

„Hypothesen getriebene Identifizierung von Virulenzfaktoren
des Maispathogens *Colletotrichum graminicola*“

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von
Herrn Fabian Weihmann
Geb. am 13.10.1981 in Leipzig

Gutachter

1. Herr Prof. Dr. Holger Deising
2. Herr Prof. Dr. Edgar Peiter
3. Herr Prof. Dr. R.T. Vögele

verteidigt am 11.11.2013 Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Anmerkungen zur Schreibweise.....	IX
A. Einleitung	1
A.1. Biologie von <i>Colletotrichum graminicola</i>	1
A.2. Bedeutung der Sekretion von Proteinen für die Pathogenese phytopathogener Pilze	4
A.2.1. Eukaryotische Proteinsekretion	4
A.2.2. Sekretierte Proteine in biotrophen Interaktionen	7
Sekretion zur Zellwand	8
Sekretion in den Apoplast	9
Sekretion und anschließende Translokation in die Wirtszellen.....	11
A.2.3. Sekretierte Proteine in nekrotrophen Interaktionen.....	12
A.3. Strategien zur Identifizierung von Virulenzfaktoren	14
A.3.1. Zufalls-Mutagenese	15
REMI-Mutagenese	15
ATMT-Mutagenese	15
A.3.2. Gezielte Gen-Deletionen.....	16
Genomische Kartierung	16
Gezielte Suche nach Homologen bekannter Pathogenitäts bzw. Virulenzgene.....	17
Gezielte Identifizierung sekretierter Proteine	17
Expressionsdaten	19
A.4. Ziele der Arbeit.....	20
B. Material & Methoden	21
B.1. Biologisches Material.....	21
B.1.1. <i>Colletotrichum graminicola</i>	21
B.1.1.1. Verwendetes Isolat.....	21
B.1.1.2. Kulturbedingungen und Lagerung	21
B.1.2. <i>Zea mays</i>	22
B.1.2.1. Verwendete Sorten	22
B.1.2.2. Anzuchtbedingungen.....	22

B.1.3.	Bakterienkulturen	22
B.1.3.1.	Verwendete Stämme	22
B.1.3.2.	Kulturbedingungen und Lagerung	22
B.2.	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	23
B.2.1.	Allgemeine Angaben	23
B.2.2.	Nährmedien	23
B.2.3.	Puffer und Lösungen	25
B.2.4.	Oligonukleotide.....	27
B.3.	Infektions- und Wachstumsversuche.....	27
B.3.1.	Herstellung des Inokulums.....	27
B.3.2.	Punktinokulation von Blattsegmenten	27
B.3.2.1.	Inokulation.....	27
B.3.2.2.	Symptomaufnahme und Ernte	28
B.3.3.	Sprühinokulation intakter Pflanzen	28
B.3.3.1.	Inokulation.....	28
B.3.3.2.	Symptomaufnahme und Ernte	29
B.3.4.	Punktinokulation intakter Pflanzen	29
B.3.4.1.	Inokulation.....	29
B.3.4.2.	Symptomaufnahme und Ernte	29
B.3.5.	In vitro Kultivierung auf verschiedenen Kohlenstoff-Quellen.....	30
B.3.6.	Bestimmung der Bildungsraten der Infektionsstrukturen bzw. der Konidien	30
B.4.	Molekularbiologische Methoden.....	31
B.4.1.	Präparation von Nukleinsäuren	31
B.4.1.1.	Mini-Präparation von genomischer DNA.....	31
B.4.1.2.	Maxi-Präparation von genomischer DNA	31
B.4.1.3.	Präparation von Plasmid-DNA	32
B.4.1.4.	Präparation von RNA	33
B.4.2.	PCR	34
B.4.2.1.	Standard PCR	34
B.4.2.2.	<i>Double-Joint</i> -PCR	35
B.4.2.3.	<i>Genomic Walking</i> PCR	38
B.4.2.4.	Quantitative PCR	40
B.4.2.5.	Quantitative-Reverse Transkriptase PCR.....	41
B.4.3.	Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren.....	42
B.4.3.1.	DNA-Elektrophorese.....	42
B.4.3.2.	RNA-Elektrophorese	43
B.4.4.	Southern-Hybridisierung.....	43
B.4.4.1.	Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden	43

B.4.4.2.	Restriktionsverdau genomischer DNA und Kapillartransfer	43
B.4.4.3.	Hybridisierung und Nachweis der gebundenen Sonde	44
B.4.5.	Transformation von <i>Colletotrichum graminicola</i>	45
B.4.5.1.	Anzucht der Vorkultur	45
B.4.5.2.	Protoplastierung und Transformation	45
B.4.5.3.	Selektion	45
B.4.6.	Klonierung in <i>E. coli</i>	46
B.4.6.1.	Gewinnung von DNA-Fragmenten	46
B.4.6.2.	Ligation	46
B.4.6.3.	Transformation von <i>E. coli</i>	47
B.4.6.4.	Selektion	47
B.4.7.	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	47
B.4.8.	Identifizierung der T-DNA-Integrationsstellen	49
B.5.	Mikroskopie und Fotografie	50
B.5.1.	Lichtmikroskopie	50
B.5.2.	Färbetechniken	50
B.5.3.	Fotografie und Bildbearbeitung	50
B.6.	Bioinformatik	51
C.	Ergebnisse	53
C.1.	Vergleich zweier Inokulationssysteme mittels qRT-PCR	53
C.2.	Identifizierung und Charakterisierung von Virulenzgenen	57
C.2.1.	Deletionsmutagenese von YSST-Kandidatengenen	57
C.2.2.	Ableitung des Sekretoms von <i>C. graminicola</i> durch Bioinformatik	60
C.2.3.	Gencluster für sekretierte Proteine	61
C.2.3.1.	Identifizierung der Gencluster durch Bioinformatik	61
C.2.3.2.	Deletionsmutagenese und Charakterisierung ausgewählter Gencluster	63
Cluster 1 – 4	65	
Cluster 5	65	
Cluster 6	66	
C.2.4.	Deletionsmutagenese von Genen mit Homologie zu Effektoren in <i>M. oryzae</i>	78
C.2.5.	Identifizierung translozierter Proteine	80
C.3.	Entwicklung und Etablierung eines qPCR-basierten Detektionsverfahrens	83
C.3.1.	Bestimmung der Spezifität und der Sensitivität	83
C.3.2.	Optimierung der Beprobung infizierter Blattsegmente	85
C.3.3.	Bestimmung der Virulenz von Mutantenstämmen	87
C.3.4.	Bestimmung der Anfälligkeit verschiedener Maissorten	91

D. Diskussion.....	94
D.1. Punktinokulation von Blattsegmenten als reproduzierbares Testsystem	94
D.2. Bewertung verschiedener Ansätze zur Identifizierung von Virulenzfaktoren.....	95
D.2.1. Deletionsmutagenese von YSST-Kandidaten	95
D.2.2. Deletionsmutagenese von Clustern sekretierter Proteine	97
D.2.3. Deletionsmutagenese homologer Gene von <i>M. oryzae</i>	99
D.2.4. Identifizierung translozierter Proteine	100
D.3. Das Gen GLRG_04686 kodiert einen Virulenzfaktor.....	102
D.4. Das Gen GLRG_04689 kodiert einen Virulenzfaktor.....	104
D.5. Biomassebestimmung mittels quantitativer PCR.....	106
E. Zusammenfassung	111
F. Literatur.....	113
G. Anhang.....	125
G.1. Liste aller Deletionsmutanten	125
G.2. Sequenzvergleiche der Proteinsequenzen von GLRG_04686p mit anderen pilzlichen Homologen.....	152
G.3. Sequenzvergleiche der Proteinsequenzen von GLRG_04689p mit anderen pilzlichen Homologen.....	153
G.4. Axenisches Wachstum der Deletionsmutanten von Cluster 1 – 5.....	154
G.5. Liste aller verwendeten Primer	155
G.6. Liste aller verwendeten Maissorten	161
G.7. Erklärung an Eides statt	162
G.8. Danksagung.....	163
G.9. Lebenslauf.....	164
G.10. Liste eigener Publikationen	165

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01: Spezifität der verwendeten qRT-Primer.	54
Abbildung 02: Expression pflanzlicher Abwehrgene nach Punktinokulation von Blattsegmenten (PIB) und Sprühinokulation intakter Pflanzen (SIP).	55
Abbildung 03: Deletionskassette, Integration und Transformantentest am Beispiel des Genes GLRG_05667.	59
Abbildung 04: Cluster sekretierter Proteine	62
Abbildung 05: Wachstum von Transformanten mit Teildeletionen des <i>Clusters</i> 5.	66
Abbildung 06: Schema des genomischen Lokus von Cluster 6 mit genspezifischen Transkriptionsmustern.	67
Abbildung 07: Blattsegment-Virulenztest der Deletionsmutanten von Δ Cluster6, Δ 04686 und Δ Cluster6B.	68
Abbildung 08: Blattsegment-Virulenztest der Deletionsmutanten von Δ 04687, Δ 04688, Δ 04689 und Δ 04690.	69
Abbildung 09: Wachstumsraten der unterschiedlichen Cluster 6 – Mutanten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.	70
Abbildung 10: Quantifizierung der Infektionsstrukturen auf Mais.	72
Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen der Infektionsstrukturen.	74
Abbildung 12: Papillenbildung in infizierten Maisblättern.	75
Abbildung 13: Blattsegment-Virulenztest auf verwundeten Maisblattsegmenten.	77
Abbildung 14: Hierarchische Verteilung der Expressionsmuster der 129 Kandidatengene mit putativem RXLR-Motiv.	82
Abbildung 15: Spezifität der verwendeten qPCR-Primer.	84
Abbildung 16: Eichgeraden für die genomische DNA von <i>C. graminicola</i> und die Plasmid-DNA von pUC18.	85
Abbildung 17: Optimierung der Beprobung infizierter Blattsegmente.	86
Abbildung 18: Einfluß der Inokulationsdichte auf den C_T -Wert.	87
Abbildung 19: Charakterisierung der ATMT-Mutanten	88
Abbildung 20: Integration der T-DNA.	89
Abbildung 21: Kinetik der Biomasseentwicklung der ATMT-Mutanten <i>in planta</i>	90
Abbildung 22: Vergleich der Anfälligkeit verschiedener Maissorten für <i>C. graminicola</i>	91
Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Infektion des Wildtypes an verschiedenen Maissorten.	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der durch qRT-PCR untersuchten Pflanzen- und Pilzgene.	53
Tabelle 2: Liste aller durch Gendeletion untersuchten YSST-Gene.....	58
Tabelle 3: Liste aller durch Gendeletion untersuchten Gencluster.	64
Tabelle 4: <i>In silico</i> Analysen zur Struktur und Funktion von GLRG_04686 bzw. GLRG_04689.	71
Tabelle 5: Liste aller durch Gendeletion untersuchten ATMT-Homologen.	79

Abkürzungsverzeichnis

ad	lat.: zu
amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
Bidest	zweifach destilliert
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
CM	<i>Complete Medium</i>
cm	Zentimeter
CSPD	Chemilumineszentes Substrat für die alkalische Phosphatase aus <i>E. coli</i> ??
d	Tag(e)
dest	einfach destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DIG dUTP	Digoxygenin markiertes Desoxyuridintriphosphat
dpi	<i>days past inoculation</i> (Anzahl der Tage nach der Inokulation)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , lat.: und andere
g	Gramm
x g	mal Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
hpi	<i>hours past inoculation</i> (Anzahl der Stunden nach der Inokulation)
HR	<i>hypersensitive response</i> (hypersensitive Reaktion)
kb	Kilobasenpaare
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
M	molar

Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µmol	Mikromol
mol	Mol
ms	Millisekunde(n)
N	Stickstoff
NaBo	Natriumborat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OMA	<i>oat meal agar</i> (Haferflocken-Agar)
ORF	<i>open reading frame</i> (Leserahmen)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	lat.: potentia hydrogenii, Wasserstoffionenkonzentration
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP	Signalpeptid
SSC	Sodiumchlorid/Sodiumcitrat
TAE	Tris/Acetat/EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _M	Schmelztemperatur, Annealingtemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TE	Tris/EDTA
U	<i>units</i> (Einheiten)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Masseprozent
WT	Wildtyp
x	mal

Anmerkungen zur Schreibweise

Fremdsprachige Fachbegriffe wurden weitestgehend ins Deutsche übersetzt. In Fällen, in denen dies nicht möglich war oder sinnvoll erschien, wurden die Originalbegriffe beibehalten und in Kursivschrift wiedergegeben. Dies gilt nicht für Produktbezeichnungen und Abkürzungen fremdsprachiger Begriffe. Lateinische Begriffe sowie Art- und Gattungsnamen wurden durch Kursivschrift gekennzeichnet. Genbezeichnungen, aus Veröffentlichungen bzw. vorrangigere Literatur, erfolgten durch die Anfangsbuchstaben des Gattungs- und Artnamens in Groß- und Kleinschrift, gefolgt von Großbuchstaben und einer Ziffer in Kursivschrift (z. B. *CgH3*). Die Bezeichnung des zugehörigen Proteins folgte der gleichen Nomenklatur, jedoch ohne kursive Markierung (z. B. CgH3). Genbezeichnungen, denen die 2010 erschienene Annotation von *Colletotrichum graminicola* zu Grunde liegt, erfolgte durch die offizielle Kennzeichnung „GLRG_“, gefolgt von einer fünfstelligen Gennummer (z. B. GLRG_04686). Die zu diesen Genen gehörenden Proteine wurden mit demselben Namen und dem Zusatz „p“ gekennzeichnet (z. B. GLRG_04686p).

A. Einleitung

A.1. Biologie von *Colletotrichum graminicola*

Colletotrichum graminicola (Cesati) Wilson, Teleomorph *Glomerella graminicola* Politis, ist ein Vertreter der Ascomyceten (Pezizomycotina, Sordariomycetes) und der Erreger von Anthraknose-Blattflecken und Stängelfäule an Mais (*Zea mays* (Wilson, 1914)). Als fakultativer Saprophyt ist *C. graminicola* in der Lage, sowohl auf lebenden als auch auf abgestorbenen Pflanzen zu wachsen. Diese Fähigkeit ist entscheidend für die Ernährung während der Überwinterung auf Ernteresten im Boden und der Bildung des primären Inokulums im folgenden Frühjahr. Im Verlauf einer Vegetationsperiode verbreitet sich *C. graminicola* asexuell über die Bildung von Konidiosporen im Bestand. Diese Lebensweise und die Fähigkeit, bei günstigen Umweltbedingungen, d. h. hoher Luftfeuchtigkeit und Temperaturen um 25 °C, innerhalb von drei bis fünf Tagen große Sporenmengen zu bilden, führte in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts in Teilen Nordamerikas zu starken Epidemien (Warren et al., 1973; Hooker and White, 1976). Durch pflanzenzüchterische Maßnahmen ist es aber gelungen, widerstandsfähigere Sorten zu etablieren (Mims et al., 2002). Dies führte dazu, dass das Schadpotential von *C. graminicola* in den folgenden Jahren zurück gegangen war. Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass bis heute keine absolut resistenten Maissorten existieren und dass die Entstehung neuer virulenterer Rassen möglich ist.

Die sichelförmigen Konidien werden in speziellen Sporenlagern, den Acervuli, gebildet. Neben sichelförmigen Konidien welche im Normalfall nur einen Zellkern besitzen, produziert *C. graminicola* auch kleinere ovale bis elliptische Konidien, welche ein bis vier Kerne enthalten können (Panaccione et al., 1989). Eine extrazelluläre Matrix umgibt die Konidien im Acervulus. Den Hauptanteil dieser Matrix macht eine Mischung hochmolekularer Glykoproteine aus, welche die Sporen vor dem Austrocknen schützen (Nicholson and Moraes, 1980; Sugui et al., 1998). Diese Proteine sind zusätzlich auf Grund ihres hohen Prolin-Anteiles in der Lage, von der Pflanze produzierte toxische Polyphenole zu binden und dadurch zu entgiften (Nicholson et al., 1986). Eine weitere wichtige Komponente der Matrix ist der Keiminhibitor, Mycosporin-Alanin, der verhindert, dass die Sporen bereits im Acervulus auskeimen (Leite and Nicholson, 1992). Ab einer zehnfachen Verdünnung des Inhibitors, wie sie bei einer Verbreitung durch Regen und Spritzwasser verursacht wird, ist es den Konidien möglich auszukeimen. Als weitere Bestandteile der Matrix sind Laccasen, Glucosidasen, nichtspezifische Esterasen und Cutinasen zu nennen (Anderson and Nicholson, 1996). Die Wirkungsweise solcher Enzyme ist noch nicht restlos geklärt; man kann aber davon ausgehen, dass sie eine Bedeutung für die Anheftung der Sporen auf dem Blatt haben.

