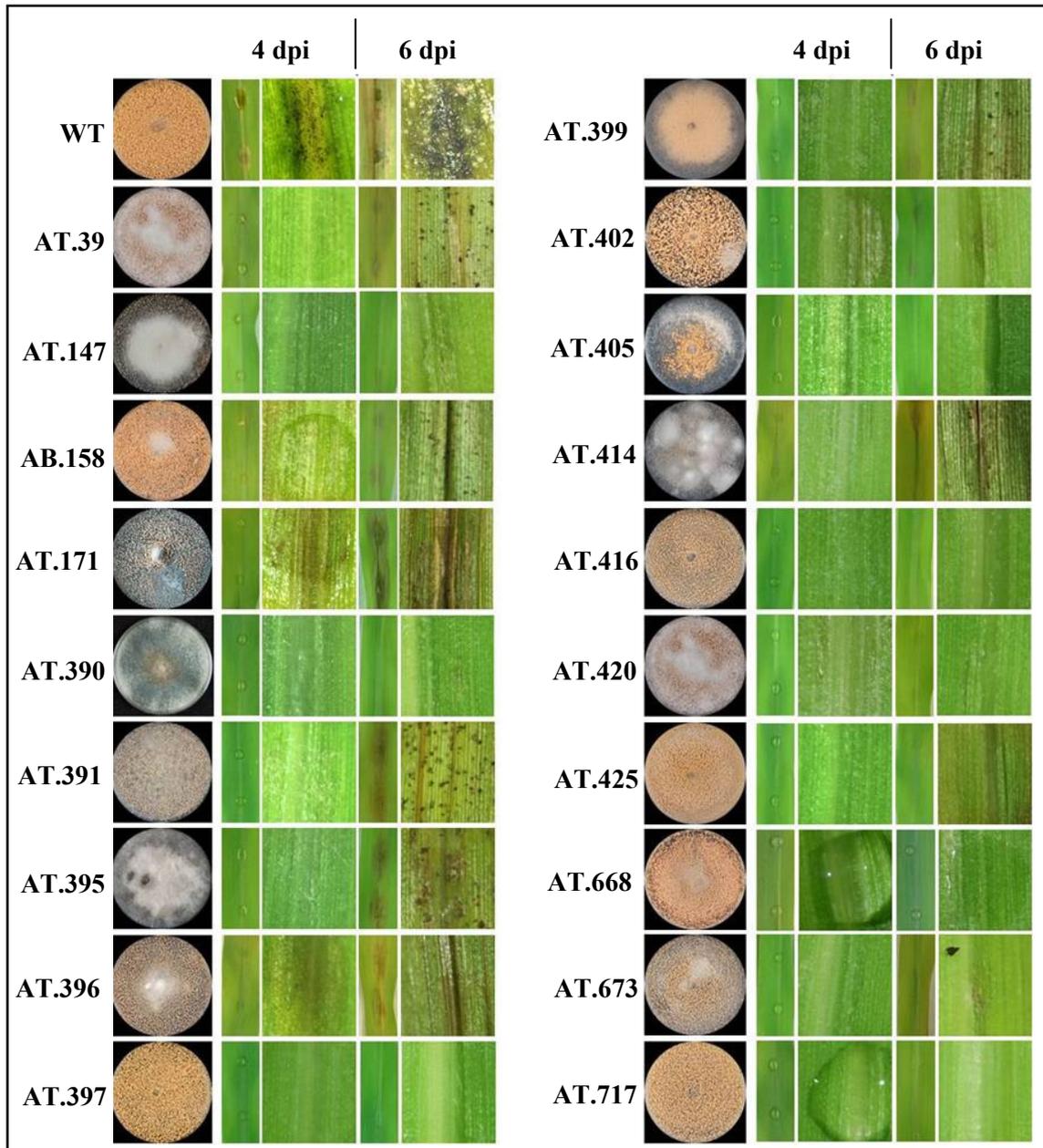


Abbildung 12: Blattsegmenttest

Phänotyp der 19 ESI und des WT-Isolates auf OMA (14 Tage alt; jeweils linke Spalte) und die Symptomausprägung auf Maisblattsegmenten 4 und 6 dpi. Das jeweils linke Bild zu jedem Zeitpunkt zeigt zwei Inokulumpunkte, das rechte Bild die 20-fache Vergrößerung eines Inokulumpunktes.

3.2.3 Nachweis der T-DNA mittels spezifischer Primer

Mittels PCR-Technik erfolgte der Nachweis der integrierten T-DNA mit Hilfe spezifischer Primer (Basenabfolge siehe Tabelle 8 im Anhang).

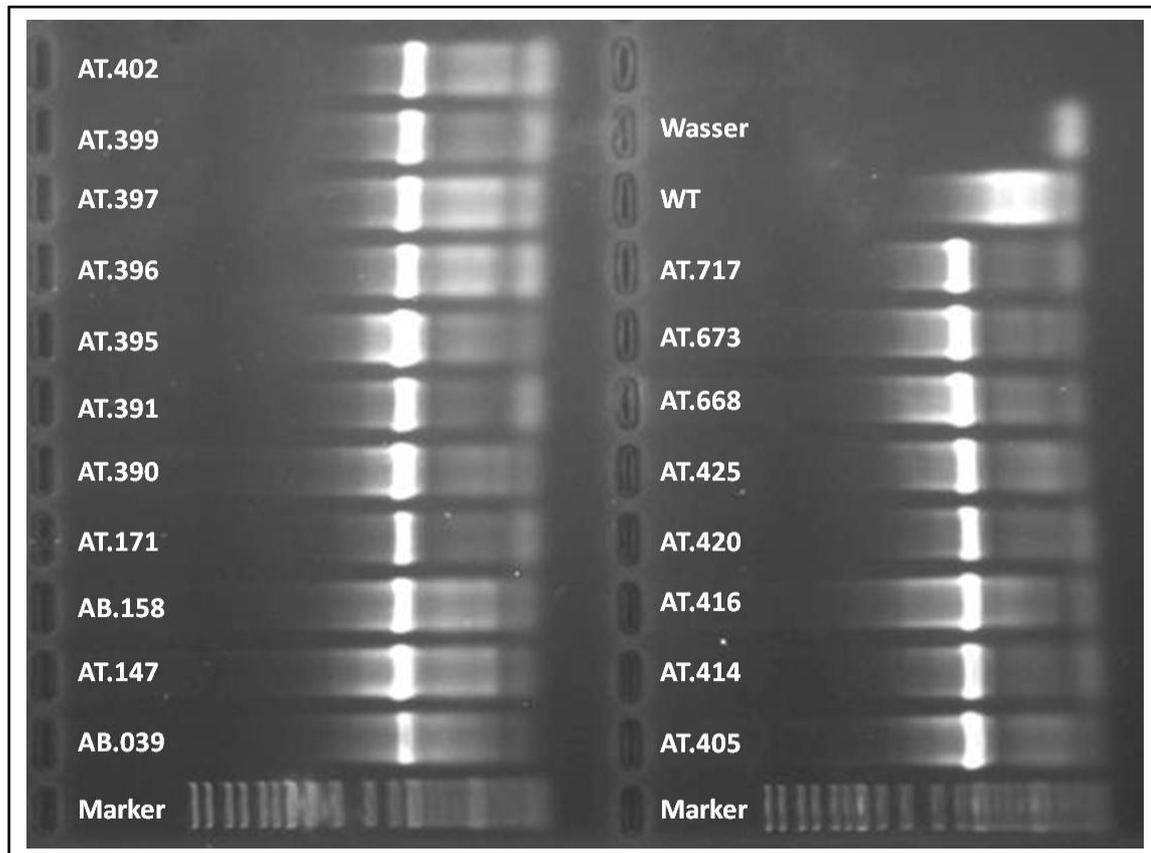


Abbildung 13: Nachweis der T-DNA Integration mittels spezifischer Primer

Ergebnis der PCR-Reaktion mit genomischer DNA der 19 ESI und des WT-Isolates. Verwendet wurden spezifische Primer (Hyg1; Gpd). Die Größe der Bande bei den ESI ist ca. 1 kb. Wasser: Ersatz der DNA durch Wasser.

Das Ergebnis der PCR-Reaktion ist in Abbildung 13 dargestellt. Alle ESI zeigten eine deutliche Bande bei der erwarteten Fragmentgröße von 1 kb. Diese Bande fehlte in den Kontrollen.

3.2.4 Charakterisierung der Entwicklung ausgewählter ESI

Der Infektionsverlauf kann durch Erhebung der Raten für Keimung, Appressorienbildung und Penetrationen beschrieben werden. Die Keimrate beschreibt den Anteil gekeimter Konidien an der Gesamtzahl Konidien. Nach Abzug der Konidien, die nur einen Keimschlauch aber kein Appressorium ausbildeten, ergab sich die Appressorienbildungsrate. Über die erfolgreiche Ausbildung einer Penetrationshyph, ausgehend vom Appressorium, gibt die Penetrationsrate Auskunft. Im Folgenden werden die Ergebnisse der mikroskopischen Analyse der Entwicklung auf Mais für 13 der 19 bisher beschriebenen ESI gezeigt; die Isolate AT.39, AT.171, AT.390, AT.399, AT.405 und AT.425 sind Gegenstand der Arbeit von S. Münch (DE 403/16-1).

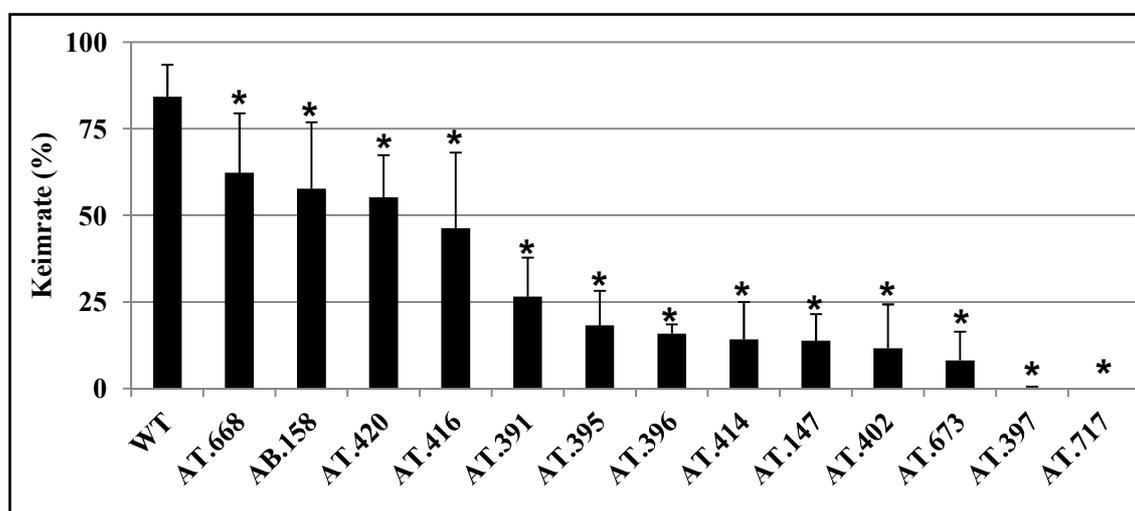


Abbildung 14: Keimraten von WT-Isolat und ESI auf Mais

Die Zählung erfolgte 24 hpi. Signifikante Unterschiede der ESI zum WT-Isolat sind mit einem * gekennzeichnet.

Alle betrachteten ATMT-Isolate zeigten hinsichtlich der Keimraten signifikante Unterschiede zum WT-Isolat. AT.717 keimte nicht auf Maisblattsegmenten (siehe Abbildung 14). Neben der Keimrate wurde ebenfalls die Appressorienbildungsrate erfasst (siehe Abbildung 15). Bis auf AB.158, dessen Rate der Appressorienbildung ähnlich der des WT-Isolates war, bildeten die weiteren betrachteten Isolate signifikant weniger Appressorien, bei AT.147, AT.673 und AT.397 unterblieb die Bildung von Appressorien. Da bei AT.717 die Keimung unterblieb, konnten ebenfalls keine Appressorien beobachtet werden.

Ergebnisse

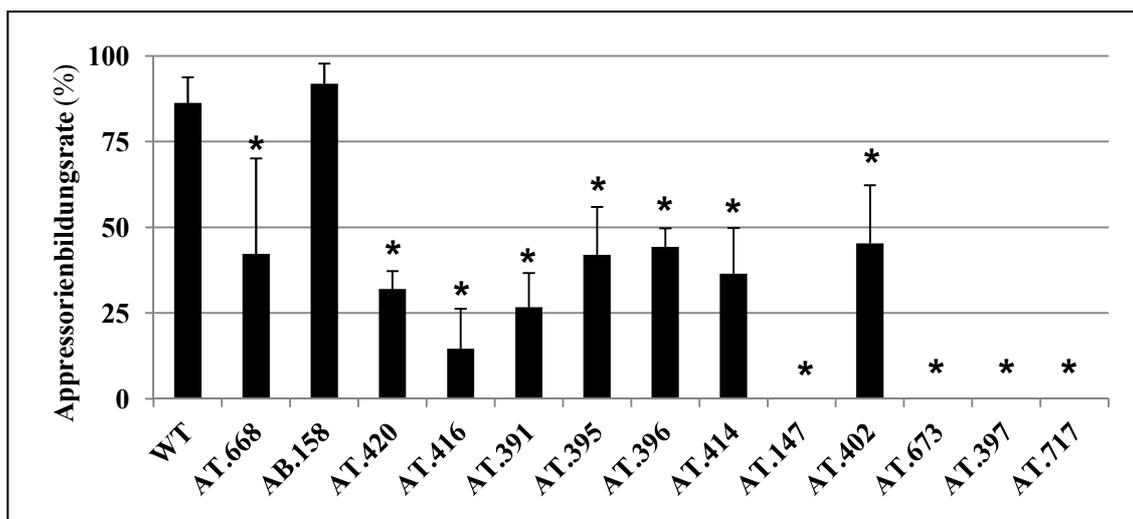


Abbildung 15: Appressorienbildungsrate von WT-Isolat und ESI auf Mais

Die Zählung erfolgte 24 hpi. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum WT-Isolat sind mit einem * gekennzeichnet.

Aufgrund der erhobenen Daten zur Entwicklung der ESI auf Mais wurden diese in vier Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Einteilung der ESI in vier Gruppen aufgrund ihrer Entwicklung auf Mais

Gruppe	ESI	Bemerkungen
A	AB.158	Keimung und Appressorienbildung ähnlich der des WT-Isolates
B	AT.668	Keim- und Appressorienbildungsrate geringer als beim WT-Isolat
C	AT.391; AT.395; AT.396; AT.402; AT.414; AT.416; AT.420	Keim- und Appressorienbildungsrate signifikant geringer als die des WT-Isolates
D	AT.147; AT.397; AT.673; AT.717	keine bzw. signifikant geringere Keimung als beim WT-Isolat; keine Appressorienbildung

Während AB.158 eine ähnliche Appressorienbildungsrate wie das WT-Isolat zeigte, konnten bei allen anderen untersuchten ESI signifikant weniger Appressorien auf Mais gefunden werden (siehe Abbildung 15). Im Folgenden wurden für AB.158 Zählungen über einen längeren Zeitraum angefertigt. So war es von besonderem Interesse, Unterschiede bei der Penetration der Wirtspflanze im Zeitverlauf aufzuzeigen. Abbildung 16 A zeigt die Ergebnisse der Zählung der Penetrationsraten des WT-Isolates und AB.158 nach 1, 2 und 3 Tagen Inkubationszeit.

Ergebnisse

Nur beim WT konnten bereits 24 hpi Penetrationsereignisse beobachtet werden. Die Entwicklung scheint bei AB.158 zeitverzögert abzulaufen, das WT-Isolat hatte zu jedem Zeitpunkt signifikant mehr Penetrationen als AB.158. Beide Isolate penetrierten 24 hpi signifikant weniger als nach 48 und 72 h. Abbildung 16 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Konidien und Appressorien (B + C) und der aus den Appressorien auswachsenden Penetrationshyphen (D + E).

Weiterhin wurde für das WT-Isolat und AB.158 die Entwicklung von Infektionsstrukturen auf einer artifiziellen Oberfläche (PET-Folie) über einen Zeitraum von drei Tagen beobachtet. Neben der Keim- und Appressorienbildungsrate (siehe Abbildung 17 A) wurde auch erfasst, inwieweit die Konidien nur an einer Seite bzw. an beiden Seiten gleichzeitig (bipolar) auskeimten (siehe Abbildung 17 B). Während das WT-Isolat 48 hpi eine signifikant höhere Keimrate zeigte, war das Ergebnis 72 hpi umgekehrt. Da nahezu jede gekeimte Konidie auch ein Appressorium ausbildete, sind die Signifikanzen mit denen der Keimrate gleichzusetzen.

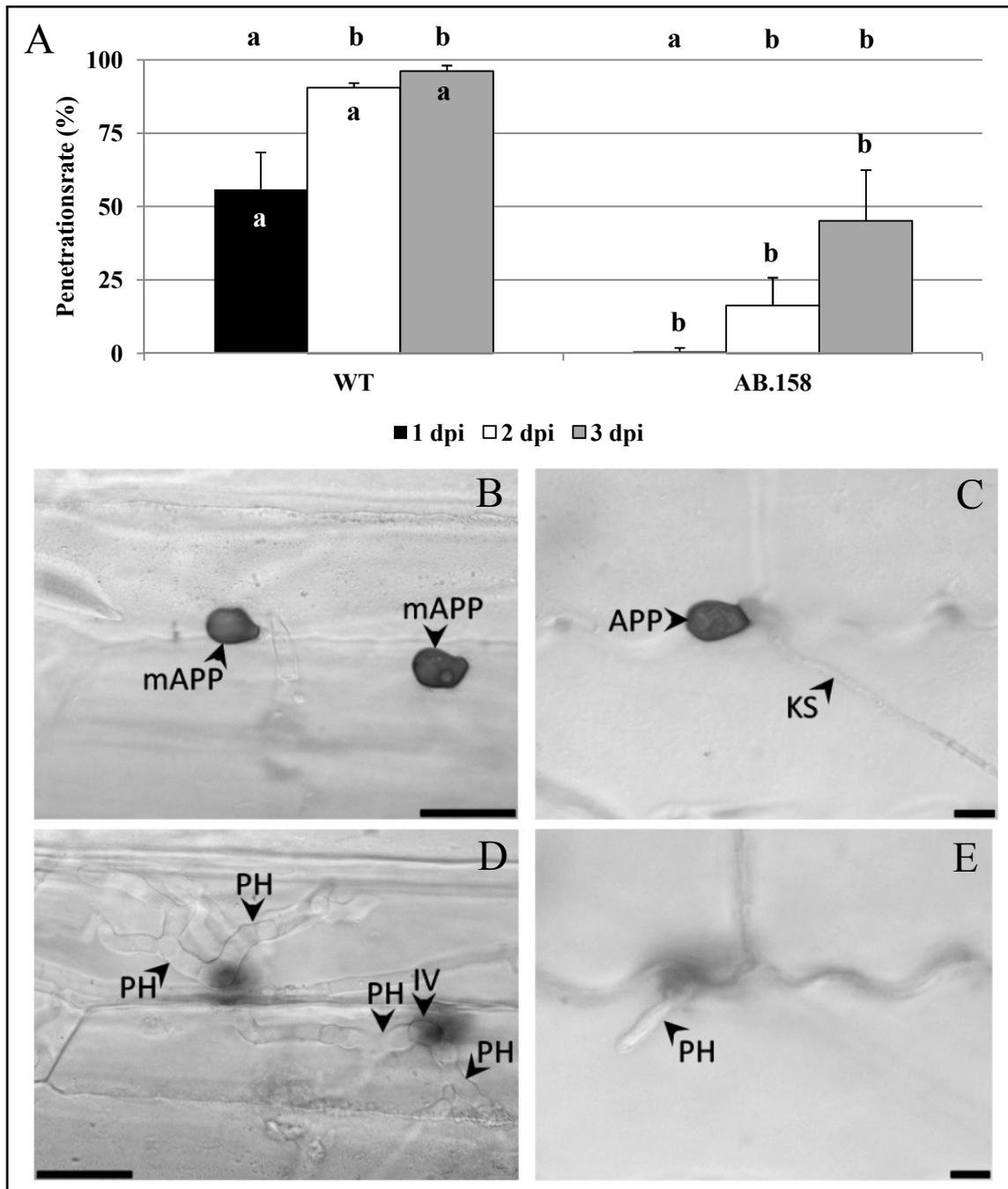


Abbildung 16: Penetrationsraten des WT-Isolates und AB.158 auf Mais

Diagramm (A): Signifikante Unterschiede zwischen den Pilzen zu einem Zeitpunkt sind in den Balken eines Zeitpunktes angegeben. Signifikante Unterschiede in der Entwicklung eines Pilzes zu den betrachteten Zeitpunkten geben die Signifikanzklassen über den Balken wieder.

Bilder: Lichtmikroskopische Aufnahmen des WT-Isolates 48 hpi (B + D) und von AB.158 72 hpi (C + E). B + C: Fokusebene Appressorium; D + F: Fokusebene Primärhyphe. KO = Konidie; KS = Keimschlauch; APP = Appressorium; mAPP = melanisiertes Appressorium; IV = Infektionsvesikel; PH = Primärhyphe. Maßstab = 10 µm.

Ergebnisse

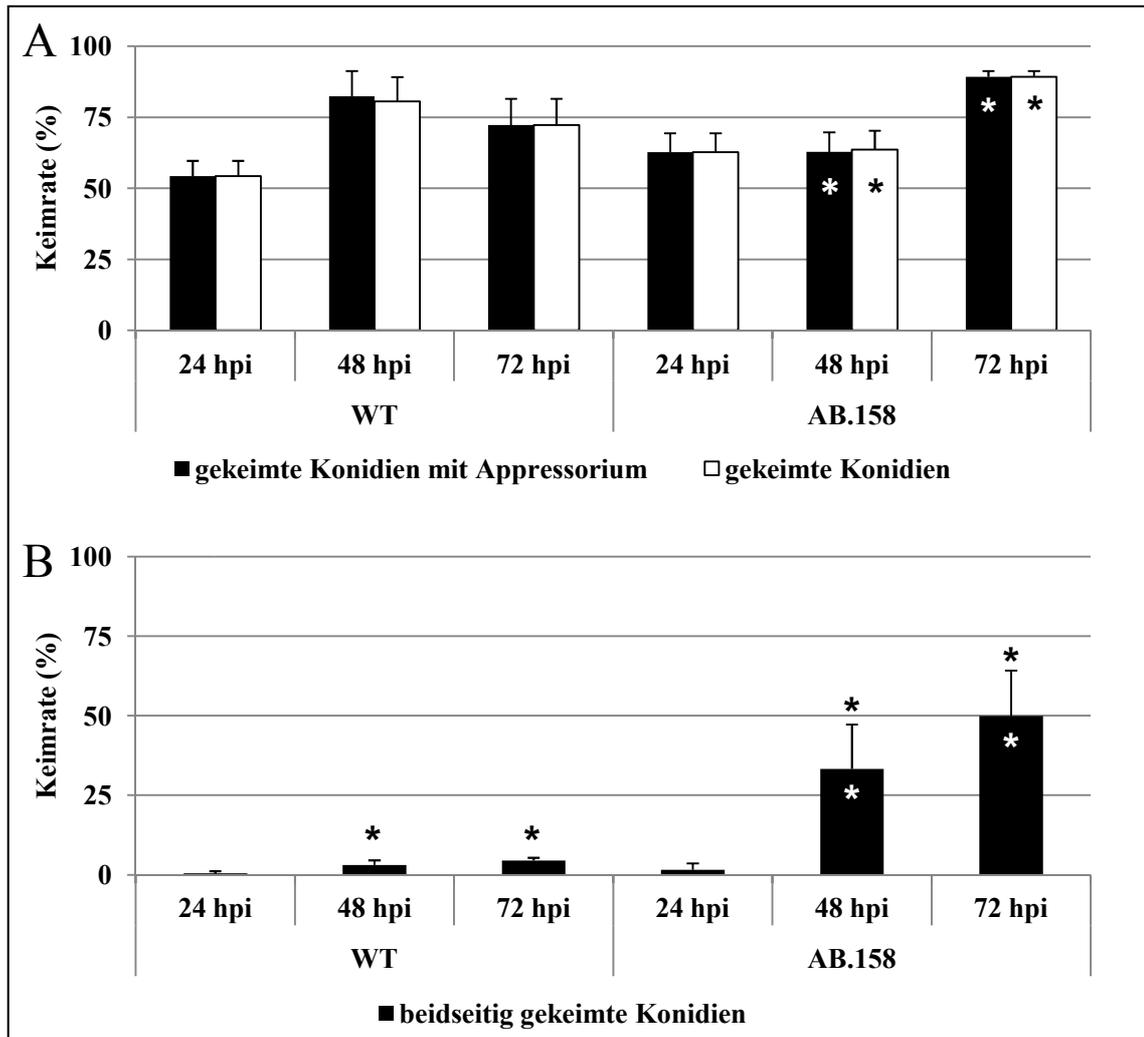


Abbildung 17: Entwicklung des WT-Isolates und AB.158 auf PET-Folie

A: Keim- und Appressorienbildungsraten. Signifikante Unterschiede für die Keimraten (schwarz) und die gebildeten Appressorien (weiß) wurden mit * gekennzeichnet. Die Pilze wurden jeweils zu einem Zeitpunkt miteinander verglichen.

B: Bipolare Keimung, die Differenz zu 100 % sind Konidien, die einseitig ausgekeimt sind. Signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten zu einem Zeitpunkt wurden mit * in den Balken gekennzeichnet. Mit einem * über den Balken sind signifikante Unterschiede für den jeweiligen Pilz über den Zeitverlauf angegeben.

AB.158 zeigte auf PET-Folie eine Besonderheit im Gegensatz zum WT-Isolat. Während der WT maximal 5,5 % bipolare Keimung zeigte und sich die Werte über den Zeitverlauf kaum veränderten, waren bei AB.158 nach 48 und 72 h mehr Konidien bipolar keimt als nach 24 h.

Eine zweite Gruppe an ESI (AT.147, AT.397, AT.673 und AT.717) zeigen, im Vergleich zum WT-Isolat, signifikant geringere Keim- und Appressorienbildungsraten auf Maisblattsegmen-

Ergebnisse

ten (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15). Für diese Gruppe wurde die Auswirkung der Zugabe eines aus Maisblättern gewonnenen Extraktes zur Sporensuspension auf die Keimfähigkeit und die weitere Entwicklung getestet. Nach Inokulation von Maisblattsegmenten und Inkubation für 24 h konnte die Wiederherstellung der Keimfähigkeit auf Mais für alle ESI beobachtet werden (siehe Abbildung 18 A). Auch auf die Appressorienbildung konnte ein positiver Effekt verzeichnet werden (siehe Abbildung 18 B). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde für die Zählung der Penetrationsrate (72 hpi) der Sporensuspension 25 % Maisblattextrakt zugegeben. Die untersuchten ESI konnten die Maisblätter penetrieren, allerdings lagen die Werte signifikant unter denen des WT-Isolates (siehe Abbildung 18 C). Der Effekt steigender Gehalte an Maisblattextrakt im Inokulum wurde auch makroskopisch im Blattsegmenttest untersucht.

Mit steigenden Konzentrationen an MBE im Inokulum konnte auch hier eine Verstärkung der Symptomausprägung (siehe Abbildung 19 A und B) und die Zunahme an gebildeten Appressorien (siehe Abbildung 20) beobachtet werden. Maisblattextrakt wirkt sich stimulierend auf die Keimfähigkeit der untersuchten ESI aus. Eine Erhöhung des Anteils an Maisblattextrakt in der Sporensuspension führte zu einer Erhöhung der Keimraten. Dieser positive Effekt ließ sich auch auf die Bildung von Appressorien (siehe Abbildung 18 B) übertragen. Die untersuchten ESI sind also generell zur Keimung und Appressorienbildung fähig. Alle hier betrachteten ESI zeigten signifikant geringere Penetrationsraten als das WT-Isolat.

Sowohl die makroskopische als auch die mikroskopische Auswertung der Blattsegmenttests stützen die Ergebnisse der Zählungen hinsichtlich Keimung und Appressorienbildung. In Abbildung 20 deutlich zu erkennen ist die erhöhte Appressorienbildungsrate in 100%igem MBE. Auch makroskopische Symptome traten ab einer Konzentration von 25 % MBE deutlicher in Erscheinung (siehe Abbildung 19).

Ergebnisse

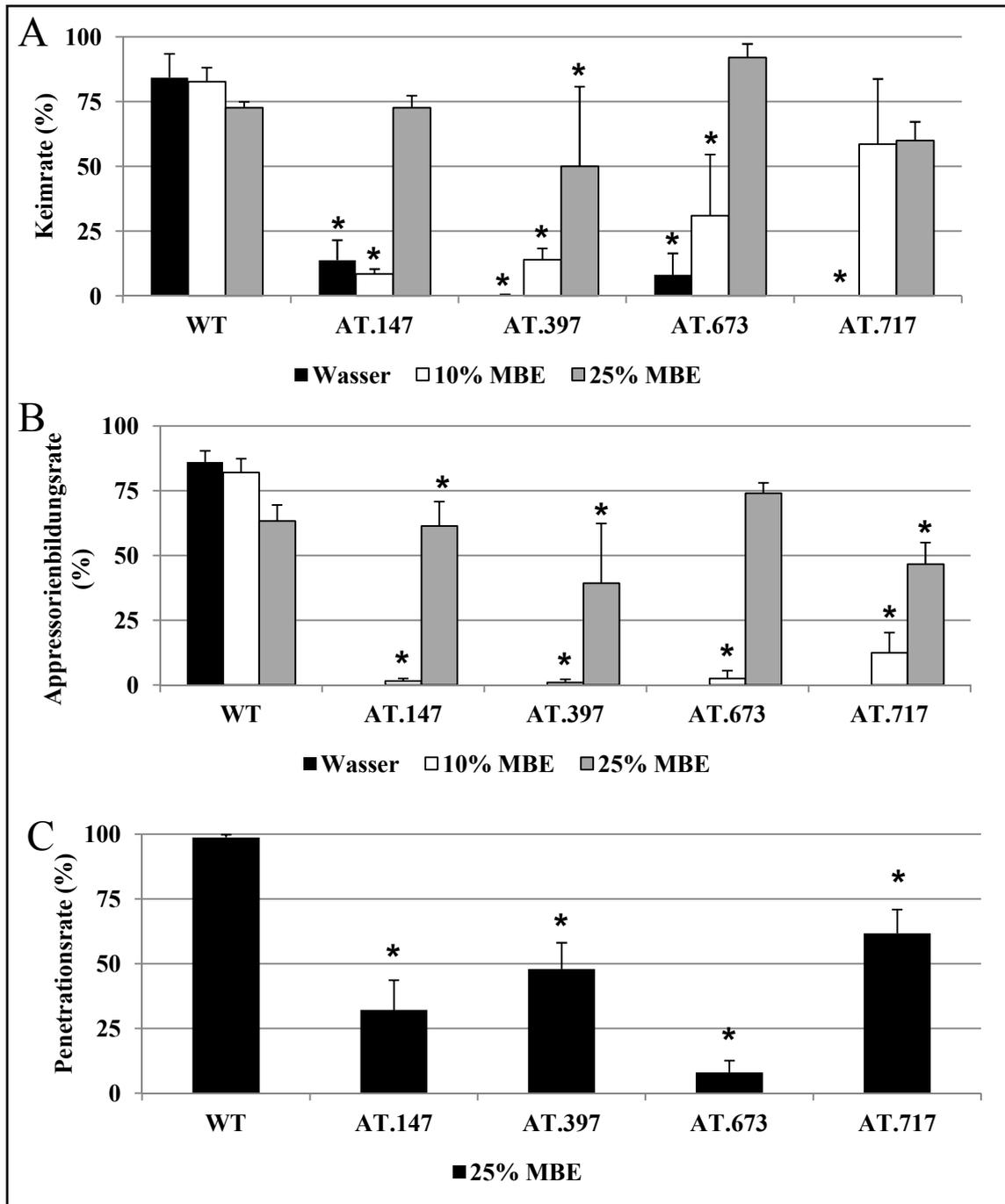


Abbildung 18: Entwicklung des WT-Isolates, AT.147, AT.397, AT.673 und AT.717 auf Mais nach Zugabe von Maisblattextrakt

A: Keimraten. Die Auswertung erfolgte 24 hpi. Ein * markiert signifikante Unterschiede zum WT-Isolat bei der jeweiligen MBE-Konzentration.

B: Appressorienbildungsrate. Die Auswertung erfolgte 24 hpi. Ein * markiert signifikante Unterschiede zum WT-Isolat bei der jeweiligen MBE-Konzentration.

C: Penetrationsrate. Die Auswertung erfolgte 72 hpi. Ein * markiert signifikante Unterschiede zum WT-Isolat.

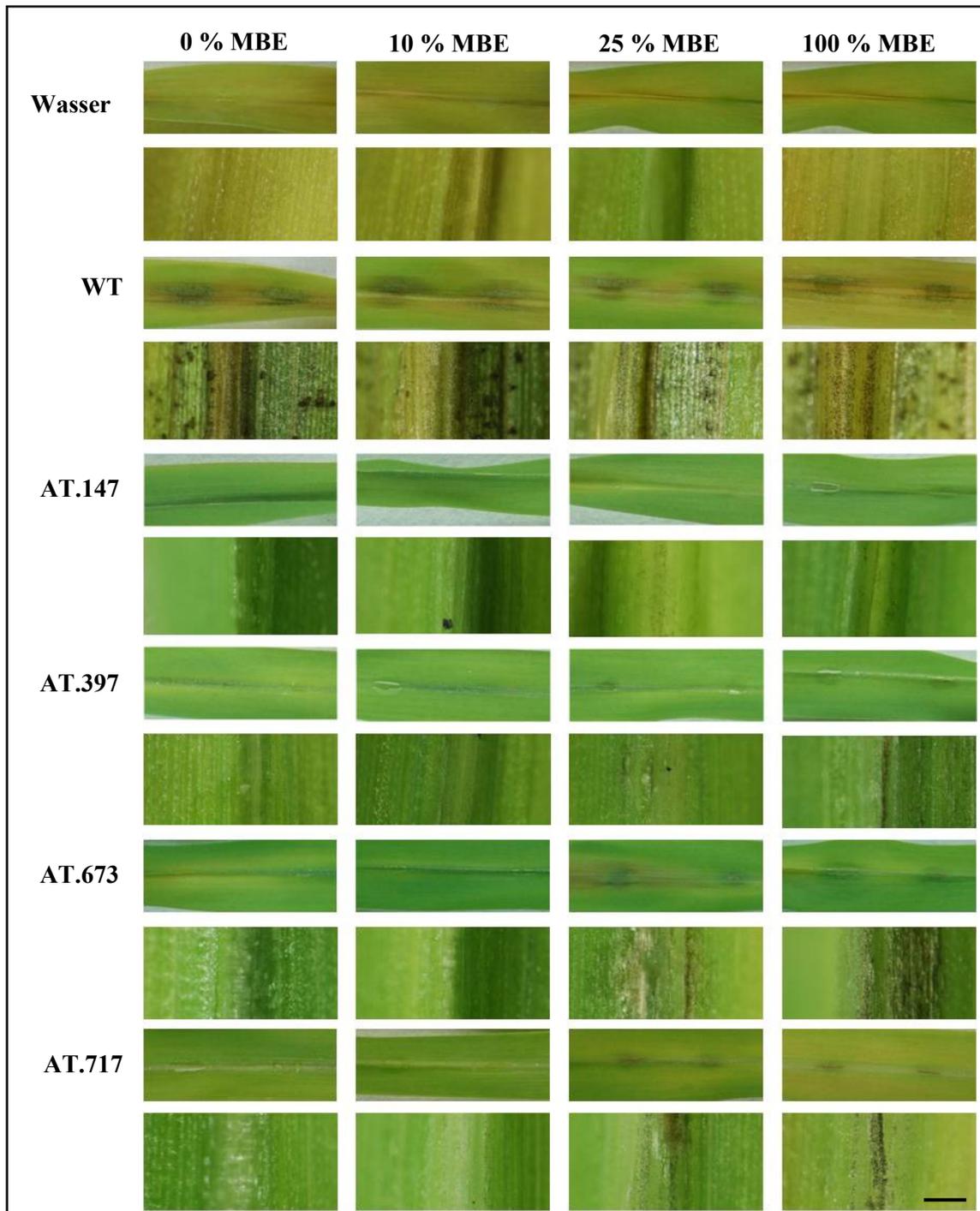


Abbildung 19: Symptomentwicklung von WT-Isolat und ESI auf Mais (makroskopisch)

Dem Inokulum wurden unterschiedliche MBE-Konzentrationen zugesetzt. Die Dokumentation erfolgte 6 dpi. Jeweils obere Reihe: Blattsegment mit zwei Inokulumpunkten. Jeweils untere Reihe: eine Infektionsstelle in 30-facher Vergrößerung (Binokular). Maßstab (gültig für alle Abbildungen der jeweils unteren Reihe) = 3 mm.

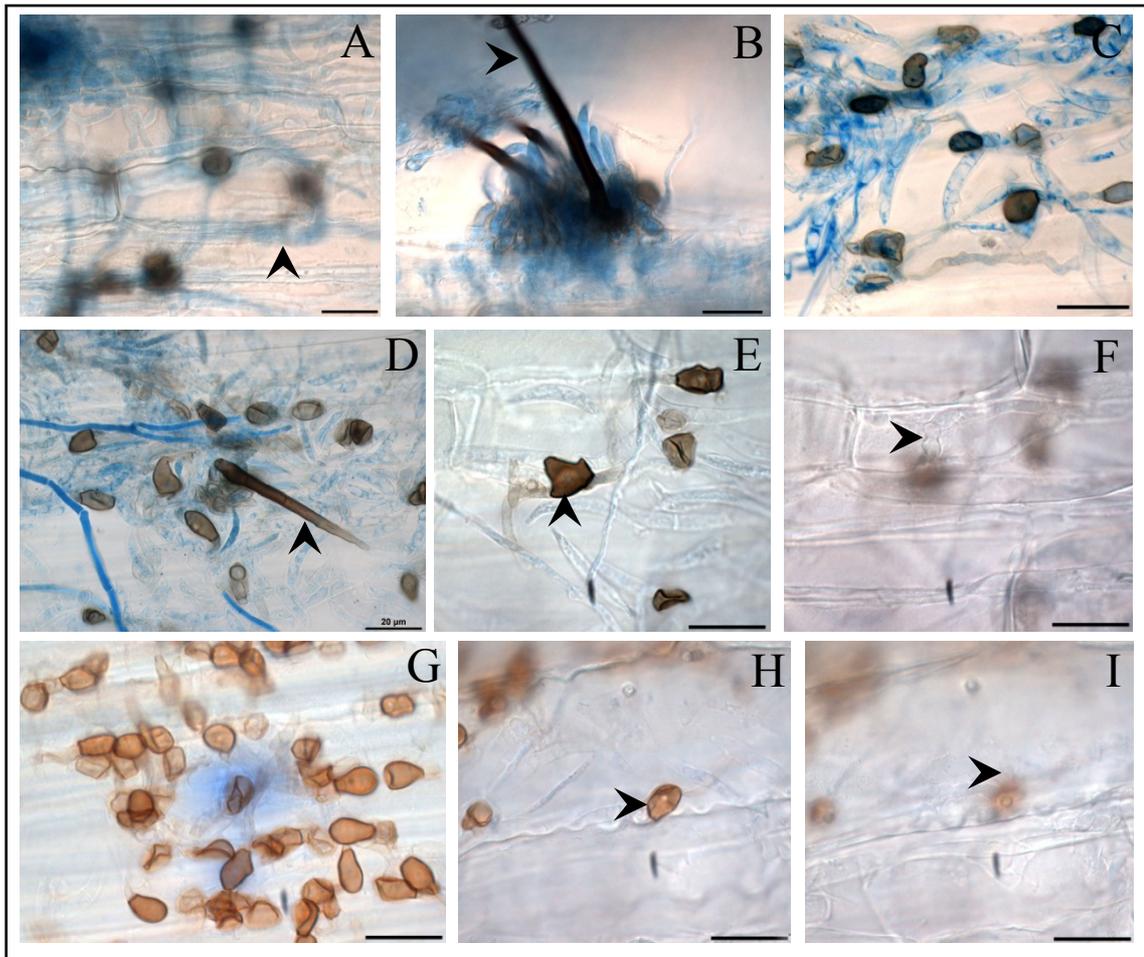


Abbildung 20: Entwicklung von WT-Isolat und ESI auf Mais (mikroskopisch)

Lichtmikroskopische Betrachtung der Infektionsstrukturen auf Mais nach 6 d Inkubation. Die entfärbten Blattsegmente wurden mit Anilinblau/Lactophenol (0,025 %) gefärbt. Maßstab = 20 µm. A + B: WT-Isolat; A: Penetrationshyphen im Blatt (Pfeil), B: Acervuli mit Setae (Pfeil). C: AT.147, Konidien mit Appressorien. D: AT.397: Acervulus mit Setae (Pfeil). E + F: AT.673; E: Appressorium (Pfeil), F: Infektionsvesikel mit Primärhyphen (Pfeil); G - I: AT.717; G: Appressorien, H: Appressorium (Pfeil), I: auswachsende Primärhyphne.

3.3 Entwicklung eines Inokulationssystems für artifizielle Dünnschichten

3.3.1 Metalldünnschichten

Die Verwendung von Dünnschichten aus Metall für die Untersuchung des Wachstums phytopathogener Pilze ist aus der Literatur bekannt (MIYOSHI, 1895; HOWARD ET AL., 1991). Für erste Untersuchungen wurden vom Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik Halle/Saale (IWM) hergestellte gesputterte Schichten aus Aluminium (Al), Kupfer (Cu) und Gold (Au) verwendet. Kupfer eignete sich nicht als Material für Keimtests, da es die Sporenkeimung inhibierte. Auf Aluminium konnte *C. graminicola* auskeimen, jedoch eigneten sich die Schichten nicht für Inokulationsversuche, da mit abnehmender Schichtdicke eine zunehmende Instabilität der Schichten beobachtet wurde. Außerdem zeigten die Al-Schichten eine hohe Korrosionsanfälligkeit, bedingt durch die der Inokulation folgende Inkubation auf Wasser. Abbildung 21 zeigt eine korrodierte Aluminiumschicht.

Einzig Goldschichten blieben auch nach mehreren Tagen auf einer Wasseroberfläche schwimmend stabil und ermöglichten so die Auswertung des Pilzwachstums.

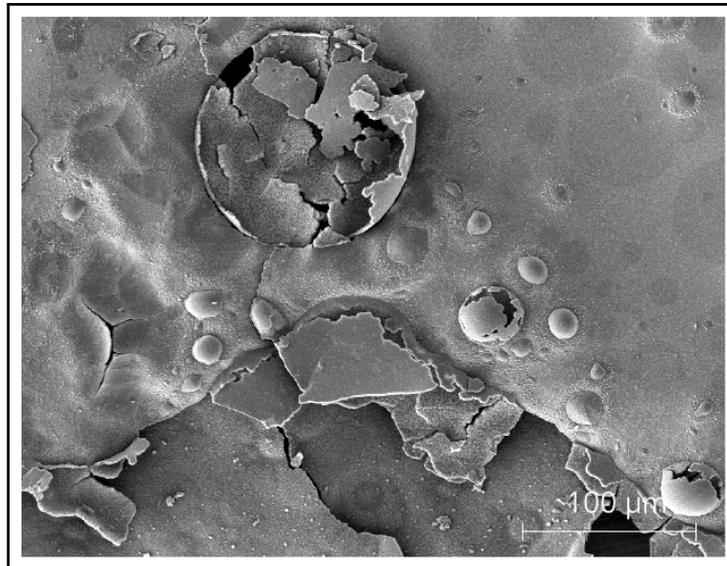


Abbildung 21: Korrodierte Aluminiumdünnschicht

Korrosionsschäden einer auf Wasser inkubierten Al-Schicht (REM), Maßstab = 100 μm . Quelle: HOFFMANN (2005).

3.3.1.1 Wachstum phytopathogener Pilze auf inerten Golddünnschichten

Neben dem *C. graminicola* Isolat M2 wurden *Magnaporthe oryzae* (Isolat ERA1-GFP) und *Phakopsora pachyrhizi* für Inokulationstests auf Goldschichten mit unterschiedlicher Dicke verwendet. Ein erster Test mit Goldschichten mit einer Dicke von 500 nm zeigte, dass alle betrachteten Sporen von *M. oryzae* ERA1-GFP auskeimen konnten und rund 93 % der gekeimten Sporen auch ein Appressorium ausbildeten (ohne Abbildung). Die Keimraten von *C. graminicola* und *P. pachyrhizi* auf 40 nm Gold sind in Abbildung 22 (A) dargestellt. Abbildung 22 B - D zeigen Infektionsstrukturen der Pilze auf Goldschichten. Bei diesen ersten Untersuchungen wurde beurteilt, inwieweit unterschiedliche Pathogene in der Lage waren, auf Goldschichten Infektionsstrukturen zu differenzieren und diese zu penetrieren. Allen getesteten Pathogenen war die Differenzierung von Infektionsstrukturen auf Goldschichten möglich.

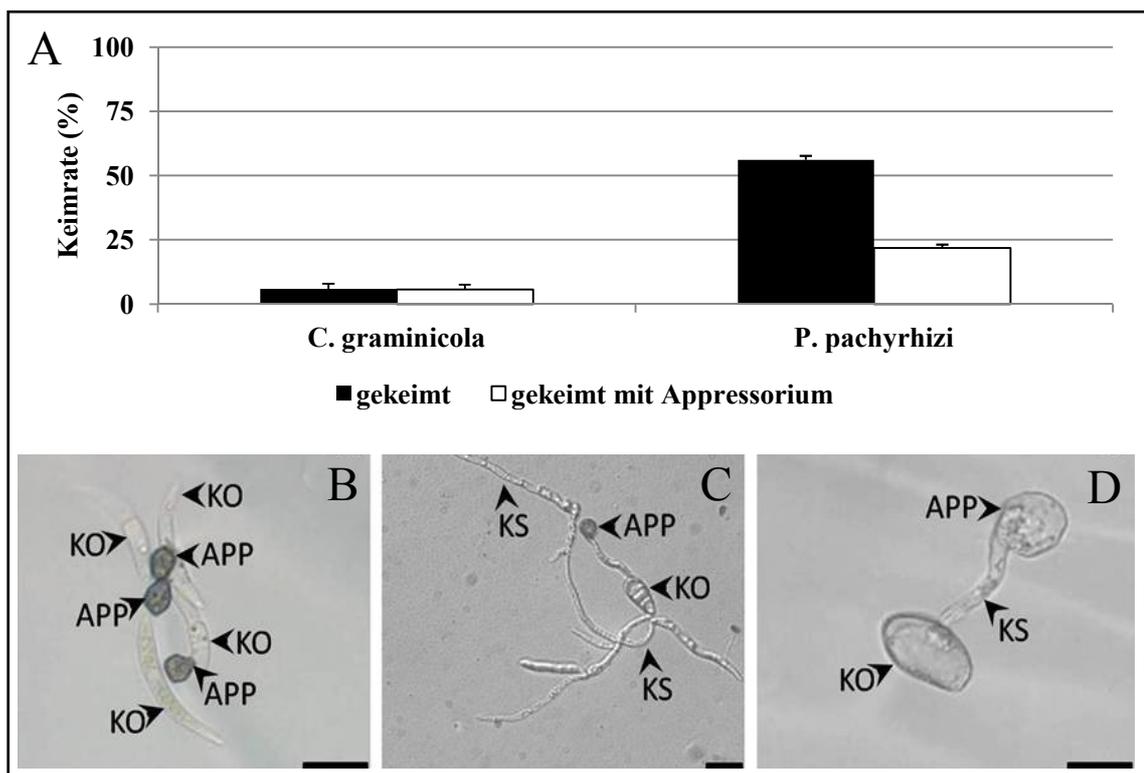


Abbildung 22: Entwicklung phytopathogener Pilze auf Goldschichten

Diagramm (A): Keimraten von *C. graminicola* und *P. pachyrhizi* auf 40 nm Gold, 3 dpi. Die Differenz zu 100 % sind die ungekeimten Konidien (Säule "gekeimt") bzw. die gekeimten Konidien ohne Appressorium (Säule "gekeimt mit Appressorium").

Bilder: B: *C. graminicola* (M2) auf 40 nm Gold; C: *M. oryzae* (ERA1-GFP) auf 500 nm Gold; D: *P. pachyrhizi* auf 40 nm Gold. KO = Konidie; KS = Keimschlauch; App = Appressorium. Maßstab = 20 µm.

Da keine Penetrationen der verwendeten Goldschichten mit einer Schichtdicke > 500 nm beobachtet werden konnten, wurde die Schichtdicke verringert. Untersuchungen mit *C. graminicola* und *P. pachyrhizi* zeigten, dass die Entwicklung bis zum Appressorium auf 40 nm dicken Schichten möglich war (siehe Abbildung 22 B und D), Penetrationen konnten jedoch nicht beobachtet werden. Dünnere Schichten wurden aufgrund der zunehmenden Instabilität nicht getestet.

Generell ist die Herstellung und Handhabung von Dünnschichten aus Gold möglich und erlaubt die Differenzierung von Infektionsstrukturen. Als nachteilig erwies sich die mit abnehmender Schichtdicke zunehmende Instabilität der Membranen. Die Lichtundurchlässigkeit der Goldschichten erschwerte die mikroskopische Auswertung.

Neben Metaldünnschichten wurden auch Polymerdünnschichten aus PTFE (Polytetrafluorethylen) und PMMA (Polymethylmetacrylat) hergestellt. Diese Schichten wurden, wie unter Punkt 2.3.4.1.2 beschrieben, mit unterschiedlichen Pathogenen inokuliert und die Entwicklung der Infektionsstrukturen 3 dpi analysiert. Einen Vorteil der Verwendung von Polymerschichten stellt deren Transparenz dar. So können eventuell vorhandene Penetrationshyphen besser gesehen werden als auf den Metallschichten. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengestellt.

3.3.2 Polymerschichten

3.3.2.1 PTFE (Polytetrafluorethylen)

3.3.2.1.1 Penetrationskompetenz unterschiedlicher Pflanzenpathogene

Generell war es allen verwendeten Pathogenen möglich, auf den verwendeten Polymerschichten auszukeimen und Infektionsstrukturen auszubilden. Für *C. graminicola* sind die Ergebnisse des Keimtests auf unterschiedlich dicken PTFE-Schichten in Abbildung 23 dargestellt. Tendenziell war eine höhere Keimrate auf dickeren Schichten zu beobachten, die Werte auf den 2400 nm dicken Schichten unterschieden sich signifikant von denen auf 60, 110, 160 und 210 nm. Auch konnten auf dickeren Schichten mehr Appressorien gebildet werden, wobei das Verhältnis von gekeimten zu gekeimten Konidien mit Appressorium gleich blieb.

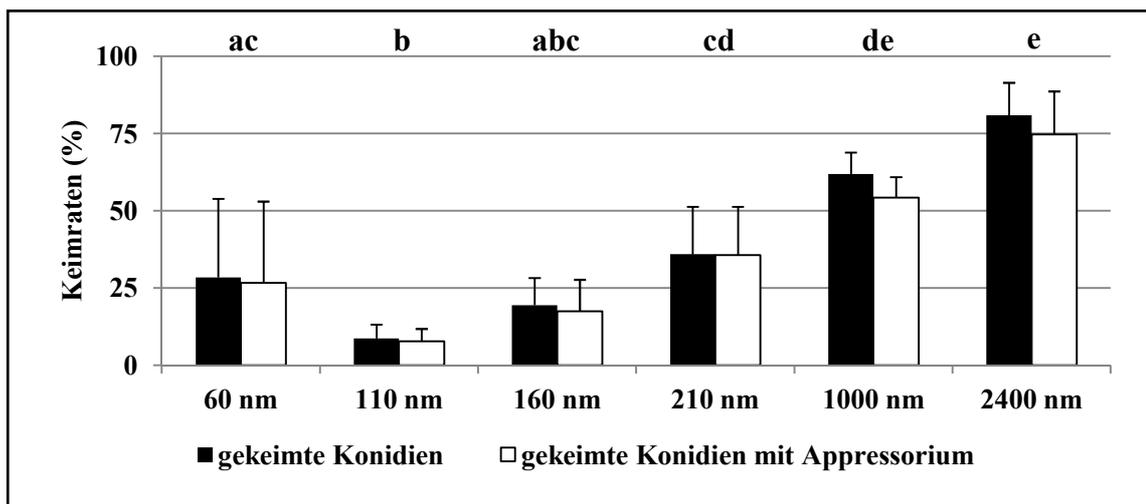


Abbildung 23: Keimraten von *C. graminicola* auf unterschiedlich dicken PTFE-Schichten

Signifikante Unterschiede werden durch die Signifikanzklassen angegeben, sie gelten sowohl für die Säulen "gekeimte Konidien" als auch "gekeimte Konidien mit Appressorium". Die Differenz zu 100 % sind ungekeimte Konidien (Säule "gekeimte Konidien") bzw. gekeimte Konidien ohne Appressorium (Säule "gekeimte Konidien mit Appressorium").

Neben den Keimraten war vor allem die weitere Entwicklung unterschiedlicher Pathogene auf Polymerschichten von Interesse. Penetrationsraten von PTFE-Schichten wurden 3 dpi bestimmt (siehe Abbildung 24 A).

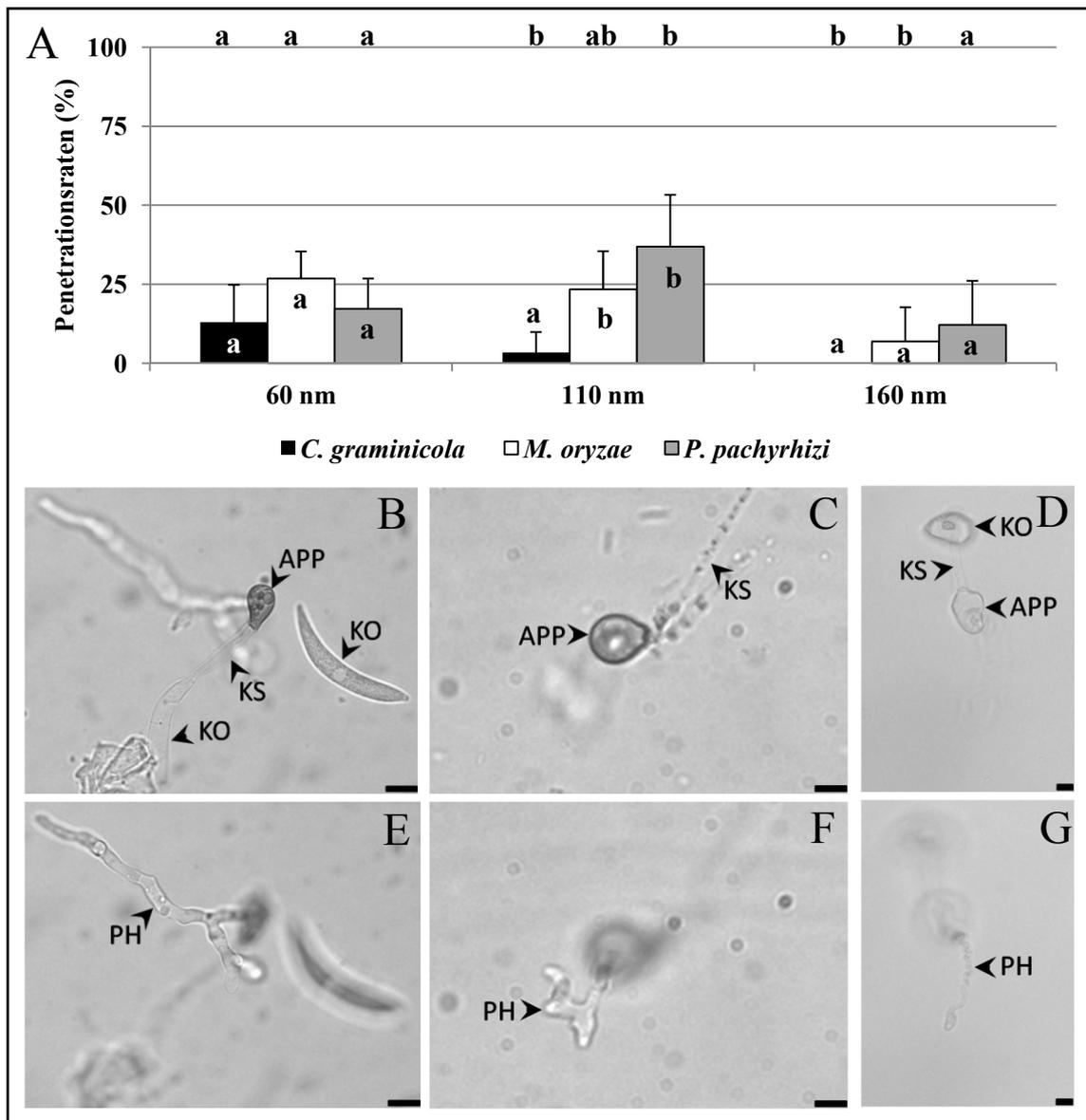


Abbildung 24: Penetrationen pflanzenpathogener Pilze auf PTFE-Schichten

Diagramm (A): Penetrationsraten 3 dpi. Signifikante Unterschiede auf Ebene der Schichtdicken zwischen den Pilzen sind durch Signifikanzklassen über den Balken gekennzeichnet, unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede. Die Signifikanzklassen über dem Diagramm zeigen signifikante Unterschiede des jeweiligen Pilzes auf den unterschiedlichen Schichtdicken.

Bilder: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Penetrationsereignissen. B - D: Fokusebene Appressorium; E - G: Fokusebene Penetrationshyphe. B + E: *C. graminicola*; C + F: *M. oryzae*; D + G: *P. pachyrhizi*. KO = Konidie; KS = Keimschlauch; APP = Appressorium; PH = Penetrationshyphe. Maßstab = 10 µm.