Gelangt eine Konidie auf das Blatt einer Wirtspflanze, so werden innerhalb von 30 Minuten nach dem Auftreffen auf die Blattoberfläche Glykoproteine gebildet und sekretiert. Diese führen zur Bildung eines Adhäsionskissens, welches einen festen Kontakt zwischen der Konidie und der hydrophoben Pflanzencuticula herstellt (Mercure et al., 1994a; Mercure et al., 1994b). Die Erkennung des Wirtes durch den Pilz erfolgt anhand der spezifischen Härte und des spezifischen Hydrophobizitätsgrads der Kutikula (Chaky et al., 2001). Vor der Keimung wird die Konidie durch Bildung eines Septums quergeteilt und eine der beiden Hälften, manchmal auch beide, keimt aus und bildet ein an der Spore anliegendes oder durch einen kurzen Keimschlauch verbundenes Appressorium. Es konnte bei Versuchen auf künstlichen, hydrophoben Oberflächen gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung eines Appressoriums am Ende eines Keimschlauches abhängig davon ist, wie groß der Kontakt zur hydrophoben Oberfläche ist (Apoga et al., 2004). Reife Appressorien erscheinen spätestens 24 Stunden nach Adhäsion der Konidien und sind unter dem Lichtmikroskop als dunkle Strukturen sichtbar. Die dunkle Färbung wird durch Einlagerungen von Melanin in die Zellwand des Appressoriums hervorgerufen. Die Penetration beruht auf dem Aufbau eines hohen Turgordruckes, welcher auf eine kleine Öffnung, der Penetrationspore, an der Basis des Appressoriums gerichtet wird, da hier die Verstärkungen der Zellwand geringer sind. Die dort auftretenden Kräfte wirken somit direkt auf die Blattepidermis, so dass eine Penetrationshyphe in die Epidermiszellen getrieben werden kann (Deising et al., 2000a). Erzeugt wird der Turgordruck durch die Konzentrierung von Glycerol im Inneren des Appressoriums und dem daraus resultierenden Einströmen von Wasser (DeJong et al., 1997). Dieser osmotische Gradient kann aufrechterhalten werden, da durch die Einlagerung des Melanins in die Appressorienzellwand die Porengröße so stark reduziert wurde, dass nur das Wasser und nicht die Osmolyte die Zellmembran passieren kann. Der Appressoriendruck erreicht eine Kraft von bis zu 17 μN (Bechinger et al., 1999). Im Zuge der Penetration scheint der Pilz zusätzlich Zellwand abbauende Enzyme zu sekretieren (Herbert et al., 2004). 24 bis 36 Stunden nach der Inokulation kommt es zur Penetration der Epidermiszelle und zur Bildung eines Infektionsvesikels und primärer Infektionshyphen. Da sich der Pilz in dieser Phase der Besiedlung noch biotroph ernährt, bleibt die Plasmamembran der Wirtszelle noch intakt. Die primären Hyphen sind nicht auf die erste Zelle beschränkt, da sie in benachbarte Epidermis- bzw. Mesophyllzellen einwachsen und sich dort ebenfalls biotroph ernähren (Mims and Vaillancourt, 2002). In dieser Phase der Infektion ist der Pilz in der Lage eine Erkennung durch die Pflanze erfolgreich zu verhindern. Eine Möglichkeit ist die Maskierung der eigenen Zellwand, indem er nach außen exponierte Chitinmoleküle deacetyliert. Diese Strategie verhindert den Abbau von Chitin durch pflanzliche Chitinasen und damit eine Erkennung von Chitin Fragmenten durch die Pflanze. So wird eine Elicitierung der Pflanzenabwehr unterdrückt (El Gueddari et al., 2002). Zwischen 48 und 72 Stunden nach der Anheftung der Spore

schaltet die Ernährung des Pilzes von biotroph auf nekrotroph. Die nekrotrophe Phase ist gekennzeichnet durch die Bildung invasiver Sekundärhyphen, welche Plasmamembranen und Zellwände benachbarter Zellen durchstoßen und auch in die Interzellularräume wachsen (Mims and Vaillancourt, 2002). Des Weiteren sind äußerlich nekrotische Blattbereiche an der Infektionsstelle zu erkennen. Die Mechanismen des Umschaltens im hemibiotrophen Lebensweg von *C. graminicola* sind bis heute nicht richtig geklärt. Es existiert eine Mutante von *C. graminicola*, die eine Insertion im Leserahmen einer möglichen Signal-Peptidase trägt. Diese Insertion hat keinen Einfluss auf die Penetration. Die Mutante ist aber nicht mehr in der Lage, nach dem biotrophen Wachstum in die nekrotrophe Phase zu wechseln. Eine komplette Deletion dieses Genes gelang jedoch nicht, was vermuten lässt, dass das Gen essentiell ist (Thon et al., 2002). Nach 72 Stunden erscheinen auf dem nekrotischen Blattgewebe Acervuli mit Konidien und schließen damit den asexuellen Reproduktionszyklus ab. Neben dieser klassischen Symptomausprägung der Anthraknose auf Blättern, konnte für *C. graminicola* auch die Ausbildung sogenannter „grüner Inseln“ auf seneszenten Blättern gezeigt werden (Behr et al., 2010). Dabei wächst der Pilz nach erfolgreicher Penetration gezielt zu den Leitbündeln und ist in der Lage, das pflanzliche Gewebe um die Infektionsstelle photosynthetisch aktiv zu halten. Auf diese Weise entstehen sichtbare grüne Bereiche, welche sich vom umgebenden, bereits gelblich Verfärbten (seneszenten) Gewebe optisch unterscheiden. Es wird vermutet, dass *C. graminicola* auf bisher unbekannte Weise, den Cytokinin-Haushalt der befallenen Zellen ändert und somit die Seneszenz verzögert wird.

Der Befall von Stängeln erfolgt nach einem ähnlichen Muster, obwohl hier die Penetration durch vorhergegangene Verletzungen stängelbohrender Insekten, wie z. B. die Larven des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*), stark gefördert wird (Bergstrom et al., 1983). *C. graminicola* ist allerdings auch in der Lage, ohne eine vorhergehende Verletzung die recht stark lignifizierte Rinde des Maisstängels zu penetrieren (Venard and Vaillancourt, 2007; Sukno et al., 2008). Die systemische Ausbreitung innerhalb des Stängels erfolgt durch Hyphen, welche in den Faserzellen der Leitgefäße weiterwachsen (Venard and Vaillancourt, 2007). Das anschließende nekrotische Wachstum erfolgt hauptsächlich im inneren Parenchymgewebe des Stängels, daher der Name Stängelfäule. Durch Befall der Leitbündel kann es außerdem zur Störung des Wassertransportes im Xylem kommen, was ein Absterben der oberen Pflanzenteile zur Folge hat.

A.2. Bedeutung der Sekretion von Proteinen für die Pathogenese phytopathogener Pilze

Die Sekretion von Proteinen und Sekundärmetaboliten durch phytopathogene Pilze ist für die Ausbildung von Infektionsstrukturen, die Interaktion mit dem Wirt und die Verwertung von Nährstoffen von zentraler Bedeutung. Im Folgenden wird die eukaryotische Proteinsekretion erläutert und es wird auf die Bedeutung der Sekretion sowohl für die Etablierung und Aufrechterhaltung der biotrophen Phase als auch auf das Abtöten und die Verwertung des Wirtsgewebes während der nekrotrophen Phase der Wirt-Pathogen Interaktion eingegangen.

A.2.1. Eukaryotische Proteinsekretion

Die Sekretion eukaryotischer Proteine lässt sich in 5 Schritte gliedern:

1. Translokation der sich bildenden Polypeptidkette durch die Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER)
2. N-Glycosylierung und Faltung der Proteine im ER
3. Transport vom ER zum Golgi-Apparat
4. Modifikation der Proteine innerhalb des Golgi-Apparates
5. Entlassen der fertigen Proteine

Proteine, die sekretiert werden, besitzen am aminoterminalen Ende der Aminosäurekette ein Signalpeptid. Dieses Signalpeptid besteht aus 3 Regionen: der N-Region, welche als aminoterminal polare Region vorrangig aus positiv geladenen Aminosäuren besteht; der H-Region, die sich ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren zusammensetzt; und der abschließenden carboxyterminalen C-Region, welche die Schnittstelle für die Signalpeptidase trägt (von Heijne, 1990). Alleine die Abfolge der 3-Regionen und die damit verbundenen physikalischen Eigenschaften begründen die Funktionsweise eines Signalpeptides. Das Signalpeptid der am Ribosom entstehenden Aminosäurekette wird durch das Ribonukleoprotein SRP (*signal recognition particle*) erkannt. Entdeckt und charakterisiert wurde das SRP in den frühen 80er Jahren des letzten Jahrhunderts durch Günter Blobel, der dafür 1999 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielt (Walter and Blobel, 1983a, b; Blobel, 1987). Die Bindung von SRP an das Signalpeptid wird durch einen Proteinkomplex mit dem Namen NAC (*nascent polypeptide associated complex*) vermittelt (Lauring et al., 1995). Sogenannte SRP-Rezeptoren dienen dazu, dass der Ribosomenkomplex und die wachsende Aminosäurekette in die räumliche Nähe der Translokationskanäle kommen. Diese Rezeptoren binden das SRP Ribonukleoprotein, wodurch dieses vom Signalpeptid abgelöst wird. Das nun freie

Signalpeptid wird auf Grund der positiven Ladung der N-Region nicht komplett durch den Translokationskanal geschleust, was dazu führt, dass die hydrophobe H-Region inmitten des Translokationskanals auf Grund hydrophober Wechselwirkungen mit der ER-Membran verschmelzen kann (Sakaguchi et al., 1992). Das Ribosom translatiert die entstehende Aminosäurekette nun direkt in das Lumen des ER. Das translatierte Protein hängt am Signalpeptid wie an einem Anker an der zum Lumen gerichteten Membranseite. Erreicht die Aminosäurekette eine Länge von ca. 100 AS, so trennt der Signalpeptidase-Komplex die Kette vom Signalpeptid an einer bestimmten Schnittstelle innerhalb der C-Region. Im Falle der REMI-Mutante $\Delta CPR1$ von *C. graminicola* scheint genau diese Abspaltung des Signalpeptides gestört zu sein (Thon et al., 2002). Diese Mutante zeigt zunächst keine Unterschiede zum Wildtyp im Bezug auf vegetatives Wachstum, Etablierung von Infektionsstrukturen und Kolonisierung der Wirtszellen während der biotrophen Phase. Ein Umschalten in die nekrotrophe Phase bleibt aber aus und die Mutante ist apathogen. Da für die nekrotrophe Phase die massive Sekretion von Enzymen entscheidend ist, könnte dies das fehlende Umschalten von Biotrophie zu Nekrotrophie erklären.

Eine weitere Möglichkeit, Proteine durch die Membran des ER zu transportieren, sind sogenannte Signal-Anker-Sequenzen. Dies sind Aminosäuresequenzen, die nicht am N-Terminus, sondern innerhalb der AS-Kette liegen. Ähnlich wie das Signalpeptid umfassen sie Bereiche hydrophober Aminosäuren, welche wiederum von positiv geladenen AS umgeben sind. Die Richtung der Integration solcher Ankersequenzen hängt von der Größe der Ladung der an den hydrophoben Bereich angrenzenden AS ab, was bedeutet, dass immer die Seite mit der geringeren positiven Ladung als erstes in den Translokationskanal geschleust wird (Wahlberg and Spiess, 1997). Ebenfalls wie beim Signalpeptid kommt es nun zu einem Verschmelzen der AS-Kette mit der Membran des ER über den hydrophoben Bereich. Im Unterschied zum Signalpeptid wird der Signal-Anker aber nicht von den restlichen Aminosäuren abgespalten, was dazu führt, dass das entstehende Protein membranständig bleibt. Signal-Anker-Sequenzen findet man daher bei vielen Membranproteinen, Ionenkanälen oder membranständigen Rezeptoren (Sakaguchi, 1997).

Gelangt die entstehende AS-Kette ins Lumen des ER, so wird sie durch einen Oligosaccharyltransferase-Komplex an der Sequenz (Asp-X-Thr/Ser) glykolysiert (Reiss et al., 1997). Diese N-Glykolysierung erhöht die Löslichkeit und die Stabilität des Proteins und ist somit essentiell für die richtige Faltung. Chaperone, z. B. Calnexin und andere Faltungsenzyme wie Disulfid-Isomerasen und Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, sorgen anschließend für die richtige Faltung. Proteine wie z. B. die Chaperone BiP und GRP94 verhindern Fehlfaltungen und eine Anreicherung von Fehlprodukten innerhalb des ER (Gething and Sambrook, 1992). Sollten dennoch fehlerhafte Proteine entstehen, so werden diese über die ER-Membran zurück ins Cytoplasma transportiert, wo sie dann

über das Proteasom abgebaut werden können (Kopito, 1997). Dieser Vorgang wird als UPR (*Unfolded Protein Response*) bezeichnet. Welche Rolle die komplexen Vorgänge im ER für die erfolgreiche Pathogenese haben zeigt sich am Beispiel der Deletionsmutanten des Genes *CgAAF1* in *C. graminicola*. Dieses Gen kodiert für einen V-ATPase Assembly-Faktor, welcher im ER lokalisiert ist. Die Deletion dieses Genes bewirkt eine stark verringerte Virulenz, was auf die reduzierte und zeitlich verzögerte Penetration des Wirtsgewebes durch die Appressorien zurückzuführen war. Appressorien der Deletionsmutanten und des Wildtyps wurden mit denselben Bildungsraten gebildet, waren normal melanisiert und zeigten zueinander keine Unterschiede im Turgordruck. Jedoch wurde im Vergleich zum Wildtyp unter den Appressorien der Deletionsmutanten eine erhöhte Papillenbildungsrate durch die Pflanze nachgewiesen, die einen Grund für die verringerte Penetrationskompetenz darstellen könnte (Münch, 2012). Welche Rolle die V-ATPase bei der verstärkten Erkennung durch den Wirt spielt, konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden.

Fertig gefaltete Proteine müssen nun aus dem ER ausgeschleust und zum Golgi-Apparat transportiert werden. Dieser Transport erfolgt über COPII (*coat protein complex II*) Vesikel. Da einige Transmembranproteine über ein ER-Ausschleusungs-Motiv verfügen, können sie direkt mit den COPII-Proteinen verbunden werden. Dieses Motiv besteht aus zwei aufeinander folgenden Phenylalaninresten, welche sich meist am carboxyterminalen Ende der Aminosäurekette befinden (Baines and Zhang, 2007). Den meisten löslichen Proteinen im ER-Lumen fehlt jedoch ein solches Motiv, daher ist es für sie nötig, an spezielle, an der Innenseite der ER-Membran befindliche Rezeptoren zu binden, um anschließend ausgeschleust zu werden (Baines and Zhang, 2007). Die COPII Vesikel gelangen nach Abspaltung vom ER zu einem Kompartiment mit dem Namen ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*). Die Funktion dieses Kompartimentes ist noch nicht restlos geklärt, es scheint aber eine Aufgabe bei der Umstellung des pH-Wertes vom ER auf den saureren pH-Wert des Golgi-Apparates zu haben (Sakaguchi, 1997).

Der Golgi-Apparat besteht aus mehreren membranumschlossenen Hohlräumen, die als Zisternen bezeichnet werden. Diese für alle Eukaryonten typische Organisationsform des Golgi-Apparates ist bei filamentösen Pilzen nicht immer eindeutig zu erkennen (Conesa et al., 2001). Der Golgi-Apparat wird des Weiteren in die dem ER zugewandte *cis*-Seite und der entgegengesetzten *trans*-Seite unterteilt. Die beiden Hauptaufgaben des Golgi-Apparates sind zum einen weitere Modifikationen an den Proteinen und zum anderen eine Sortierung der Proteine gemäß ihrer späteren Verwendung. Zu den Modifikationen zählen unter anderem Glykosylierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen. Der Transport zwischen den einzelnen Zisternen des Golgi-Apparates erfolgt auf zwei verschiedene Weisen. Die erste Möglichkeit ist der „*vesicle shuttle*“, worunter man sich ein Abschnüren von Golgi-

Vesikeln von den Membranen der Zisternen vorstellt. Diese Golgi-Vesikel werden dann durch die nächste Zisternenmembran aufgenommen. Die zweite Möglichkeit ist das „*cisternal maturation*“, wobei ganze Zisternen miteinander verschmelzen und somit ihren Inhalt transportieren (Neumann et al., 2003). Ein Rücktransport von Proteinen, die ihre Funktion im ER haben, erfolgt über COPI (*coat protein complex I*) Vesikel (Gaynor and Emr, 1997). Was passiert, wenn die Vorgänge innerhalb des Golgi-Apparat gestört werden, zeigt sich am Beispiel der Mutante $\Delta MgATP2$ des Reispathogens *Magnaporthe oryzae*. Dieses Gen kodiert für eine P-Typ ATPase, welche für die endo- und exocytotischen Vorgänge des Golgi-Apparates verantwortlich ist. $\Delta MgATP2$ Mutanten zeigen abnorm geformte Zisternen-ähnliche Strukturen, eine Beeinträchtigung in der Sekretion zahlreicher Enzyme und eine starke Reduktion der Virulenz. Nicht beeinträchtigt dagegen sind das vegetative Hyphenwachstum und die Sporulation.

Auf der trans-Seite des Golgi-Apparates erfolgt dann die Sortierung der Proteine auf Grund ihres späteren Bestimmungsortes. Hauptziele des Proteinexportes sind die Plasmamembran, die Zellwand, die Vakuolen oder Granula, das Lysosom und der extrazelluläre Raum. Da bei sekretierten Proteinen das Sekretionssignal während der Einschleusung in das ER verloren geht, ist anzunehmen, dass es weitere Signale geben muss, die Informationen über den Zielort des jeweiligen Proteins enthalten. In der Membran des Golgi sind sogenannte VSR-Rezeptoren (*vacuolar sorting receptor*) identifiziert worden, welche durch Kontakt mit bestimmten Signalen einen direkten Transport vom Golgi-Apparat in Richtung Vakuole ermöglichen (Piper et al., 1997; Paris and Neuhaus, 2002). Es wird vermutet, dass solche Mechanismen auch für Proteine existieren, welche in den extrazellulären Raum sekretiert oder in andere Plasmamembranen eingebaut werden.

A.2.2. Sekretierte Proteine in biotrophen Interaktionen

Im Gegensatz zu sich nekrotroph ernährenden Pilzen, verfolgen obligat biotrophe Pilze, wie z. B. Mehltau und Roste, aber auch hemibiotrophe Pilze, wie viele Arten in der Gattung *Colletotrichum*, nicht die Strategie, den Wirt so schnell wie möglich abzutöten, sondern eine gewisse Zeit unbemerkt im Wirtsgewebe zu wachsen. Das bedeutet, dass virulente Pilzstämmen schon mit Beginn der Ausformung der ersten Infektionsstrukturen eine mögliche Abwehrreaktion durch die Pflanze verhindern müssen, um eine kompatible Interaktion zu gewährleisten. Die Begriffe Virulenz und Pathogenität beschreiben in quantitativer bzw. qualitativer Weise die Fähigkeit eines Pathogens, einen Wirt zu infizieren. Kompatibilität hingegen bedeutet, dass ein Pathogen auf einem Wirt seinen Lebenszyklus bis zur Reproduktion erfolgreich durchlaufen kann. Andererseits bedeutet Inkompatibilität, dass es nicht zur Reproduktion kommt, da die Pathogenese durch geeignete Abwehrmaßnahmen des Wirtes unterbrochen wird, wobei dieser Zeitpunkt je nach Pathosystem

recht unterschiedlich sein kann. Während der Etablierung und Aufrechterhaltung der biotrophen Phase weisen sekretierte Proteine verschiedenste Funktionen und Lokalisationsorte auf, die im weiteren Verlauf eingegangen werden soll.

Sekretion zur Zellwand

Das größte Problem, dem sich Phytopathogene während der Besiedlung des lebenden Wirtsgewebes gegenübersehen, ist die Erkennung durch den Wirt und der damit verbundenen Aktivierung der pflanzlichen Abwehr. Da biotrophe Pilze mit ihren Hyphen bzw. mit speziellen Infektionsstrukturen, wie z. B. Haustorien oder Infektionsvesikeln, in das Wirtsgewebe einwachsen, hat sich das pflanzliche Abwehrsystem im Laufe der Evolution darauf eingestellt, genau diese zu erkennen. Die erfolgreiche Abwehr eines Pathogens durch die Pflanze basiert auf dessen zeitiger Erkennung und der schnellen Aktivierung der induzierten Abwehr. Daher haben Pathogene Strategien entwickelt, um diese Erkennung zu verhindern. Normalerweise sekretieren sie während der Interaktion Effektor-Moleküle (Proteine oder Toxine), welche in den apoplastischen Raum oder sogar in die Wirtszelle transferiert werden, um den Wirtsmetabolismus zu Ihren Vorteilen zu manipulieren. Die Pflanzen ihrerseits entwickelten Strategien um genau diese Effektoren (Avr-Gene) durch pflanzliche Resistenzproteine (R-Gene) zu erkennen und eine Effektor-vermittelte Abwehrreaktion auszulösen (Jones and Dangl, 2006). Dieser Vorgang wurde als Gen für Gen-Hypothese beschrieben, bei dem immer ein pflanzliches R-Gen mit einem komplementären Avr-Gen um eine Resistenz auszulösen (Flor, 1971).

Die basale pflanzliche Abwehr ist in der Lage einen Hauptbestandteile der pilzlichen Zellwand, das Chitin, zu perzipieren und drastische Gegenmaßnahmen wie z. B. die hypersensitive Reaktion auszulösen (Wan et al., 2008). Die Erkennung erfolgt dabei über auf der Pflanzenzelle verteilten Rezeptoren die Chitin Fragmente erkennen (Kaku et al., 2006). Das Vorhandensein solcher Fragmente ist entweder natürlichen Ursprungs während des Aufbaus der pilzlichen Zellwand oder sie werden durch von der Pflanze sekretierte Chitinasen gebildet. Aber auch die Pilze haben sich im Laufe dieses evolutionären Wettrüstens an diese Problematik angepasst. So wird vermutete, dass z. B. Rostpilze wie *Puccinia graminis* und *Uromyces fabae* oder der Ascomyzet *C. graminicola* in der Lage sind, an der Oberfläche ihrer Zellwand exponierte Chitinmoleküle zu deacetylieren und somit das von der Pflanze nicht elicitierbare Chitosan zu bilden (El Gueddari et al., 2002). Der Erreger der Samtfleckenkrankheit auf Tomate *Cladosporium fulvum* geht sogar noch einen Schritt weiter bei der Maskierung seiner Zellwände. Das während der Besiedlung sekretierte Protein Avr4 ist imstande, an Chitinmolekülen der eigenen Zellwand zu binden und diese somit vor der Hydrolyse durch pflanzliche Chitinasen zu schützen (van Esse et al., 2007). Ein ähnliches Verhalten konnte auch für das Protein Slp1 aus *M. oryzae* gezeigt werden (Mentlak et al., 2012). Genau wie Avr4 bindet es an

Chitinmolekülen und verhindert damit die Perzeption möglicher Elicitor-Moleküle durch wirtseigene Chitin-Elicitor bindende Proteine (CEBiP). Der Erreger von Anthrakosen auf vielen Leguminosen, *Colletotrichum lindemuthianum*, sekretiert das Protein CIH1 ausschließlich während der biotrophen Phase. Dieses Prolin- und Hydroxyprolin-reiche Protein zeigt Ähnlichkeiten mit Proteinen der pflanzlichen Zellwand und könnte so, durch eine Form der Maskierung, die Erkennung des Pilzes durch den Wirt verhindern (Perfect et al., 1998). Für den Erreger der Anthrakosen auf Mais *C. graminicola* konnte gezeigt werden, dass die Synthese von beta-1,3-Glukan während der biotrophen Phase verringert wird, um somit vielleicht die Elicitierung von Glukan-Fragmenten zu verhindern (Garcia et al., 2013).

Sekretion in den Apoplast

Der Raum zwischen den Hyphen des Pilzes und den angrenzenden Pflanzenzellen stellt den Bereich dar, in dem die sekretierten, pilzlichen Proteine versuchen die pflanzliche Abwehr zu unterdrücken aber auch für die Nährstoffaufnahme sorgen. Das zurzeit größte bekannte Repertoire sekretierter Effektoren für diesen apoplastischen Raum zeigen die Vertreter der zu den Oomyceten gehörenden Gattung *Phytophthora*. Der Begriff Effektor beschreibt Moleküle des Pathogens, welche in der Lage sind die Funktionen der Wirtszelle bzw. deren Struktur zu manipulieren, um dadurch eine Infektion zu ermöglichen oder aber die Wirtsabwehr auszulösen (Kamoun, 2006). Um den Abbau der eigenen Zellwand durch pflanzliche Enzyme und die damit verbundene Freisetzung von Elicitoren zu verhindern, werden Enzym-Inhibitoren vom Pilz sekretiert, darunter die Glukanase-Inhibitoren GIP1 und GIP2 (Rose et al., 2002), die Serin-Protease-Inhibitoren EPI1 und EPI10 und die Cystein-Protease-Inhibitoren EPIC1 und EPIC2 (Kamoun, 2006). Neben diesen für den Pilz dienlichen Proteinen gibt es auch sekretierte Proteine, die direkt die Wirtsabwehr auslösen und somit als Elicitoren für die Pflanze dienen. Diese als Elicitine bezeichneten Proteine sind sowohl im apoplastischen Raum als auch im Cytoplasma der Pflanzenzelle lokalisiert. Fast alle dieser Elicitine sind kleine Cystein-reiche Proteine, die auf Grund der gebildeten Cysteinbrücken eine hohe Stabilität gegenüber Proteasen aufweisen. Ihre eigentliche Funktion war und ist Gegenstand zahlreicher Forschungen. Es konnte gezeigt werden, dass einige Elicitine Sterole binden und somit eine biologische Funktion bei der Assimilierung von Sterolen und dem Aufbau der Zellwand haben (Mikes et al., 1998; Vauthrin et al., 1999). Oomyceten, zu denen auch die Pilze der Gattung *Phytophthora* zählen, sind nicht in der Lage das für ihre Plasmamembran essentiellen Sterole selbst zu synthetisieren.

Auch der ebenfalls fakultativ biotrophe Erreger der Samtfleckenkrankheit auf Tomate *Cladosporium fulvum* sekretiert eine Vielzahl bekannter Effektoren und Proteininhibitoren in den apoplastischen Raum während der Besiedlung seines Wirtes (Thomma et al., 2005), darunter auch das als

Virulenzfaktor beschriebene Protein Avr2, welches in der Lage ist verschiedene vom Wirt sekretierte, Cystein-Proteasen zu inhibieren. Die heterologe Überexpression von Avr2 in *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen bewirkte eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber anderen pilzlichen Erregern (van Esse et al., 2008). Im Falle einer inkompatiblen Interaktion wird die Inhibierung der wirtseigenen Protease Rcr3 durch Avr2, von dem ebenfalls im apoplastischen Raum vorkommenden Protein Cf-2 erkannt und dadurch die Wirtsabwehr in Form einer hypersensitiven Reaktion ausgelöst (Rooney et al., 2005). Beim Erreger der Blattfleckkrankheit von Tomate, *Septoria lycopersici*, wurde ein sekretiertes Enzym mit dem Namen Tomatinase identifiziert, welches in der Lage ist, im Apoplasten das Phytoalexin α -Tomatin zu detoxifizieren (Martin-Hernandez et al., 2000). Tomatinase spaltet einen bestimmten Glucoseresest von α -Tomatin ab, wodurch das ungefährlichere β 2-Tomatin entsteht. Eine Tomatinase-Mutante zeigte ein vermindertes Wachstum bei Anwesenheit von α -Tomatin. Bezüglich der Entwicklung der Infektionsstrukturen und der Symptomausprägung war sie nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Bei einer Infektion durch die Mutante war jedoch im Gegensatz zum Wildtyp ein vermehrtes Absterben der befallenen Mesophyllzellen zu erkennen. Die Autoren vermuteten, dass das Enzym Tomatinase eine zusätzliche Rolle bei der Suppression der Pflanzenabwehr besitzt. In einer darauffolgenden Arbeit wurde gezeigt, dass das Abbauprodukt β 2-Tomatin alleine in der Lage ist, die Grundabwehr der Pflanze auf eine noch unbekannt Art auszuschalten (Bouarab et al., 2002).

Wie entscheidend einzelne kleine Proteine für die Etablierung der biotrophen Phase sind, zeigt das Beispiel des Proteins CgDN3 des hemibiotrophen Ascomyceten *Colletotrichum gloesporioides* (Stephenson et al., 2000). Das native Protein hat eine Gesamtgröße von nur 34 Aminosäuren und wird vorrangig während der Etablierung der primären Infektionsvesikel exprimiert und sekretiert. Δ CgDN3-Mutanten wiesen ein normales vegetatives Wachstum und eine normale Appressorienbildungsrate auf. Sie waren aber nicht mehr dazu befähigt zu infizieren und sich im intakten Wirtsgewebe zu reproduzieren. Mikroskopische Untersuchungen offenbarten, dass sich um die Infektionsstellen kleine nekrotische Bereiche gebildet hatten, welche den Schluss nahelegten, dass die Deletionsmutanten eine wirtsspezifische, lokal sehr begrenzte, hypersensitive Reaktion auslösten. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte das *Colletotrichum orbiculare* das kleine Protein NIS1 (*necosis inducing secreted protein 1*) während der Infektion seines Wirtes Tabak sekretiert. NIS1p ist in der Lage den Zelltod der befallenen Tabakpflanzenzellen zu induzieren (Yoshino et al., 2012). Desweiteren konnte aber gezeigt werden dass die Induktion des Zelltodes durch NIS1p, von einem in *C. orbiculare* vorkommenden CgDN3-Homolog während der Infektion supprimiert wird. Solch eine Interaktion von CgDN3 und einem NIS1-Homolog in *C. gloesporioides* würden die beobachteten Phänotypen der Δ CgDN3-Mutanten erklären, da hier keine Supprimierung mehr

stattfinden kann würde es folgerichtig zu kleinen lokalen HR-Reaktionen im Bereich der Infektionsstellen kommen. Auch bei *M. oryzae* spielt ein kleines sekretiertes Protein eine große Rolle für die erfolgreiche Besiedlung des Wirtsgewebes. MSP1 ist ein 119 Aminosäuren großes Protein dessen Deletion eine starke Reduktion der Virulenz im Vergleich mit dem Wildtypisolat zur Folge hat (Jeong et al., 2007). Die Deletion des 173 Aminosäuren großen sekretierten Proteins Pep1, des biotrophen Erregers des Maisbeulenbrandes *Ustilago maydis*, hat ebenfalls eine massive Reduktion der Virulenz zur Folge (Doehlemann et al., 2009). Δ Pep1-Mutanten zeigten zwar morphologisch keine Unterschiede zum Wildtypisolat, konnten aber nicht mehr erfolgreich in das Wirtsgewebe eindringen und eine kompatible Interaktion etablieren. Expressionsanalysen zeigten dass Δ Pep1-Mutanten nicht mehr dazu befähigt waren die pflanzliche Abwehr zu supprimieren. Neueste Untersuchungen zeigten das Pep1p eine Rolle bei der Inhibierung von pflanzlichen Peroxidasen spielt, da an den Penetrationsstellen von Δ Pep1-Mutanten eine starke Akkumulation von H₂O₂ nachgewiesen werden konnte. Desweiteren wurden durch Lokalisationsstudien mit fluoreszenten Markern eine Interaktion von Pep1p mit der pflanzlichen Peroxidase POX12 gezeigt (Hemetsberger et al., 2012).

Sekretion und anschließende Translokation in die Wirtszellen

Pflanzliche Resistenzproteine sind von vielen Nutzpflanzen bekannt, so z. B. die Gene der L, M, N und P-Familie des Flaxes (*Linum usitatissimum*) gegen den Erreger des Flax-Rostes *Melampsora lini* (Lawrence et al., 1995; Anderson et al., 1997; Dodds et al., 2001), das Resistenzprotein Pi-ta des Reises gegen *M. oryzae* (Orbach et al., 2000), das Tomatenprotein I-2 welches Resistenz gegenüber *Fusarium oxysporum* vermittelt (Huang, 1997) oder die Resistenzproteine der Rps-Familie der Sojabohne (*Glycine max*) gegen den Befall des Oomyceten *Phytophthora sojae* (Buzzell, 1992). Die genannten Resistenzproteine sind intrazellulär lokalisiert, wodurch schon frühzeitig vermutet wurde, dass die zu den Resistenzproteinen korrespondierenden pilzlichen Avirulenzproteine auf Grund eines unbekanntes aktiven oder passiven Vorganges in die Wirtszellen transloziert werden und somit die Abwehrreaktion auslösen. Durch Sequenzvergleiche verschiedener in der Wirtszelle lokalisierter Avirulenzproteine innerhalb der Gattung *Phytophthora* wurden zwei hoch konservierte Motive identifiziert, das RXLR- und das dEER-Motiv (Rehmany et al., 2005; Birch et al., 2006). Durch weiterführende genomweite Vergleiche wurden alleine in den Arten *Phytophthora sojae* und *Phytophthora ramorum* jeweils 350 Proteine identifiziert, die diese beiden Translokationsmotiven besitzen (Tyler et al., 2006). Auch für viele Pilze wurde die lange vermutete Translokation und das Vorhandensein eines RXLR-ähnlichen Motives in bekannten Avirulenzproteinen gezeigt. So werden z. B. die in den Haustorien des Flaxrostes exprimierten Avirulenzgene *AvrL567A*, *AvrL567B* und *AvrL567C* über die extrahaustoriale Matrix in die Zellen des Wirtes transloziert, wo sie mit drei

Resistenzproteinen (L5,L6,L7) interagieren und im Falle von AvrL567A und AvrL567B HR-ähnliche Nekrosen auslösen (Dodds et al., 2004).

Das Tomatenpathogen *F. oxysporum* sekretiert und transloziert ebenfalls ein Avirulenzprotein in die Zellen des Wirtes. Das Protein Avr2 aktiviert im Zytoplasma der Wirtszellen einer resistenten Pflanze, das Protein I-2 und somit die nachgeschaltete Abwehr. Dieses Protein ist einer der wenigen nachgewiesenen Fälle, bei denen gezeigt werden konnte, daß ein AVR-Protein in der kompatiblen Interaktion für die volle Virulenz notwendig ist (Houterman et al., 2009). Für AvrL567 aus *M. lini*, Avr2 aus *F. oxysporum* und dem Avirulenzprotein AvrPITA aus *M. oryzae*, konnte die Translokation auf Grund des Vorhandenseins eines degenerierten, aber funktionsfähigen, RXLR-Motives nachgewiesen werden (Kale et al., 2010). Nicht alle von Pilzen translozierten Proteine besitzen ein RXLR-ähnliches Motiv und vermitteln Avirulenz auf entsprechenden Wirtslinien. Der Bohnenrost *Uromyces fabae* exprimiert das Protein Uf-RTP1, welches auf noch unbekannte Weise in die Pflanzenzelle gelangt und dort auf Grund des im Protein enthaltenen Kernlokalisierungssignal in den Zellkern der Pflanzenzelle gelangt (Kemen et al., 2005; Pretsch et al., 2012). Der biotrophe Brandpilz *U. maydis* manipuliert den Metabolismus seines Wirtes durch die translozierte Chorismat-Mutase Cmu1 (Djamei et al., 2011). Vergleichende Metabolom-Analysen zwischen dem Wildtypisolat und Δ Cmu1-Mutanten zeigten eine verringerte Anwesenheit von Endprodukten des Phenylpropanoid- und Flavonoid-Biosyntheseweges, aber einen erhöhten Gehalt an Salizylsäure im infizierten Gewebe. Die Autoren vermuteten, dass das pilzliche Enzym zusammen mit der pflanzeigenen Chorismatmutase ZmCm2 den Strom von Chorismat von den Plastiden zum Cytosol so stark erhöht, dass die im Plastiden erfolgenden Biosynthesewege von Salizylsäure verlangsamt und weniger Metabolite gebildet werden können. Desweiteren wird angenommen, dass auf Grund der fehlenden Eigenschaft der Δ Cmu1-Mutanten die Salicylatmenge in den Wirtszellen zu erniedrigen, die verringerte Virulenz zu Stande kommt.