Bei *C. graminicola* und *M. oryzae* handelt es sich um Pathogene, die melanisierte Appressorien ausbilden. Im Gegensatz dazu bildet *Phakopsora pachyrhizi* nicht-melanisierte Appressorien ausbilden.

Ergebnisse

rien. Jedem der Pathogene war es möglich, mit ihren Penetrationshyphen PTFE-Schichten zu durchwachsen (siehe Abbildung 24, Bilder B - G). Tendenziell konnten die dünneren Schichten besser penetriert werden als die dickeren. Bei einer Schichtdicke von 110 nm erreichten *M. oryzae* und *P. pachyrhizi* höhere Penetrationsraten als *C. graminicola*, zwischen *M. oryzae* und *P. pachyrhizi* gab es keine signifikanten Unterschiede. Obwohl *M. oryzae* und *P. pachyrhizi* die 160 nm dicken Schichten tendenziell besser penetrieren konnten, sind diese Unterschiede nicht signifikant. *P. pachyrhizi* zeigte die höchste Penetrationsrate auf 110 nm. Generell schien sich der Erreger des Sojarostes auf den 60 nm Schichten schlechter zu entwickeln als auf dickeren Schichten.

Das Prinzip der lichtmikroskopischen Betrachtung der Penetrationshyphen ist in Abbildung 25 am Beispiel einer Penetrationsstelle von *P. pachyrhizi* auf PTFE 110 nm dargestellt. Durch Veränderung der Fokusebene konnte dem Verlauf der Penetrationshyphe unter der Schicht gefolgt werden. Die Werte links unten im Bild geben die Veränderung der Fokusebene (in μm) an.

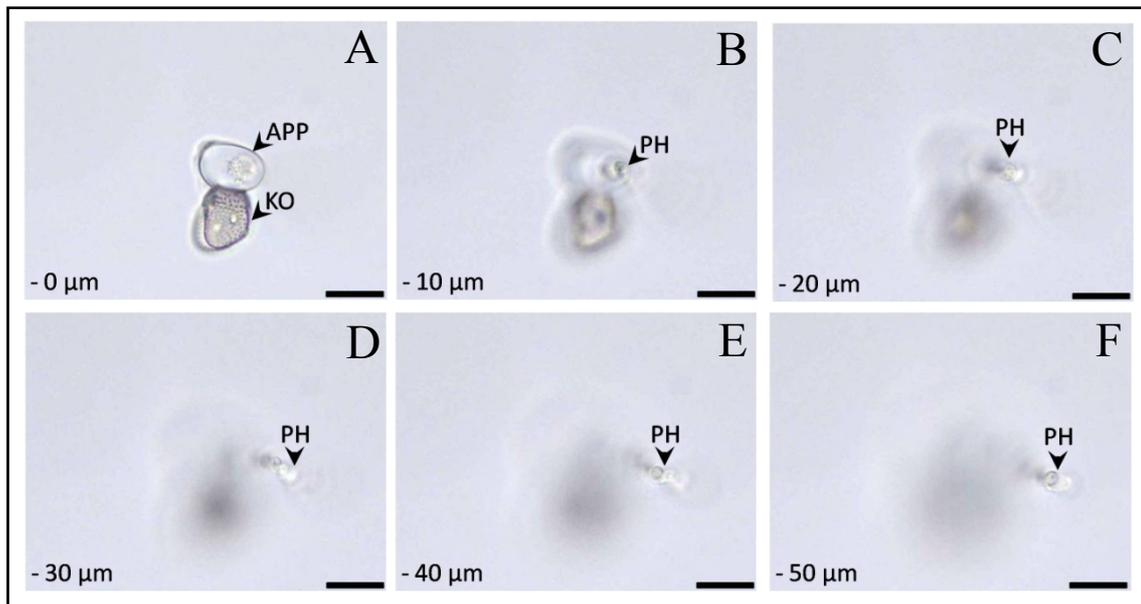


Abbildung 25: Penetrationsereignis von *P. pachyrhizi* auf PTFE, 110 nm

Dem Verlauf der Penetrationshyphe wurde mit Hilfe des Feintriebese gefolgt (Bilder A - F). KO = Konidie; APP = Appressorium; PH = Primärhyphe. Maßstab = 20 μm .

Neben der lichtmikroskopischen Betrachtung der Penetrationsereignisse wurde bei *C. graminicola* und *P. pachyrhizi* zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texas Red WGA gearbeitet. Texas Red WGA ist ein spezifischer Chitinfarbstoff. Bei den Penetrationshyphen

Ergebnisse

von *C. graminicola* trat die chitinspezifische Farbreaktion nur als ringförmige Fluoreszenz an der Spitze der Hyphe auf (siehe Abbildung 26 D). Dies kann auf die bereits aus der Literatur bekannte Tatsache zurückgeführt werden, dass *Colletotrichum* ssp. nach der Penetration Chitin in Chitosan umwandeln (EL GUEDDARI ET AL., 2002). Im Gegensatz dazu fluoreszierte bei *P. pachyrhizi* die gesamte Penetrationshyphe (siehe Abbildung 26 H).

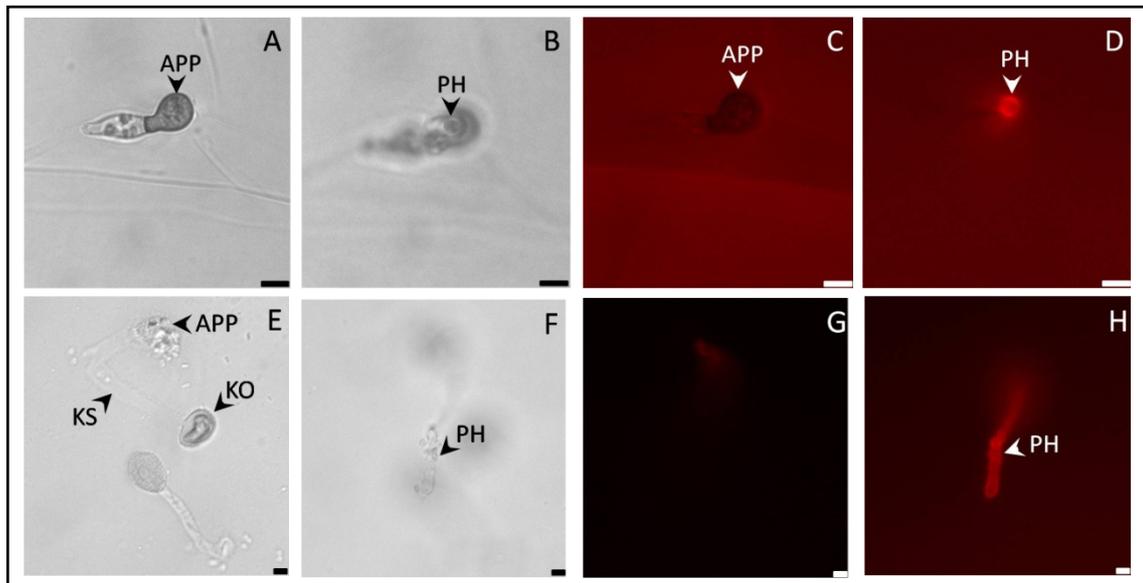


Abbildung 26: Penetrationsereignisse auf PTFE (Färbung mit Texas Red WGA)

Licht- (A, B, E, F) und fluoreszenzmikroskopische (C, D, G, H) Aufnahmen der Penetrationshypen von *C. graminicola* (A - D) und *P. pachyrhizi* (E - H) nach Färbung mit Texas Red WGA (verwendeter Filter: TxRed). KO = Konidie; KS = Keimschlauch; APP = Appressorium; PH = Penetrationshyphe. Maßstab = 10 µm.

Neben der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Penetrationsereignissen auf artifiziellen Membranen wurden inokulierte Membranen auch im ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscope*) und REM (Rasterelektronenmikroskop) betrachtet. Hierfür wurden Bereiche der inokulierten Membran mit einem TEM-Netz abgetrennt (siehe Abbildung 27 E) und entweder direkt (ESEM) oder nach vorheriger Trocknung und Beschichtung (REM) für die Elektronenmikroskopie verwendet. Abbildung 27 (Bilder C - D) zeigen sehr deutlich die Penetrationspore von *P. pachyrhizi* und die um die Penetrationsstelle erkennbaren Membranfragmente (M). Die Bilder F - H zeigen Aufnahmen der Unterseite der Membran. Während die Penetrationshyphe deutlich sichtbar ist, sind Konidie und Appressorium nur als Abdruck durch die Membran erkennbar.

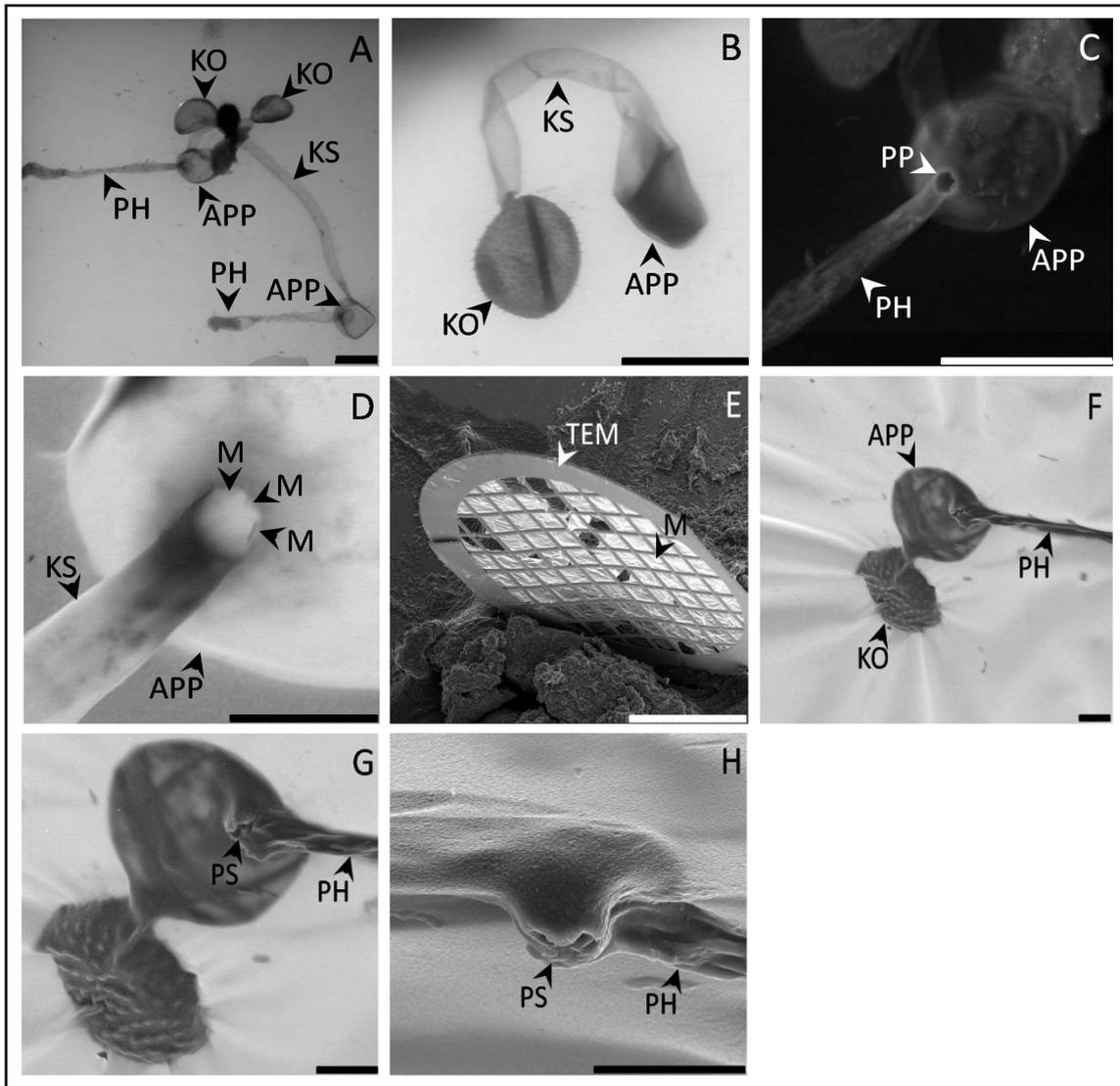


Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Abbildung von Penetrationsereignissen bei *P. pachyrhizi*

ESEM- (A - D) und REM- (E - H) Aufnahmen von *P. pachyrhizi* auf PTFE. KO = Konidie; KS = Keimschlauch; APP = Appressorium; PH = Penetrationshyphne; PP = Penetrationsspore; PS = Penetrationsstelle; M = Membran; TEM = TEM-Netz. Maßstab A - C = 20 μ m; D = 5 μ m; E = 1 mm; F - H = 5 μ m.

Analog zu *P. pachyrhizi* wurden ähnliche Aufnahmen auch von *C. graminicola* angefertigt (siehe Abbildung 28).

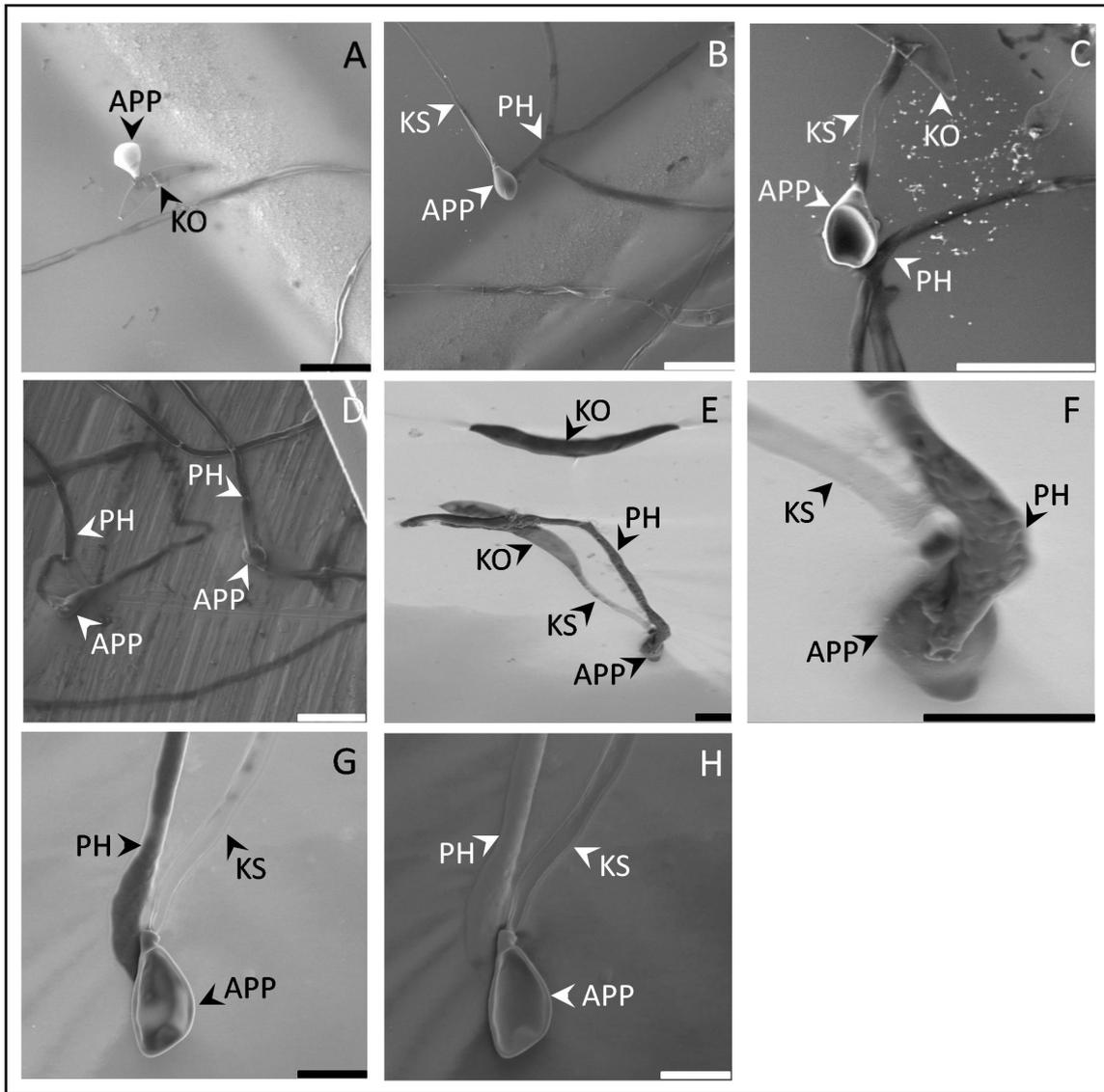


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Abbildung von Penetrationsereignissen bei *C. graminicola*

ESEM- (A - D) und REM-Aufnahmen (E - H) von *C. graminicola* auf PTFE. A - C zeigen Aufnahmen von der Oberseite der Schicht, D von der Unterseite. Aufgrund der gewählten Parameter (kV) ist eine Durchsicht auf darunter liegende Infektionsstrukturen möglich. E - G: 5 kV, die Schicht erscheint transparent; H: 1 kV, die Schicht ist undurchsichtig. KO = Konidie; KS = Keimschlauch; APP = Appressorium; PH = Penetrationshypha. Maßstab A - D = 20 µm; E - F = 5 µm.

3.3.2.1.2 Penetrationskompetenz von *Colletotrichum graminicola* WT-Isolat und $\Delta Cgpk1$

Für die Untersuchung der Rolle der Melanisierung von Appressorien bei der Penetration wurden Knock Out-Mutanten von *C. graminicola* verwendet, die durch eine gezielte Deletion der Polyketidsynthase 1 hergestellt wurden (HORBACH, 2010). Neben der Charakterisierung des Infektionsverlaufs auf Mais, Zwiebel und PET-Folie (siehe Abbildung 29) wurde parallel das Penetrationsvermögen auf artifiziellen Membranen (PTFE; siehe Abbildung 30) getestet.

Neben der Penetrationsrate wurde für eine Transformante mit ektopischer Integration (ECT) und zwei Knock Out-Mutanten (KO1, KO2) auch der Umfang der lateralen Keimung ausgehend von den gebildeten Appressorien erfasst (siehe Abbildung 29). Während Appressorien von WT und ECT nur selten laterale Keimung zeigten, erreichten die KOs auf Zwiebel nach 48 h Werte um 50 %. Auf allen untersuchten Substraten (Mais, Zwiebel, PET-Folie) war die laterale Keimung der KOs nach 48 h signifikant höher als die von WT und ECT.

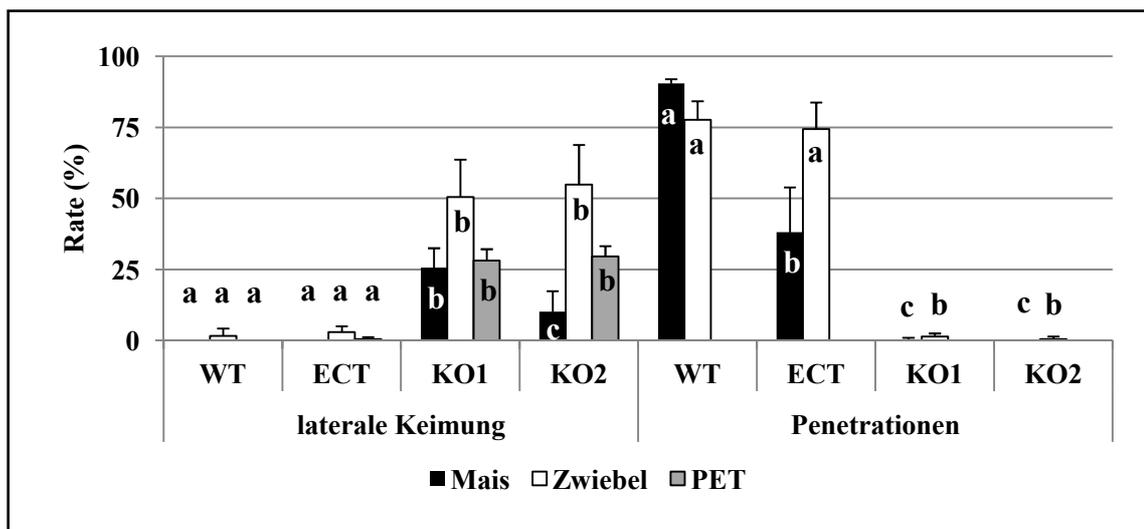


Abbildung 29: Laterale Keimung und Penetrationen bei WT *CgM2* und $\Delta Cgpk1$

Signifikante Unterschiede sind als Signifikanzklassen angegeben, unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede. Verglichen wurden die 4 Pilzisolat jeweils auf einem Substrat. Die Differenz zu 100 % sind Appressorien ohne lateralen Keimschlauch (Säulen "laterale Keimung") bzw. ohne Penetrationsereignis (Säulen "Penetrationen").

Während WT und ECT Mais und Zwiebel penetrieren konnten, wurden für die KOs signifikant geringere (Zwiebel) bzw. keine Penetrationen (Mais) beobachtet. Im Gegensatz dazu waren die KOs in der Lage artifizielle Membranen (PTFE) zu penetrieren. So konnten auf 60,

Ergebnisse

110 und 160 nm Schichten keine signifikanten Unterschiede zum WT festgestellt werden (siehe Abbildung 30 A).

Die laterale Keimung war auch auf den PTFE-Schichten bei KO1 signifikant höher als die des WT-Isolates. Mittels Licht- und Elektronenmikroskopie konnten die Penetrationsereignisse der KO 1 Mutante dargestellt werden (siehe Abbildung 30 B - D).

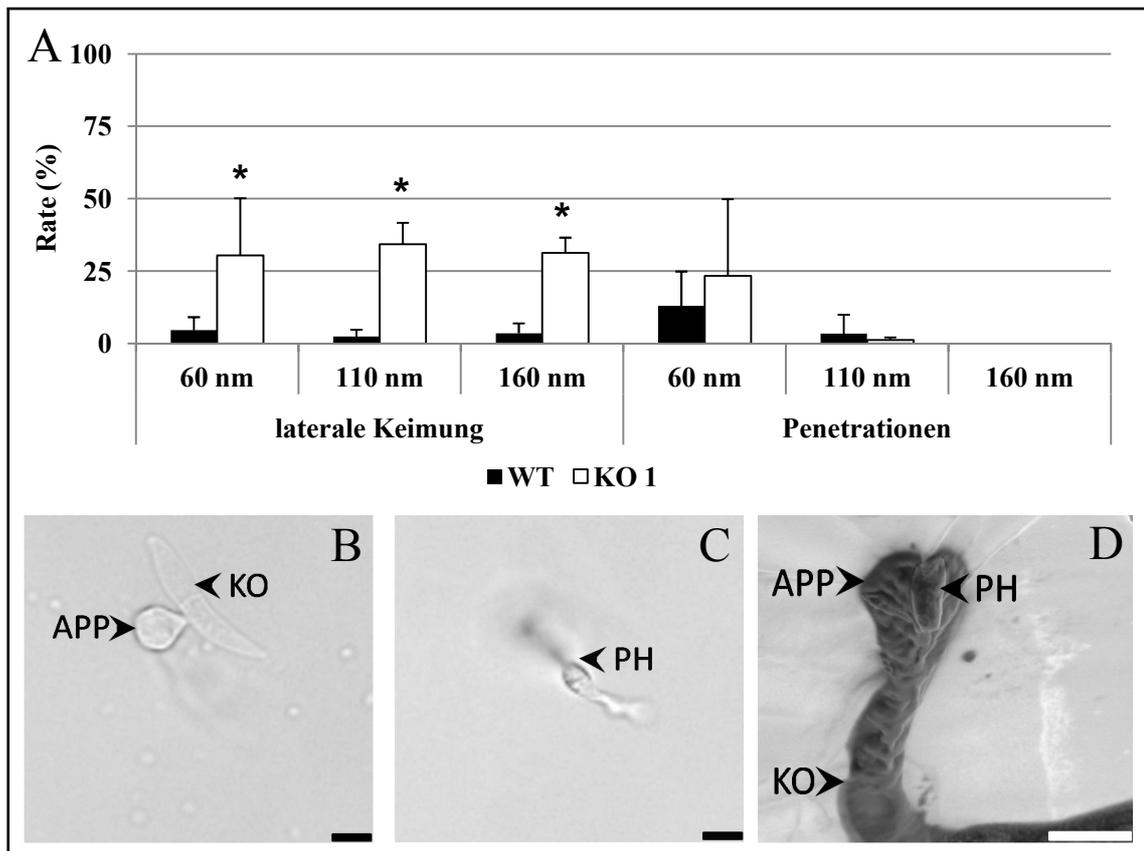


Abbildung 30: Laterale Keimung und Penetrationen von WT CgM2 und $\Delta Cgpk1$ auf PTFE

Diagramm (A): Die Auswertung der Proben erfolgte 3 d nach Inokulation. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und KO1 sind mit einem * gekennzeichnet. Die Differenz zu 100 % sind Appressorien ohne lateralen Keimschlauch (Säulen "laterale Keimung") bzw. ohne Penetrationsereignis (Säulen "Penetrationen").

Bilder: Licht- (B + C) und Rasterelektronenmikroskopische (D) Aufnahmen von Penetrationsstellen der KO 1 durch PTFE, 60 nm. KO = Konidie; APP = Appressorium; PH = Penetrationshyphe. Maßstab B + C = 10 μ m; D = 5 μ m.

3.3.2.2 PMMA (Polymethylmetacrylat)

3.3.2.2.1 Vergleich der Entwicklung von *Colletotrichum graminicola* und *Phakopsora pachyrhizi*

Neben den bereits beschriebenen Experimenten mit unterschiedlichen Pflanzenpathogenen auf PTFE-Schichten wurden im Folgenden auch Inokulationsversuche mit einem zweiten Polymer (PMMA) durchgeführt. Parallel zu den Versuchen mit PTFE wurden PMMA-Schichten mit Sporensuspensionen von *C. graminicola* (WT) und *P. pachyrhizi* inokuliert. Die Vorgehensweise bei der Inokulation entsprach der bei PTFE. Auch hier wurden Schichten mit unterschiedlicher Dicke (60 und 110 nm) verwendet. In Abbildung 31 sind vergleichend die Keimraten beider Pilze auf PTFE und PMMA dargestellt.

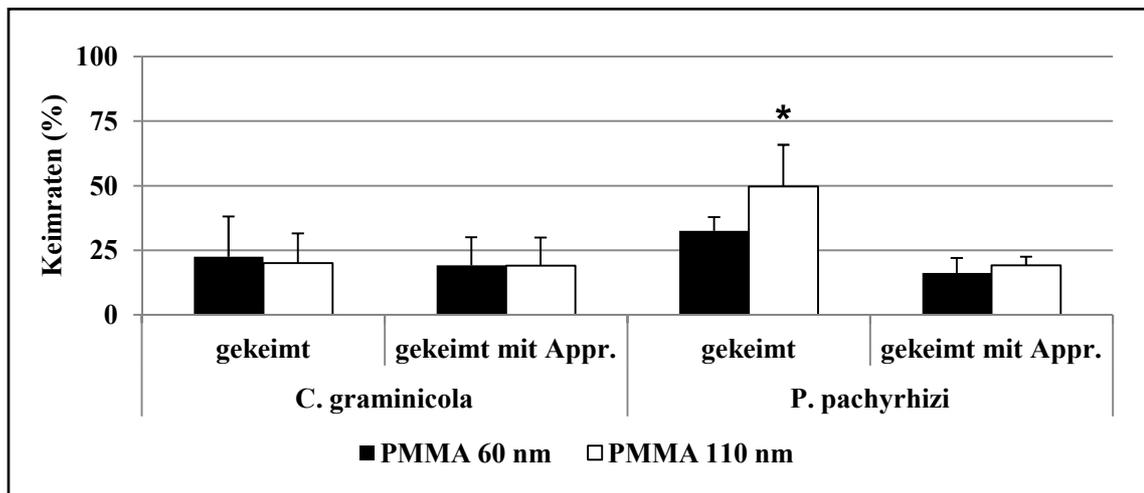


Abbildung 31: Entwicklung von *C. graminicola* und *P. pachyrhizi* auf PMMA

Keimraten. Signifikante Unterschiede zwischen den Pilzen auf Ebene der Schichtdicken sind mit einem * gekennzeichnet.

Während die Keimraten beider Pilze sich auf PTFE und PMMA nicht signifikant unterscheiden, bildete *C. graminicola* mehr Appressorien auf PMMA, *P. pachyrhizi* auf PTFE (Ergebnisse siehe Tabelle 10, Anhang).

PMMA-Schichten konnten durch *C. graminicola* signifikant besser penetriert werden als PTFE-Schichten (siehe Abbildung 32 A). Der Erreger des Sojarostes erreichte höhere Penetrationsraten auf PMMA, im Gegensatz zu PTFE, nur auf Schichten mit einer Dicke von 110 nm. Bilder von *P. pachyrhizi* auf PMMA sind in Abbildung 32 (Bilder B - E) dargestellt.