A.2.3. Sekretierte Proteine in nekrotrophen Interaktionen

Wechseln hemibiotrophe Pilze, wie *C. graminicola*, von der biotrophen in die nekrotrophe Phase ihres Entwicklungszyklus, ändert sich ihr Verhalten auf drastische Weise. Die Supprimierung der Wirtsabwehr als wichtigster Aufgabe, weicht nun dem schnellen Abtöten und Auflösen der Wirtszellen und dem effizienten Verwerten frei gewordener Nährstoffe um sich massiv im Wirt ausbreiten und reproduzieren zu können.

Es zeigte sich bei der Auswertung der Transkriptomdaten von *C. graminicola* und dem nahen Verwandten *Colletotrichum higginsianum*, dass während der nekrotrophen Phase besonders viele der sogenannten „Carbohydrate active enzymes“ (CAZymes) transkribiert werden (O'Connell et al.,

2012). Zu dieser Klassifizierung von Proteinen zählen Glykosid-Hydrolasen, Polysaccharid-Lyasen und Kohlenhydrat-Esterasen, alles Proteine die vorrangig beim Abbau der pflanzlichen Zellwand eine Rolle spielen. Für *C. graminicola* konnte desweiteren gezeigt werden, dass während der nekrotrophen Phase spezielle Hexose-Transporter (CgHXT2 und CgHXT5) vermehrt exprimiert werden (Lingner et al., 2011). Dabei weisen diese Zuckertransporter sowohl ein breites Substratspektrum gegenüber Fruktose, Galaktose und Xylose (CgHXT2), als auch eher enge Substratspektren gegenüber Glukose und Mannose (CgHXT5) auf. Diese Ergebnisse zeigen, welch ein reichhaltiges Angebot, an verschiedenen Kohlenstoffquellen, unter anderem durch den Abbau der Zellwände während der nekrotrophen Phase, für den Pilz existiert. Welche Bedeutung dabei Zellwandabbauende Enzyme haben, wurde besonders für den Pezizomycet *Cochliobolus carbonum* belegt. Denn hier wurde schon frühzeitig die Bildung von sekretierten, Pektin abbauenden Enzymen wie Endopolygalakturonasen, Exopolygalakturonasen und Pektin-Methylsterasen, während der saprophytischen Besiedelung von Mais, nachgewiesen (Scott-Craig et al., 1990; Scott-Craig et al., 1998). Die gezielte Gendisruption von zwei dieser Polygalakturonasen hatte aber keine Auswirkungen auf die Virulenz der Mutanten. Auch die Disruption zweier weiterer Gene für sekretierte Zellwandabbauende Enzyme, der Endo- β 1,4-Xylanasen Xyl2 und Xyl3 in *C. carbonum*, hatte keine Auswirkungen auf die Virulenz (Apel-Birkhold and Walton, 1996). Erst die Deletion des Genes *CcSnf1* führte zu einem Phänotyp mit reduzierter Virulenz. Dieses Gen kodiert die Proteinkinase SNF1, welcher für die Expression von Katabolit reprimierten Genen unter Glukosemangel benötigt wird. Bei Δ *Snf1* Mutanten von *C. carbonum* kommt es zu einer Herunterregulierung der Transkriptgehalte vieler sekretierter Zellwandabbauender Enzyme (Tonukari et al., 2000). Dadurch scheinen die Mutanten nicht mehr in der Lage zu sein, effizient die Kohlenhydrate der Wirtszellwände abzubauen und das Wirtsgewebe zu besiedeln.

Auf welche Art und Weise hemibiotrophe Pilze nach dem Übergang in die nekrotrophe Phase die Wirtszellen abtöten, ist bis heute nur zum Teil geklärt. Bei *C. graminicola* ist es eine Kombination aus einem Cocktail von Enzymen, Effektoren und Sekundärmetaboliten vorstellbar, sowie dem reinen mechanischen Druck schnell wachsender Sekundärhyphen. Andere pflanzenpathogene Pilze töten die Wirtszellen mit Hilfe sekretierter wirtsspezifischer Toxine, die Proteine oder Sekundärmetabolite sein können. So produziert der Erreger der Blattdürre an Weizen *Pyrenophora tritici-repentis* das Toxin ToxA. Dabei handelt es sich um ein 28 Aminosäuren großes Protein, welches auf noch unbekannte Art und Weise in die Wirtszellen gelangt und dort den Zelltod auslöst (Manning and Ciuffetti, 2005). Der ebenfalls auf Weizen siedelnde Erreger der Blattflecken *Stagonospora nodorum* macht sich die pflanzeigene Abwehr zu Nutze um die Wirtszellen zu töten. Das wirtsspezifische Toxin SnTox1 interagiert mit dem Pflanzenprotein Snn1, was zu pflanzlichen Abwehrmaßnahmen wie

dem oxidativen *Burst*, dem Abbau von genomischer DNA und der erhöhten Expression von PR-Genen (*pathogenicity-related*) und schließlich dem Zelltod führt (Liu et al., 2012). Durch die Transformation des *SnTox1*-Genes in einen avirulenten Stamm von *S. nodorum* und die damit verbundene Wiederherstellung der Pathogenität zeigte die Bedeutung dieser pflanzeigenen Reaktionen für die Besiedelung des Wirtsgewebes durch den Pilz. Auch der bereits erwähnte *C. carbonum* produziert während der Besiedlung von Mais das wirtsspezifische, zyklische Tetrapeptid, HC-Toxin (benannt nach dem ursprünglichen Pilznamen *Helminthosporium carbonum*), welches inhibitorisch auf die pflanzlichen Histondeacetylasen und somit vermutlich auch auf die Expression pflanzlicher Abwehrgene wirkt (Brosch et al., 1995). Resistente Maispflanzen sind aber in der Lage durch die Carbonylreduktase Hm1 das HC-Toxin zu detoxifizieren (Walton, 2006). Andere nekrotrophe Pilze wie *Botrytis cinerea* aktivieren Gene für die Produktion von ROS (*reactive oxygen species*) um das Wirtsgewebe abzutöten (Govrin and Levine, 2000; Choquer et al., 2007). Auch in *C. graminicola* wurden einige sekundäre Metabolite wie z. B. Colletopyrone, Colletoquinone, Colletoanthrone A, Orcinol und Tyrosol identifiziert. Keine dieser Substanzen zeigte jedoch bisher eine phytotoxische Aktivität (Horbach et al., 2009).

A.3. Strategien zur Identifizierung von Virulenzfaktoren

Die Identifizierung pilzlicher Gene, welche für eine vollständige Etablierung des Pathogens während der Interaktion verantwortlich sind, ist eine zentrale Aufgabe der molekularen Phytopathologie. Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene genetische Ansätze um Pathogenitäts- bzw. Virulenzgene zu identifizieren: 1) die vorwärts gerichtete Mutagenese und 2) die rückwärts gerichtete Mutagenese. Diese unterscheiden sich darin dass im ersten Fall, durch zufällig statt findende Insertionen eines selektierbaren Markergenes eine große Zahl von Transformanten erzeugt wird, die auf den gewünschten Phänotyp hin untersucht werden. Im Anschluss daran wird die Insertion des Markergenes im Genom bestimmt, um das für den Phänotyp verantwortliche Gen bzw. Protein zu identifizieren. Beim zweiten Ansatz geht man hingegen von einem postulierten Pathogenitäts- bzw. Virulenzgen aus, dass zum Beispiel durch bioinformatische Ansätze gefunden wurde. Die Funktion eines solchen Genes wird durch eine gerichtete Mutagenese untersucht, wobei im Regelfall die Gendeletion verwendet wird. In den nächsten beiden Abschnitten sollen die beiden erwähnten Ansätze näher vorgestellt werden.

A.3.1. Zufalls-Mutagenese

Zur Zufalls-Mutagenese bei Pilzen wurden in den letzten Jahren besonders zwei Methoden angewendet, die REMI- und die ATMT-Mutagenese.

REMI-Mutagenese

REMI steht für „restriction enzyme mediated integration“. Hierbei werden Pilz-Protoplasten mit dem gleichen Restriktionsenzym, mit dem das zu transformierende DNA-Fragment an den 5'- und 3'-Enden geschnitten wurde, zusammen mit der transformierten DNA inkubiert. Hierbei gelangen sowohl die DNA, als auch etwas Enzym in die Zelle. Letzteres setzt zufällige Schnitte in den Chromosomen, so daß die Inkubation zeitlich begrenzt werden muß. Durch homologe Überhänge in der geschnittenen genomischen DNA kann es nun zur Integration der Fremd-DNA kommen. Diese Methode ist für eine Vielzahl von Pilzen durchgeführt worden, darunter *U. maydis* (Bölker et al., 1995), *M. oryzae* (Sweigard et al., 1998) und *C. heterostrophus* (Lu et al., 1994). Für die genannten Pilze konnte bei bis zu 2,0 % der Transformanten ein Virulenzdefekt identifiziert werden. Für *C. graminicola* lag der entsprechende Wert jedoch nur bei 0,3 % (Thon et al., 2000). Ein großer Nachteil der REMI-Mutagenese ist, dass bis zu 50 % der erhaltenen Transformanten unmarkierte Mutationen als Folge der Behandlung mit dem Restriktionsenzym tragen (Kahmann et al., 1999; Maier and Schäfer, 1999). Auf Grund dieser Umstände ist in vielen Fällen nicht eindeutig zu klären, ob ein erhaltener Phänotyp auf das durch die Integration der Fremd-DNA disruptierte Gen zurückzuführen ist.

ATMT-Mutagenese

ATMT steht für „*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation“. Diese Art der Zufalls-Mutagenese nutzt den in der Natur vorkommenden DNA-Transfer von *A. tumefaciens* in Pflanzenzellen aus. Dafür benötigt das Bakterium, bei *in vitro* Versuchen, zwei Plasmide. Zum einen das Ti-Helferplasmid, auf dem alle notwendigen *vir*-Gene für den T-DNA Transfer aus dem Bakterium in die Eukaryontenzelle kodiert sind und als weiteres das binäre Ti-Plasmid. Dieses Plasmid trägt die zu übertragende T-DNA in Form einer Resistenzkassette zur selektiven Markierung von Transformanten. Die T-DNA wird im Ti-Plasmid durch die jeweils 25 bp langen LB (*left border*) und RB (*right border*) Sequenzen an den Enden begrenzt. Die phenolische Substanz Acetosyringon, die *in vivo* durch Verletzungen der Pflanze produziert wird, induziert die Expression der *vir*-Gene und der Transferprozess startet. Nach der Übertragung der T-DNA in den Empfängerorganismus und deren Transport in den Zellkern integriert die T-DNA mutmaßlich zufällig in das Genom. Die entstandene

genomische Disruptionsstelle ist durch die T-DNA markiert, trägt den Selektionsmarker und ist durch die bekannte Sequenz der T-DNA lokalisierbar.

Die Methode der ATMT zur Erzeugung von Zufallsmutanten ist bei pflanzenpathogenen Pilzen mehrfach angewendet worden, darunter *M. oryzae* (Jeon et al., 2007), *F. oxysporum* (Khang et al., 2005), *C. acutatum* (Maruthachalam et al., 2008), *B. cinerea* (Rolland et al., 2003) und dem Oomyceten *P. infestans* (Vijn and Govers, 2003). Die Integration der T-DNA erfolgte bei 60-70 % der Fälle als Einzelintegration, was die ATMT im Gegensatz zur REMI-Mutagenese erfolgreicher machte, da hier die Zuordnung des Phänotyps zum Disruptionsort effizienter funktioniert. Es soll an dieser Stelle besonders erwähnt werden, dass auch für *C. graminicola* eine ATMT-Mutantenbank in der AG Phytopathologie an der MLU erzeugt wurde. Von über 500 getesteten Transformanten zeigten 19 reduzierte Virulenz (Münch et al., 2008). Bei 14 dieser Transformanten konnte der Integrationsort der T-DNA eindeutig identifiziert werden, wodurch u.a. die Gene für einen V-ATPase Assembly Faktor, eine Allantoicase und ein hypothetisches Protein als Virulenzgene identifiziert worden (Münch et al., 2011).

A.3.2. Gezielte Gen-Deletionen

Im Gegensatz zur Zufallsmutagenese untersucht man bei diesem Verfahren, ob nach einer gerichteten Deletion eines Kandidatengenes ein selektierbarer Phänotyp in den Transformanten auftritt. Im Falle von Virulenzfaktoren erwartet man also einen Phänotyp hinsichtlich reduzierter bzw. fehlender pathogener Eigenschaften. Mit Hilfe verschiedener Methoden und Analysen, welche in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellt werden, lassen sich mögliche Kandidatengene für diesen Ansatz auffinden.

Genomische Kartierung

Die ersten Ansätze zur genetischen Identifizierung von Virulenzfaktoren pflanzenpathogener Pilze, waren Kartierungen durch klassische Kreuzungsexperimente. Voraussetzung für einen solchen Ansatz sind gut erkennbare und unterscheidbare Phänotypen, auf die man im Verlauf der Experimente selektieren kann. Wie auch bei Pflanzen- und Tier-Kreuzungsexperimenten werden dafür Nachkommen untersucht, welche auf Grund der während der Meiose zufällig entstandener Crossover unterschiedliche Genotypen tragen. Bei Pezizomycotina werden die F1 Nachkommen direkt auf den selektierbaren Phänotyp untersucht, hier also der Virulenz. In Verbindung mit einer physikalischen Genomkarte kann man sich dann mit Hilfe von Markern, die in weiteren Kreuzungen verwendet werden, dem entsprechenden genomischen Lokus sukzessive annähern. In dem

gefundenen Bereich liegen oft mehrere Gene, die dann durch Gendeletion einzeln überprüft werden können. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig. Einer der ersten Pilze bei dem solche Experimente zur Identifizierung von Virulenzfaktoren geführt hatten, war *M. oryzae*. Dabei wurden durch Rückkreuzungsexperimente zweier Isolate, die sich hinsichtlich ihrer Pathogenität gegenüber der Wirtspflanze Reis als auch einer zweiten Wirtspflanze, dem afrikanischen Liebesgrass (*Eragrostis curvula*), unterschieden, genomische Bereiche identifiziert, die für die verschiedenen Wirtsspezifitäten verantwortlich waren (Valent et al., 1991). Durch weiterführende Arbeiten wurde in späteren Jahren sowohl das für die Wirtsspezifität gegenüber dem afrikanischen Liebesgrass verantwortliche Gen *PWL2* identifiziert (Sweigard et al., 1995), als auch das Avirulenzgen *AvrPITA*, dass in resistenten Reissorten, welche das Resistenzprotein Pi-ta exprimieren, eine hypersensitive Reaktion auslöst (Bryan et al., 2000; Orbach et al., 2000). Auch das komplexe Zusammenspiel der Resistenzgene des Flaxes *L5*, *L6* und *L7* mit den Avirulenzgenen *AvrL567-A*, *AvrL567-B* und *AvrL567-C* des Flaxrostes *Melampsora lini* konnte erst gezeigt werden, nachdem durch Kreuzungsexperimente und genomischer Kartierung die Co-Segregation der beiden Avirulenzgene *AvrL567-A* und *AvrL567-B* innerhalb eines genomischen Locus nachgewiesen wurde (Dodds et al., 2004).

Gezielte Suche nach Homologen bekannter Pathogenitäts bzw. Virulenzgene

Durch die kurz vor der Jahrtausendwende aufkommende Möglichkeit ganze pilzliche Genome zu sequenzieren, was zunächst für *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1996), *Neurospora crassa* (Galagan et al., 2003), *Magnaporthe oryzae* (Dean et al., 2005) und *Ustilago maydis* (Kaemper et al., 2006) durchgeführt wurde, wurden immer mehr interessante Kandidatengene identifiziert. Somit wurde es möglich für die bis dato noch nicht vollständig sequenzierten Pilzarten, wie *C. graminicola*, Kandidatengene über Homologievergleiche zu ermitteln. Auf diese Weise wurde z. B. eine Chitinsynthase in *C. graminicola* identifiziert, welche essentiell für die Zellwand-Synthese der Konidien und der vegetativen Hyphen ist (Werner et al., 2007). Auch die Bedeutung eines weiteren Proteins, der Sfp-Typ 4'-Phosphopantetheinyltransferase CgPPT1, für die Pathogenese und die daraus resultierende Charakterisierung neuer Sekundärmetabolite (Horbach et al., 2009) war nur möglich, da durch vorrangegangene Homologievergleiche mit bereits vollständig annotierten Pilzgenomen, das Kandidatengen ermittelt werden konnte.