Ergebnisse

Die Penetrationshyphen fluoreszierten, nach Inkubation in Texas Red WGA, rot. Abbildung 32 (Bilder F + G) zeigen ein Penetrationsereignis von *C. graminicola* durch eine PMMA-Schicht.

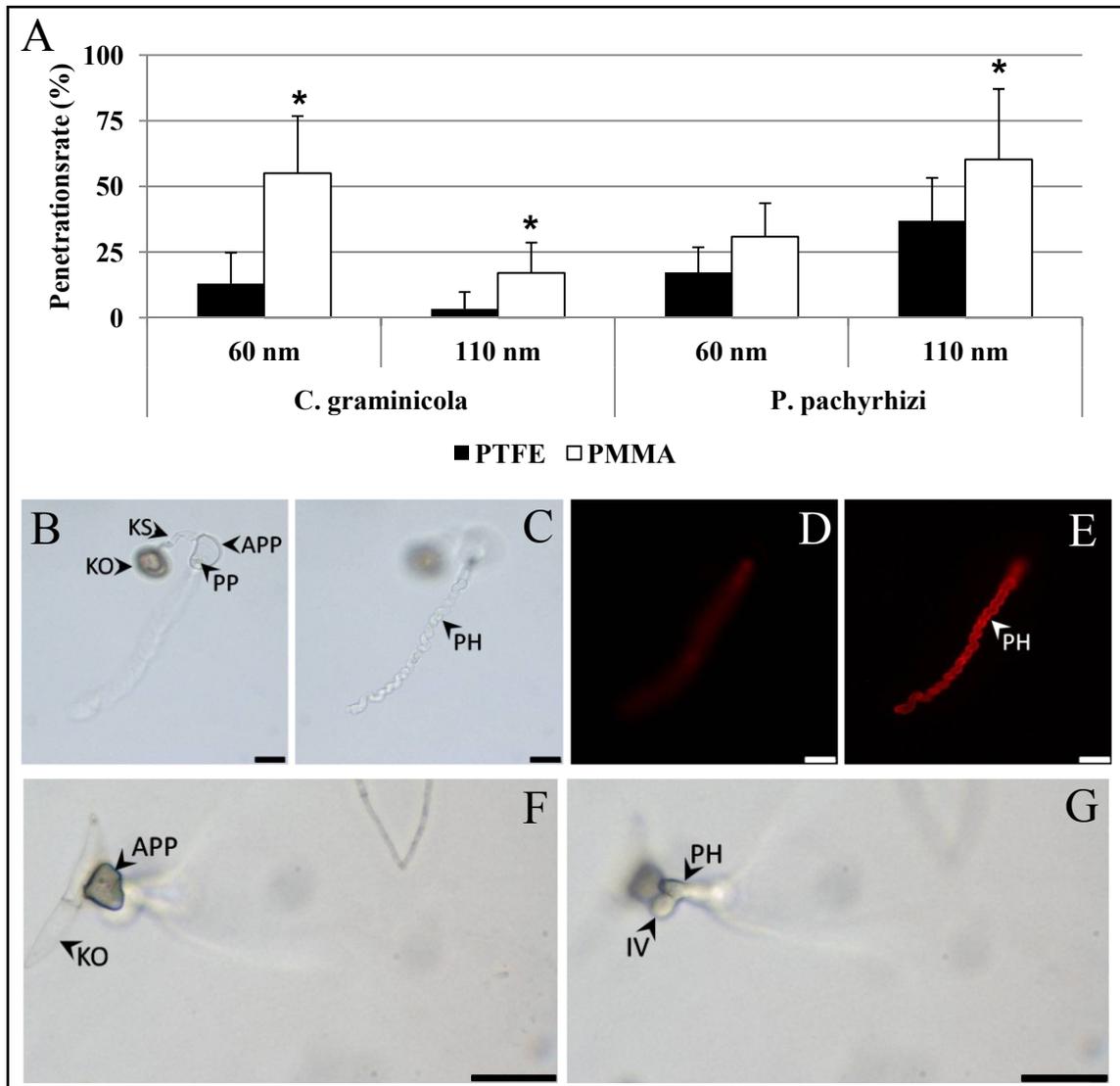


Abbildung 32: Penetrationen von *C. graminicola* und *P. pachyrhizi* auf PTFE und PMMA

Diagramm (A): Penetrationsraten, 3 dpi. Signifikante Unterschiede zwischen den Werkstoffen auf Ebene der Pilze sind mit einem * gekennzeichnet.

Bilder: B - E: Penetrationsereignisse von *P. pachyrhizi* auf PMMA (Färbung mit Texas Red WGA). Betrachtet wurde eine 110 nm dicke Schicht 3 dpi. B + C: Durchlicht; D + E: Filterblock TxRed. KO = Konidie; KS = Keimschlauch; APP = Appressorium; PP = Penetrationsspore; PH = Penetrationshyphe. B + D: Fokusebene Appressorium; C + E: Fokusebene Penetrationshyphe. F + G: Penetrationsereignis von *C. graminicola* auf PMMA. Betrachtet wurde eine 60 nm dicke Schicht, 3 dpi. F: Fokusebene Appressorium; G: Fokusebene Penetrationshyphe. KO = Konidie; KS = Keimschlauch; APP = Appressorium; IV = Infektionsvesikel; PH = Penetrationshyphe. Maßstab = 20 µm.

3.3.2.2.2 Penetrationsraten von *Colletotrichum graminicola* WT-Isolat und AB.158

Neben der Betrachtung von *C. graminicola* und *P. pachyrrhizi* wurde auch die Entwicklung von AB.158 mit der des WT-Isolates auf 60 nm dicken PMMA-Schichten verglichen. Auf die Entwicklung von AB.158 auf Mais wurde bereits im Abschnitt 3.2.4 genauer eingegangen. Der Vergleich der Penetrationsrate auf Mais mit der des WT-Isolates zeigte, dass die Penetration des Wirtes verzögert beginnt. Bei AB.158 wurden signifikant weniger Penetrationsereignisse beobachtet. Auf PMMA-Schichten (siehe Abbildung 33) konnte AB.158 höhere Penetrationsraten als das WT-Isolat erreichen.

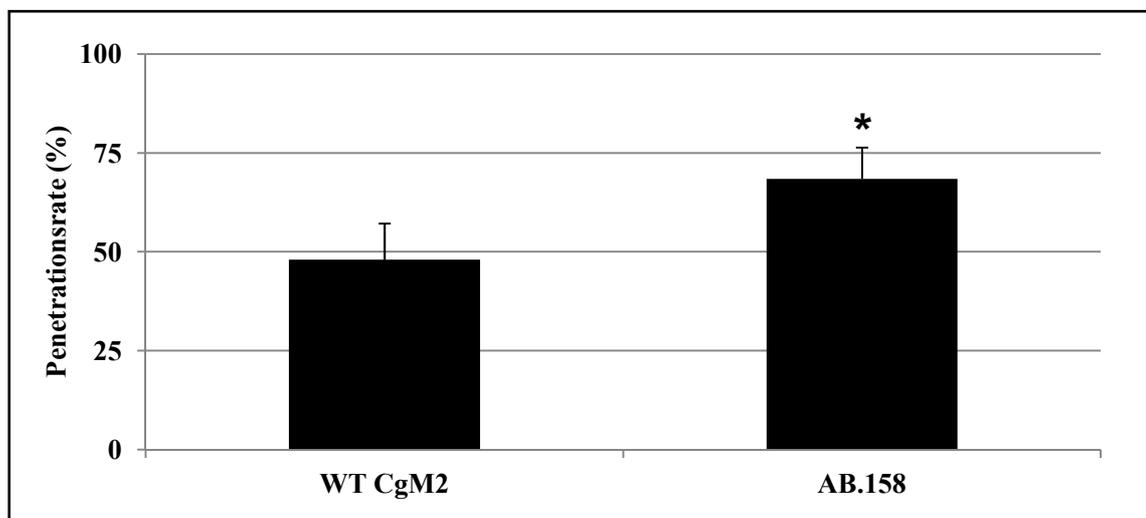


Abbildung 33: Penetrationsraten von WT CgM2 und AB.158 auf PMMA-Schichten

Betrachtet wurden die Penetrationsraten auf 60 nm dicken Schichten, 3 dpi. Ein * markiert signifikante Unterschiede im Vergleich zum WT-Isolat.

Generell eignen sich artifizielle Membranen, die in unterschiedlichen Schichtdicken hergestellt werden können, für Inokulationsversuche mit phytopathogenen Pilzen bzw. für das Screening von Transformanten. Ein Vorteil der Verwendung von PMMA-Schichten liegt in der einfacheren Herstellung und damit der Möglichkeit, schneller größere Schichtenmengen herzustellen.

Wie die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, konnten artifizielle Membranen durch Pilze mit nicht-melanisierten Appressorien (*P. pachyrrhizi* und die Polyketidsynthase-KO-Mutante von *C. graminicola*) penetriert werden. Die Ergebnisse der Penetrationstests auf artifiziellen Membranen lassen darauf schließen, dass der in den nicht-melanisierten Appressorien erreichte Turgordruck es *P. pachyrrhizi* und $\Delta Cgpk1$ erlaubt, artifizielle Membranen zu

penetrieren. Untersuchungen der Appressorien durch Cytorrhizie sollten über diesen Verdacht Aufschluss geben. Eine Enzymtätigkeit kann bei der Penetration artifizieller Membranen ausgeschlossen werden, da die verwendeten Schichten biologisch nicht abbaubar sind.

3.4 Bestimmung des osmotischen Druckes in Appressorien mittels Cytorrhizie

3.4.1 *Colletotrichum graminicola* (WT-Isolat und $\Delta Cgpk51$)

Die verwendeten Isolate (WT, ECT, KO1 und KO2) wurden auf Glasdeckgläschen für 24 h angezogen (siehe Abschnitt 2.4.1). Abbildung 34 zeigt die Zunahme der kollabierten Appressorien mit zunehmender Molarität der verwendeten PEG 6000 Lösungen. Da bei Erreichen der Gleichgewichtscytorrhizie der externe osmotische Druck dem internen (im Appressorium) entspricht, können für WT und ECT Werte von ca. 2,5 MPa, für die beiden KOs von ca. 2,8 MPa angenommen werden. Der Unterschied zwischen diesen Werten ist signifikant (siehe Tabelle 13 im Anhang). Die Ergebnisse der Cytorrhizie korrelieren mit den Ergebnissen der Penetrationskompetenzbestimmung auf PTFE-Schichten. Auf 60 und 110 nm dicken Schichten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Isolat und KO1 festgestellt werden. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 34 B - I) zeigen nicht-kollabierte und kollabierte Appressorien der untersuchten Pilze. Deutlich zu erkennen waren die kollabierten Strukturen durch die Bildung einer Falte, bedingt durch den Wasseraustritt aus den Appressorien.

3.4.2 *Phakopsora pachyrhizi*

Für *Phakopsora pachyrhizi* wurden ebenfalls Cytorrhizie-Daten erhoben. Die Werte für die Bestimmung der Kollabierungsrate 24 hpi sind in Abbildung 34 (A) gezeigt, Gleichgewichtscytorrhizie wurde bei ca. 3,3 MPa externen osmotischen Druck erreicht. Die Werte liegen über denen von *C. graminicola* und würden damit die höheren Penetrationsraten auf artifiziellen Membranen erklären.

Deutlich war die Bildung der für eine Kollabierung der Appressorien typischen Falten in PEG 6000 (8,59 MPa) zu erkennen (siehe Abbildung 35 C). Für *Magnaporthe grisea* ist der Wert für den Zellinnendruck der melanisierten Appressorien aus der Literatur bekannt (5,8 MPa; DE JONG, 1997). Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch in nicht-melanisierten App-

Ergebnisse

ressorien hohe osmotische Drücke aufgebaut werden können und daher ähnliche bzw. zum Teil auch höhere Penetrationsraten auf artifiziellen Membranen erreicht werden konnten.

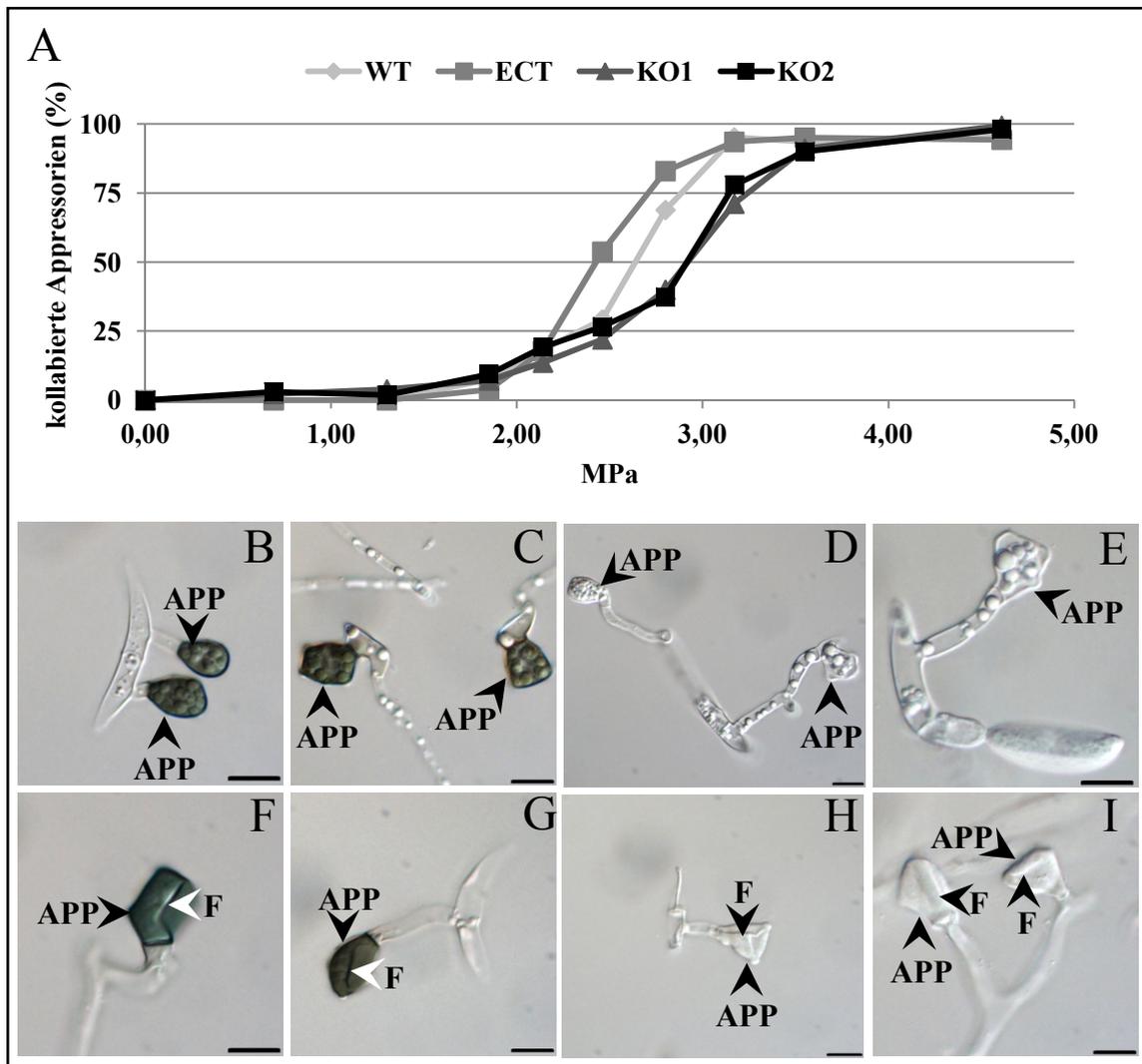


Abbildung 34: Cytorrhizie bei *Colletotrichum graminicola* (WT-Isolat und $\Delta Cgpk1$)

Diagramm (A): Verhältnis zwischen der Erhöhung des externen osmotischen Druckes (MPa) und der Kollabierung der Appressorien von WT und $\Delta Cgpk1$. Die Signifikanzklassen (auf Ebene des extern angesetzten osmotischen Druckes) sind in Tabelle 13 im Anhang angegeben.

Bilder: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Appressorien von WT *C. graminicola* (B + F) und der $\Delta Cgpk1$ Mutanten ECT (C + G), KO 1 (D + F) und KO 2 (E + I). B - E: Appressorien in Wasser (ohne Osmotikum); F - I: Appressorien in PEG 6000 (5,79 MPa). APP = Appressorium; F = Falte (bedingt durch Kollaps). Maßstab = 10 μ m.

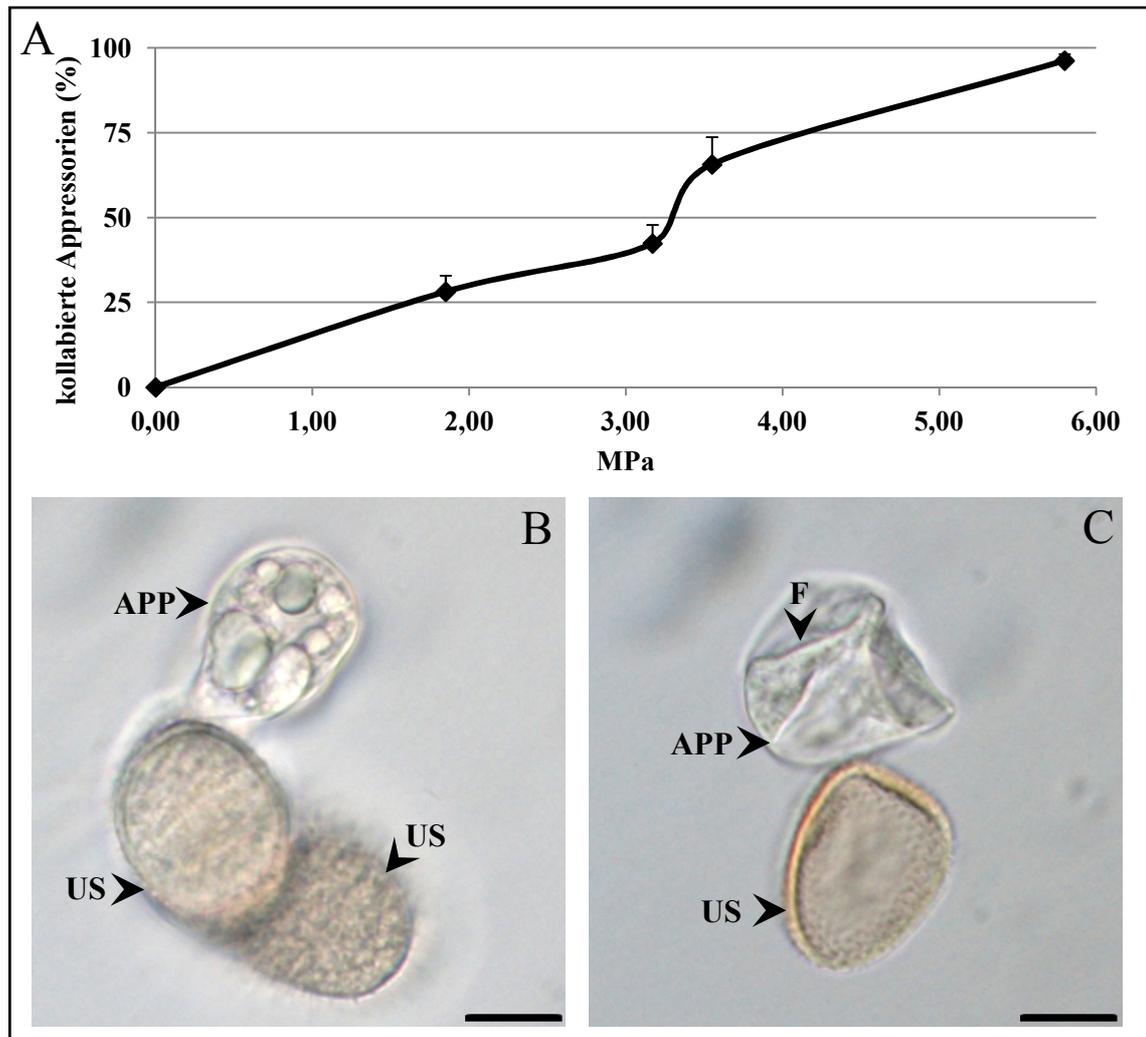


Abbildung 35: Cytorrhizie bei *Phakopsora pachyrhizi*

Diagramm (A): Rate der kollabierten Appressorien auf Glas-Deckgläschen, 24 hpi. Fehlerindikator = Standardabweichung.

B + C: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Uredospore mit einem nicht-kollabierten Appressorium (B, in Wasser) und eines kollabierten Appressoriums mit erkennbarer Falte (C; in PEG 6000, 8,59 MPa). APP = Appressorium; F = Falte; US = Uredospore. Maßstab = 10 μ m.

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, mittels eines Zufallsmutagenese-Ansatzes unter Nutzung der ATMT eine Vielzahl von Transformanten zu erzeugen und diese auf Pathogenitäts- oder Virulenzdefekte zu untersuchen. Der Ansatz der Suche nach Homologen bekannter Virulenzdeterminanten im Genom von *C. graminicola* über degenerierte Primer wurde in den vergangenen Jahren erfolgreich genutzt (WERNER ET AL., 2007). Zusätzlich wurde die ATMT für dieses Pathogen im Rahmen einer Diplomarbeit etabliert (FLOSS, 2004). Weiterhin sollte, in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik Halle/Saale, die Herstellung artifizieller Schichten und deren Einsatz für Inokulationsversuche mit unterschiedlichen pflanzenpathogenen Pilzen und *C. graminicola* Mutanten optimiert werden.

4.1 Erstellung einer *Colletotrichum graminicola* Transformantenbank für die Suche nach Pathogenitäts- bzw. Virulenz-defizienten Mutanten

4.1.1 Hygromycinphosphotransferase-Gen als Selektionsmarker

Die Auswahl des richtigen Selektionsmarkers ist ein wichtiger Schritt vor der eigentlichen Transformation. Neben dem *hph*-Gen, welches Resistenz gegenüber Hygromycin B vermittelt, ist auch der Einsatz von Phleomycin, Sulfonylurea, Nourseothricin, Bialophos, Carboxin, Blastocidin S und Benomyl beschrieben worden (siehe Quellen in WELD ET AL., 2006). Aminocyclitol-Antibiotika, zu denen auch Hygromycin B gehört, wirken gegen ein weites Spektrum an Eu- und Prokaryoten und behindern die Polypeptidsynthese. Ihre Inaktivierung ist durch Acetylierung, Adenylylation und Phosphorylierung möglich (DAVIES & DAVIS, 1968). Das Gen für eine Hygromycinphosphotransferase aus *E. coli* (DAVIES & DAVIS, 1968) vermittelt, wenn es in ursprünglich Hygromycin-sensitive Organismen übertragen wird, Resistenz. Das während dieser Arbeit verwendete Plasmid pPK2 trägt dieses Hygromycinphosphotransferase-Gen (siehe z. B. auch COVERT ET AL., 2001). Ein Vorversuch mit dem *C. graminicola* WT-Isolat zeigte, dass dieser bereits auf geringen Hygromycin B-Konzentrationen (25 µg/ml) nicht mehr wachsen konnte (siehe Abbildung 10). Für die Selektion von ATMT-Transformanten wurde eine Konzentration von 100 µg/ml gewählt. Das Vermögen auf Hygromycin B-haltigem Medium zu wachsen, ist für die nicht-transformierten WT-Stämme unterschiedlicher Pilze sehr verschieden, sodass auch die Konzentrationen im Selektionsmedium variieren (siehe Tabelle 14 im Anhang). Auch zwischen Spezies der

Gattung *Colletotrichum* gibt es Unterschiede hinsichtlich der Hygromycin B-Toleranz. Während *C. falcatum* (50 µg/ml), *C. gloeosporioides*, *C. lagenarium* und *C. trifolii* (jeweils 100 µg/ml) sensitiv auf geringe Konzentrationen reagierten, zeigte *C. acutatum* eine erhöhte Toleranz gegenüber dem Antibiotikum. Das verwendete *hph*-Gen im Vektor pPK2 stand unter der Kontrolle des Promotors des *gpd*-Gens (Glyceraldehyd-3-phosphat) und des Terminators des *trpC*-Gens (Tryptophan C) aus *Aspergillus nidulans*. Diese Kombination wurde auch in anderen Pilzen erfolgreich bei der ATMT eingesetzt, z. B. bei *Verticillium fungicola* (AMEY ET AL., 2002).

4.1.2 Möglichkeiten der Transformation filamentöser Pilze

Als Transformation beschreibt man den Prozess, durch den DNA in eine Zelle eingebracht wird und so zu einer vererbaren Veränderung führt (HINNEN ET AL., 1978). Für die Grundlagenforschung ist die Identifizierung und Charakterisierung von Genen von Bedeutung, die für Pathogenität und Virulenz filamentöser Pilze essenziell sind. So sollen REMI und ATMT durch die zufällige Insertionsmutagenese phytopathogener Pilze zum Auffinden neuer Pathogenitätsgene beitragen.

Generell kann die Übertragung von DNA-Fragmenten über verschiedene Wege erfolgen. Plasmid-vermittelte Transformationssysteme müssen dabei die exogene DNA in die Empfängerzelle übertragen. Die DNA sollte anschließend stabil inseriert und repliziert werden (RUIZ-DÍEZ, 2002). Neben der noch relativ neuen Methode der ATMT können Protoplasten mittels chemischer Behandlung (PEG/CaCl₂ oder Lithium-Acetat), biolistischer Methoden oder Elektroporation zur Aufnahme von Fremd-DNA befähigt werden (Details siehe Review von RUIZ-DÍEZ, 2002).

Für die Erstellung einer Transformantenbank im Hinblick auf die Gewinnung neuer Erkenntnisse zu pathogenitäts- bzw. virulenzbeeinflussenden Genen ist das *gene tagging*, die zufällige Insertionsmutagenese, die Methode der Wahl. Im Idealfall sollte sie zu einer hohen Transformationsfrequenz und der zufälligen Integration der Fremd-DNA als Einzelkopie und an einem einzelnen Locus ohne Änderungen oder Deletionen an der transferierten DNA und der Wirts-DNA führen (WELD ET AL., 2006).

Functional Genomics-Ansätze bei filamentösen Pilzen haben über die letzten Jahre, bedingt durch die Entwicklung vielfältiger Transformationssysteme und damit der Möglichkeit eine

Vielzahl an filamentösen Pilzen und unterschiedlicher Ausgangsmaterialien zu transformieren, zugenommen. Zufällige und gezielte Methoden für eine Genmutation wurden adaptiert und dienen der Untersuchung von Genfunktionen in Pilzen. Weiterhin hat die Anzahl sequenzierter pilzlicher Organismen über die letzten Jahre zugenommen. Eine Übersicht über bereits sequenzierte Pilze bietet das *Broad Institute* mit der *Fungal Genome Initiative* (FGI; [HTTP://WWW.BROADINSTITUTE.ORG/SCIENCE/PROJECTS/FUNGAL-GENOME-INITIATIVE/CURRENT-FGI-SEQUENCE-PROJECTS](http://www.broadinstitute.org/science/projects/fungal-genome-initiative/current-fgi-sequence-projects)).

Für die zufällige Insertionsmutagenese filamentöser Pilze können neben der ATMT auch REMI und die Transformation mittels Transposons zum Einsatz kommen. Der Review von MICHIELSE ET AL. (2005 A) und die darin aufgeführte weiterführende Literatur zeigen Vor- und Nachteile der genannten Methoden. Die Transposon-basierte Methode führt nur bedingt zur zufälligen Integration der Fremd-DNA und diese zeigt eine Präferenz für nicht-kodierende Bereiche. Bei der REMI enthält ein hoher Anteil (30 - 50 %) der erhaltenen Mutationen nicht getaggte DNA. Auch hier ist die Integration nur bedingt zufällig und findet vor allem in stark transkribierten genomischen Regionen statt. Die ATMT hat mehrere entscheidende Vorteile. Zum einen sind keine speziellen Geräte nötig (z. B. ein Elektroporator), zum anderen ist eine vorherige Protoplastierung nicht erforderlich (ABUODEH ET AL., 2000). Weiterhin kann meist nur eine Integration je Mutante beobachtet werden. Es wurde bisher angenommen, dass die Insertion der T-DNA ins Genom zufällig erfolgt [vgl. DE GROOT ET AL. (1998), ABUODEH ET AL. (2000), MULLINS ET AL. (2001), RHO ET AL. (2001), BUNDOCK ET AL. (2002), COMBIER ET AL. (2003), DEGEFU & HANIF (2003), LECLERQUE ET AL. (2004), MICHIELSE, ET AL. (2004)]. Die Arbeit von LI ET AL. (2007) zeigte jedoch bei *Magnaporthe oryzae*, dass die Integration der T-DNA bevorzugt in nicht-kodierende Bereiche erfolgte und somit nicht zufällig ist. Auch MÜNCH ET AL. (2011) konnten für *Colletotrichum graminicola* nicht zufällige Integrationsmuster zeigen. Weiterhin ist die ATMT auch für nachfolgende Analysen mittels homologer Rekombination einsetzbar. Dies wurde z. B. von BUNDOCK ET AL. (1999) bei der Hefe *Kluyveromyces lactis* gezeigt. Somit ist diese Methode im Vergleich zu anderen effizienter hinsichtlich Zeit und Aufwand (AMEY ET AL., 2002).