Gezielte Identifizierung sekretierter Proteine

Da während der Interaktion von Pathogenen mit ihren Wirten vor allem sekretierte Proteine eine große Rolle spielen, ist die gezielte Identifizierung solcher Proteine ein erfolgsversprechender Ansatz um neue Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren finden zu können. Eine oft angewandte Methode ist

hierbei die Isolation von Proteinen aus den extrazellulären Flüssigkeiten von infizierten Pflanzengeweben mit anschließender Proteinsequenzierung durch die Edman-Degradation oder Massenspektrometrie. Durch solch einen Ansatz wurden unter anderem die Avirulenzgene *Avr4* und *Avr9*, sowie weitere extrazelluläre Proteine (ECP's) des Tomatenpathogens *Cladosporium fulvum* identifiziert (Schottens-Thoma and De Wit, 1988; Van den Ackerveken et al., 1993; Joosten et al., 1994; Laugè et al., 1997; Bolton et al., 2008). Auch das kleine Cystein-reiche Protein SIX1 („secreted in xylem“) von *Fusarium oxysporum* wurde durch die Analyse des Xylemsaftes einer infizierten Tomatenpflanze entdeckt (Rep et al., 2004).

Bei intrazellulär wachsenden Pilzen, wie auch *C. graminicola*, ist die Analyse der extrazellulären Flüssigkeit nicht erfolgsversprechend genug um sekretierte Proteine während der Interaktion zu identifizieren, da diese in zu geringer Konzentration im Apoplasten vorhanden sind. Daher wurde ein Verfahren mit dem Namen SST (*signal sequence trap*) eingesetzt, das sich die Eigenschaften des Signalpeptides sekretierter Proteine zu Nutze macht, um diese aus der Gesamtheit aller Proteine aufzufinden. Das verwendete Selektionsprinzip beruht auf der Sekretion eines Reporterproteins. Dieses besitzt primär kein Signalpeptid, muss aber sekretiert werden, um ein Überleben zu ermöglichen. Die Befähigung zur Sekretion erhält das Reporterprotein, indem es mit einer cDNA fusioniert wird, welche ein Signalpeptid kodiert, wodurch geschlossen werden kann, dass es sich bei dem durch die cDNA kodierten Protein um ein sekretiertes Protein handeln muss (Klein et al., 1996). Eine effiziente Variante des Verfahrens ist das YSST (*yeast secretion sequence trap*), bei dem mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gearbeitet wird. Diese Variante wurde erfolgreich zur Identifizierung sekretierter Proteine bei dem Bohnenrost *Uromyces fabae* (Link and Voegelé, 2008), dem Humanpathogen *Candida albicans* (Monteoliva et al., 2002) und dem in dieser Arbeit verwendeten Ascomyceten *C. graminicola* (Krijger et al., 2008) angewendet. Bei letzterem stammten die verwendeten cDNAs aus *in vitro* Kulturen, welche durch Zugabe von Pflanzenextrakten zur Expression spezifischer Proteine angeregt wurden (Krijger et al., 2008).

Neben diesen experimentellen Nachweisverfahren von sekretierten Proteinen können diese auch durch Bioinformatik abgeleitet werden. Durch die Entdeckung und Aufklärung der Funktionsweise des eukaryotischen Signalpeptides (siehe → A.2.1) in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts ist es heute möglich die Fähigkeit zur Sekretion eines Proteins nur auf Grund der Aminosäuresequenz vorherzusagen. Die hierzu verwendeten Computerprogramme ermitteln die biochemischen Eigenschaften des N-Terminus eines Proteines zur Voraussage, ob dieses in den Signalweg geht oder nicht (siehe → C.2.2). Gestützt und bestätigt werden solche Vorhersagen durch funktionelle Nachweise von unzähligen sekretierten Proteinen in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen. Durch

die fortschreitende Sequenzierung und Annotation ganzer Genome von vielen heute existierenden Organismen, wurde es möglich die Gesamtheit aller sekretierten Proteine eines eukaryotischen Organismus (Sekretom), ohne funktionelle Tests, mit hoher Genauigkeit zu bestimmen.

Expressionsdaten

Das Messen von Transkriptgehalten während der Pathogenese und die daraus gefolgerte Expression des zur mRNA korrespondierenden Proteins stellt eine weitere Methode dar um interessante Kandidatengene zu identifizieren. Eines der ersten Proteine, welches durch den Vergleich der mRNAs von infizierten und nicht-infiziertem Pflanzengewebe als potentieller Virulenzfaktor identifiziert werden konnte, war das Hydrophobin MPG1 (Talbot et al., 1993) von *M. oryzae*. Die Identifizierung erfolgte dabei über differentielles cDNA-*Screening* und anschließende DNA-Sequenzierung. Diese Methode wurde später nochmals angewendet um drei Ubiquitingene, welche spezifisch während der biotrophen Phase exprimiert werden, zu charakterisieren (McCafferty and Talbot, 1998). Die Nachteile dieses Ansatzes waren die fehlende Quantifizierung der Transkripte sowie eine geringe Sensitivität. Durch die Möglichkeit der schnellen und kostengünstigen Sequenzierung ganzer pilzlicher Genome, etablierten sich auch im Bereich der Transkriptomanalysen neue Methoden. Dazu zählen zum Beispiel die „*expressed sequence tag*“ Analysen, bei denen unzählige von cDNA-Klonen sequenziert werden, um anschließend mit den vorhandenen Datenbanken von Pflanzen und Pilzen verglichen zu werden (Kim et al., 2001). Auf eine ähnliche Weise funktionieren auch die Methode des „*serial analysis of gene expression*“ (SAGE) (Velculescu et al., 1995) und deren Weiterentwicklung das „*SuperSAGE*“ (Matsumura et al., 2003). Hierbei wird die entstandene cDNA in kleine Stücke von ca 12 bp (SAGE) bzw. 27 bp (SuperSAGE) zerlegt, um anschließend wieder als lange Kette (Konkatemeren) ligiert und sequenziert zu werden. Der Vorteil dieser Methoden war die simultane Identifizierung und Quantifizierung von Transkripten. Heutzutage werden komplette Transkriptome durch DNA-Microarray Analysen oder RNA-Sequenzierungen bestimmt und analysiert wie z. B. *M. oryzae* (Mosquera et al., 2009; Mathioni et al., 2011), *Fusarium graminearum* (Becher et al., 2011) und *C. higginsianum* bzw. *C. graminicola* (O'Connell et al., 2012).

A.4. Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen Gene von *C. graminicola*, welche für putative sekretierte Proteine kodieren, identifiziert und zur Ermittlung ihrer Bedeutung für die Pathogenese durch Gendelektionen charakterisiert werden. Ein Ansatz zur Auswahl von Kandidatengenem ist eine Liste von Proteinen, bei denen zuvor ein funktionelles Signalpeptid durch das YSST-Verfahren nachgewiesen worden war (Krijger et al., 2008). Des Weiteren wurde durch bioinformatische Analysen das Sekretom (Gesamtheit aller Proteine mit Signalpeptid) vorhergesagt und auf Grund folgender Kriterien nach weiteren Kandidatengenem hin eingegrenzt:

- 1. Gencluster, die sekretierte Proteine codieren.
- 2. Gene, die sekretierte Proteine codieren, die homolog zu solchen sind, welche in dem Reispathogen *Magnaporthe oryzae* in einem ATMT-Screen als mögliche Virulenzfaktoren identifiziert wurden.
- 3. Gene, die Proteine kodieren, die hinter dem Signalpeptid ein in der Literatur beschriebenes Sequenzelement trugen, das eine Translokation in Wirtszellen vermitteln soll.

Da die Symptomausprägung des Wildtypisolates von *C. graminicola* und den erzeugten Deletionsmutanten variabel war, erschien es schwierig, nur auf Grund der makroskopischen Sichtbonitur eindeutige Aussagen über Virulenzunterschiede zu treffen. Daher sollte ein zweites objektives Testsystem, basierend auf der Messung der Biomasse während der Infektion durch quantitative PCR, entwickelt und optimiert werden. Dieses neue System sollte anschließend an Mutanten, welche unterschiedliche Virulenzgrade zeigten, und auf verschiedenen Maissorten getestet werden, um einen Vergleich zwischen sichtbaren Symptomen und errechneter Biomasse zu erlauben.

B. Material & Methoden

B.1. Biologisches Material

B.1.1. *Colletotrichum graminicola*

B.1.1.1. Verwendetes Isolat

Der in dieser Arbeit verwendete Referenzstamm war das Isolat CgM2 von *Colletotrichum graminicola*, das als Wildtypstamm angesehen wird. (Anderson and Nicholson, 1996; Bergstrom and Nicholson, 1999)

B.1.1.2. Kulturbedingungen und Lagerung

Die Kultivierung von Pilzen auf festen Medien erfolgte auf zwei Agarmedien. Das erste enthielt Haferflocken (OMA-Medium, siehe → B.2.2) und diente der kurzfristigen Lagerung (max. 6 Wochen) sowie zur Bildung von Konidien. Die Inkubation erfolgte im Inkubationsschrank bei 23 °C unter langwelligem UV-Licht (Phillips TLD 36W/08, Hamburg). Das zweite Medium enthielt Kartoffeldextrose (PDA-Medium, siehe → B.2.2) und diente der mittelfristigen Lagerung (bis ca. 3 Monate) im Kühlschrank bei 4 °C. Zur Selektion Hygromycin-resistenter Transformanten wurde diesem Medium Hygromycin B (Invitrogen Ltd, Paisley, England) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und für Nourseothricin-resistente Transformanten 100 µg/ml Nourseothricin (Werner BioAgents, Jena). Für die langfristige Lagerung wurden Dauerpräparate hergestellt, die dazu dienen, die Pilzstämmen über Jahre zu konservieren. Hierzu wurden 1,5 ml Eppendorfgefäße mit 900 µl sterilem 20%igem Glycerin gefüllt. Die Konidien einer 2 bis 3 Wochen alten Kultur auf OMA wurden mit 100 µl H₂O-Bidest ab gespült und in die vorbereiteten 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Suspension wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt und für 1 h auf Eis gestellt. Anschließend konnten die Ansätze bei –80 °C eingefroren werden. Die hohe Konzentration an Glycerin verhinderte, dass die Suspension vollständig einfroren und somit später die Entnahme der darin enthaltenden Konidien erleichtert wurde. Neben der Kultivierung auf festen Medien bestand die Möglichkeit zu einer Kultivierung in flüssigem CM-Medium, die vorrangig zur Gewinnung ovaler Konidien genutzt wurde (siehe → B.2.2).

B.1.2. Zea mays

B.1.2.1. Verwendete Sorten

Zum Vergleich aller in dieser Arbeit erzeugten Pilz-Transformanten hinsichtlich Ihrer Pathogenität- bzw. Virulenzeigenschaften wurde die Maissorte „Mikado“ verwendet, deren Saatgut von der Firma KWS Saat AG (Einbeck, Deutschland) bezogen wurde. Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Maissorten sind im Anhang aufgeführt (siehe → G.1.1.3).

B.1.2.2. Anzuchtbedingungen

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus für 2 Wochen unter Hochdruck-Metallhalogendampf-Lampen (Master HPI-TPlus 400W, Phillips), die in etwa 2 m Entfernung von der Standfläche aufgehängt waren. Diese Lampen erzeugten einen Lichtstrom von 35000 Lumen und waren auf einen Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h/8 h eingestellt. Die durchschnittliche Temperatur betrug tagsüber 23 °C (± 2 °C) und nachts 20°C (± 2 °C). Es wuchsen 3 bis 4 Pflanzen in einem Topf (Durchmesser 10 cm), welcher mit Komposterde und Einheitserde ED73 (Hochmoortorf, Naturton und NPK Düngung) im Verhältnis 5 : 1 befüllt war. Eine zusätzliche Düngung war auf Grund der schon enthaltenden Vordüngung während der 2 Wachstumswochen nicht nötig. Für die Punktinokulation intakter Pflanzen (siehe → B.5.4) wurde je 1 Pflanze in einer konisch zulaufenden Pflanzröhre (Durchmesser 5 cm, Höhe 25 cm) angezogen.

B.1.3. Bakterienkulturen

B.1.3.1. Verwendete Stämme

Der in dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli*-Stamm war NEB 5-alpha F' (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland).

B.1.3.2. Kulturbedingungen und Lagerung

Die *E. coli*-Kulturen wurden in Petrischalen auf LB-Agar (siehe → B.2.2) bei 37 °C im Brutschrank (Function Line Serie 7000, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) kultiviert. Die Kultivierung im Flüssigmedium erfolgte durch Animpfen von LB-Medium (siehe → B.2.2) mit einer Einzelkolonie und anschließender Inkubation bei 37 °C und 200 rpm im Kulturschüttler (Classic C25, New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA) über Nacht.

B.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

B.2.1. Allgemeine Angaben

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Auf Bezugsquellen von Enzymen und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten wird an den entsprechenden Textstellen verwiesen. Sämtliche Verbrauchsmaterialien wurden über die Firma B. Heinemann (Duderstadt) bezogen.

B.2.2. Nährmedien

Medien wurden standardmäßig bei 121 °C und $1,1 \times 10^5$ Pa für 25 min autoklaviert. Abweichungen sind im Einzelnen erwähnt.

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

- 25 g Haferflockenmehl
- 7,5 g Agar-Agar
- ad 500 ml H₂O_{dest}
- Besonderheit: 45 min autoklavieren (121 °C; $1,1 \times 10^5$ Pa).

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

- 10 g Glucose
- 1 g Hefeextrakt
- 1 g Caseinhydrolysat
- 10 ml Stammlösung A (→ B.2.3)
- 10 ml Stammlösung B (→ B.2.3)
- ad 1000 ml H₂O_{dest}

Minimalmedium (MM) (Leach et al., 1982)

- 10 ml Stammlösung A (→ B.2.3)
- 10 ml Stammlösung B (→ B.2.3)
- ad 1000 ml H₂O_{dest}
- verschiedene C-Quellen, je 10 mM
- 15 g Agarose (bei Verwendung als Festmedium)

Lysogeny Broth(→ B.2.3)

- 10 g Bacto-Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g Natriumchlorid
- 15 g Agar-Agar (bei Verwendung als Festmedium)
- ad 1000 ml H₂O_{dest}

Saccharose-Vollmedium (YES-Medium)

- 171,15 g Saccharose
- 1 g Hefeextrakt
- 15 g Agar-Agar (bei Verwendung als Festmedium)
- ad 1000 ml H₂O_{dest}

Kartoffel-Dextrose-Agar (*Potatoe Dextrose Agar* = PDA)

- 24 g Kartoffel-Dextrose (BD, Heidelberg)
- 15 g Agar-Agar
- ad 1000 ml H₂O_{dest}
- wenn benötigt 1 ml Antibiotika (100 mg/ml)

Regenerationsmedium

- 34,2 g Saccharose
- 0,1 g Hefeextrakt
- 0,1 g Caseinhydrolysat
- 0,6 g Agar-Agar
- ad 100 ml H₂O_{dest}

Selektionsmedium

- 171,15 g Saccharose
- 0,5 g Hefeextrakt
- 0,5 g Caseinhydrolysat
- 7,5 g Agar-Agar
- 2 ml Antibiotikum (100 mg/ml)
- ad 500 ml H₂O_{dest}

B.2.3. Puffer und Lösungen

DNA-Extraktionspuffer I

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

DNA-Extraktionspuffer II

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

Lysispuffer

- 200 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA; 200 mM NaCl; 1 % n-Lauroylsarcosin; pH 8,0

1x TAE-Puffer

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

1x Natriumborat-Puffer

- 20 mM Natriumborat; mit Borsäure pH 6,7 einstellen

6x DNA-Probenpuffer

- 33 % Glycerin (v/v) und 66 % 10 x TAE-Puffer (v/v)
- 0,75 mg/ml Orange G und 0,03 mg/ml Xylen Cyanol
- Farbstoffe zuletzt zugeben

20x SSC-Transferpuffer

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

Hybridisierungspuffer

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

2x Waschlösung

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

0,5x Waschlösung

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

0,25x Waschlösung

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

Waschpuffer

- 150 mM NaCl; 100 mM Maleinsäure-NaOH; 0,3 % (v/v) Tween20; pH 7,5

Blockingpuffer

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

Detektionspuffer

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

Protoplastierungspuffer

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

STC-Puffer

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

PEG-Puffer

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

Stammlösung A

- 50 g Ca(NO₃)₂, ad 500 ml H₂O-bidest, autoklaviert

Stammlösung B

- 10 g KH₂PO₃, 12,5 g Mg₂SO₄ x 7 H₂O, 2,7 g NaCl, ad 500 ml H₂O_{Bidest}, autoklaviert

Transformation & Storage Solution (TSS)

- 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,17 M NaCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM Mg₂SO₄, 10 % (w/v) PEG 4000, nach dem Autoklavieren 5 % (v/v) Dimethylsulfoxid (steril filtriert) hinzugeben

Depurinierungslösung

- 0,25 M HCl

Denaturierungslösung

- 0,4 M NaOH

Ampicillin-Stammlösung

- 100 mg/ml Ampicillin (Sigma, St. Gallen, Deutschland) in H₂O_{Bidest}, steril filtriert

Kanamycin-Stammlösung

- 50 mg/ml Kanamycin (Sigma, St. Gallen, Deutschland) in H₂O_{Bidest}, steril filtriert

Hygromycin-Stammlösung

- 100 mg/ml Hygromycin B (Sigma, St. Gallen, Deutschland) in H₂O_{Bidest}, steril filtriert

Nourseothricin-Stammlösung

- 100 mg/ml Nourseothricin (Werner BioAgents, Jena, Deutschland) in H₂O_{Bidest}, steril filtriert

Anilinblau-Färbelösung

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

B.2.4. Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide für die meisten Anwendungen lieferte die Firma biomers.net GmbH (Ulm). Solche, die in qRT-PCR Reaktionen verwendet wurden, wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bestellt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind im Anhang (siehe → G.2) aufgeführt.