4.1.3 Integration der T-DNA

Aus Pflanzen ist bekannt, dass der T-DNA-Strang über illegitime Rekombination ins Genom integriert. Selbst bei Sequenzhomologie wird bei Pflanzen nur selten die homologe

Rekombination beobachtet (VAN ATTIKUM ET AL., 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass T-DNA-Stränge vorrangig in Regionen mit aktiver Transkription integrieren (KONCZ ET AL., 1989; HERMAN ET AL., 1990), da hier die Wahrscheinlichkeit von Brüchen in der DNA höher ist und das DNA-Molekül durch seine aufgelockerte Form während der Transkription einfacher zu erreichen ist.

Im Gegensatz zu Pflanzen integriert die T-DNA in das Genom der Hefe *S. cerevisiae* vorrangig über homologe Rekombination (BUNDOCK ET AL., 1995). Während bei *S. cerevisiae* die homologe Rekombination effizienter abläuft als die illegitime, heterologe Rekombination, gibt es hinsichtlich der Transformationseffizienzen bei *Kluyveromyces lactis*, einer weiteren Hefe-Spezies, dahingehend keine Unterschiede. Sind Sequenzhomologien vorhanden, wird hier die homologe Rekombination bevorzugt. *S. cerevisiae* scheint jedoch effizientere Mechanismen für homologe Rekombination zu besitzen (BUNDOCK & HOOYKAAS, 1996; BUNDOCK ET AL., 1999).

4.1.4 T-DNA Insertion in das Genom von Hefen und filamentösen Pilzen

Durch BRUNAUD ET AL. (2002) wurden fünf Schritte der T-DNA-Integration nach dem Transfer in *Arabidopsis thaliana* postuliert. *Upstream* der LB (*left border*) wird ein mehr oder weniger perfekter Duplex mit dem oberen Strang der Wirts-DNA gebildet. Nach der Degradierung des LB-Bereiches *downstream* des Duplex erfolgt die Ligation zwischen dem verdauten unteren Strang der Wirts-DNA und dem 3'-Ende der T-DNA durch Wirtsenzyme. Ausgehend von einem Schnitt im oberen Wirts-DNA-Strang wird der Komplementärstrang synthetisiert, imperfekte Paarungen werden dabei erkannt und durch Wirts-Enzyme repariert. Die T-DNA-Sequenz dient dabei als Matritze. Zuletzt wird die RB in die Wirts-DNA ligiert und der obere Strang der Wirts-DNA zwischen den beiden Mikrohomologien verdaut und mit dem Komplementärstrang verbunden. Dabei kommt es häufig zur Deletion von Wirts-DNA.

Die Möglichkeit, ATMT für Insertionsmutagenese zu nutzen, wurde bei Hefen und filamentösen Pilzen untersucht. Durch BUNDOCK ET AL. (2002) konnte die zufällige Insertion in kodierende und nicht-kodierende Bereiche, zufällig über das gesamte Genom von *S. cerevisiae* verteilt, gezeigt werden. Nur 1 - 5 % der Transformanten trugen mehr als eine Kopie der T-DNA, die zumeist als *inverted repeat structure* (Tandemintegration) vorlag.

Für *M. oryzae* konnte eine Präferenz der T-DNA-Insertion in Promotorregionen von Genen, weniger in die kodierenden Bereiche selbst, festgestellt werden (CHOI ET AL., 2007). Dies könnte durch eine Bevorzugung von Bereichen mit einem höheren AT-Gehalt bei der T-DNA Integration erklärt werden (HURST ET AL., 2004). Die Präferenz für AT-reiche Bereiche ist z. B. auch aus *Arabidopsis thaliana* (BRUNAUD ET AL., 2002; PAN ET AL., 2005) bekannt. Promotor- bzw. AT-reiche Bereiche scheinen Organismen übergreifend bevorzugt zu werden.

Eine Möglichkeit, die flankierenden Bereiche der T-DNA-Insertion zu identifizieren, stellt das *PCR walking* dar. Durch COTTAGE ET AL. (2001) wurde eine nach SIEBERT ET AL. (1995) adaptierte Methode vorgestellt. Die isolierte pflanzliche DNA wird mit Restriktionsenzymen, die in glatten Enden resultieren, verdaut. Die Fragmente werden nachfolgend an asymmetrische Adaptoren ligiert. Durch eine Kombination aus Primern, die für die verwendeten Adaptoren und die T-DNA spezifisch sind, wird es möglich, die unbekannt flankierenden DNA-Bereiche zu amplifizieren.

4.1.5 Einfluss verschiedener Faktoren auf den Transformationserfolg durch ATMT

Neben Konidien, die im ungekeimten [u. a. bei *Fusarium ssp.* (*F. circinatum*, COVERT ET AL., 2001; *F. oxysporum*, MULLINS ET AL., 2001), *Aspergillus ssp.* (*A. giganteus*, MEYER ET AL., 2003; *A. fumigatus*, SUGUI ET AL., 2005) und *M. grisea*, RHO ET AL., 2001] und gekeimten (*Colletotrichum higginsianum*; O'CONNELL ET AL., 2004) Zustand verwendet werden können, ist auch die Transformation von haploidem (*Hebeloma cylindrosporium*; COMBIER ET AL., 2003) und dikaryotischem Myzel (*Suillus bovinus*; HANIF ET AL., 2002) und Fruchtkörpern (*Agaricus bisporus*; CHEN ET AL., 2000) möglich. Während es hinsichtlich der Verwendung von protoplastiertem und nicht-protoplastiertem Ausgangsmaterial bei *Coccidioides immitis* (ABUODEH ET AL., 2000), *Aspergillus awamori* (DE GROOT ET AL., 1998) und *Mycosphaerella graminicola* (ZWIERS & DE WAARD, 2001) keine Auswirkung auf die Transformationseffizienz gab, war die Transformation des Zygomyceten *Rhizopus oryzae* nur bei Verwendung von Protoplasten erfolgreich. Die Verwendung von Sporen und gekeimten Sporen blieb ergebnislos (MICHIELSE, ET AL., 2004). Für die Transformation von *C. graminicola* wurden durch FLOWERS & VAILLANCOURT (2005) und auch während dieser Arbeit Sporen eingesetzt. Ob es Unterschiede hinsichtlich der Transformationseffizienz bei der Verwendung protoplasierter Sporen gab wurde nicht untersucht. Konidien (ungekeimt oder gekeimt) sind das

vorherrschende Ausgangsmaterial bei der ATMT von *Colletotrichum* ssp. (siehe Tabelle 14 im Anhang).

Für die Transformation filamentöser Pilze und Hefen wurden unterschiedliche *Agrobacterium tumefaciens* Stämme verwendet. Ein positiver Einfluss auf die Transformationseffizienz ist, im Vergleich zu LBA1100, bei Verwendung supervirulenter Stämme zu verzeichnen (MICHIELSE ET AL., 2005A). Dieser hochvirulente Phänotyp wird durch den *virG* Lokus auf dem Helferplasmid bestimmt. Mutationen im *virG* (z. B. bei den Stämmen AGL-0 und AGL-1) bzw. dessen konstitutive Expremierung (bei Stamm EHA-105) führen zu einer erhöhten Expremierung der *vir* Gene und somit zu einer effizienteren Übertragung der T-DNA (COVERT ET AL., 2001). In einem direkten Vergleich der Stämme LBA1100 und AGL-1 bei der Transformation von *Monascus purpureus* waren die Trans-formationseffizienzen des supervirulenten Stammes 2 bis 4-mal höher als die von LBA1100 (CAMPOY ET AL., 2003). Möglicherweise könnte die während dieser Arbeit erzielte Transformationsrate von ca. 221 Transformanten bei Verwendung von 10^6 Sporen durch Einsatz eines supervirulenten Stammes (z. B. AGL-1) noch erhöht werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen bei anderen Pilzen liegt die bei *C. graminicola* mit dem Stamm LBA1100 erzielte Transformationsrate höher als die bei *Calonectria morganii* (13 aus 10^6 Sporen; MALONEK & MEINHARDT, 2001) und *A. giganteus* (79 aus 10^6 Sporen; MEYER ET AL., 2003).

Allerdings gibt es neben dem verwendeten Bakterienstamm noch weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Effizienz der Transformation haben können. So ist z. B. die Induktion der *vir* Gene, die für den Transfer der T-DNA in die Wirtszelle benötigt werden, essenziell für den Transformationserfolg (MICHIELSE ET AL., 2005A). Die Induktion erfolgt im Labor hauptsächlich durch Zugabe von Acetosyringon (AS), einem monozyklischen Phenol. Erste Versuche der T-DNA Übertragung auf Hefe (BUNDOCK ET AL., 1995) zeigten deutlich die Unabdingbarkeit des Zusatzes von AS zum Transformationsansatz. Auch bei den folgenden Arbeiten zur ATMT bei filamentösen Pilzen konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (z. B. bei *A. awamori*, *A. niger*, *C. gloeosporioides*, *F. venenatum*, *T. reesei*, *N. crassa* und *A. bisporus* durch DE GROOT ET AL., 1998). Die Transformation von *C. graminicola* gelang nur in Anwesenheit von AS (FLOSS, 2004; FLOWERS & VAILLANCOURT, 2005), wobei bei der Arbeit von FLOSS (2004) nach Co-Kultivierung auf positiv geladenen Nylonmembranen auch in Abwesenheit von AS putative Transformanten zu finden waren. Die Verwendung von Cellulosefiltern und gewaschenen Nylonmembranen führte nicht zur Entstehung von Transformanten. Es wurde vermutet, dass die Nylonmembranen phenolische Substanzen

freisetzen und es deshalb zur Induktion der *vir* Gene kam. Für weiterfolgende Arbeiten, auch während dieser Arbeit, wurden Cellulosefilter für die Co-Kultivierung genutzt. Auf einen nochmaligen Test der Transformationseffizienzen bei An- bzw. Abwesenheit von AS wurde während dieser Arbeit verzichtet. In einigen Arbeiten wurde AS nicht nur während der Co-Kultivierung, sondern auch für eine Vorkultur der Bakterien verwendet. Bei der Transformation von *H. cylindrosporium* konnten keine Unterschiede hinsichtlich des Transformationserfolges nach Vorkultur mit und ohne AS festgestellt werden (COMBIER ET AL., 2003), in einigen Fällen führte es jedoch zu einer Zunahme der Transformationseffizienz (MULLINS ET AL., 2001; RHO ET AL., 2001). Nachteilig wirkte sich die AS-haltige Vorkultur auf die Anzahl multipler Integrationen der T-DNA aus, die bei *M. grisea* (RHO ET AL., 2001) anstieg. Der gegenteilige Effekt konnte bei *F. oxysporum* (MULLINS ET AL., 2001) beobachtet werden; bei *C. acutatum* (TALHINHAS ET AL., 2008) gab es keinen Unterschied. Die Vorkultur von *C. graminicola* während dieser Arbeit erfolgte ohne den Zusatz von AS. Bei den Arbeiten von FLOWERS & VAILLANCOURT (2005) wurde AS für die Vorkultivierung genutzt. Da kein Vergleich zwischen Kulturen mit und ohne AS-haltiger Vorkultur durchgeführt wurde, konnte keine Aussage getroffen werden, ob die hohen Raten an multiplen Insertionen, die von FLOWERS & VAILLANCOURT (2005) beschrieben wurden, auch, wie bei *M. grisea*, teilweise von der AS-Zugabe zur Vorkultur beeinflusst wurde.

Die Übertragung der T-DNA erfolgt während der Co-Kultivierung von Bakterien und Pilzmaterial. Auch hier gibt es Faktoren, z. B. die Länge der Co-Kultivierung und das Verhältnis von Bakterienzellen zu beispielsweise Pilzsporen, die das Transformationsergebnis beeinflussen können. In den meisten Fällen wurde die Co-Kultivierung für zwei bis drei Tage (siehe Tabelle 14 im Anhang) durchgeführt. Bei *C. graminicola* wurden Pilzsporen und Bakterien für drei Tage gemeinsam inkubiert (FLOSS, 2004; FLOWERS & VAILLANCOURT, 2005; diese Arbeit). Die Länge der Co-Kultivierung kann sich positiv auf die Höhe der Transformanten, aber auch positiv auf das Ausmaß multipler Insertionen auswirken (z. B. *M. grisea*, RHO ET AL., 2001; *C. acutatum* und *C. falcatum*, MARUTHACHALAM ET AL., 2008). Die Reduzierung der Co-Kultivierungszeit könnte daher bei *C. graminicola* zu einer Reduzierung von multiplen Insertionen führen.

Dieser Ansatz könnte in zukünftigen Arbeiten getestet werden, ebenso wie der Einfluss der Bakterienzellzahl im Transformationsansatz. Auch hiermit ist oftmals eine Erhöhung der Transformationseffizienz verbunden (z. B. ABUODEH ET AL., 2000; MULLINS ET AL., 2001; RHO ET AL., 2001; FLOWERS & VAILLANCOURT, 2005; MARUTHACHALAM ET AL., 2008). Zu

viele Zellen können, wahrscheinlich aufgrund von zunehmender Nährstoffkonkurrenz, aber auch den gegenteiligen Effekt haben (MEYER ET AL., 2003; YANG & LEE, 2008). Allerdings kann die eingesetzte Menge an Bakterienzellen das Auftreten von multiplen Insertionen bzw. Tandem-Insertionen an einem Locus beeinflussen (siehe Ergebnisse in SULLIVAN ET AL., 2002).

Zwischen der eingesetzten Sporenanzahl und der Anzahl an resultierenden Transformanten gibt es oftmals keinen direkten Zusammenhang. So führte die Erhöhung von 10^4 auf 10^5 Sporen bei *F. oxysporum* nicht zur Zunahme an Transformanten (COVERT ET AL., 2001), bei *A. awamori* konnten bei 100-facher Erhöhung der Sporen nur 20-mal mehr Transformanten beobachtet werden (DE GROOT ET AL., 1998). Eine zu hohe Sporenkonzentration kann jedoch dazu führen, dass die Selektion putativ positiver Transformanten erschwert wird (TALHINHAS ET AL., 2008). Der Einsatz von 10^5 Sporen je Transformationsansatz erlaubte die Isolierung einzelner Kolonien und eignet sich daher für die Transformation von *C. graminicola*. Auch FLOWERS & VAILLANCOURT (2005) arbeiteten mit dieser Sporenkonzentration.

Ein bekanntes Phänomen, welches bereits 1926 beschrieben wurde (siehe Referenzen in FULLNER & NESTER, 1996), ist die Temperaturabhängigkeit der Tumorbildung bei *A. tumefaciens*. So konnten die Arbeiten von FULLNER & NESTER (1996) und BARON ET AL. (2001) zeigen, dass die T-DNA-Transfermaschinerie ein Temperaturoptimum besitzt (ca. 19 - 22 °C) und dass sich Temperaturen > 28 °C negativ auswirken. Auch SUGUI ET AL. (2005) beobachteten bei der ATMT von *A. fumigatus* den negativen Einfluss von höheren Temperaturen auf den Transformationserfolg.

In einem parallel laufenden Projekt (S. Münch, DE 403/16-1) sollten die erzeugten ATMT Transformanten molekular charakterisiert werden. Diese Aufgaben waren nicht Bestandteil der hier vorgestellten Arbeit. Neben der Analyse der Integrationsmuster in ca. 100 zufällig ausgewählte Transformanten sollte mittels *genome walking* das durch die T-DNA-Insertion betroffene Gen bei Transformanten mit Pathogenitäts- bzw. Virulenzverlust identifiziert werden. MÜNCH ET AL. (2011) zeigten, dass bei 69,5 % der untersuchten Transformanten die T-DNA-Integration an nur einem Locus festgestellt werden konnte. Doppelintegrationen konnten bei MÜNCH ET AL. (2011) zu 26,7 %, Mehrfachintegrationen (> 2) mit 3,8 % beobachtet werden. Weiterhin wurde durch Flowers & Vaillancourt (2005) von Tandem-Integrationen der Plasmid-Sequenz (80 %) berichtet, 36 % hatten multiple Integrationen im Genom. Desweiteren wurde von Tandem-Integrationen des ganzen Plasmids (70 %) berichtet.

Die Angaben zu den erlangten Transformationsraten sind jedoch nicht eindeutig. Die untersuchten Mutanten in MÜNCH ET AL. (2011) zeigten zu 33 % die Integration des gesamten Plasmids an einem Locus, bei 3 % integrierte die Plasmidsequenz als Tandem. Für 67 % konnte definitiv gesagt werden, dass sie keine Integration des gesamten Plasmids enthielten. Diese Unterschiede könnten auf Unterschiede bei der Durchführung der ATMT zurückzuführen sein. So wurden unterschiedliche *A. tumefaciens* Stämme und Plasmide verwendet. Da es sich bei AGL-1, dem durch FLOWERS & VAILLANCOURT (2005) verwendeten Stamm, um ein supervirulentes Isolat handelt, könnte auch hier die Übertragung mehrerer T-DNA-Kopien auf eine pilzliche Zelle begründet liegen. Einen Einfluss des Verhältnisses zwischen *A. tumefaciens*-Zellen und Zielzellen auf das Auftreten von Einzel- bzw. Tandemintegrationen konnte für *Blastomyces dermatitidis* nachgewiesen werden (SULLIVAN ET AL., 2002). Wurde die Anzahl der eingesetzten *A. tumefaciens*-Zellen reduziert (Verhältnis 1:50 auf 1:0,5), konnten zwar häufig multiple Integrationen in das Genom beobachtet werden, die Integration mehrerer DNA-Kopien an einer Stelle nahm jedoch ab. Eine Verlängerung der Co-Kultivierungsdauer führte bei *M. grisea* (RHO ET AL., 2001) zum Anstieg der Mehrfachintegrationen. Diese Beispiele könnten Ansatzpunkte für eine weitere Optimierung der ATMT bei *C. graminicola* bieten. So könnte die Dauer der Co-Kultivierung und die Anzahl der eingesetzten *A. tumefaciens* Zellen reduziert werden. Neben den *Southern blot* Untersuchungen (MÜNCH, ET AL., 2011) konnte die geglückte Insertion des *hph*-Genes mittels Wachstumstests auf Hygromycin B-haltigem Medium (siehe Abbildung 10) und eines PCR-basierten Ansatzes (siehe Abbildung 13) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum WT-Isolat, welches ausschließlich auf Hygromycin B-freiem Medium wachsen konnte, war es den getesteten 19 Einzelsporisولاتen durchgängig möglich, das Antibiotikum abzubauen und auf dem Selektionsmedium zu wachsen (siehe Abbildung 11). Diese Versuche gaben einen ersten Hinweis auf die geglückte Transformation. Mittels spezifischer Primer, die im Promotor und im *hph*-Gen selbst binden können, konnte die entsprechende Bande in den ESI, nicht aber im WT nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13). Allerdings erfolgt so nur der Nachweis der T-DNA-Integration ins Genom, über die Häufigkeit der Insertionen gab der PCR-basierte Ansatz keinen Aufschluss.

4.2 Mutantenscreening

Die nach der erfolgreichen Insertionsmutagenese mittels ATMT zur Verfügung stehenden Transformanten wurden auf Pathogenitätsverlust bzw. eine Reduktion ihrer Virulenz auf der

Wirtspflanze Mais hin untersucht. Als Pathogenitätsgene werden Gene bezeichnet, die für die Krankheitsentwicklung, jedoch nicht für die Vollendung des Lebenszyklus *in vitro*, notwendig sind. Ihre Disruptierung resultiert in der Verringerung oder dem kompletten Wegfallen der Symptomausbildung (IDNURM & HOWLETT, 2001). Je nach Infektionsstrategie können Gene essenziell sein, die z. B. an der Ausbildung von Infektionsstrukturen (z. B. Appressorien), dem Abbau von Kutikula und Zellwand, der Antwort auf die Wirtsumgebung und an der Bildung von Toxinen beteiligt sind. Eine weitere wichtige Rolle kommt Genen zu, deren Produkte bei der Reizweiterleitung von Bedeutung sind. Andere Gene können in keine der Klassen eingeteilt werden (Einteilung nach IDNURM & HOWLETT, 2001). Eine Vielzahl von Genen, die für die Pathogenität bzw. für die Virulenzausprägung phytopathogener Pilze benötigt werden, konnten über den Ansatz der *functional genomics* in den letzten Jahren identifiziert werden. Sekundärmetabolite sind in einigen Pathosystemen als Pathogenitätsfaktoren bekannt, z. B. Melanin (siehe HOWARD ET AL., 1991) und Toxine [z. B. T-Toxin bei *Cochliobolus heterostrophus* (BAKER ET AL., 2006)]. Die Arbeit von HORBACH ET AL. (2009) läßt auf das Vorhandensein von Toxinen im Pathosystem *C. graminicola/Zea mays* schließen, da PPTase-defiziente Mutanten das Wirtsgewebe noch besiedeln können, jedoch nicht mehr dazu in der Lage sind, Anthraknose-Symptome auf den befallenen Pflanzen auszubilden.

Zellwandabbauende Enzyme scheinen eine große Rolle bei der Penetration und der Ausbreitung in der Wirtspflanze zu spielen. Pflanzenpathogene bilden eine Vielzahl an unterschiedlichen Enzymen (z. B. Kutinasen, Xylanasen, Pektinasen), der Knock-Out einzelner Gene hatte jedoch häufig keinen dramatischen Effekt auf die Virulenz (HAMER & HOLDEN, 1997 und darin enthaltene Quellen). Gründe dafür könnten die genetische Redundanz sein, so konnten z. B. multiple Xylanasen (APEL-BIRKHOFF & WALTON, 1996), Kutinasen (YAO & KÖLLER, 1995) und Proteasen (MURPHY & WALTON, 1996) nachgewiesen werden. Außerdem sekretieren Pathogene immer ein Gemisch aus unterschiedlichen Enzymen (KNOGGE, 1996). Neben der Sekretion von Enzymen ist die Ausbildung spezifischer Infektionsstrukturen, z. B. Keimschläuche, Appressorien und Hyphen, die im Pflanzengewebe wachsen können, von Bedeutung. Die Ausbildung von Appressorien ist ein komplexer Vorgang, der die Synthese neuer Zellwandschichten, die Bildung spezialisierter Zellabteilungen, Änderungen des Zytoskeletts und der Genexpressionsmuster umfasst (HAMER & HOLDEN, 1997). Eine Vielzahl von Genen, die für die Bildung und die Funktion der Appressorien benötigt werden, konnten mittels zufälliger Mutagenese identifiziert und deren Rolle für den Pathogenitätsverlauf geklärt werden [z. B. PMK1 (XU & HAMER, 1996); MCK1

(JEON, ET AL., 2008)]. Vor der Bildung von Infektionsstrukturen auf der Wirtspflanze steht jedoch deren Erkennung und die Reaktion auf vorhandene Umweltfaktoren. Hierbei spielen die bereits in der Einleitung beschriebenen Signaltransduktionswege eine Rolle (siehe Abschnitt 1.3.2 - Appressorienbildung und Penetration).

Eine erste Auswahl an ESI, die im Gegensatz zum WT-Isolat eine veränderte Symptomentwicklung auf Maisblattsegmenten zeigten, wurde mittels eines Blattsegment-tests getroffen. Eine Wiederholung des Blattsegmenttests und ein parallel laufender Ganzpflanzen-test (beide durchgeführt durch S. Münch, DE 403/16-1) führten zur Auswahl von 19 ESI, die entweder keine Symptome zeigten (Apathogenität) oder aufgrund von nur geringer Symptomausprägung scheinbar einen Virulenzdefekt haben. Während dieser Arbeit wurde der Blattsegmenttest mit den 19 ESI wiederholt (siehe Abbildung 12), zusätzlich wurde die mikroskopische Entwicklung von 13 dieser Isolate auf Mais ausgewertet. Die Verwendung von Blattsegmenten für ein erstes Screening auf Pathogenitäts- bzw. Virulenzmutanten phytopathogener Pilze wurde bei *M. grisea* als Bestandteil eines *high-throughput phenotype screening* (HPS; Hochdurchsatz Phänotypen Screening) beschrieben (JEON, ET AL., 2007) und hat den Vorteil, dass es im Gegensatz zur Inokulation von Ganzpflanzen zu einer Ersparnis an Zeit und Platz kommt. Wurde der zu screenende Umfang an Mutanten so eingegrenzt, kann nachfolgend auch ein Test der Mutanten auf unverletzten Pflanzen erfolgen. Die Symptomausprägung von Mutanten mit einem Verlust der Pathogenität bzw. einer reduzierten Virulenz auf Blattsegmenten und Ganzpflanzen kann sich unterschiedlich gestalten. So wurde der Einfluss des Pflanzenalters und der Seneszenz auf die Symptomausprägung einer *C. heterostrophus* Δgal Mutante untersucht (DEGANI ET AL., 2004). Das Abschneiden der Blätter führte zu schnellerer Seneszenz, Makromoleküle werden schneller abgebaut und könnten somit für die Mutanten eine leichter verfügbare Nahrungsquelle darstellen. Im Falle der während dieser Arbeit verwendeten Mutante konnten die deutlichsten Unterschiede hinsichtlich der Symptomausprägung auf den jungen Blättern intakter 9 - 12 Tage alter Pflanzen gefunden werden. Die Verwendung eines Blattsegmenttests bei *C. graminicola* zur Charakterisierung von Mutanten wurde auch bei EPSTEIN ET AL. (1998); THON ET AL. (2000) und THON ET AL. (2002) beschrieben. Für die mikroskopische Auswertung wurden ebenfalls Blattsegmente inokuliert, denen zuvor die Mittelrippe zur Erleichterung der nachfolgenden Mikroskopie entfernt wurde. Ebenfalls aus der Literatur bekannt ist, dass der Zusatz von Tween 20 (0,01 %) zum Inokulum zu einer Herabsetzung der Oberflächenspannung und somit zur besseren Haftung der Inokulumtropfen auf den hydrophilen Blättern führt (EPSTEIN ET

AL., 1998). Die mikroskopische Analyse des Infektions-verlaufes erfolgte 24, 48 und 72 hpi. Diese Zeitpunkte eignen sich, die unterschiedlichen Etappen der hemibiotrophen Entwicklung zu verfolgen [siehe Abbildung 4 A - D (SUGUI & DEISING, 2002); THON ET AL., 2002).

Die Transformante AB.158 zeigte bis zur Appressorienbildung ein ähnliches Verhalten wie das WT-Isolat, Abweichungen traten erst bei der Penetration des Wirtes und der Bildung von Acervuli auf. AB.158 penetrierte signifikant geringer als das WT-Isolat, jedoch konnten PMMA-Schichten von der Mutante im Vergleich zum WT-Isolat signifikant besser penetriert werden. Somit konnte AB.158 die PMMA-Schichten besser penetrieren als die Pflanze. Eventuell kommt es durch Abwehrreaktionen der Pflanze (z. B. ROS, Papillen) zu einer verringerten Penetrationsrate auf der Wirtspflanze, hierzu müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Da die Appressorien von AB.158 und WT CgM2 bei ähnlichen Glycerolkonzentrationen eine Kollabierungsrate von 50 % erreichten (siehe Tabelle 11 im Anhang), scheint der Turgordruck als Grund für die geringere Penetrations-rate von AT.158 auf Mais nicht in Frage zu kommen. Probleme bei der Penetration der Wirtsoberfläche zeigten auch $\Delta mps1$ Mutanten von *M. grisea* (XU ET AL., 1998), allerdings waren diese Mutanten komplett apathogen, die Bildung und Melanisierung von Appressorien war im Vergleich zum WT-Isolat unverändert. Bei dieser Mutante, die einen Defekt in der Mitogen-aktivierten Proteinkinase 1 hat, wird die Polarisierung des Aktin-Zytoskeletts während der Bildung der Penetrationshyphe gestört. Die Keimraten der ESI AT.391, AT.395, AT.396, AT.402, AT.414, AT.416, AT.420 und AT.668 unterschieden sich signifikant von der des WT-Isolates auf Mais, lagen aber noch höher als 25 %. Auch hinsichtlich der weiteren Entwicklung (Bildungsrate und Melanisierung der Appressorien, Penetrationsrate) gab es Unterschiede, die bisher jedoch nicht genauer charakterisiert wurden.