B.3. Infektions- und Wachstumsversuche

B.3.1. Herstellung des Inokulums

Die Konidien der zu untersuchenden Stämme wurden mit 100 µl H₂O_{dest} von einer 2 bis 3 Wochen alten Haferflockenagarplatte abgespült und in 900 µl H₂O_{dest} aufgenommen. Es wurde von jeder Suspension Verdünnungen (meist 1:10 und 2:10) hergestellt und diese mit Hilfe einer Thoma Zählkammer (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf) ausgezählt. Die Endkonzentration für alle Infektionsexperimente betrug 10⁶ Konidien/ml. Das verwendete H₂O_{dest} enthielt bei den Punktinokulationen von Blattsegmenten (→ B.3.2) und intakter Pflanzen (→ B.3.3) 0,02 % bzw. 0,04 % Tween20.

B.3.2. Punktinokulation von Blattsegmenten

B.3.2.1. Inokulation

Blattsegmente (ca. 8 cm) einer 2 bis 3 Wochen alten Maispflanze wurden geerntet und in eine mit Filterpapier ausgelegte Plastik-Petrischale (ø 14 cm) gelegt und durch Tesafilm fixiert. Die Inokulation der Blätter erfolgte mit mehreren 10 µl Tropfen der Sporensuspension im Bereich der Blattrippe. Es wurde darauf geachtet, dass zwischen den einzelnen Tropfen ein Mindestabstand von 1 cm bestand. Bei Inokulationsexperimenten, welche im Anschluss für qPCR/qRT-Analysen genutzt wurden, erfolgte die Inokulation mit nur einem Tropfen in der Mitte des Blattsegments. Das Filterpapier wurde nach der Inokulation mit 4 ml Wasser befeuchtet und die Petrischale mit Parafilm (Brand Scientific GmbH, Wertheim, Deutschland) verschlossen. Die Petrischalen lagerten bei 23 °C im Dunkeln.

B.3.2.2. Symptomaufnahme und Ernte

Eine Sichtbonitur erfolgte täglich, wobei spätestens ab dem dritten Tag nach der Inokulation von allen Petrischalen Fotos zur Dokumentation gemacht wurden. Die Probennahme für qPCR/qRT-Experimente erfolgte mit Hilfe eines Korkbohrers (\varnothing 8 mm), mit dem die Inokulationspunkte auf dem Blatt ausgestanzt und sofort in flüssigem Stickstoff fixiert wurden. Pro Probe wurden mindestens 4 solcher Blattscheiben in einem Pool zusammengefasst.

B.3.3. Sprühinokulation intakter Pflanzen

B.3.3.1. Inokulation

Die Tests wurden in Klimakammern des Typs AR75-L (Percival Scientific, Inc, United States) durchgeführt. Die Klimakammer enthielt 50 LED-Lampen, die Rotlicht entwickelten und zehn 55 W Philips PL-L Leuchtstoffröhren, die einen Lichtstrom von je 4800 Lumen erzeugten. Die Programmeinstellung bezüglich Temperatur, Luftfeuchte und Lichtintensität während der Versuche war wie folgt:

Programm ab Inokulation bis 24 h nach der Inokulation

Zeit	Leuchtstoffröhren	Licht LED	Feuchtigkeit	Temperatur
06:00 – 22:00	70 %	Ein	100 %	25 °C
22:00 – 06:00	0 %	Aus	100 %	25 °C

Programm ab 24 h nach Inokulation

Zeit	Leuchtstoffröhren	Licht LED	Feuchtigkeit	Temperatur
06:00 – 22:00	70 %	Ein	50 %	25 °C
22:00 – 06:00	0 %	Aus	70 %	20 °C

2 bis 3 Wochen alte Maispflanzen (2 Pflanzen pro Topf) wurden in speziellen Feuchteammern innerhalb der Klimakammern gestellt. Diese Feuchteammern dienten in den ersten 24 Stunden zum Erreichen einer Luftfeuchte von annähernd 100 %, da die Klimakammern nicht die programmierten 100 % erreichten. Sie bestanden aus einem Drahtgestell, welches mit Plastikfolie umspannt war und komplett verschlossen werden konnte. Diese Einheiten wurden in eine Schale gestellt, die mit Wasser gefüllt war, das durch Verdunstung die benötigte Feuchte bereitstellte. Die Inokulation der Pflanzen erfolgte mit Hilfe einer Air-Brush Pistole (Revell Air-Brush Komplett Set, Conrad Elektronik, Hirschau, Deutschland). Auf jede Pflanze

wurden ca. 2 ml Inokulum aufgesprüht. Nach 24 Stunden wurden die Feuchtekkammern aus den Klimakammern entfernt.

B.3.3.2. Symptomaufnahme und Ernte

Eine Sichtbonitur erfolgte täglich und entstandene Symptome wurden fotografisch dokumentiert. Die Probennahme für qRT-Experimente erfolgte durch Abschneiden der Blätter und dem sofortigem Fixieren in flüssigem Stickstoff. Pro Probe wurden mindestens 6 Blätter verschiedener Pflanzen in einem Pool vereinigt.

B.3.4. Punktinokulation intakter Pflanzen

B.3.4.1. Inokulation

Dieser relativ aufwendige Virulenztest zielt darauf ab, die Vorteile der beiden zuvor beschriebenen Verfahren zu vereinigen. Die Pflanzen wurden nicht wie in B.1.2.2 beschrieben in Töpfen, sondern in speziellen Röhren angezogen. Dieses spezielle Verfahren war nötig, da die Pflanzen vor der Inokulation waagrecht in große Schalen gelegt und die Blätter durch Tesafilm fixiert wurden. Die Röhren wurden während der Inokulation und für die folgenden 24 h mit feuchtem Filterpapier bedeckt um ein Austrocknen der Wurzeln zu verhindern. Die fixierten Blätter wurden mit 10 µl Tropfen der Sporensuspension inokuliert. Es wurde auch hier wieder darauf geachtet, dass ein Mindestabstand von 1 cm zwischen den Tropfen bestand. Die Schalen wurden anschließend mit einem Deckel und zusätzlicher Plastikfolie verschlossen und für 24 h bei 23 °C und Dunkelheit gelagert. Die benötigte Luftfeuchte wurde durch Verdunstung von dem Filterpapier erreicht. Anschließend wurden die Pflanzen wieder aufgerichtet und in den S1-Sicherheitskabinen des Gewächshauses unter Normalbedingungen weiter angezogen.

B.3.4.2. Symptomaufnahme und Ernte

Eine Sichtbonitur erfolgte täglich und entstandene Symptome wurden fotografisch dokumentiert. Die Probennahme für qRT-Experimente erfolgte mit Hilfe eines Korkbohrers (ø 8 mm), mit dem die Inokulationspunkte auf dem Blatt ausgestanzt und sofort in flüssigem Stickstoff fixiert wurden. Pro Probe wurden mindestens 9 solcher Blattscheiben in einem Pool zusammengefasst.

B.3.5. In vitro Kultivierung auf verschiedenen Kohlenstoff-Quellen

Das Wachstum des Wildtypstammes von *C. graminicola* und verschiedener Mutanten wurde auf festem Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoff-Quellen (siehe → B.2.2) getestet. Die C-Quellen waren Glucose, Saccharose und Malat. Von 7 Tage alten Masterplatten (CM-Medium) des WT und der Mutanten, auf denen sich eine klare Wachstumsfront abzeichnete, wurde mit Hilfe eines Korkbohrers (\varnothing 7 mm) Myzel ausgestochen und die Minimalmediumsplatten angeimpft. Das radiäre Wachstum wurde täglich (insgesamt 10 Tage) mit einem Lineal gemessen. Für den Wildtyp und die Mutanten wurden je 4 biologische Wiederholungen der einzelnen C-Quellen durchgeführt.

B.3.6. Bestimmung der Bildungsraten der Infektionsstrukturen bzw. der Konidien

Zur Bestimmung der Infektionsstrukturen wurde eine Konidien suspension mit einer Konzentration von 1×10^5 Konidien / ml hergestellt. Mit dieser Lösung wurden Blätter von 2 bis 3 Wochen alten Maispflanzen inokuliert (siehe → B.3.2). Nach 24, 48 bzw. 72 Stunden wurde die Mittelrippe der inokulierten Blätter durch eine Rasierklinge entfernt, mit Anillinblau gefärbt (siehe → B.5.2) und mikroskopiert. Von 100 Konidien wurde die Keimungsrate bestimmt um daraus die entstandenen Appressorien bzw. die Penetration durch die Appressorien zu bestimmen. Gezählt wurden mindestens 3 x 100 Konidien pro Transformante und WT.

Zur Bestimmung der Konidienbildungsrate wurden die Konidien mit 2 ml 0,02 % Tween 20 von einer ca. 14 Tage alten Kultur auf einer OMA-Platte ab gespült. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 1 ml 0,02 % Tween 20 resuspendiert. Von dieser Konidien suspension wurden verschiedene Verdünnungen (1:50; 1:100; 1:200) hergestellt und mit Hilfe einer Thomazählkammer ausgezählt. Für jedes untersuchte Isolat wurden je 3 OMA-Platten verwendet.

B.4. Molekularbiologische Methoden

B.4.1. Präparation von Nukleinsäuren

B.4.1.1. Mini-Präparation von genomischer DNA

Diese Methode wurde angewendet um DNA-Qualitäten zu erhalten, die für einfache PCR-Anwendungen (Kolonie-PCR) ausreichen (Saitoh, 2006). Diese schnelle Präparation ist für andere Nachweise ungeeignet, was sowohl die Qualität als auch die Quantität der erhaltenen DNA betrifft. In ein 2 ml Eppendorfgefäß wurde 1 ml CM-Medium gegeben und mit Myzel angeimpft. Nach ca. 5 Tagen wurde das neu entstandene Myzel für 5 min bei 10000 x g abzentrifugiert, in 500 µl Lysispuffer aufgenommen und mit 2 x 3 mm Stahlkugeln für 30 s bei 30 Hertz im Tissue-Lyser (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 18000 x g für 10 min. Der Überstand (ca. 400 µl) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 100%igem Ethanol durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Die anschließende Zentrifugation bei 18000 x g für 10 min und 4 °C führte zur Sedimentation der DNA. Diese wurde daraufhin mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde unter der Sterilbank getrocknet und in 50 µl sterilem H₂O_{Bidest} oder TE- Puffer (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH 8) aufgenommen.

Diese Methode konnte zur Gewinnung von DNA, welche für qPCR-Analysen verwendet werden sollte, nicht eingesetzt werden. Stattdessen wurde hierzu das Plant DNA Kit (Peqlab, Erlangen, Deutschland) laut Herstellerangaben mit folgenden Abweichungen benutzt: 1) Die Eppendorfgefäße mit den enthaltenen Blattscheiben und 2 x 3 mm Stahlkugeln wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren, um das Gewebe anschließend für 30 s bei 30 Hertz im Tissue-Lyser (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufzuschließen. Danach erfolgte die Zugabe des im Kits enthaltenen Resuspensionspuffers. 2) Nach vollständiger Resuspension der Probe erfolgte die Zugabe von 10 µl des externen Standards, dem pUC18-Plasmid (Thermo-Scientific, Deutschland) in einer Konzentration von 5 pg/µl. Dieser Standard wurde eingesetzt, um mögliche schwankende Verluste bei den folgenden Reinigungsschritten zu bestimmen und einen probenspezifischen Korrekturfaktor zu ermitteln.

B.4.1.2. Maxi-Präparation von genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach (Döbbeling et al., 1997). Etwa 500 mg Pilzmyzel einer 7 d alten Flüssigkultur (100 ml CM-Medium) wurden kurz auf saugfähigem Papier getrocknet und anschließend im Mörser in flüssigem Stickstoff zerrieben, bis ein homogenes

Pulver vorlag, welches noch in gefrorenem Zustand in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 800 µl Extraktionspuffer I überführt wurde. Nach Zugabe von 800 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) und Mischen erfolgte die Trennung der Phasen durch Zentrifugation (Sorvall RC 5C Plus, Rotor SS 34; Kendro GmbH, Langenselbold) für 10 min bei 20000 g und 4 °C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und analog dem vorhergehenden Schritt extrahiert und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA durch Überführung der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß, der Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol und einer 60-minütigen Inkubation bei -20 °C. Die DNA wurde danach 15 min bei 6800 g und 4 °C sedimentiert und das erhaltene Sediment in 700 µl Extraktionspuffer II resuspendiert. RNA und verbliebene Proteine wurden durch eine 30-minütige Behandlung mit 3,5 µl (10 mg/ml) RNase A bei 37 °C sowie durch eine anschließende Zugabe von 10 µl (14-22 mg/ml) Proteinase K und einer nachfolgenden Inkubation für 60 min bei 60 °C zerstört. Danach erfolgten erneut Phenol-Chloroform- und Chloroform-Extraktionen mit anschließender Isopropanol-Fällung (s. oben). Die präzipitierte DNA wurde 20 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und wiederum für 20 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach sorgfältigem Entfernen des Überstands mit Hilfe einer Pipette wurde das DNA-Sediment unter der Sterilbank getrocknet und anschließend in sterilem H₂O_{bidest} oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und der Reinheit der Präparation erfolgte photospektrometrisch durch den Nano-Drop (Thermo-Scientific, Deutschland).

B.4.1.3. Präparation von Plasmid-DNA

Hierfür wurden 5 ml einer *E. coli* Kultur (5 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in einem 15 ml Greinerröhrchen im Inkubationsschüttler angezogen. 2 ml der gewachsenen *E. coli* Kultur wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß pipettiert, bei 10000 x g für 2 min sedimentiert und in 200 µl Resuspensionspuffer (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 3 µl RNase A (10 mg/ml), pH 8) sorgfältig gelöst. Durch Zugabe von 200 µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS) erfolgte der Zellaufschluss unter vorsichtigem Invertieren. Während der folgenden Inkubation von 15 min bei RT wurde die RNA enzymatisch abgebaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl Neutralisierungspuffer (3M Natriumacetat-HCl, pH 5) und eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis. Dann wurde der Ansatz 10 min bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nun

erfolgte die Fällung durch Zugabe von 1 ml 100%igem Ethanol und einer anschließenden Zentrifugation von 10 min bei 10000 x g. Nach einem abschließenden Waschschrift mit 70%igem Ethanol wurde das Sediment unter der Sterilbank getrocknet und in 50 µl sterilem H₂O_{bidest} oder TE-Puffer aufgenommen.

B.4.1.4. Präparation von RNA

Die Art der Aufarbeitung der im Stickstoff gefrorenen Proben war abhängig von ihrer Größe. Im Falle ganzer Blätter erfolgte die Homogenisierung des Gewebes im ebenfalls mit Stickstoff vorgekühlten Mörser. Anschließend wurden ca. 200mg des Pulvers in 900 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgenommen und zur RNA-Extraktion durch das Plant-RNA-Kit (Peqlab, Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben weiter verwendet. Im Falle ausgestanzter Blattscheiben, welche in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 2 x 3 mm Stahlkugeln in flüssigen Stickstoff eingefroren waren, wurde zur Homogenisierung der Tissue-Lyser (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Da die Gefahr bestand, dass die Proben während der Aufarbeitung antauen könnten und es somit zur RNA-Degradierung kommen könnte, wurde der Probenadapter ebenfalls in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Homogenisierung erfolgte für 60 s bei 30 Hertz. Das aufgearbeitete Pulver wurde in 450 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgenommen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte laut Herstellerangaben mit dem Plant-RNA-Kit (Peqlab, Erlangen, Deutschland).