Einen interessanten Phänotyp zeigten die ESI AT.147, AT.397, AT.673 und AT.717. Ihre Keimrate lag auf Mais signifikant unter der des WT-Isolates und war nicht höher als 25 %. Einige zeigten in Wasser keine Keimung und eine schlechte Adhäsion der Konidien an die Blattoberfläche. Hierzu könnten detaillierte Zählungen durchgeführt werden. Für AT.147, AT.397, AT.673 und AT.717 wurden der Einfluss der Zugabe von Maisblattextrakt, der durch das autoklavieren von Maisblättern in H_2O_{dest} entstand, zur Sporensuspension und der Einfluss auf die Keimrate untersucht. Für alle ESI war die Keimrate nach Zugabe des Maisblattextraktes erhöht, auch Appressorien wurden auf Maisblättern ausgebildet. Alle ESI konnten nach drei Tagen und bei Zusatz von 25 % MBE Mais signifikant schlechter penetrieren als der WT. Die verringerte Adhäsion und Keimung könnte auf der Unfähigkeit

der Mutanten beruhen, die Maisoberfläche zu erkennen. MAP-Kinase-Signalwege sind wichtig für die Bildung von Infektionsstrukturen und pathogenem Wachstum (TAKANO ET AL., 2000). Das Verhalten von MAP-Kinase-defizienten Mutanten wurde unter anderem in *M. grisea* (XU & HAMER, 1996; *pmk1*) und *C. lagenarium* (TAKANO ET AL., 2000; *cmk1*) untersucht. Während PMK1 essenziell für die Appressorienbildung, aber nicht für vegetatives Wachstum und Sporenkeimung ist, konnten *cmk1* Nullmutanten auf induktiven Oberflächen nicht keimen und somit auch keine Appressorien bilden. Eine Zugabe von Hefeextrakt stellte die Fähigkeit zur Keimung wieder her, hier scheint der eigentliche Signalweg umgangen zu werden und die Keimung wird unabhängig von CMK1 induziert. Die ATMT-Mutanten sind, wie auch $\Delta cmk1$ auf Gurkenblättern, apathogen und zeigten eine Reduktion der Adhäsion und Keimung auf induktiven Oberflächen. Die Keimung und Appressorienbildung konnte durch Zugabe von Maisblattextrakt wiederhergestellt werden, was auf eine Überbrückung der verhinderten Oberflächenerkennung auf Mais hinweist. Die Auswirkungen der Zugabe von Hefeextrakt wurden nicht getestet. Der Zusatz von Maisblattextrakt zu den Sporensuspension der ESI erhöhte die Keim-, Appressorienbildungs- und Penetrationsrate im Gegensatz zur Entwicklung in Wasser. Generell sind diese ESI jedoch als apathogen zu bezeichnen, da sie, ohne den Zusatz einer stimulierend wirkenden Substanz, nur unzureichend bzw. nicht keimen können und die Bildung von Appressorien weitgehend unterbleibt. Weiterführende Untersuchungen müssten klären, ob bei allen ESI dieser Gruppe dasselbe Gen disruptiert wurde. Dies würde gegen die zufällige Insertion der T-DNA sprechen und für die Insertion in transkribierende Bereiche. Eventuell wurden hier ein oder mehrere Gene getroffen, die für die Keimung der Sporen benötigt werden. Da bei der Co-Kultivierung ungekeimte Sporen eingesetzt wurden, die dann erst bei Anwesenheit der Bakterien zu keimen begannen, wäre dies durchaus denkbar.

Generell eignet sich die Methode der ATMT für die Erstellung von Insertionsmutanten und die nachfolgende Suche nach Genen, die für Pathogenität bzw. Virulenz bei *C. graminicola* benötigt werden. Allerdings scheint die T-DNA-Integration nicht gänzlich zufällig abzulaufen, da einige der untersuchten ESI einen ähnlichen Phänotyp auf Mais zeigten und für zwei ESI die Integration im selben Gen nachgewiesen werden konnte (AT.399 und AT.425; S. Münch, unveröffentlichte Daten). Für AT.171 konnte das durch die Integration der T-DNA disruptierte Gen mittels eines *genome walking*-Ansatzes ausfindig gemacht werden (MÜNCH ET AL., 2011). Es handelt sich um ein Allantoikase-Gen. Allantoin kann unter Stickstoffmangelsituationen als Stickstoffquelle verwendet werden (YOO & COOPER, 1991). Eine

Verbindung zwischen der Regulierung des Stickstoffmetabolismus und der Pathogenität von *Magnaporthe grisea* ist seit längerem bekannt [*nr*-Mutanten (*nitrogen regulation defective*), LAU & HAMER, 1996; TALBOT ET AL., 1997].

4.3 Artificielle Membranen und ihre Eignung für ein Screening auf Penetrationskompetenz

Phytopathogene Pilze können Enzyme, Kraft oder eine Kombination aus beidem für die Penetration der Wirtsoberfläche verwenden (DEISING ET AL., 2000). Für Pilze, die melanisierte Appressorien bilden, z. B. *C. graminicola* und *M. grisea*, wird angenommen, dass der in ihren Appressorien gebildete Druck [ca. 5 MPa bei *C. graminicola* (BECHINGER ET AL., 1999) und ca. 8 MPa bei *M. grisea* (HOWARD ET AL., 1991)] für die Penetration der Wirtsepidermis, neben dem Einfluss zellwandabbauender Enzyme, essenziell ist (DEISING ET AL., 2000). Ob der Turgordruck alleine zur Penetration ausreicht, lässt sich durch Verwendung artifizieller Schichten, die nicht biologisch, also durch Enzyme, abbaubar sind, testen. Ergebnisse von Penetrationstests von *B. cinerea* und *M. grisea* auf Gold (MIYOSHI, 1895; HOWARD ET AL., 1991) und Mylar (Polyethylenterephthalat; HOWARD ET AL., 1991) sind aus der Literatur bekannt und zeigen, dass die Penetration nicht biologisch abbaubarer Schichten durch phytopathogene Pilze möglich ist. Problematisch ist bei diesen älteren Arbeiten, dass zu wenig Details über die verwendeten Materialien bekannt sind. So ist bei den Arbeiten von MIYOSHI (1895) die Beschaffenheit der verwendeten Goldhäutchen nicht überzeugend dargelegt, bei HOWARD ET AL. (1991) sind nur die Härten, jedoch nicht die Schichtdicken der verwendeten Mylarmembranen genannt. Eine Alternative ist die Herstellung von definierten Schichten und deren Charakterisierung mittels neuester Technologie. Diese Aufgabe wurde durch Mitarbeiter des Fraunhofer Institutes für Werkstoffmechanik in Halle/Saale übernommen [Details siehe HOFFMANN (2005) und WILLERS (2007)]. Für die Herstellung nicht biologisch abbaubarer Metall- und Polymerschichten kamen das Hochfrequenz-Sputtern und das Spin-Coating zum Einsatz. Die Bestimmung der Schichtdicke erfolgte mittels eines Profilometers. So konnten Schichten mit definierten Eigenschaften für die weitere Verwendung bei Penetrationstests hergestellt werden.

Am Anfang der Penetrationstest stand die Erarbeitung einer Methodik zur Inokulation, Lagerung und Auswertung der mit Pilzsporen inokulierten Schichten. Die Lagerung der Schichten vor der Inokulation erfolgte in einem mit Silica-Gel gefüllten Exsikkator. So sollte

verhindert werden, dass es durch die Feuchtigkeit der Luft zur vorzeitigen Auflösung der Kaliumbromidschicht zwischen Substrat und Membran kommt. Vor der Sprühinokulation wurden mit einer Rasierklinge die Ränder der Membran nachgezogen, um die Ablösung der Schichten nach der Inokulation zu erleichtern. Sowohl die Sprühinokulation als auch das Aufsetzen von Inokulumtropfen im μl -Bereich eignen sich zur Inokulation von Dünnschichten. Da die Gefahr der Verletzung der Schichten mit der Pipettenspitze bestand, wurde im Laufe der Arbeit die Sprühinokulation favorisiert. Ein weiterer Vorteil ist die gleichmäßigere Verteilung des Inokulum (siehe Abbildung 9 B). Das Aufsetzen von Inokulumtropfen erfolgte nach Ablösen der Schichten, bei der Sprühinokulation wurden die Konidien auf die noch nicht abgelöste Schicht aufgebracht. Das Ablösen der Schichten erfolgte entweder durch Eintauchen des Substrates in Wasser (bei den mittels einer Maske hergestellten Goldschichten) bzw. durch Zugabe von Wasser an die Außenkanten des beschichteten Objektträgers. Beide Methoden resultierten in einer frei schwimmenden Schicht mit dem wässrigen Inokulum auf der Oberseite. Auch HOWARD ET AL. (1991) beschrieben die Verwendung einer wässrigen Sporensuspension zur Inokulation der Schichten mit Tropfen.

Die nachfolgende Handhabung der Schichten erschien ein sehr kritischer Aspekt zu sein, da die während dieser Arbeit verwendeten Schichten z. T. nur 40 nm (Gold) bzw. 60 nm (PTFE, PMMA) dick waren. Es musste verhindert werden, dass es zur Zerstörung der Schichten während der Inokulation und Inkubation kommt. Aus diesem Grund wurden die Objektträger mit den Schichten, im Fall von PTFE und PMMA, nach der Inokulation vorsichtig zurück in die Probenschachteln gelegt. In dieser erfolgte durch Zugabe von Wasser das Ablösen der Schichten. Die Probenschachteln wurden anschließend verschlossen und in eine feuchte Kammer (Glasschale mit angefeuchteten Papiertüchern) gelegt, um optimale Bedingungen für das Pilzwachstum zu schaffen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schichten bei konstanten Bedingungen für drei Tage.

Die Inkubationsdauer beruht auf Erfahrungswerten erster Inokulationsversuche. Nach dieser Zeit konnten Penetrationen beobachtet werden; ausreichend lange Penetrations-hyphen für die mikroskopische Betrachtung waren gebildet worden (siehe Abbildung 24). Während der hier beschriebenen Arbeiten blieb die Dauer der Inkubation konstant. Ein Effekt der Schichtdicke auf den Penetrationserfolg konnte beobachtet werden. Während z. B. *C. graminicola* 60 nm dicke PTFE-Schichten penetrieren konnte, wurden auf 160 nm dicken Schichten keine Penetrationsereignisse gefunden. Da es anderen Pilzen (*M. grisea* und *P. pachyrhizi*) in der selben Zeit möglich war 160 nm dicke PTFE-Schichten zu penetrieren, scheint der Faktor

Zeit hier nicht von vorrangiger Bedeutung zu sein und es wurde auf eine Verlängerung der Inkubationszeit verzichtet. Neben dem Einfluss der Schichtdicke auf die Penetrationsrate konnte auch ein positiver Effekt auf die Keimrate von *C. graminicola* verzeichnet werden. Während der Pilz auf dünnen Schichten (bis 160 nm) im Mittel nur zu 25 % auskeimte, lagen die Keimraten auf 1000 nm dicken Schichten bei 61,89 % ($\pm 6,94$ %), auf 2400 nm Schichten bei 80,86 % ($\pm 10,52$ %). Mit Zunahme der Schichtdicke konnte bei PTFE eine Zunahme der Oberflächenrauheit, und damit auch der Hydrophobizität, verzeichnet werden (KÜSTER ET AL., 2008). Dieser Zusammenhang wurde auch bei Untersuchungen mit *B. cinerea* publiziert (DOEHLEMANN ET AL., 2006). Während Oberflächen mit geringer Hydrophobizität (z. B. Glas, Kontaktwinkel $13,7^\circ \pm 0,3^\circ$) die Keimung der Sporen nicht induzierten, erreichten Sporen auf Teflon (Kontaktwinkel $131,3^\circ \pm 4,4^\circ$) Keimraten von im Mittel 88,5 %. Neben der Hydrophobizität kann auch die Härte der Oberfläche für die Appressorienbildung von Bedeutung sein. Auf diesen Umstand wiesen EMMETT & PARBERRY bereits 1975 hin. KOLATTUKUDY und Mitarbeiter konnten zu Beginn des 20. Jhd. aufklären, dass es Gene gibt, die spezifisch nach Kontakt mit harten Oberflächen expremiert werden (CHIP Gene, *Colletotrichum* hard-surface induced proteins; KIM ET AL., 2000). HOWARD ET AL. (1991) zeigten einen Zusammenhang zwischen der Inkubationsdauer (bis zu 240 h) und dem Penetrationsvermögen von *M. grisea* durch Schichten mit unterschiedlicher Härte (140 bis 250 MPa). Da die Härte der während dieser Arbeit verwendeten Schichten fix war, konnte der Einfluss der Härte auf die Entwicklung phytopathogener Pilze nicht untersucht werden.

Generell konnten sich alle untersuchten Pilze auf den verwendeten Schichten entwickeln. *M. grisea* bildete auf gesputterten Goldschichten (500 nm) Appressorien (siehe Abbildung 22). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Beobachtungen von HOWARD ET AL. (1991), hier wurden auf 10 μm dicker Goldfolie und auf mit Gold (100 nm) besputterter Zellophanmembran keine Appressorien ausgebildet. Allerdings gestaltete sich die Entwicklung von *M. grisea* auf PTFE als schwierig, da die Appressorienbildung unterblieb. Durch Zugabe von 3-Isobutyl-Methylxanthin (IBMX; 2,5 mM) konnte die Bildung von Appressorien stimuliert werden (LEE & DEAN, 1993). IBMX ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase. Durch deren Hemmung kommt es zur Akkumulation von cAMP in der pilzlichen Zelle (LEE & DEAN, 1993), dieses wird für die Aktivierung einer Proteinkinase benötigt (cAMP-abhängige Proteinkinase A; DEISING ET AL., 2000). XU ET AL. (1997) konnten bei *M. grisea* die Abhängigkeit der Appressorienbildung von einem cAMP-abhängigen Signalweg nachweisen. Dementsprechend löst die Zugabe von externem cAMP bzw. die Hemmung des Abbaus in der

Zelle die Appressorienbildung auch auf nicht-induktiven Oberflächen aus. Nach Induktion der Appressorienbildung konnte *M. grisea* die PTFE-Schichten penetrieren. Auch hier publizierten HOWARD ET AL. (1991) gegensätzliche Ergebnisse. Penetrationen von *M. grisea* konnten während ihrer Arbeiten auf Teflon nicht beobachtet werden. Allerdings fehlten hier die Angaben zu den Dicken der verwendeten Schichten. Goldfolien konnten auch bei einer Schichtdicke von 40 nm von keinem der verwendeten Pathogene penetriert werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von MIYOSHI (1895), der Penetrationen von *B. cinerea* durch Goldblättchen publizierte. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Goldschichten um gewalztes Gold handelte, das nicht selten feine Löcher aufweist, die dem Pilz als Durchtrittspforte dienen konnten (KÜSTER ET AL., 2008).

Die Verwendung artifizieller Membranen soll den Effekt der zellwandabbauenden Enzyme bei der Penetration ausklammern. Bei den durchgeführten Versuchen mit *C. graminicola* auf PTFE und PMMA wurde deutlich, dass die artifiziellen Membranen bis zu einer bestimmten Dicke (110 nm) penetriert werden konnten, dass die erreichten Penetrationsraten 3 dpi aber signifikant geringer waren als die Penetrationsraten nach der gleichen Inkubationszeit auf der Wirtspflanze Mais (siehe Tabelle 12 im Anhang). Dieses könnte als Hinweis darauf dienen, dass für die Penetration der Maisoberfläche eine Kombination aus Kraft und Enzymen benötigt wird. Auch im System *M. grisea* und Reis konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden. Während nach drei Tagen Inkubationszeit auf Mylar mit einer Härte von 140 MPa ca. 50 % der Appressorien die artifizielle Membran penetriert hatten, konnte auf Reis nach 48 h bereits eine Penetrationsrate von 75 % beobachtet werden (HOWARD ET AL., 1991). Auch hier wurde der zusätzliche Einfluss zellwandabbauender Enzyme als mögliche Ursache für die höhere und schnellere Penetration der Reisblätter diskutiert.

Die Hydrophobizität einer Oberfläche wird bestimmt durch den Kontaktwinkel, die Oberflächenenergie und die Rauigkeit. Die Oberflächenenergie stellt hierbei eine Funktion des gemessenen Kontaktwinkels dar (WILLERS, 2007). Die durch KÜSTER ET AL. (2008) ermittelten Werte für den Kontaktwinkel von Maisblätter, PTFE (gesputtert) und PMMA (Spin-Coating) charakterisieren die ersten beiden Oberflächen als hydrophob, PMMA als hydrophil (siehe Tabelle 1). Dies ließe erwarten, dass phytopathogene Pilze besser auf den hydrophoben Oberflächen auskeimen und sich entwickeln können (MERCURE ET AL., 1994). Der Vergleich der Keimraten von *C. graminicola* und *P. pachyrhizi* auf 60 nm dicken PTFE- und PMMA-Schichten zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Bildung von Appressorien erfolgte durch *C. graminicola* signifikant besser auf den weniger hydrophoben

PMMA-Schichten, bei *P. pachyrhizi* signifikant besser auf PTFE (siehe Tabelle 10 im Anhang).

Interessante Ergebnisse erbrachte der Vergleich der Penetrationsraten von Pilzen, die melanisierte bzw. nicht-melanisierte Appressorien ausbilden. *P. pachyrhizi*, der Erreger des Sojarostes, bildet nicht-melanisierte Appressorien, konnte aber die artifiziellen Schichten z. T. besser penetrieren als *C. graminicola*, der melanisierte Appressorien bildet (siehe Abbildung 24). Bisher wurde angenommen, dass Pilze mit nicht-melanisierten Appressorien im Vergleich zu Pilzen mit melanisierten Appressorien keinen hohen Turgordruck aufbauen können und daher zellwandabbauende Enzyme eine größere Rolle spielen. Dies scheint bei *P. pachyrhizi* nicht der Fall zu sein. Mittels Zellkollapsuntersuchungen konnten auch in den Appressorien von *P. pachyrhizi* ein hoher Turgordruck nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35). Bisher wurde angenommen, dass das Melanin in den appressorialen Zellwänden zur Verkleinerung der Poren führt und somit die akkumulierten osmotisch aktiven Substanzen nicht die Zellwand passieren können (HOWARD ET AL., 1991). Untersuchungen zur Größe der Poren in den Appressorienwänden der hier verwendeten Pilze stehen noch aus. Ähnliche Ergebnisse erbrachte auch der Vergleich der Penetrationskompetenz von WT *C. graminicola* und einer Melanin-defizienten Mutante ($\Delta Cgpk5I$).

4.4 Die Rolle von Melanin und des Turgordruckes für die Penetrationskompetenz bei *Colletotrichum graminicola*

Eine Reihe phytopathogener Pilze nutzen Appressorien für die Penetration der Wirtsoberfläche. Hierbei wird zwischen der Bildung melanisierter (u. a. durch *M. grisea* und *Colletotrichum* ssp.) und nicht-melanisierter (u. a. durch *Blumeria graminis*, *Botrytis cinerea* und *P. pachyrhizi*) Appressorien unterschieden. Bisher wurde angenommen, dass der Aufbau eines ausreichend hohen Turgordruckes für die erfolgreiche Penetration der Wirtsoberfläche nur Pathogenen mit melanisierten Appressorien möglich ist, bedingt durch die Reduzierung des Porendurchmessers der appressorialen Zellwand nach der Einlagerung von Melanin (HOWARD ET AL., 1991; HOWARD & FERRARI, 1989). So soll verhindert werden, dass osmotisch aktive Substanzen (z. B. Glycerol) passiv durch die Zellwand diffundieren können (HOWARD & FERRARI, 1989). Durch Wasseraufnahme in das Appressorium gegen einen Konzentrationsgradienten, welcher durch Akkumulation gelöster Stoffe gebildet wird, kommt es zur Bildung eines hohen Turgordruckes (WANG, ET AL., 2005; vergleiche auch Abschnitt 1.1.2.2 und Ab-

bildung 3). Als osmotisch aktive Substanz konnte in den Appressorien von *M. grisea* Glycerol in Konzentrationen von 3,22 M (\pm 0,40 M) nachgewiesen werden (DE JONG ET AL., 1997). Weiterhin wurde die Rolle von Trahalose für die Appressorienfunktion diskutiert (FOSTER ET AL., 2003).

Der Turgordruck in den Appressorien kann durch unterschiedliche Methoden nachgewiesen werden. HOWARD ET AL. (1991) publizierten einen Druck von bis zu 8 MPa (Gleichgewichtscytorrhizie) bzw. 3,38 MPa (*cold stage*; MONEY & HOWARD, 1996) in den melanisierten Appressorien von *M. grisea*. Die unterschiedlichen Werte erklärten die Autoren mit der Schwierigkeit der exakten Messung der Gefrierpunktserniedrigung bei melanisierten Appressorien. Die gemessenen Werte für nicht-melanisierte Appressorien lagen bei beiden Methoden unter denen für melanisierte Appressorien. Eigene Ergebnisse, die in Abschnitt 3.4.1 vorgestellt wurden, zeigen jedoch, dass bei *C. graminicola* WT und der PKS1-defizienten Mutante mittels Gleichgewichtscytorrhizie ähnliche Turgordrücke in den Appressorien festgestellt wurden. Der so ermittelte osmotische Druck von ca. 2,5 MPa für die melanisierten Appressorien und 2,8 MPa für die nicht-melanisierten Appressorien liegt unter den Werten, die durch BECHINGER ET AL. (1999) publiziert wurden (ca. 5,35 MPa).

Die Etablierung der Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung mittels einer *cold stage* bei WT *C. graminicola* und $\Delta Cgpk1$ während dieser Arbeit blieb leider ergebnislos. Das Auftreten von deutlichen Eiskristallen, wie in MONEY & HOWARD (1996) publiziert, konnte bei den hier verwendeten Pilzen und der eingesetzten Technik nicht beobachtet werden. In zukünftigen Projekten könnte weitere Optimierungsarbeit folgen. Die mittels Cytorrhizie gefundenen Ergebnisse für *C. graminicola* wurden durch die Penetrationsraten von WT und $\Delta Cgpk1$ auf PTFE unterstützt. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (siehe Abschnitt 3.3.2.1.2 und Abbildung 30). Penetrationenstellen konnten sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch gezeigt werden (siehe Abbildung 30).

Der Zusammenhang zwischen aufgebautem Turgordruck und der Kraft, die auf eine Unterlage wirkt, wird jedoch auch kritisch betrachtet. Zum einen hängt die Kraft nicht nur vom Turgor ab, sondern wird auch durch den Durchmesser der Penetrationshyphe und den Grad, bis zu welchem die Zellwand nachgibt, beeinflusst (MONEY, 1999). Messungen mit der Vickers Indentertechnik zeigten, dass Mylarfilme mit einer Härte von 200 MPa (oder 2×10^8 N/m) durch *M. grisea* penetriert werden konnten (HOWARD ET AL., 1991). Dies würde bedeuten, dass bei einem Durchmesser der Penetrationshyphe von ca. 1 μ m das Appressorium

eine Kraft von 200 μN ausüben müsste, was aber die bisher in der Literatur beschriebenen Werte um ein Vielfaches übersteigt (MONEY, 1999; GORIELY & TABOR, 2006). Erklärt werden könnten diese Abweichungen durch falsche Messergebnisse oder durch die Möglichkeit, dass die verwendeten Pilze die Schichten mit bisher unbekanntem Enzymen oder Substanzen doch angreifen können (MONEY, 1999; GORIELY & TABOR, 2006). Weiterhin wiesen GORIELY & TABOR (2006) darauf hin, dass ein Indenter normalerweise immer härter ist als das zu penetrierende Material. Dies trifft, auch bei vollem Turgordruck, nicht auf eine Penetrationshyphye zu, die durch eine artifizielle Membran wächst. Die Autoren spekulierten über eine mögliche spezielle Verstärkung der Hyphen. Eine abschließende Aufklärung dieser doch widersprüchlichen Ergebnisse steht noch aus. Auf Mais und Zwiebel erwies sich die nicht-melanisierte Mutante als apathogen (siehe Abbildung 29). Dies deckt sich mit Ergebnissen für Melanin-defiziente Mutanten bei *M. grisea* auf Reis. Arbeiten mit Mutanten, die an unterschiedlichen Stellen der Melaninbiosynthese gestört sind (Buf-, Alb-, Rsy-) zeigen, dass diese Mutanten auf Reis apathogen sind, nach Verletzung des Gewebes jedoch befallen können (CHUMLEY & VALENT, 1990). Auch für *C. lindemuthianum* (WOLKOW ET AL., 1983) und *C. lagenarium* (KUBO ET AL., 1982) konnte die Notwendigkeit der Melanisierung der Appressorien für die Wirtspenetration gezeigt werden. In beiden Arbeiten zeigten die verwendeten Melanin-defizienten Mutanten vermehrte laterale Keimung. Dieses Phänomen trat auch bei *C. graminicola* auf unterschiedlichen Substraten auf (Abbildung 29), konnte jedoch bei *M. grisea* nicht beobachtet werden (HOWARD & FERRARI, 1989). Es wird angenommen, dass Melanin für die Steuerung der Auswuchsrichtung der Penetrationshyphye benötigt wird (KUBO ET AL., 1985). Dieses Beispiel zeigt jedoch, dass Ergebnisse nicht immer auf andere Pilzspezies übertragen werden können, auch wenn es so scheint, als ob der Penetrationsprozess bei *Magnaporthe* und *Colletotrichum* ssp. viele Parallelen aufweist.

Weiterhin bleibt die Frage zu klären, warum die Melanin-defiziente *C. graminicola* Mutante artifizielle Membranen penetrieren kann, pflanzliche Oberflächen jedoch nicht. Möglicherweise erfüllt Melanin in den Appressorien neben den in der Literatur diskutierten Aufgaben (Verstärkung der appressorialen Wand, Verkleinerung der Poren, Lenkung der Penetrationshyphye) weitere Aufgaben, die eher im Bereich der Wirt-Parasit-Interaktion zu finden sind. So ist es aus Humanpathogenen, wie z. B. *Cryptococcus neoformans* und *Wangiella dermatitidis* bekannt, dass pilzliche Melanine antioxidative Funktionen übernehmen (JACOBSON & TINNELL, 1993). Bei beiden Pathogenen konnte Melanin als Virulenzdeterminante beschrieben werden (JACOBSON & EMERY, 1991). Hierbei steht vor allem der Schutz vor ROS (reaktive

Sauerstoffspezies) im Vordergrund (JACOBSON & TINNELL, 1993). Melanin-defiziente Mutanten von *C. neoformans* waren weniger anfällig gegenüber von Stickstoff und Sauerstoff abgeleiteten Oxidantien als nicht-melanisierte Zellen (WANG & CASADEVALL, 1994). Dieser Zusammenhang konnte auch bei *W. dermatitidis* und *Alternaria alternata* gezeigt werden (JACOBSON ET AL., 1995). Auch bei *M. grisea* zeigten apathogene nicht-melanisierte Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Sauerstoffradikalen (AVER'YANOVET AL., 1989). Als dominante Vertreter der Reaktiven Sauerstoffspezies während der Pflanze-Pathogen-Interaktion sind das Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (OH^\cdot) zu nennen (MEHDY, 1994), wobei Melanin H_2O_2 nicht entgiften konnte (JACOBSON ET AL., 1995). Der Nachweis des Superoxidanions in der Interaktion *C. graminicola* (WT und $\Delta Cgpk1$) und Mais steht noch aus. Bei der Interaktion *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*/*Hordeum vulgare* sind jedoch Färbemethoden mit NBT (Nitrobluetetrazolium) etabliert worden (HÜCKELHOVEN & KOGEL, 1998). Diese Methode könnte in zukünftigen Arbeiten auf das System *C. graminicola*/*Zea mays* überragen werden.

Eine hohe Penetrationsrate auf artifiziellen Membranen zeigte auch der Sojabohnenrost *Phakopsora pachyrhizi*. Er erreichte ähnliche Werte wie *M. grisea*, die signifikant über denen von *C. graminicola* lagen (siehe Abbildung 24). Auch dieses Ergebnis trägt zur kritischen Betrachtung der Aussage bei, dass nur in melanisierten Appressorien hohe Turgordrücke aufgebaut werden können. Ausgehend von Uredosporen bildet *P. pachyrhizi* nicht-melanisierte Appressorien auf seiner Wirtspflanze, mit deren Hilfe er die pflanzliche Oberfläche direkt penetrieren kann (BONDE ET AL., 1976). Häufig zeigten Penetrationshyphen von *P. pachyrhizi* und dem eng verwandten *P. apoda* eine charakteristische Korkenzieher-Form, die auch während dieser Arbeit licht- (siehe Abbildung 26) und elektronenmikroskopisch (siehe Abbildung 27) beobachtet werden konnte. Für die Penetration der Wirtspflanze wurde auch bei *P. apoda* eine Kombination aus Enzymen und Kraft diskutiert (ADENDORFF & RIJKENBERG, 2000). Da beide Pilze einen ähnlichen Penetrationsprozess aufweisen (ADENDORFF & RIJKENBERG, 2000), ist dies auch für *P. pachyrhizi* anzunehmen. Die Messung des osmotischen Druckes in Appressorien von *P. pachyrhizi* mittels Gleichgewichtscytorrhizie (siehe Abschnitt 3.4.2 und Abbildung 35) ergab 24 hpi ein Wert von 3,3 MPa, der damit über dem Wert für *C. graminicola* lag. Dies könnte die höheren Penetrationsraten auf artifiziellen Membranen erklären. Allerdings wurden niedrigere Werte als die für *M. grisea* publizierten erreicht. Trotzdem gab es keine signifikanten Unterschiede bei den Penetrationsraten beider Pilze auf PTFE.

5 Zusammenfassung/Summary

5.1 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Herstellung einer Transformantenbank des Maispathogens *Colletotrichum graminicola* durch die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (ATMT) und die Identifizierung von Mutanten, die in ihrer Pathogenität bzw. Virulenz beeinträchtigt sind.