B.4.2. PCR

B.4.2.1. Standard PCR

Sämtliche Reaktionen wurden in den Geräten Biometra T Professional Thermocycler oder Biometra T Personal Thermocycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die verwendeten Enzyme und Enzympuffer stammten von Thermo Scientific (Deutschland). Das Volumen einer Standard-PCR-Reaktion betrug 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

PCR mit Taq-Polymerase

pipettiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
2 µl	ThermoPol Puffer	10 x
0,4 µl	dNTPs	10 mM
2 µl	Primer1	2 µM
2 µl	Primer2	2 µM
0,2 µl	Taq-Polymerase	5 Units/ml
<i>template</i> DNA (1-20 ng)		
<i>ad</i> H ₂ O _{Bidest}		

PCR mit Phusion-Polymerase

pipettiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
4 µl	HF Puffer	5 x
0,4 µl	dNTPs	10 mM
2 µl	Primer1	2 µM
2 µl	Primer2	2 µM
0,2 µl	Phusion-Polymerase	2 Units/ml
<i>template</i> DNA (1-20 ng)		
<i>ad</i> H ₂ O _{Bidest}		

Die PCR-Geräte wurden wie folgt programmiert:

PCR mit Taq-Polymerase

95 °C	2 min	Initiale Denaturierung	Zyklische Schritte
95 °C	30 s	Denaturierung	
T _m + 2 °C	30 s	Annealing	
72 °C	2 min	Elongation	
72 °C	5 min	Abschließende Elongation	
4 °C	∞	Pause	

PCR mit Phusion-Polymerase

98 °C	2 min	Initiale Denaturierung	Zyklische Schritte
98 °C	20 s	Denaturierung	
T _m + 2 °C	20 s	Annealing	
72 °C	1 min	Elongation	
72 °C	2 min	Abschließende Elongation	
4 °C	∞	Pause	

In den meisten Fällen waren 30 zyklische Schritte für das Standard PCR-Protokoll ausreichend. Die Elongationszeit variierte wegen der Größe des zu erzeugenden Amplifikates. Dabei galt als Regel, dass die Taq-Polymerase ca. 1 kb pro Minute amplifiziert, während die Phusion-Polymerase 1 kb in 15 – 30 sec amplifiziert. Die verwendeten Primer besaßen alle eine Schmelztemperatur T_m von 60 °C (+/-2 °C) die nach folgender Formel berechnet wurde:

$$T_M = 69,5 \text{ °C} + (0,41 \times \text{GC-Gehalt}) - (650 / \text{Anzahl der Basen des Primers})$$

B.4.2.2. Double-Joint-PCR

Die Technik der DJ-PCR (Yu et al., 2004) diente zum Erzeugen der Deletions-Kassetten, welche verwendet wurden, um Deletionsmutanten von *C. graminicola* zu erzeugen. Das DJ-PCR Protokoll besteht aus 3 Teilreaktionen. In der ersten Reaktion wurden je einzeln die beiden Flanken und das Resistenzgen durch spezifische Primer erzeugt. Die zweite Reaktion diente dazu, aus den 3 Produkten der ersten Reaktion (5'-Flanke, 3'-Flanke, Resistenzgen) ein einziges, zusammenhängendes PCR-Produkt (Fusionsfragment) zu erzeugen. Diese Reaktion kam ohne die Zugabe von Primern aus, da die Flanken teilweise mit dem Resistenzgen überlappten und somit selber als Primer fungierten. In der anschließenden dritten Reaktion wurde wiederum durch spezifische Primer, die von den zuvor verwendeten „Außenprimern“ etwas nach innen versetzt lagen, die vollständige Deletions-Kassette amplifiziert. Die DJ-PCR Reaktionen wurden alle mit dem Enzym „Phusion™-High Fidelity DNA Polymerase“ der Firma Thermo-Scientific durchgeführt. Dieses Enzym hat die Eigenschaft, auch große Produkte bis 10 kb schnell zu amplifizieren und weist durch die eigene 3' → 5' Exonucleaseaktivität eine 50fach kleinere Fehlerrate als gewöhnliche Taq Polymerasen auf.

Ansatz der DJ-PCR 1. Reaktion

pipettiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
10 µl	HF Puffer	5 x
1 µl	dNTPs	10 mM
5 µl	Primer1	2 µM
5 µl	Primer2	2 µM
0,5 µl	Phusion-Polymerase	2 Units/ml
<i>template</i> DNA (1-20 ng)		
<i>ad</i> H ₂ O _{Bidest}		

Das Gesamtvolumen der ersten Reaktion betrug 50 µl. Bei der Amplifikation der Flanken wurden 5 µl genomischer DNA des Stammes CgM2 in einer Konzentration von 10 ng/µl

eingesetzt. Das Hygromycin-Resistenzgen wurde ausgehend von dem Plasmid pAN7-1 (Punt et al., 1987) amplifiziert, das Nourseothricin-Resistenzgen vom Plasmid pNR1 (Malonek et al., 2004). Hierbei wurden 5 ng des jeweiligen Plasmides eingesetzt. Alle PCR-Produkte wurden danach durch das peqGOLD Cycle-Pure Kit (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) gereinigt, um Reste von Primern und Nukleotiden zu entfernen.

Ansatz der DJ-PCR 2. Reaktion

pipettiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
10 µl	HF Puffer	5 x
1 µl	dNTPs	10 mM
0,5 µl	Phusion-Polymerase	2 Units/ml
Im molaren Verhältnis 1:3:1	5'-Flanke	-
	Resistenzgen	-
	3'-Flanke	-
<i>ad</i> H ₂ O _{Bidest}		

Das Volumen der zweiten Reaktion betrug 50 µl, um genügend Fusionsfragmente für die dritte Reaktion zu erzeugen. Im Gesamtansatz wurden normalerweise je 10 ng der beiden Flanken und 30 ng des Resistenzgenes verwendet, da die Resistenzkassette des Nourseothricin bzw. die Gen-spezifischen Flanken ca. 1000 bp lang waren. Diese Mengen wurden bei Bedarf variiert, wobei das molare Verhältnis von 1:3:1 beibehalten wurde. Ein anschließendes Aufreinigen des Ansatzes war nicht nötig, da sich keine Primer in der Reaktion befanden.

Ansatz der DJ-PCR 3. Reaktion

pipettiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
10 µl	HF Puffer	5 x
1 µl	dNTPs	10 mM
5 µl	<i>nested</i> -Primer1	2 µM
5 µl	<i>nested</i> -Primer2	2 µM
0,5 µl	Phusion-Polymerase	2 Units/ml
2 µl	Fusionsfragmente	-
26,5 µl	H ₂ O _{Bidest}	-

Bei der dritten Reaktion handelt es sich um eine Standard-PCR, in dem die endgültige Deletions-Kassette amplifiziert wird. Die finale Aufreinigung erfolgte mit dem peqGOLD Cycle-Pure Kit (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen).

Die PCR Programme der DJ-Reaktionen sahen wie folgt aus:

DJ-PCR 1. Reaktion (wie Standard PCR, siehe →B.4.2.1)

DJ-PCR 2. Reaktion

98 °C	30 s	Initiale Denaturierung	
98 °C	15 s	Denaturierung	10 Zyklen
60 °C	15 s	Annealing	
72 °C	1 min	Elongation	
98 °C	15 s	Denaturierung	25 Zyklen
72 °C	1 min 30 s	Elongation	
72 °C	5 min	Abschließende Elongation	
4 °C	∞	Pause	

Dieses PCR-Programm war auf das Fehlen von Primern im 2. Reaktionsansatz angepasst. Wenn dennoch Primer verwendet wurden, sollte es sich um dieselben Außenprimer der Flanken wie in der ersten Reaktion handeln. Des Weiteren sollten diese erst während der zweiten Zyklusphase in die laufende PCR pipettiert werden. Dabei darf nicht vergessen werden, eine zweite *Annealing*-Phase in das PCR-Programm einzufügen. Außerdem wird es somit nötig, den Ansatz vor der Weiterverwendung aufzureinigen, da nun Primer verwendet wurden.

DJ-PCR 3. Reaktion (wie Standard PCR, siehe →B.4.2.1)

B.4.2.3. Genomic Walking PCR

Mit dieser Art von PCR ist es möglich unbekannte Genomregionen, ausgehend von einer bekannten Sequenz, zu amplifizieren. In dieser Arbeit wurde diese Technik genutzt, um den Integrationsort der T-DNA in ATMT-Mutanten zu bestimmen.

Je 5 µg der zu testenden Transformanten-DNA wurden mit 3 verschiedenen Restriktionsenzymen (KpnI, PvuI, AatII) über Nacht verdaut. Anschließend wurde an die durch den Verdau entstandenen DNA Fragmente ein Poly-Cytosin-Schwanz angehängt. Dafür wurde das Enzym Terminale-Transferase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) benutzt. Durch diese Behandlung besteht das gesamte Genom nun aus Fragmenten, welche an den 5' bzw 3'-Enden immer die Schnittstellensequenz und dem Poly-Cytosin-Schwanz tragen. Das Prinzip der *Genomic Walking* PCR beruht auf 2 aufeinander folgenden PCR-Reaktionen mit der zuvor behandelten DNA. In der ersten Reaktion wird mit Hilfe eines Primers, der innerhalb einer bekannten Sequenz bindet und jeweils einem von 3 verschiedenen degenerierten Primern (KpnWalk, PvuWalk oder AatWalk), welche exakt auf den Schnittstellen und dem Poly-Cytosin-Schwanz binden, Amplifikate unterschiedlicher Länge erzeugt. In der zweiten Reaktion werden nun definierte Amplifikate, durch Verwendung eines Tail-Primers (Tail-Nested-Neu), und einem Primer der innerhalb der bekannten Sequenz bindet, erzeugt. Da man bei der T-DNA auf beiden Border-Seiten in die unbekannte Region amplifizieren konnte, wurden als Primer für die Left Border Cg-SQ_rev7 in der ersten Reaktion und Cg-SQ_rev20 in der zweiten Reaktion verwendet. Bei der Right Border waren es die Primer Cg-SQ_20 in der ersten Reaktion und Cg-SQ_5 in der zweiten Reaktion.

Ansatz der 1. Reaktion (C-walk PCR)

pipettiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
5 µl	ThermoPol Puffer	10 x
1 µl	dNTPs	10 mM
5 µl	Primer1	2 µM
5 µl	Primer2	2 µM
0,5 µl	Taq-Polymerase	2 Units/ml
<i>template</i> DNA (1-20 ng)		
<i>ad</i> H ₂ O _{Bidest}		

Das Gesamtvolumen der PCR betrug 50 µl.

Ansatz der 2. Reaktion (nested PCR)

pipetiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
5 µl	ThermoPol Puffer	10 x
1 µl	dNTPs	10 mM
5 µl	Primer1	2 µM
5 µl	Primer2	2 µM
0,5 µl	Taq-Polymerase	2 Units/ml
1 µl <i>template</i> DNA (von der 1.Reaktion)		
<i>ad</i> H ₂ O _{Bidest}		

Die PCR Programme der Genome-Walking-Reaktionen sehen wie folgt aus:

1. Reaktion

95 °C	2 min	Initiale Denaturierung	
95 °C	30 s	Denaturierung	5 Zyklen
70 °C	30 s	Annealing	
72 °C	2 min	Elongation	
95 °C	30 s	Denaturierung	5 Zyklen
65 °C	30 s	Annealing	
72 °C	2 min	Elongation	
95 °C	30 s	Denaturierung	20 Zyklen
60 °C	30 s	Annealing	
72 °C	2 min	Elongation	
72 °C	5 min	Abschließende Elongation	
4 °C	∞	Pause	

2. Reaktion (wie Standard PCR, siehe → B.4.2.1)

B.4.2.4. Quantitative PCR

Mit dieser Technik kann die Biomasse des Pilzes, unter der Annahme, dass die Biomasse und der Gehalt an genomischer DNA korrelieren, in infiziertem Pflanzengewebe bestimmt werden. Für die qPCR wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems GmbH; Darmstadt, Deutschland) verwendet und in einem „MyiQ-single color real-time PCR detection system“ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) gemessen. Das Reaktionsvolumen umfasste 20 µl.

Ansatz der qPCR

pipettiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
10 µl	Power Sybr Green Mix	2 x
0,4 µl	Primer1	10 µM
0,4 µl	Primer2	10 µM
2 µl	template DNA	-
<i>ad</i> H ₂ O _{Bidest}		

Die DNA-Konzentration der verwendeten DNA-Präparation, die bereits mit der externen Standard-DNA pUC18 versetzt war (siehe → B.4.1.1), wurde mit Hilfe des NanoDrop Gerätes photometrisch bestimmt. Von den einzelnen DNA-Proben wurden immer 2 µl in die PCR eingesetzt. Dabei sollte beachtet werden das die Konzentration der Proben annähernd 10 ng/µl betragen, da diese Menge der verwendeten Eichgerade entspricht. Die verschiedenen absolut eingesetzten DNA-Mengen der einzelnen Proben wurden später zueinander relativiert.

Programm der qPCR

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

Zur Bestimmung des Pilzes wurden die Primer (Cg_ITS2-F1.1 und Cg_ITS2-R1) verwendet. Diese banden innerhalb des „internal transcribed spacer 2“ und erzeugten ein 98 bp großes Fragment. Für die Bestimmung des externen Standards pUC18 wurden die Primer (M13neu-For und M13neu-Rev) verwendet, welche ein 105 bp großes Fragment erzeugten und im Bereich der Klonierstelle des Plasmides banden. Nach der qPCR wurde durch eine

Gelelektrophorese in einem 1,5%igen Natrium-Borat-Agarosegel (siehe → B.4.3.1) kontrolliert, ob in den Ansätzen Fragmente der richtigen Größe entstanden. Für die Bestimmung vergleichbarer C_T -Werte wurden für alle Messungen der Pilz-DNA die *threshold*-Einstellungen der Eichgerade von *CgITS2* übernommen, analog dazu für alle pUC18 Messungen die *threshold*-Einstellungen der pUC18-Eichgerade. Aus den korrigierten C_T -Werten wurden anschließend mit Hilfe der Formeln der Eichgeraden die Mengen an gDNA des Pilzes bzw. an pUC18 DNA in den Proben ermittelt. Anschließend wurde aus den pUC18 Werten ein Korrekturfaktor errechnet, der sich durch Division der tatsächlich gemessenen zu der eingesetzten DNA-Menge ergab. Diese Korrekturfaktoren wurden nun mit dem Ergebnis der *CgITS2* Bestimmung multipliziert. Diese und die sich anschließenden statistischen Berechnungen erfolgten alle mit dem Computerprogramm Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, USA).

B.4.2.5. Quantitative-Reverse Transkriptase PCR

Mit dieser Technik kann die Menge eines definierten RNA-Transkripts bestimmt werden. Durch Abgleich mit Referenz-Transkripten, deren Gehalte in unterschiedlichen physiologischen Zuständen nicht oder kaum schwanken, kann die Zunahme an pilzlicher Biomasse im Verlaufe des Experimentes herausgerechnet werden, so dass eine Aussage über die transkriptionelle Regulation des Kandidatengenes möglich wird. Für die qRT-PCR wurde das Power SYBR® Green RNA-to-CT™-Kit (Applied Biosystems GmbH; Darmstadt, Deutschland) verwendet und in einem „MyiQ-single color real-time PCR detection system“ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) gemessen. Das Reaktionsvolumen umfasste 20 µl.

Ansatz der qRT-PCR

pipettiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
10 µl	RNA-to- C_T Sybr Green Mix	2 x
0,4 µl	Primer1	10 µM
0,4 µl	Primer2	10 µM
0,16 µl	RT Enzyme-Mix	125 x
2 µl	template RNA	25 ng / µl
<i>ad</i> H ₂ O _{Bidest}		

Der RNA-Gehalt wurde nach der Extraktion (siehe → B.4.1.4) photometrisch bestimmt und die Konzentration durch Verdünnung auf 25 ng/ µl eingestellt.

Programmierung des PCR-Gerätes für die qRT-PCR

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

Nach der qRT-PCR-Reaktion wurde durch eine Gelelektrophorese in einem 1,5%igen Natrium-Borat-Agarosegel (siehe → B.4.3.1) kontrolliert, ob in den Ansätzen Fragmente der richtigen Größe entstanden sind. Bei einem positiven Ergebnis wurde mit Hilfe des Programms SigmaPlot Version 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) die Funktion des sigmoidalen Kurvenverlaufs der qRT-PCR Messdaten von jeder Reaktion bestimmt. Anhand dieser Funktion wurde der jeweils zugehörige initiale Fluoreszenzwert F_0 ermittelt, der mit der Menge der Matrize zu Beginn der Reaktion in einem Ansatz korreliert (Liu and Saint, 2002). Diese F_0 -Werte wurden nun mit denen der Referenzgene normalisiert und als absolute Werte in den Diagrammen aufgetragen. Statistische Auswertungen erfolgten mit Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, USA).

B.4.3. Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren**B.4.3.1. DNA-Elektrophorese**

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Gele mit Agarosekonzentrationen von 0,7 bis 2 % (w/v; Seakem LE-Agarose; Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) hergestellt. Dazu wurde Agarose in TAE-Puffer gegeben, durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und in einen Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Vol. Probenpuffer versetzt, mit Hilfe einer Pipette auf das Gel aufgetragen und bei konstanter Spannung (80 – 100 Volt) in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Färbung des Gels in Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml TAE) für 20 bis 60 min. Das Resultat wurde auf dem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 320 nm mittels Videodokumentation aufgezeichnet. Als Größenstandard wurde eine Leiter mit DNA-Fragmenten definierter Größe (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Thermo Scientific) verwendet.

Neben TAE Puffer wurde auch Natrium-Borat Puffer verwendet (Brody and Kern, 2004), denn dieser erlaubte die Spannung auf bis zu 400 V zu erhöhen, was einem Zeitgewinn entsprach. Allerdings werden Fragmente über 1,5 kb nur mäßig aufgetrennt, weswegen sich Größenunterschiede in diesem Bereich nur schwer erkennen ließen.

B.4.3.2. RNA-Elektrophorese

Die elektrophoretische Größenauftrennung und qualitative Überprüfung von RNA erfolgte mit Hilfe des Bio-Analyzers Gerätes (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die dazu verwendeten RNA-Pico-Chips wurden, wie laut Herstellerangaben angegeben, verwendet.

B.4.4. Southern-Hybridisierung

B.4.4.1. Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden

Die Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin-dUTP erfolgte in einer Standard PCR-Reaktion (siehe → B.4.2.1). Verwendet wurde ein spezieller DIG-dNTP-Mix, bestehend aus je 2 mM dATP; dCTP; dGTP; 0,19 mM dTTP und 0,1 mM DIG-dUTP (Alkali-labil; Roche Diagnostics, Mannheim). Als Matrize dienten Plasmide, die die nachzuweisende DNA insertiert hatten. Ein paralleler Kontrollansatz ohne DIG-dUTP wurde zusammen mit dem Sondenfragment in einem Agarosegel aufgetrennt. Der Erfolg der Markierung konnte auf diese Weise am veränderten Laufverhalten der Sonde überprüft werden, da diese auf Grund des Einbaus von DIG-dUTP im Agarosegel nicht so schnell aufgetrennt wird und somit größer erscheint.