Die ATMT von *C. graminicola* erwies sich als einfache und effiziente Transformationsmethode. Einzelsporisolate eines Teiles der gewonnenen Transformanten wurden für Blattsegmenttests auf Mais verwendet. So konnte eine erste Auswahl an Mutanten erfolgen, die sich phänotypisch vom WT-Isolat unterschieden. 19 Isolate wurden für eine makroskopische und mikroskopische Charakterisierung ausgewählt. Die Beurteilung des Infektionsverlaufes auf Maisblattsegmenten erlaubte die Einteilung dieser Mutanten in vier Gruppen, einige Vertreter wurden im Folgenden genauer untersucht. Isolat AB.158 (FLOSS, 2004) zeigte eine ähnliche Entwicklung wie das WT-Isolat, allerdings zeigte es im Vergleich zum WT-Isolat eine signifikant geringere Penetrationsrate auf Maisblattsegmenten. Eine zweite Gruppe an ESI (Gruppe D, siehe Tabelle 7) konnte ohne externe Nährstoffzugabe nicht auf der Wirtspflanze auskeimen, die ESI waren apathogen. Für AT.147, AT.397, AT.673 und AT.717 führte die Zugabe von Maisblattextrakt zum Inokulum zu steigenden Keim-, Appressorienbildungs- und Penetrationsraten. Der Anstieg der Keim- bzw. Penetrationsraten korrelierte positiv mit dem Gehalt an Maisblattextrakt im Inokulum.

Neben der Erstellung der ATMT-Transformanten konnte parallel ein Inokulationssystem für artifizielle Dünnschichten, die vom Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik Halle/Saale in variablen Materialien und Dicken hergestellt wurden, etabliert werden. Dieses wurde im Folgenden für die Beurteilung der Penetrationskompetenz pflanzenpathogener WT-Isolate (*C. graminicola*, *M. grisea* und *P. pachyrhizi*) und *C. graminicola* Mutanten ($\Delta Cgpk1$, AB.158) verwendet. Penetrationsereignisse konnten sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch abgebildet werden. Erstaunlicherweise konnten Pilze mit nicht-melanisierten Appressorien gleich gut ($\Delta Cgpk1$) oder sogar häufiger (*P. pachyrhizi*) die Polymerdünnschichten penetrieren. Dieses Ergebnis wurde durch Zellkollapsuntersuchungen (Cytorrhizie) mit PEG 6000 bestätigt, da sowohl in den Appressorien der Melanin-defizienten *C. graminicola* Mutante ($\Delta Cgpk1$) als auch in denen des Sojabohnenrostes hohe Turgordrücke nachgewiesen werden

konnten, die über denen des WT *C. graminicola* lagen. Dies wirft ein neues Licht auf die Diskussion der Rolle von Melanin an der Penetrationskompetenz pflanzenpathogener Pilze und könnte einen Anreiz für weitere Forschungsarbeit, auch in Verbindung mit dem nun etablierten Penetrationsscreen auf artifiziellen Membranen, geben.

5.2 Summary

One goal of the work presented here was to produce insertional *C. graminicola* mutants through an ATMT approach for further investigation due to finding mutants, which are not able to infect maize and therefore show a loss of pathogenicity or an impairment of virulence.

The *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *C. graminicola* is an efficient and easy method to produce large numbers of insertional mutants. Single spore isolates (SSI) of a part of the produced transformants were used for a detached leaf segment assay on maize. This led to the discovering of single spore isolates, which could not infect the host as the WT could. 19 SPI were chosen for a macroscopic and microscopic characterization. The behavior on maize leaf segments led to the division in 4 groups, as you can see in table 7, group A and D were further investigated. Compared to the WT mutant AB.158 (FLOSS, 2004) behaved in a similar way up to the development of melanized appressoria, afterwards the mutant could penetrate less than the WT, the development on maize was delayed. Representatives of a second group of SSI (D) were impaired in germination on the host plant, when no external nutritional source was added, they were apathogen. Raising the amount of maize leaf extract in the inoculum led to germination, appressoria development and, partly, also to penetration of the host cells, although significantly less than the WT isolate.

Besides the ATMT transformation an inoculation system for artificial membranes, which were produced in variable materials and thicknesses from the Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik Halle/Saale, was developed. It proved to be suitable for comparison of the penetration capability of phytopathogenic WT isolates (*C. graminicola*, *M. grisea* and *P. pachyrhizi*) and *C. graminicola* mutants ($\Delta Cgpk1$, AB.158). Penetration events could be monitored by light and electron microscopy. Surprisingly, fungi with non-melanized appressoria could breach the artificial membranes as well ($\Delta Cgpk1$) or even better than the WT *C. graminicola* (*P. pachyrhizi*). To verify these results a cell collapse approach with PEG 6000 was used, showing that the osmotic pressure in the non-melanized appressoria of the melanin-deficient *C. graminicola* mutant and the soy bean rust fungus were as high, or even

higher, than the one in the WT *C. graminicola*. These results could bring insights and stimulate more research concerning the role of melanisation during the penetration of phytopathogenic fungi, also in combination with the newly established penetration assay on artificial membranes.

6 Literaturverzeichnis

- Abuodeh, R. O., Orbach, M. J., Mandel, M. A., Das, A., & Galgiani, J. N. (2000). Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *The Journal of Infectious Diseases* 181: 2106-2110.
- Adendorff, R., & Rijkenberg, F. H. (2000). Scanning electron microscopy of direct host leaf penetration by urediospore-derived infection structures of *Phakopsora apoda*. *Mycological Research* 104: 317-324.
- Amey, R. C., Athey-Pollard, A., Burns, C., Mills, P. R., Bailey, A., & Foster, G. D. (2002). PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. *Mycological Research* 106: 4-11.
- Anthenill, F. J., & Nicholson, R. L. (1978). Hydrolase activity in the spore matrix of *Colletotrichum graminicola*: cutinolytic function. (Abstr.). *Phytopathology News* 12: S. 213.
- Apel-Birkhold, P., & Walton, J. D. (1996). Cloning, disruption, and expression of two endo β -1,4-xylanase genes, XYL2 and XYL3, from *Cochliobolus carbonum*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4129-4135.
- Apoga, D., Barnard, J., Craighead, H. G., & Hoch, H. C. (2004). Quantification of substratum contact required for initiation of *Colletotrichum graminicola* appressoria. *Fungal Genetics and Biology* 41: 1-12.
- Aver'yanov, A. A., Lapikova, V. P., Petelina, G. G., & Dzhavakhiya, V. G. (1989). Increased sensitivity of pigment mutants of *Pyricularia oryzae* to toxic excretions of rice leaves. *Fiziol. Rast. (Moscow)* 36: 1088-1095.
- Bailey, J. A., Nash, C., Morgan, L. W., O'Connell, R. J., & TeBeest, D. O. (1996). Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the *Malvaceae*. *Phytopathology* 86: 1076-1083.
- Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Pring, R. J., & Nash, C. (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. In J. A. Bailey, & M. J. Jeger, *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. (S. 88-120). Wallingford: CAB International.
- Baker, S. E., Kroken, S., Inderbitzin, P., Asvarak, T., Li, B.-Y., Shi, L., et al. (2006). Two polyketide synthase-encoding genes are required for biosynthesis of the polyketide virulence factor, T-toxin, by *Cochliobolus heterostrophus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 139-149.
- Baron, C., Domke, N., Beinhofer, M., & Hapfelmeier, S. (2001). Elevated temperature differentially affects virulence, virB protein accumulation, and T-pilus formation in

- different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* strains. *Journal of Bacteriology* 183: 6852-6861.
- Bastmeyer, M., Deising, H. B., & Bechinger, C. (2002). Force exertion in fungal infection. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 31: 321-341.
- 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: 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.
- Beijersbergen, A., Smith, S. J., & Hooykaas, P. J. (1994). Localization and topology of virB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 32: 212-218.
- Bergstrom, G. C., & Nicholson, R. L. (1977). Invertase in the spore matrix of *Colletotrichum graminicola* and its role in anthracnose development on maize. (Abstr.). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 4: 164.
- Bergstrom, G. C., & Nicholson, R. L. (1999). The biology of corn anthracnose - knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease* 83: 596-608.
- Biederman, H. (2000). RF sputtering of polymers and its potential application. *Vacuum* 59: 594-599.
- Biederman, H., Zeuner, M., Zalman, J., Bílková, P., Slavínská, D., Stelmasuk, V., et al. (2001). RF magnetron sputtering of polytetrafluoroethylene under various conditions. *Thin Solid Films* 392: 208-213.
- Birren, B., Fink, G., & Lander, E. (2003). A white paper for fungal comparative genomics. *The Fungal Genome Initiative Steering Committee, Whitehead Institute Center for Genome Research* .
- Bonde, M. R., Melching, J. S., & Bromfield, K. R. (1976). Histology of the suscept-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. *Phytopathology* 66: 1290-1294.
- Bourett, T. M., & Howard, R. J. (1990). In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Canadian Journal of Botany* 68: 329-342.
- Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Aubourg, S., Samson, F., Chauvin, S., et al. (2002). T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO reports* 3: 1152-1157.
- Bundock, P., & Hooykaas, P. J. (1996). Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 15272-15275.

- Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., & Hooykaas, P. J. (1995). Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 14: 3206-3214.
- Bundock, P., Mróczek, K., Winkler, A. A., Steensma, H. Y., & Hooykaas, P. J. (1999). T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Molecular Genetics and Genomics* 261: 115-121.
- Bundock, P., van Attikum, H., den Dulk-Ras, A., & Hooykaas, P. J. (2002). Insertional mutagenesis in yeasts using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Yeast* 19: 529-536.
- Campoy, S., Pérez, F., Martín, J. F., Gutiérrez, S., & Liras, P. (2003). Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Current Genetics* 43: 447-452.
- Case, M. E., Schweizer, M., Kushner, S. R., & Giles, N. H. (1979). Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 5259-5263.
- Centis, S., Guillas, I., Séjalon, N., Esquerré-Tugayé, M.-T., & Dumas, B. (1997). Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: Cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 769-775.
- Chen, X., Stone, M., Schlaghauser, C., & Romaine, C. P. (2000). A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4510-4513.
- Choi, J., Park, J., Jeon, J., Chi, M.-H., Goh, J., Yoo, S.-Y., et al. (2007). Genome-wide analysis of T-DNA integration into the chromosomes of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology* 66: 371-382.
- Chumley, F. G., & Valent, B. (1990). Genetic analyses of melanin-deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 135-143.
- Combiér, J.-P., Melayah, D., Raffier, C., Gay, G., & Marmeisse, R. (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiology Letters* 220: 141-148.
- Cottage, A., Yang, A., Maunders, H., de Lacy, R. C., & Ramsay, N. A. (2001). Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR-Walking. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 321-327.

- Couch, B. C., & Kohn, L. M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94: 683-693.
- Covert, S. F., Kapoor, P., Lee, M.-H., Briley, A., & Nairn, C. J. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycological Research* 105: 259-264.
- Crouch, J. A., Clarke, B. B., & Hillman, B. I. (2006). Unraveling evolutionary relationships among the divergent lineages of *Colletotrichum* causing anthracnose disease in turfgrass and corn. *Phytopathology* 96: 46-60.
- Davies, J., & Davis, B. D. (1968). Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *The journal of biological chemistry* 243: 3312-3316.
- De Bary, A. (1866). *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- de Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P. J., & Beijersbergen, A. G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature* 16: 839-842.
- de Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnov, N., & Talbot, N. J. (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389: 244-245.
- Degani, O., Maor, R., Hadar, R., Sharon, A., & Horwitz, B. A. (2004). Host physiology and pathogenic variation of *Cochliobolus heterostrophus* strains with mutations in the G protein alpha subunit, CGA1. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5005-5009.
- Degefu, Y., & Hanif, M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leaf-blight fungus. *Archives of Microbiology* 180: 279-284.
- Deising, H. B., 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., Nicholson, R. L., Haug, M., Howard, R. J., & Mendgen, K. (1992). Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterase in the attachment of uredospores to the host cuticle. *The Plant Cell* 4: 1101-1111.
- Deising, H. B., Werner, S., & Wernitz, M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection* 2: 1631-1641.
- Dickinson, S. (1979). Growth of *Erysiphe graminis* on artificial membranes. *Physiological Plant Pathology* 15: 219-221.

- 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. *Bio Techniques* 22: 88-90.
- Doehlemann, G., Berndt, P., & Hahn, M. (2006). Different signalling pathways involving a cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology* 59: 821-835.
- Ebata, Y., Yamamoto, H., & Uchiyama, T. (1998). Chemical composition of the glue from appressoria of *Magnaporthe grisea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62: 672-674.
- Eilbert, F., Thines, E., Sterner, O., & Anke, H. (1999). Fatty acids and their derivatives as modulators of appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63: 879-883.
- 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 Phytologist* 156: 103-112.
- Emmett, R. W., & Parbery, D. G. (1975). Appressoria. *Annual Review of Phytopathology* 13: 147-167.
- Epstein, L., Lusnak, K., & Kaur, S. (1998). Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*). *Fungal Genetics and Biology* 23: 189-203.
- Flaishman, M. A., & Kolattukudy, P. E. (1994). Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 6579-6583.
- Floss, D. (2004). Entwicklung eines *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformationssystems für das Mais-Pathogen *Colletotrichum graminicola* (CES.) WILS. *Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Flowers, J. L., & Vaillancourt, L. J. (2005). Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. *Current Genetics* 48: 380-388.
- Foster, A. J., Jenkinson, J. M., & Talbot, N. J. (2003). Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The EMBO Journal* 22: 225-235.
- Fullner, K. J., & Nester, E. W. (1996). Temperature affects the T-DNA machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 178: 1498-1504.
- Goriely, A., & Tabor, M. (2006). Estimates of biomechanical forces in *Magnaporthe grisea*. *Mycological Research* 110: 755-759.

- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal Of Biological Chemistry* 256: 4494-4497.
- Hahn, M. (2000). The rust fungi. Cytology, physiology and molecular biology of infection. In J. Kronstadt, *Fungal Pathology*, S. 267-306. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- Hall, D. B., Underhill, P., & Torkelson, J. M. (1998). Spin coating of thin and ultrathin polymer films. *Polymer Engineering And Science* 38: 2039-2045.
- Hamer, J. E., & Holden, D. W. (1997). Linking approaches in the study of fungal pathogenesis: A Commentary. *Fungal Genetics and Biology* 21: 11-16.
- Hammerschmidt, R., & Nicholson, R. L. (1977). Resistance of maize to anthracnose: changes in host phenols and pigments. *Phytopathology* 67: 251-258.
- Hanif, M., Pardo, A. G., Gorfer, M., & Raudaskoski, M. (2002). T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Current Genetics* 41: 183-188.
- Herman, L., Jacobs, A., van Montagu, M., & Depicker, A. (1990). Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. *Molecular and General Genetics* 224: 248-256.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6: 271-282.
- Hinnen, A., Hicks, J. B., & Fink, G. R. (1978). Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75: 1929-1933.
- Hoffmann, J. (2005). Entwicklung eines in vitro - Modellsystems zur Untersuchung der Penetrationskompetenz pflanzenpathogener Pilze. *Hochschule Anhalt, Fachbereich Elektrotechnik, Diplomarbeit*.
- Hoi, J. W., Herbert, C., Bacha, N., O'Connell, R., Lafitte, C., Borderies, G., et al. (2007). Regulation and role of a STE12-like transcription factor from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Microbiology* 64: 68-82.
- Horbach, R. (2010). Die Sfp-4'-Phosphopantetheinyltransferase CgPPT1 des Maispathogens *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson aktiviert Pathogenitätsfaktoren. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Biowissenschaften, Dissertation.
- Horbach, R., Graf, A., Weihmann, F., Antelo, L., Mathea, S., Liermann, J. C., et al. (2009). Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase is indispensable for fungal pathogenicity. *The Plant Cell* 21: 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. *Journal of Plant Physiology* 168: 51-62.
- Howard, R. J., & Ferrari, M. A. (1989). Role of melanin in appressorium function. *Experimental Mycology* 13: 403-418.
- Howard, R. J., & Valent, B. (1996). Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology* 50: 491-512.
- Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H., & Money, N. P. (1991). Penetration of hard substances by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 11281-11284.
- Hückelhoven, R., & Kogel, K.-H. (1998). Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 292-300.
- Hurst, L. D., Pál, C., & Lercher, M. J. (2004). The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nature Reviews Genetics* 5: 299-310.
- Hwang, C.-S., & Kolattukudy, P. E. (1995). Isolation and characterisation of genes expressed uniquely during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* conidia induced by the host surface wax. *Molecular and General Genetics* 247: 282-294.
- Hwang, C.-S., Flaishman, M. A., & Kolattukudy, P. E. (1995). Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *The Plant Cell* 7: 183-193.
- Idnurm, A., & Howlett, B. J. (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology* 2: 241-255.
- Jacobson, E. S., & Emery, H. S. (1991). Catecholamine uptake, melanization, and oxygen toxicity in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology* 173: 401-403.
- Jacobson, E. S., & Tinnell, S. B. (1993). Antioxidant function of fungal melanin. *Journal of Bacteriology* 175: 7102-7104.
- Jacobson, E. S., Hove, E., & Emery, H. S. (1995). Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infection and Immunity* 63: 4944-4945.
- Jelitto, T. C., Page, A. H., & Read, N. D. (1994). Role of external signals in regulating the pre-penetration phase of infection by the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Planta* 194: 471-477.
- Jeon, J., Goh, J., Yoo, S., Chi, M.-H., Choi, J., Rho, H.-S., et al. (2008). A putative MAP kinase kinase kinase, MCK1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of

- the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 525-534.
- Jeon, J., Park, S.-Y., Chi, M.-H., Choi, J., Park, J., Rho, H.-S., et al. (2007). Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nature Genetics* 39: 561-565.
- Kankanala, P., Czymmek, K., & Valent, B. (2007). Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *The Plant Cell* 19: 706-724.
- Keller, N. P., Bergstrom, G. C., & Carruthers, R. I. (1986). Potential yield reductions in maize associated with an anthracnose/european corn borer pest complex in New York. *Phytopathology* 76: 586-589.
- Khan, A., & Hsiang, T. (2003). The infection process of *Colletotrichum graminicola* and relative aggressiveness on four turfgrass species. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 433-442.
- Kim, Y.-K., Liu, Z.-M., Li, D., & Kolattukudy, P. E. (2000). Two novel genes induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia. *Journal of Bacteriology* 182: 4688-4695.
- Knogge, W. (1996). Fungal infection of plants. *Plant Cell* 8: 1711-1722.
- Koch, E., & Hoppe, H. H. (1988). Development of infection structures by the direct-penetrating soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) on artificial membranes. *Journal of Phytopathology* 122: 232-244.
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Körber, H., Redei, G. P., et al. (1989). High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 8467-8471.
- Kozar, F., & Netolitzky, H. J. (1978). Studies on hyphal development and appressorium formation of *Colletotrichum graminicola*. *Canadian Journal of Botany* 56: 2234-2242.
- Kubo, Y., Suzuki, K., Furusawa, I., & Yamamoto, M. (1982). Effect of tricyclazole on appressorial pigmentation and penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* 72: 1198-1200.
- Kubo, Y., Suzuki, K., Furusawa, I., & Yamamoto, M. (1985). Melanin biosynthesis as a prerequisite for penetration by appressoria of *Colletotrichum lagenarium*: Site of inhibition by melanin-inhibiting fungicides and their action on appressoria. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 23: 47-55.
- Kubo, Y., Suzuki, K., Furusawa, I., Ishida, N., & Yamamoto, M. (1982). Relation of appressorium pigmentation and penetration of nitrocellulose membranes by *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* 72: 498-501.

- Küster, 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: 1809-1818.
- Latunde-Dada, A. O. (2001). *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* 2: 187-198.
- Latunde-Dada, A. O., Bailey, J. A., & Lucas, J. A. (1997). Infection process of *Colletotrichum destructivum* O'Gara from lucerne (*Medicago sativa* L.). *European Journal of Plant Pathology* 103: 35-41.
- Lau, G., & Hamer, J. E. (1996). Regulatory genes controlling MPG7 expression and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* 8: 771-781.
- Leclercq, A., Wan, H., Abschütz, A., Chen, S., Mitina, G. V., Zimmermann, G., et al. (2004). *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Current Genetics* 45: 111-119.
- Lee, Y.-H., & Dean, R. A. (1993). cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* 5: 693-700.
- Lee, Y.-H., & Dean, R. A. (1994). Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters* 115: 71-76.
- Leite, B., & Nicholson, R. L. (1992). Mycosporine-Alanin: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Experimental Mycology* 16: 76-86.
- Li, G., Zhou, Z., Zheng, F., & He, C. (2007). Characterization of T-DNA insertion patterns in the genome of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Current Genetics* 51: 233-243.
- Liu, Z.-M., & Kolattukudy, P. E. (1998). Identification of a gene product induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a ubiquitin-conjugated enzyme by yeast complementation. *Journal of Bacteriology* 180: 3592-3597.
- Loehrer, M., Langenbach, C., Goellner, K., Conrath, U., & Schaffrath, U. (2009). Characterization of nonhost resistance of Arabidopsis to the asian soybean rust. *Molecular Plant Microbe Interaction* 21: 1421-1430.
- 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. *Biological Chemistry* 380: 855-864.
- Malonek, S., & Meinhardt, F. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. *Current Genetics* 40: 152-155.

- 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*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 234-241.
- Mehdy, M. C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* 105: 467-472.
- Mendgen, K., & Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science* 7: 352-356.
- Mercure, E. W., Leite, B., & Nicholson, R. L. (1994). Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 421-440.
- Meyer, V., Mueller, D., Strowig, T., & Stahl, U. (2003). Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Current Genetics* 43: 371-377.
- Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., van den Hondel, C. A., & Ram, A. F. (2005 A). *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics* 48: 1-17.
- Michielse, C. B., Salim, K., Ragas, P., Ram, A. F., Kudla, B., Jarry, B., et al. (2004). Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Molecular Genetics and Genomics* 271: 499-510.
- Mitchell, T. K., & Dean, R. A. (1995). The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* 7: 1869-1878.
- Miyoshi, M. (1895). Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. *Jahrbuch der Wissenschaftlichen Botanik* 28: 269-289.
- Money, N. P. (1999). Fungus punches its way in. *Nature* 401: 332-333.
- Money, N. P. (1989). Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. *Plant Physiology* 91: 766-769.
- Money, N. P., & Howard, R. J. (1996). Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. *Fungal Genetics and Biology* 20: 217-227.
- Money, N. P., Caesar-TonThat, T.-C., Frederick, B., & Henson, J. M. (1998). Melanin synthesis is associated with changes in hyphopodial turgor, permeability and wall rigidity in *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Fungal Genetics and Biology* 24: 240-251.
- Moriwaki, J., Tsukiboshi, T., & Sato, T. (2002). Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. *Journal of General Plant Pathology* 68: 307-320.

- Muimba-Kankolongo, A., & Bergstrom, G. C. (1992). Wound predisposition of maize to anthracnose stalk rot as affected by internode position and inoculum concentration of *Colletotrichum graminicola*. *Plant Disease* 76: 188-195.
- Mullins, E. D., & Kang, S. (2001). Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 2043-2052.
- 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: 173-180.
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D. S., Ludwig, N., Sauer, N., & Deising, H. B. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology* 165: 41-51.
- Münch, S., Ludwig, N., Floss, D. S., Sugui, J. A., Koszucka, A. M., Voll, L. M., et al. (2011). Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Molecular Plant Pathology* 12: 43-55.
- Murphy, J. M., & Walton, J. D. (1996). Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum*: cloning and targeted disruption of ALP1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 290-297.
- Nicholson, R. L., & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.
- Nicholson, R. L., & Moraes, W. B. (1980). Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. *Phytopathology* 70: 255-261.
- Nicholson, R. L., & Warren, H. L. (1976). Criteria for evaluation of resistance to maize anthracnose. *Phytopathology* 66: 86-90.
- Nicholson, R. L., Butler, L. G., & Asquith, T. N. (1986). Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. *Phytopathology* 76: 1315-1318.
- O'Connell, R. J. (1987). Absence of a specialised interface between intracellular hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* and cells of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist* 107: 725-734.
- O'Connell, R. J., Bailey, J. A., & Richmond, D. V. (1985). Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology* 27: 75-98.
- O'Connell, R. J., Pain, N. A., Bailey, J. A., Mendgen, K., & Green, J. R. (1996). Use of monoclonal antibodies to study differentiation of *Colletotrichum* infection structures.

In *Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions* (S. 79-97), Kluwer.

- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 272-282.
- Oliver, R., & Osbourn, A. (1995). Molecular dissection of fungal phytopathogenicity. *Microbiology* 141: 1-9.
- Pain, N. A., Green, J. R., Jones, G. L., & O'Connell, R. J. (1996). Composition and organisation of extracellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Protoplasma* 190: 119-130.
- Pan, X., Li, Y., & Stein, L. (2005). Site preferences of insertional mutagenesis agents in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137: 168-175.
- Panaccione, D. G., Vaillancourt, L. J., & Hanau, R. M. (1989). Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* 81: 876-883.
- 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*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 37-51.
- Perfect, S. E., & Green, J. R. (2001). Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology* 2: 101-108.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, J. R., & Green, J. R. (1999). *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27: 186-198.
- Politis, D. J., & Wheeler, H. (1973). Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Plant Pathology* 3: 465-471.
- Ramadoss, C. S., Uhlig, J., Carlson, D. M., Butler, L. G., & Nicholson, R. L. (1985). Composition of the mucilaginous spore matrix of *Colletotrichum graminicola*, a pathogen of corn, sorghum, and other grasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 728-732.
- Rho, H.-S., Kang, S., & Lee, Y.-H. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and Cells* 12: 407-411.
- Ruiz-Díez, B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* 92: 189-195.

- Sela-Buurlage, M., Epstein, L., & Rodriguez, R. J. (1991). Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 345-352.
- Serfling, A., Wirsal, S. G., Lind, V., & Deising, H. B. (2007B). Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. *Phytopathology* 97: 523-531.
- Sheng, J., & Citovsky, V. (1996). Agrobacterium-plant cell DNA transport: Have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell* 8: 1699-1710.
- Sherriff, C., Whelan, M. J., Arnold, G. M., Lafay, J.-F., Brygoo, Y., & Bailey, J. A. (1994). Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology* 18: 121-138.
- Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., & Lukyanov, S. A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research* 23: 1087-1088.
- Smith, S. E., & Smith, F. A. (1990). Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist* 114: 1-38.
- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 929-941.
- Struck, C., Ernst, M., & Hahn, M. (2002). Characterization of a developmentally regulated amino acid transporter (AAT1p) of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Molecular Plant Pathology* 3: 23-30.
- Sugui, J. A., & Deising, H. B. (2002). Isolation of infection-specific sequence tags expressed during early stages of maize anthracnose disease development. *Molecular Plant Pathology* 3: 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. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1798-1802.
- Sugui, J. A., Leite, B., & Nicholson, R. L. (1998). Partial characterisation of the extracellular matrix released onto hydrophobic surfaces by conidia and conidial germilings of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 411-425.
- Sullivan, T. D., Rooney, P. J., & Klein, B. S. (2002). *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. *Eukaryotic Cell* 1: 895-905.

- Sutton, B. C. (1980). *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Kew, England: Commonwealth Mycological Institute.
- Takahara, H., Tsuji, G., Kubo, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., Inagaki, Y., et al. (2004). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. *Journal of General Plant Pathology* 70: 93-96.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 374-383.
- Talbot, N. J., McCafferty, H. R., 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. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 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. *Molecular Biotechnology* 39: 57-67.
- Thines, E., Aguirre, J., Foster, A. J., & Deising, H. B. (2006). Genetics of phytopathology: secondary metabolites as virulence determinants of fungal plant pathogens. *Progress in Botany* 67: 134-161.
- Thon, M. R., Nuckles, E. M., & Vaillancourt, L. J. (2000). Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 120-128.
- Tremblay, A., Hosseini, P., Alkharouf, N. W., Li, S., & Matthews, B. F. (2010). Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. *Plant Science* 179: 183-193.
- Tsuji, G., Fujii, S., Fujihara, N., Hirose, C., Tsuge, S., Shiraishi, T., et al. (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Journal of General Plant Pathology* 69: 230-239.
- Turgeon, B. G., Garber, R. C., & Yoder, O. C. (1987). Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity. *Molecular and Cellular Biology* 7: 3297-3305.

- Vaillancourt, L. J., & Hanau, R. M. (1992). Genetic and morphological comparisons of *Glomerella (Colletotrichum)* isolates from maize and from sorghum. *Experimental Mycology* 16: 219-229.
- van Attikum, H., Bundock, P., & Hooykaas, P. J. (2001). Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. *The EMBO Journal* 20: 6550-6558.
- van den Moertel, M., Recknor, J. C., Graham, M. A., Nettleton, D., Dittman, J. D., Nelson, R. T., et al. (2007). Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 887-899.
- Van Dyke, C. G., & Mims, C. W. (1991). Ultrastructure of conidia, conidium germination, and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. *Canadian Journal of Botany* 69: 2455-2467.
- van Kan, J. A. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11: 247-253.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 8133-8138.
- Wang, K., Stachel, S. E., Timmerman, B., van Montagu, M., & Zambryski, P. C. (1987). Site-specific nick in the T-DNA border sequence as a result of *Agrobacterium* vir gene expression. *Science* 235: 587-591.
- Wang, Y., & Casadevall, A. (1994). Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infection and Immunity* 62: 3004-3007.
- Wang, Z.-Y., Jenkinson, J. M., Holcombe, L. J., Soanes, D. M., Veneault-Fourrey, C., Bhambra, G. K., et al. (2005). The molecular biology of appressorium turgor generation by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Biochemical Society Transactions* 33: 384-388.
- Warwar, V., & Dickman, M. B. (1996). Effects of calcium and calmodulin on spore germination and appressorium development in *Colletotrichum trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 74-79.
- Weber, R. W., Wakley, G. E., Thines, E., & Talbot, N. J. (2001). The vacuole as central element of the lytic system and sink for lipid droplets in maturing appressoria of *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma* 216: 101-112.
- Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A., & Ridgway, H. J. (2006). Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research* 16: 31-44.

- Werner, S. (2002). Untersuchungen zur Regulation und Bedeutung der Chitin-Synthese beim Maispathogen *Colletotrichum graminicola* (CES.) WILS. (Teleomorph: *Glomerella graminicola* POLITIS). *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation.*
- Werner, S., Sugui, J. A., Steinberg, G., & Deising, H. B. (2007). A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1555-1567.
- Wharton, P. S., Julian, A. M., & O'Connell, R. J. (2001). Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 91: 149-158.
- Wijesundera, R. L., Bailey, J. A., Byrde, R. J., & Fielding, A. H. (1989). Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34: 403-413.
- Willers, G. (2007). Charakterisierung von Polymermembranen für die Untersuchung des Eindringverhaltens von phytopathogenen Pilzen. Friedrich-Schiller-Universität Jena; Physikalisch-Astronomische Fakultät; Diplomarbeit Werkstoffwissenschaften.
- Winans, S. C., Mantis, N. J., Chen, C.-Y., Chang, C.-H., & Han, D. C. (1994). Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Research in Microbiology* 145: 461-473.
- Wirsel, S. G., Voegelé, R. T., & Mendgen, K. (2001). Differential regulation of gene expression in the obligate biotrophic interaction of *Uromyces viciae-fabae* with its host *Vicia faba*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1319-1326.
- Wolkow, P. M., Sisler, H. D., & Vigil, E. L. (1983). Effect of inhibitors of melanin biosynthesis on structure and function of appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology* 22: 55-71.
- 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 & Development* 10: 2696-2706.
- Xu, J.-R., Staiger, C. J., & Hamer, J. E. (1998). Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 12713-12718.
- Xu, J.-R., Urban, M., Sweigard, J. A., & Hamer, J. E. (1997). The CPKA gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorial penetration. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 187-194.

- Yang, Y.-J., & Lee, I. (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Monascus ruber*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 754-758.
- Yang, Z., & Dickman, M. B. (1997). Regulation of cAMP and cAMP dependent protein kinase during conidial germination and appressorium formation in *Colletotrichum trifolii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 117-127.
- Yao, C., & Köller, W. (1995). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Different cutinases are expressed during saprophytic and pathogenic stages of *Alternaria brassicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 122-130.
- Yoo, H. S., & Cooper, T. G. (1991). Sequences of two adjacent genes, one (DALZ) encoding allantoicase and another (DCGI) sensitive to nitrogen-catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 104: 55-62.
- Young, D. H., & Krauss, H. (1984). Adhesion of *Colletotrichum lindemuthianum* spores to *Phaseolus vulgaris* hypocotyls and to polystyrene. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 616-619.
- Zhao, X., Kim, Y., Park, G., & Xu, J.-R. (2005). A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* 17: 1317-1329.
- Zheng, W., Chen, J., Liu, W., Zheng, S., Zhou, J., Lu, G., et al. (2007). A Rho3 homolog is essential for appressorium development and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Eukaryotic Cell* 6: 2240-2250.
- Zhu, H., Whitehead, D. S., Lee, Y.-H., & Dean, R. A. (1996). Genetic analysis of developmental mutants and rapid chromosome mapping of APP1, a gene required for appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 767-774.
- Zwiers, L.-H., & de Waard, M. A. (2001). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* 39: 388-393.

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessung unterschiedlicher Substrate	27
Tabelle 2: Verwendete Pilzisolat	30
Tabelle 3: Zusammensetzung eines 20 µl PCR-Ansatzes	37
Tabelle 4: Ablauf des verwendeten PCR-Programmes	38
Tabelle 5: Material und Herstellungsverfahren der Dünnschichten	40
Tabelle 6: Transformationseffizienzen	51
Tabelle 7: Einteilung der ESI in vier Gruppen aufgrund ihrer Entwicklung auf Mais	57
Tabelle 8: Basenabfolge der Primer Hyg1 und Gpd.....	125
Tabelle 9: Signifikante Unterschiede des Wachstums von <i>C. graminicola</i> WT und ATMT Isolaten auf PDA und PDA/HygB	125
Tabelle 10: Vergleich der Keim- und Appressorienbildungsraten von <i>C. graminicola</i> und <i>P. pachyrhizi</i> auf PTFE und PMMA.....	126
Tabelle 11: Zellkollapsraten von <i>C. graminicola</i> WT und AB.158	126
Tabelle 12: Penetrationsrate von <i>C. graminicola</i> auf unterschiedlichen Substraten.....	126
Tabelle 13: Signifikanzklassen der Zellkollapsraten von <i>C. graminicola</i> WT und Δ Cgpk1	126
Tabelle 14: Transformation filamentöser Pilze mittels ATMT	127

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese von <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	9
Abbildung 2: Anthraknose-Symptome an Mais	12
Abbildung 3: Aufbau und Funktionsweise eines melanisierten Appressoriums.....	19
Abbildung 4: Infektionsverlauf bei <i>Colletotrichum</i> ssp.	21
Abbildung 5: Vektor pPK2.....	37
Abbildung 6: Schichtenherstellung (Schema).....	41
Abbildung 7: Schema - Schichtenherstellung, Inokulation und Auswertung (nach Hoffmann, 2005).....	42
Abbildung 8: Herstellung und Präparation von Goldschichten.....	43
Abbildung 9: Sprühinokulation von Polymerschichten.....	44
Abbildung 10: Sensitivitätstest von <i>C. graminicola</i> auf Hygromycin B.....	50

Abbildung 11: Wachstum des WT-Isolates und ATMT ESI auf PDA und PDA/HygB.....	52
Abbildung 12: Blattsegmenttest	54
Abbildung 13: Nachweis der T-DNA Integration mittels spezifischer Primer	55
Abbildung 14: Keimraten von WT-Isolat und ESI auf Mais	56
Abbildung 15: Appressorienbildungsraten von WT-Isolat und ESI auf Mais	57
Abbildung 16: Penetrationsraten des WT-Isolates und AB.158 auf Mais	59
Abbildung 17: Entwicklung des WT-Isolates und AB.158 auf PET-Folie	60
Abbildung 18: Entwicklung des WT-Isolates, AT.147, AT.397, AT.673 und AT.717 auf Mais nach Zugabe von Maisblattextrakt	62
Abbildung 19: Symptomentwicklung von WT-Isolat und ESI auf Mais (makroskopisch)	63
Abbildung 20: Entwicklung von WT-Isolat und ESI auf Mais (mikroskopisch).....	64
Abbildung 21: Korrodierte Aluminiumdünnschicht	65
Abbildung 22: Entwicklung phytopathogener Pilze auf Goldschichten	66
Abbildung 23: Keimraten von <i>C. graminicola</i> auf unterschiedlich dicken PTFE-Schichten ..	68
Abbildung 24: Penetrationen pflanzenpathogener Pilze auf PTFE-Schichten.....	69
Abbildung 25: Penetrationsereignis von <i>P. pachyrhizi</i> auf PTFE, 110 nm.....	70
Abbildung 26: Penetrationsereignisse auf PTFE (Färbung mit Texas Red WGA).....	71
Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Abbildung von Penetrationsereignissen bei <i>P. pachyrhizi</i>	72
Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Abbildung von Penetrationsereignissen bei <i>C. graminicola</i>	73
Abbildung 29: Laterale Keimung und Penetrationen bei WT CgM2 und $\Delta Cgpk1$	74
Abbildung 30: Laterale Keimung und Penetrationen von WT CgM2 und $\Delta Cgpk1$ auf PTFE	75
Abbildung 31: Entwicklung von <i>C. graminicola</i> und <i>P. pachyrhizi</i> auf PMMA.....	76
Abbildung 32: Penetrationen von <i>C. graminicola</i> und <i>P. pachyrhizi</i> auf PTFE und PMMA..	77
Abbildung 33: Penetrationsraten von WT CgM2 und AB.158 auf PMMA-Schichten.....	78
Abbildung 34: Cytorrhizie bei <i>Colletotrichum graminicola</i> (WT-Isolat und $\Delta Cgpk1$)	80
Abbildung 35: Cytorrhizie bei <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	81

7.3 Tabellen und Abbildungen im Anhang

Tabelle 8: Basenabfolge der Primer Hyg1 und Gpd

Bezeichnung des Primers	Basenabfolge
Hyg1	5' TGT TGG CGA CCT CTA TTG G 3'
Gpd	5' GTC CCT CAG TCC CTG GTA GG 3'

Tabelle 9: Signifikante Unterschiede des Wachstums von *C. graminicola* WT und ATMT Isolaten auf PDA und PDA/HygB

Gezeigt werden signifikante Unterschiede (*) der ESI im Vergleich zum WT-Isolat auf PDA (Spalte 2) und PDA/HygB (Spalte 3) sowie Unterschiede im Wachstum der einzelnen Pilze zwischen den Medien (Spalte 4).

	PDA Vergleich mit WT	PDA/HygB Vergleich mit WT	Vergleich PDA und PDA/HygB
WT	/	/	*
AT.39	*	*	/
AT.147	/	*	/
AB.158	*	*	*
AT.171	*	*	*
AT.390	*	*	*
AT.391	*	*	*
AT.395	/	*	*
AT.396	*	*	*
AT.397	*	*	*
AT.399	/	*	*
AT.402	*	*	*
AT.405	*	*	*
AT.414	*	*	*
AT.416	*	*	*
AT.420	*	*	/
AT.425	*	*	*
AT.668	*	*	*
AT.673	*	*	*
AT.717	*	*	*

Tabelle 10: Vergleich der Keim- und Appressorienbildungsraten von *C. graminicola* und *P. pachyrhizi* auf PTFE und PMMA

Ein * kennzeichnet signifikante Unterschiede.

<i>P. pachyrhizi</i>	60 nm		110 nm	
	PTFE	PMMA	PTFE	PMMA
Keimrate (%)	41,80 ± 18,11	32,48 ± 5,27	42,41 ± 9,87	49,75 ± 16,02
Appressorienbildungsrates (%)	19,73 ± 17,34	16,19 ± 5,74	29,40 ± 7,93*	19,22 ± 3,22*
<i>C. graminicola</i>	60 nm		110 nm	
	PTFE	PMMA	PTFE	PMMA
Keimrate (%)	28,18 ± 25,45	22,49 ± 15,52	8,72 ± 4,45	19,99 ± 11,52
Appressorienbildungsrates (%)	26,69 ± 26,27	19,11 ± 10,91	7,54 ± 4,01*	19,08 ± 10,82*

Tabelle 11: Zellkollapsraten von *C. graminicola* WT und AB.158

Glycerolkonzentration	0 M	0,5 M	1 M	1,5 M	2 M	2,5 M	3 M
WT	0	4,65 ± 2,92	23,21 ± 6,95	44,16 ± 8,06	94,10 ± 1,65	87,86 ± 5,03	95,26 ± 3,69
AB.158	0	0*	36,03 ± 3,96*	58,94 ± 1,97*	63,46 ± 5,01*	74,21 ± 3,16*	77,81 ± 3,06*

Tabelle 12: Penetrationsrate von *C. graminicola* auf unterschiedlichen Substraten

<i>C. graminicola</i>	Mais	PTFE 60 nm	PMMA 60 nm
Penetrationsrate 3 pi (%)	96,15 ± 1,89	13,01 ± 11,91*	47,71 ± 22,25*

Tabelle 13: Signifikanzklassen der Zellkollapsraten von *C. graminicola* WT und Δ Cgpk1

MPa	0,00	0,69	1,30	1,85	2,14	2,46	2,80	3,17	3,55	4,61
WT	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ac
ECT	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a
KO1	a	b	b	a	a	a	b	b	a	b
KO2	a	b	ab	a	a	a	b	b	a	cb

Tabelle 14: Transformation filamentöser Pilze mittels ATMT

Tabelle erstellt in Anlehnung an MARUTHACHALAM ET AL., 2008. In der Spalte "% Einzelintegration" gibt die Zahl in Klammern die Gesamtzahl der untersuchten Transformanten an. Ein * kennzeichnet die Vorkultur in IMAS. Die mit ** gekennzeichneten Angaben entstammen der Arbeit von MÜNCH ET AL., 2008.

Spezies	Ausgangsmaterial	<i>A. tumefaciens</i> Stamm	Vektor	HygB Konz. (µg/ml)	Co-Kultivierungsdauer (h)	% Einfachintegration	Anzahl Transformanten	Sporenanzahl
<i>Coccidioides immitis</i> (ABUODEH ET AL., 2003)	Anthrokonidien	EHA105	pRATI2.9 und pRATI1.4	150-500	48	81 (21)	1	1x10 ⁵
<i>Fusarium circinatum</i> (COVERTE ET AL., 2001)	Konidien	AGL-1	pPK2	150	48	87,5 (8)	2-150	1x10 ⁵
<i>Calonectria morgarii</i> (MALONEK & MEINHARDT, 2001)	Konidien	LBA1100	pTAS5	100	72	100 (4)	13	1x10 ⁶
<i>Fusarium oxysporum</i> (MULLINS ET AL., 2001)	Sporen	AGL-1	pBHt1 pBHt2 pKht pDht	75	48	53 * (19) 81 (26)	300 - 500	1x10 ⁵
<i>Magnaporthe grisea</i> (RHO ET AL., 2001)	Sporen	AGL-1	pBHt2	200	48	> 60	500 - > 1000	1x10 ⁵
<i>Verticillium fungicola</i> (AMEY ET AL., 2002)	Konidien	LBA1126	pBIN7.1	550	48	100 (5)	4068	8.6 x 10 ⁵
<i>Helminthosporium turcicum</i> (DEGEFU & HANIF, 2003)	Konidien	AGL-1	pBGgHg	100	48	100 (5)	30 - 50	1x10 ⁴
<i>Aspergillus giganteus</i> (MEYER ET AL., 2003)	Konidien	LBA1100	pUR5750	100	48	100 (10)	79	1x10 ⁶
<i>Botrytis cinerea</i> (ROLLAND ET AL., 2003)	Konidien	LB1126	P17, p18 (pBHt2)	70	48	50 (4 bei p17, 6 bei p18)	15	1x10 ⁵
<i>Aspergillus fumigatus</i> (SUGUI ET AL., 2005)	Konidien	EHA105	pDht	200	48	-	> 100	1x10 ⁷
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (DE GROOT ET AL., 1998)	Konidien und Protoplasten	pUR5750	pBIN19	100	48	-	130	1x10 ⁶
<i>C. lagenarium</i> (TSUJI ET AL., 2003)	-	C58C1	pBIG2 RHPH2	100	48	86	150 - 300	1x10 ⁶
<i>C. trifolii</i> (TAKAHARA ET AL., 2004)	-	C58C1	pBIG2 RHPH2	100	48	75	20 - 30	1x10 ⁶
<i>C. higginsianum</i> (O'CONNELL ET AL., 2004)	Konidien (gekeimt)	AGL-1	pBIN-GFP-hph	-	-	40	250	1x10 ⁶
<i>C. graminicola</i> (FLOWERS & VAILLANCOURT, 2005)	Konidien	AGL-1	pBIN-GFP-hph	250	72	16	300 - 1706	1x10 ⁶
<i>C. falcatum</i> (MARUTHACHALAM ET AL., 2008)	Konidien	SK1044	pBHt2	50	24	62	300 - 500	1x10 ⁶
<i>C. acutatum</i> (MARUTHACHALAM ET AL., 2008)	Konidien	SK1044	pBHt2	300	36	65	200 - 250	5x10 ⁵
<i>C. graminicola</i> (eigene Arbeit)	Konidien	LBA1100	pPK2	100	72	70 (100)**	27	1x10 ⁶

7.4 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Medien

7.4.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien der Firma Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Verbrauchsmaterialien von Fa. Heinemann Labortechnik GmbH (Duderstadt, Deutschland) bezogen.

7.4.2 Lösungen

Acetosyringon (AS)

Nach dem Einwiegen der erforderlichen Menge Acetosyringon für eine 10 mM Stammlösung wurde die Lösung unter Rühren gelöst und anschließend steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vor Licht geschützt.

Antibiotika-Stammlösungen

Die folgenden Antibiotika kamen im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz:

- Kanamycin
- Spectinomycin
- Streptomycin

Stammlösungen (50 mg/ml) wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ angesetzt, steril filtriert und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Cefotaxim

Cefotaxim wurde den PDA/HygB Platten nach der Co-Kultivierung zur Abtötung von *A. tumefaciens* zugesetzt. Eine Stammlösung mit 20 mg/ml wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ angesetzt und steril filtriert.

Lactophenol

Lactophenol bestand aus 20 % Phenol, 20 % Milchsäure, 40 % Glycerol und 20 % $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$.

Maisblattextrakt (MBE)

Der während dieser Arbeit verwendete Maisblattextrakt wurde aus Blättern 2 - 3 Wochen alter Maispflanzen der Sorte Nathan hergestellt. 2,4 g Blätter wurden in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ bei $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 min autoklaviert. Der entstandene Extrakt wurde, falls eine Verdünnung erwünscht war, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gemischt.

Minimalmedium-Salze (MM-Salze)

Eine 2,5x Stammlösung setzt sich aus folgenden Salzen zusammen, die jeweils separat in Wasser gelöst wurden:

- 3,62 g/l KH_2PO_4
- 5,125 g/l K_2HPO_4
- 0,375 g/l NaCl
- 1,250 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
- 0,165 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- 0,0062 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
- 1,250 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Auf ein Autoklavieren der Lösung konnte verzichtet werden. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Morpholinethansulfonsäure (MES)

Benötigt wurde eine 1 M Lösung MES mit einem pH Wert von 5,3. Die Lösung wurde steril filtriert und bei -20°C gelagert.

7.4.3 Medien

Induktionsmedium (IM)

Während der ATMT wurden sowohl *A. tumefaciens* als auch die Sporen von *C. graminicola* in Induktionsmedium kultiviert. Als IMAS wurde Induktionsmedium nach Zugabe von Acetosyringon bezeichnet.

Für flüssiges IM werden 1x MM-Salze, 10 mM Glucose und 0,5 % Glycerol auf 1 l mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgefüllt und bei 121°C 20 min autoklaviert. Wurden IM-Platten benötigt, erhöhte sich die Glucose-Konzentration auf 5 mM und 1,5 % Agar-Agar wurden dem Medium vor dem Autoklavieren zugesetzt. In das handwarme, autoklavierte Medium wurden 40 mM MES und 200 μM AS zugegeben.

Komplettmedium (CM)

Für 1 l Flüssigmedium wurden je 10 ml Stammlösung A (50 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ in 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$) und B (10 g KH_2PO_4 , 12,5 g MgSO_4 und 2,7 g NaCl in 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$), 1 g Hefeextrakt und 1 g Caseinhydrolysat in 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst und bei 121°C 20 min autoklaviert.

Luria Broth-Medium (LB)

LB ist ein Standardmedium zur Bakterienanzucht. Für einen Liter Flüssigmedium wurden 10 g Trypton, 10 g NaCl und 5 g Hefeextrakt in H₂O_{dest} gelöst und bei 121 °C 20 min autoklaviert. Für LB Platten wurde zusätzlich 1,5 % Agar-Agar zugegeben.

Die Zugabe von Antibiotika erfolgt in das handwarme Medium unmittelbar vor dem Gießen der Nährmediumplatten.

oat meal agar (OMA)

Oat meal agar eignet sich für die Kultivierung und die Induktion der Sporulation von *C. graminicola*. Für 1 l Medium wird die Hälfte des H₂O_{dest} mit 12 g/l Agar-Agar in der Mikrowelle kurz aufgeköcht, während die andere Hälfte mit 50 g Haferflocken im Standmixer 6x 20 s homogeniert wird. Anschließend wurden beide Suspensionen miteinander vereint und das Medium für 45 min bei 121 °C autoklaviert.

potato dextrose agar (PDA)

PDA eignet sich für die Kultivierung einer Vielzahl von Pilzen, unter anderem diente es als Kulturmedium für *C. graminicola* und *M. oryzae*. Mit Hygromycin B versetzt ist es ein Selektionsmedium nach der Transformation von *C. graminicola* mittels *A. tumefaciens*.

Da ein fertiges *potato dextrose* Produkt (Difco Potato Dextrose Broth, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) verwendet wurde, entfiel die Zubereitung des Mediums aus frischen Kartoffeln. Laut Packungsanweisung wurde für 1 l Medium 24 g PD in H₂O_{dest} gelöst und für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Die Zugabe von Hygromycin B (für PDA/HygB) erfolgte in das abgekühlte, handwarme Medium.

Selektionsmedium (SM)

Nach der Transformation von *C. graminicola* Sporen mittels ATMT wurde das Filterpapier mit den putativen Transformanten von Induktionsmedium auf ein Hygromycin B-haltiges Selektionsmedium übertragen.

Für Selektionsmedium-Platten wurden 1 M Saccharose, 0,1 % Hefeextrakt, 0,1 % Caseinhydrolysat und 1,5 % Agar-Agar in 1 l H₂O_{dest} gelöst und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Zugabe von 100 µg/ml Hygromycin B erfolgte zum handwarmen Medium.

Wasseragar

Für 1 l Wasseragar wurden 15 g Agar-Agar in 1 l H₂O_{dest} bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

7.5 Anmerkungen zur Schreibweise

Englische Fachbegriffe sind im Text kursiv geschrieben. Fachbezogene Abkürzungen wurden bei ihrer ersten Nennung vollständig ausgeschrieben, die entsprechende Abkürzung in Klammern angegeben. Bezeichnungen für Gene wurden im Text abgekürzt, in Kleinbuchstaben und kursiv dargestellt. Proteinbezeichnungen wurden ebenfalls abgekürzt, aber in Großbuchstaben.

7.6 Abkürzungsverzeichnis

Organismen

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>C. graminicola</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i>
<i>C. acutatum</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>
<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
<i>C. truncatum</i>	<i>Colletotrichum truncatum</i>
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<i>C. orbiculare</i>	<i>Colletotrichum orbiculare</i>
<i>C. lagenarium</i>	<i>Colletotrichum lagenarium</i>
<i>C. destructivum</i>	<i>Colletotrichum destructivum</i>
<i>C. trifolii</i>	<i>Colletotrichum trifolii</i>
<i>C. sublineolum</i>	<i>Colletotrichum sublineolum</i>
<i>C. capsici</i>	<i>Colletotrichum capsici</i>
<i>C. circinans</i>	<i>Colletotrichum circinans</i>
<i>C. musae</i>	<i>Colletotrichum musae</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>M. grisea</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
<i>M. oryzae</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>
<i>C. carbonum</i>	<i>Cochliobolus carbonum</i>
<i>P. pachyrhizi</i>	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>

im Text verwendete Abkürzungen

ALB	<i>anthracnose leaf blight</i> (Anthraknose Blattflecken)
AS	Acetosyringon
ASR	<i>anthracnose stalk rot</i> (Anthraknose Stängelfäule)
AT	ATMT-Transformante
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelte Transformation)

BA	Barrierefilter
bp	Basenpaare
BPA	<i>Bauhinia purpurea</i> Agglutinin
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
Ca ²⁺	2-wertiges Kalziumion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cg	<i>Colletotrichum graminicola</i>
cm	Zentimeter
CM	Komplett-Medium
d	Tag
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DHN	Dihydroxynaphtalen
DM	Zweifarbenspiegel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNasen	Desoxyribonukleasen
dNTPs	2'Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat(e)
dpi	<i>days post inoculation</i> (Tage nach Inokulation)
E	Extinktion
ECT	Ektope (Mutante mit ektopischer Integration)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
ESEM	<i>environmental scanning electron microscope</i>
ESI	Einzelsporisolat

et al.	<i>et alteri</i> , lat. für und andere
Ex	Anregungsfilter
f	Frequenz
F	Fluor
FAO	Food and Agriculture Organization
f. sp.	<i>forma specialis</i>
°C	Grad Celsius
g	Gramm
gpd	Glyceraldehyd-3-phosphat Gen
gw%	Gewichtsprozent
h	Stunde
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HF	Hoch-Frequenz
HiWi	Hilfswissenschaftler, wissenschaftliche Hilfskraft
hpi	<i>hours post inoculation</i> (Stunden nach Inokulation)
HR	<i>hypersensitive reaction</i> (Hypersensitiver Zelltod)
HygB	Hygromycin B
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin
IM	Induktionsmedium
IMAS	Induktionsmedium mit Acetosyringon
insg.	insgesamt
kb	Kilobasen

kHz	Kilohertz
KO	Knock Out; Knock Out Mutante
kV	Kilovolt
LB	<i>left border</i> (linke Begrenzung der T-DNA)
LB	Luria Broth-Medium
μ	mikro (griechisch), ein Millionstel
m	milli, ein Tausendstel
M	Molar
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
max.	maximal
MBI	Melaninbiosyntheseshemmer
MBE	Maisblattextrakt
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μ g	Mikro-Gramm
μ l	Mikro-Liter
μ M	Mikro-Molar
μ m	Mikro-Meter
μ N	Mikro-Newton
mM	Milli-Molar
MPa	Mega-Pascal
Mrd.	Milliarden
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nano-Gramm
nm	Nanometer

O ₂	Sauerstoff
OD	<i>optical density</i> (optische Dichte)
OMA	<i>oat meal agar</i> (Haferflocken-Agar)
%	Prozent
PBS	Poly-Butylensuccinat
PBSA	Poly-Butylensuccinat-co-Adipat
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PDA	<i>potato dextrose agar</i> (Kartoffeldextrose-Agar)
PEG	Polyethylenglycol
pH	potentia hydrogenii; pH-Wert
PKS	Polyketidsynthase
PE	Polyethylen
PET	Polyethylenterephthalat
PTFE	Polytetrafluorethylen
PMMA	Polymethylmetacrylat
RB	<i>right border</i> (rechte Begrenzung der T-DNA)
REM	Rasterelektronenmikroskop
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
REMI	<i>restriction enzyme-mediated insertion</i> (Restriktionsenzym-vermittelte Insertion)
RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonukleasen
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
SDS	Sodiumlaurylsulfat
SEM	<i>scanning electron microscope</i>
SM	Selektionsmedium

SSI	<i>single spore isolate</i>
ssp.	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	transferierte DNA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
trpC	Tryptophan C Gen
&	und
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra-Violett
\$US	US Dollar
V	Volt
v. a.	vor allem
vir Gene	Virulenzgene von <i>A. tumefaciens</i>
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
W	Watt
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)
WT	Wildtyp
x	mal
z. B.	zum Beispiel

z. T.

zum Teil

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nancy Ludwig, geb. Eichler
geboren am: 06.02.1980
geboren in: Halle/Saale
wohnhaft in: Salzatal OT Bennstedt (06198)
Neustädter Str. 24

Ausbildung

1986 - 1991 Grundschule "Wilhelm Pieck" in Halle/Saale
1991 - 1998 Gymnasium "Albert Schweitzer" in Halle/Saale
1998 - 2005 Studium der Agrarwissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Diplomarbeit angefertigt im Fachgebiet Phytopathologie und Pflanzenschutz (Thema: "Pathogenese von *Colletotrichum* ssp. auf Mais und Gerste")

Promotion

2005 - 2008 Doktorand am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Fachgebiet Phytopathologie und Pflanzenschutz

beruflicher Werdegang

seit April 2011 beschäftigt als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau

Publikationen

Stefan Küster, Nancy Ludwig, Guido Willers, Jens Hoffmann, Holger B. Deising, Andreas Kiesow

"Thin PTFE-like membranes allow characterizing germination and mechanical penetration competence of pathogenic fungi"

Acta Biomaterialia (2008), 4: 1809 - 1818.

Steffen Münch, Ulrike Lingner, Daniela S. Floss, Nancy Ludwig, Norbert Sauer, Holger B. Deising

"The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species"

Journal of Plant Physiology (2008), 165: 41 - 51.

Steffen Münch, Nancy Ludwig, Daniela S. Floss, Janyce A. Sugui, Anna M. Koszucka, Lars M. Voll, Uwe Sonnewald, Holger B. Deising

"Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation"

Molecular Plant Pathology (2011), 12: 43 - 55.

Ralf Horbach, Nancy Ludwig, Holger B. Deising (in Vorbereitung)

"Melanine protects *Colletotrichum graminicola* appressoria against hydrolytic enzymes"

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Es wurden mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen.

Desweiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Halle/Saale, den