B.4.4.2. Restriktionsverdau genomischer DNA und Kapillartransfer

Die genomische DNA wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut. Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Thermo-Scientific bezogen. Dauer, Temperatur und Puffer hingen dabei vom jeweiligen Enzym ab. In der Regel wurden 10 µg genomische DNA in einem 50 µl Ansatz mit 20 Units Restriktionsenzym für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung (siehe → B.4.3.1) der Fragmente im 0,7%igen TAE Agarosegel für 3 - 4 h bei 80 V. Restriktion und Laufverhalten der Proben wurden nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht kontrolliert. Nach der Kontrolle des Gels wurde dieses 30 min in 0,25 M HCl unter leichtem Schütteln gewaschen und anschließend 30 min in 0,4 M NaOH neutralisiert. Die DNA wurde dann über Nacht durch einen abwärts gerichteten Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) übertragen. Der Aufbau des Transfers sah wie folgt aus (von unten nach oben). Auf einen 10 cm hohen Stapel Papiertücher wurden

3 Lagen Filterpapier (Whatmann 3MM; Göttingen), die ein wenig größer als das Gel zugeschnitten waren, gelegt. Nun folgte die Nylonmembran, die exakt die Größe des Gels besaß. Das Gel wurde mit der Öffnung der Ladetaschen nach oben luftblasenfrei auf die Membran und außerdem drei Filterpapiere auf das Gel gelegt. Membran und Filterpapiere wurden vor dem Auflegen mit 2 x SSC-Transferpuffer befeuchtet. Den Abschluss bildete ein Streifen Filterpapier, welcher in Gelbreite geschnitten die Verbindung zu den beiden SSC-Pufferreservoirs herstellte. Im Anschluss an den Transfer erfolgte eine kovalente Verknüpfung der DNA an die Membran durch 2-stündiges Backen bei 80 °C. Die relative Lage der DNA wurde an der Membran vor dem Transfer durch Abschneiden einer Membranecke gekennzeichnet.

B.4.4.3. Hybridisierung und Nachweis der gebundenen Sonde

Als erstes erfolgte eine Prähybridisierung für 2 h im Hybridisierungspuffer bei 65 °C im Hybridisierungsofen (Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf). In der Zwischenzeit wurde die Sonde 5 min bei 100 °C denaturiert und dann sofort in Eiswasser gestellt, um die Reassoziations der beiden DNA-Stränge zu verhindern. Nach Zugabe der denaturierten Sonde zum Prähybridisierungsansatz wurde dieser bei 65 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 2 x 5 min in 2 x Waschlösung bei Raumtemperatur und anschließend 1 x 15 Minuten in 0,5 x Waschlösung und 1 x 15 Minuten in 0,25 x Waschlösung bei 65 °C gewaschen. Der folgende Nachweis erfolgte ausschließlich bei Raumtemperatur. Die Membran wurde 15 min in 40 ml Waschpuffer gewaschen und dann 1 h in 40 ml Blocking Puffer getränkt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu unterdrücken. Die Zugabe des Antikörpers (anti-DIG-AP-Fab-Fragment, Roche Diagnostic, Mannheim) erfolgte in einer Verdünnung von 1:10000 (= 4 µl) in Blocking Puffer, inkubiert wurde für mindestens 30 min. Abschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit Waschpuffer behandelt, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Als Vorbereitung für die CSPD-Reaktion wurde die Membran 5 min in Detektionspuffer gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml CSPD-Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim) zwischen zwei Plastikfolien (Folienhalbschlauch, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurde die Membran etwa 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde sie luftblasenfrei in einer zweiten Plastikfolie verpackt und zusammen mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in eine Filmkassette gelegt. Die Belichtungsdauer richtete sich nach der Signalstärke. Der Film wurde in einem automatischen Filmentwicklungsgerät (Optimax TR, MS Laborgeräte, Heidelberg) entwickelt.

B.4.5. Transformation von *Colletotrichum graminicola*

B.4.5.1. Anzucht der Vorkultur

Die Sporen einer Kultur auf einer zwei Wochen alten Haferflockenagarplatte wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ abgewaschen. Mit dieser Sporensuspension wurden 100 ml CM Medium (siehe → B.2.2) in einer Konzentration von 10^6 Konidien/ml angeimpft. Die Kultur wurde auf einem Taumelschüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach) für 2 d bei RT inkubiert und anschließend weitere 5 d ohne Schütteln bei RT stehen gelassen. Bei dieser Anzuchtmethode entstanden in der Flüssigkultur ovale Konidien, die als Inokulum für die folgende Protoplastierung dienten.

B.4.5.2. Protoplastierung und Transformation

Für die Transformation von *C. graminicola* liegen mehrere Protokolle vor (Redman and Rodriguez, 1994; Epstein et al., 1998; Chung et al., 2002). Das vorliegende Verfahren orientierte sich weitgehend am Protokoll von Epstein *et al.*; es wurden aber einige Modifikationen eingeführt. Die Vorkultur (B.4.5.1) wurde durch autoklaviertes Nesseltuch filtriert und das Filtrat 10 min bei $4000 \times g$ zentrifugiert. Die sedimentierten Sporen wurden dann in 20 ml Protoplastierungspuffer (siehe → B.2.3) aufgenommen und für etwa 4 h bei 30°C unter mäßigem Schütteln inkubiert. Der Erfolg der Protoplastierung wurde mikroskopisch überprüft. Die Protoplasten wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren bei $800 \times g$ sedimentiert, um darauf in 10 ml STC gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 1 ml STC resuspendiert zu werden. Je nach Größe des Protoplastensediments wurden 100 bis 200 μl Aliquots in 15 ml Greinerröhrchen pipetiert und diese auf Eis gestellt. Die DNA (1 – 5 μg) wurde zugegeben und die Ansätze für 30 min auf Eis inkubiert. Hierbei war zu beachten, dass das Volumen an zugegebener DNA nicht mehr als 50 μl betrug, um die osmotische Stabilisierung der empfindlichen Protoplasten zu gewährleisten. Nun wurde 1 ml PEG Lösung zugegeben und der Ansatz weitere 20 min bei RT inkubiert. Zu jedem Ansatz wurden dann 3 bis 4 ml flüssiges (50°C) Regenerationsmedium (siehe → B.2.2) gegeben und dieser auf dem Selektionsmedium (siehe → B.2.2) ausplattiert.

B.4.5.3. Selektion

Nach 4 bis 6 d entstanden die ersten Kolonien. Diese wurden mit Hilfe eines Lanzettinadel auf PDA/Hyg-Platten (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B) überimpft. Um genetisch einheitliche Isolate zu erhalten, wurde von den entstandenen Kolonien etwas Mycel von der Hyphenfront auf OMA-Platten übertragen, auf denen die Transformanten zur Konidienbildung angeregt wurden.

Einige Sporen wurden mit 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$ abgeschwemmt und auf PDA-Platten (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B) ausplattiert. Bei Kolonien, die dort aus einer Spore anwuchsen, handelt es sich um monokaryotische Einzelsporisolate, welche wiederum auf OMA-Platten überimpft wurden, um mit den darauf gebildeten Sporen Dauerkulturen (siehe \rightarrow B.1.1.2) herzustellen. Im Falle der Nourseothricin resistenten Transformanten wurde analog verfahren. Die Nourseothricin Konzentration betrug 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in den PDA-Platten. Um die Anzahl an Kandidaten für eine mögliche Einzelsporisolation zu verringern, wurde zunächst eine Kolonie-PCR aller von der ursprünglichen Selektionsplatte isolierten Transformanten durchgeführt (siehe \rightarrow B.4.1.1).

B.4.6. Klonierung in *E. coli*

B.4.6.1. Gewinnung von DNA-Fragmenten

Sämtliche zu klonierende DNA-Fragmente wurden mittels PCR (siehe \rightarrow B.4.2.1 bzw. B.4.2.2) erzeugt. Nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarose-Gel und Ethidiumbromid Färbung wurden einzelne Banden mit Hilfe eines Skalpells unter dem UV-Licht ausgeschnitten. Die anschließende Gelelution der DNA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben des Gel Extraktionskits peqGOLD (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen).

B.4.6.2. Ligation

Zur Ligation von PCR-Produkten wurde das CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo-Scientific, Deutschland)) verwendet. Ein Standard-Ligationsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 10 μl und war wie folgt aufgebaut:

pipettiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
5 μl	Reaktions Puffer	2 x
1 μl	PCR-Produkt	unverdünnt
0,5 μl	pJET1.2/blunt cloning vector	50 ng/ μl
0,5 μl	T4 DNA Ligase	5 Units/ μl
3 μl	Wasser, Nuclease-frei	-

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und direkt für die *E. coli* Transformation eingesetzt.

B.4.6.3. Transformation von *E. coli*

Die Transformation chemokompetenter Zellen erfolgte mittels der TSS-Methode (Chung et al., 1989). Dazu wurden 25 ml LB-Medium mit 200 µl einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Erreichen der OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 (~ 3 - 4 x 10⁹ Zellen/ml), ein Wert der innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase liegt, wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 x g gesammelt und anschließend in 2,5 ml TSS (siehe → B.2.3) resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100 µl Aliquots (~ 3 - 4 x 10⁸ Zellen) in sterile Mikroreaktionsgefäße überführt und 5 bis 15 min auf Eis inkubiert. Nicht unmittelbar benötigte Aliquots wurden bei -70 °C für eine spätere Nutzung eingefroren. Für die Transformation wurde der CloneJET™-Ligationsansatzes zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 30 min erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für max. 90 s, eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min und die Zugabe von 900 µl LB-Medium. In der nachfolgenden Regenerationsphase, 30 bis 60 min bei 37 °C und 250 rpm im Kulturschüttler, begann die Expression des Ampicillin-Resistenzfaktors in transformierten Bakterienzellen.

B.4.6.4. Selektion

Volumina von 10 µl bis 200 µl des Transformationsansatzes wurden je nach Zelldichte und zu erwartender Transformationseffizienz auf LB_{Amp}-Agar (siehe → B.2.2) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Kulturschrank inkubiert. Die Identifizierung transformierter Zellen erfolgte anhand des Überlebens der Zellen, die, wenn sie keine Insertion im Vektor trügen, das für sie selbst tödliche Restriktionsenzym *Eco47IR* exprimieren würden. Einzelkolonien wurden mit Hilfe eines Zahnstochers unter sterilen Bedingungen in ein 15 ml Greinerröhren mit 5 ml LB_{Amp} Medium übertragen und über Nacht bei 37 °C, 250 rpm im Kulturschüttler kultiviert.

B.4.7. DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die verwendete Sequenziermethode beruht auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977), wobei fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide den Nachweise der Fragmente ermöglichen. Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt. Sequenziert wurden ausschließlich PCR-Produkte, welche zuvor aufgereinigt wurden. Ein 10 µl Sequenzieransatz setzte sich wie folgt zusammen:

pipettiertes Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
2 μ l	<i>Ready Reaction Mix</i>	-
1 μ l	<i>Sequencing Buffer</i>	5 x
1 μ l	Primer	2 μ M
-	PCR-Produkt (10 ng)	-
<i>ad H₂O_{Bidest}</i>		

Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

96 °C	1 min	Initiale Denaturierung	
96 °C	10 s	Denaturierung	15 Zyklen
50 °C	5 s	Annealing	
60 °C	1 min 15 s	Elongation	
96 °C	10 s	Denaturierung	5 Zyklen
50 °C	5 s	Annealing	
60 °C	1 min 30 s	Elongation	
96 °C	10 s	Denaturierung	5 Zyklen
50 °C	5 s	Annealing	
60 °C	2 min	Elongation	
4 °C	∞	Pause	

Anschließend wurde der Ansatz von den nicht umgesetzten Primern und fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durch folgende Methode gereinigt. Zum Ansatz wurden 5 μ l EDTA (125 mM) und 60 μ l 100%iges Ethanol gegeben und durch Invertieren gemischt. Nun erfolgte eine Inkubation bei RT für 15 min und eine anschließende Zentrifugation bei 10000 x g für 30 min und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, weitere 60 μ l 70%iges Ethanol zugegeben und anschließend wie zuvor zentrifugiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurde der Ansatz im Dunkeln unter einer Sterilbank getrocknet. Sequenzanalysen wurden mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) am Institut für Biologie der MLU durchgeführt. Die Handhabung des Geräts erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Auswertung und Korrekturen wurden die Programme „Clone Manager v9.0“ (Scientific & Educational Software, North Carolina, United States) und das Freeware Programm „Chromas Lite“ (Technelysium, Australien) genutzt. Für alle weiterführenden *in silico* Analysen siehe → B.6.

B.4.8. Identifizierung der T-DNA-Integrationsstellen

Die Identifizierung der T-DNA Integrationsstellen in den Transformanten erfolgte über die Amplifizierung des Übergangsbereichs von der *right*-Border bzw. von der *left*-Border der T-DNA zur angrenzenden unbekanntem genomischen Region. Dazu wurde die Methode nach Liu und Baird (Liu and Baird, 2001) in abgewandelter Form verwendet. Zunächst wurden 10 µg genomische DNA einer Transformante mit 20 *Units* des Restriktionsenzymes *KpnI*, *PvuI* oder *AatII* in einem Ansatz von 50 µl über Nacht bei 37 °C verdaut. Der Ansatz wurde mit einer SureClean-Lösung (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) gereinigt. Anschließend wurde an den 3' Enden der DNA-Fragmente ein oligo-C Anhang synthetisiert. Dieser *Tailing*-Ansatz bestand aus der gereinigten DNA-Lösung, 10 *Units* der terminalen Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT), 1x Reaktionspuffer der TdT, 0,25 mM CoCl₂ und 0,2 mM dCTP. Der gesamte Ansatz von 50 µl wurde für 1 h bei 37 °C und zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70 °C inkubiert (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg). Ausgehend von diesem Ansatz wurden mit einer *C-walk*-PCR und einer anschließenden *nested*-PCR (siehe → B.4.2.3) Fragmente amplifiziert, deren Sequenz den Übergang von der LB bzw. von der RB der T-DNA in die genomische Flanke repräsentiert. Im Anschluss wurden die entstandenen PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt, das Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt (siehe → B.4.3.1) und die Fragmente aus dem Gel eluiert (peqGOLD Gel-Extraction Kit, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Die DNA-Fragmente wurden in CloneJET™-Plasmide (Thermo-Scientific, Deutschland) kloniert (siehe → B.4.6), sequenziert und analysiert (siehe → B.4.7). Für die Sequenzier-PCR wurden die Primer M13neu-For und M13neu-Rev verwendet.

B.5. Mikroskopie und Fotografie

B.5.1. Lichtmikroskopie

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

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

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

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

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

B.5.2. Färbetechniken

Für mikroskopische Analysen wurden Blätter in Ethanol mit 25 % (v/v) Acetat über Nacht bei Raumtemperatur entfärbt. Eine Lagerung der entfärbten Blätter konnte anschließend in 50 % (v/v) Glycerol bei 8°C erfolgen. Vor der Entfärbung wurde die Mittelrippe der Blätter entfernt. Zur Färbung Glucan/Callose-haltiger Strukturen wurden infizierte Maisblätter zunächst entfärbt und anschließend für 5 bis 30 min in einer Anilinblau-Färbelösung (siehe → B.2.3) gefärbt. Nach einem Waschschrift mit Wasser wurde das Objekt im Durchlicht mikroskopiert.

B.5.3. Fotografie und Bildbearbeitung

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

B.6. Bioinformatik

Im folgenden Abschnitt werden Programme gelistet mit denen die *in silico* Analysen durchgeführt wurden.

Microsoft Office 2007	Die Anwendungen Excel und Word wurden zur Datenverwaltung und Ordnung genutzt.
Clone Manager 9	Programm für die Simulation von Klonierungen, <i>Primer Design</i> , Sequenz-Vergleichen und dem Erstellen von Restriktionskarten
Augustus gene prediction	Vorhersage von Genen in DNA-Sequenzen http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/
Phobius	Vorhersage von Signalpeptiden und Transmembran-Domänen http://phobius.sbc.su.se/
SignalP 2.0	Vorhersage von Signalpeptiden http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/
Signal P 3.0	Vorhersage von Signalpeptiden http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/
Rostlab	Vorhersage von NLS-Sequenzen http://cubic.bioc.columbia.edu/services/predictNLS/
Prosite	Vorhersage von Protein-Domänen und Familien http://prosite.expasy.org/
InterProScan	Vorhersage von Protein-Domänen und Familien http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/
Pfam	Vorhersage von Proteinfamilien http://pfam.sanger.ac.uk/

BLAST	Datenbank für DNA und Proteinvergleiche http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Bioinformatique Lyonnaise	Möglichkeit zur Erstellung einer eigenen Datenbank und zu multiplen Sequenzvergleichen innerhalb dieser Datenbank http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html
Target P 1.1	Vorhersage subzellulärer Lokalisation http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
Broad-Institute	Datenbank des <i>Colletotrichum graminicola</i> Genoms http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/colletotrichum_group/MultiHome.html
NC-IUBMB	Bestimmung der Enzym-Nomenklatur http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/
IMP	Vorhersage von GPI-Ankern http://mendel.imp.ac.at/gpi/plant_server.html
ProtComp	Vorhersage subzellulärer Lokalisation http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompanion&group=programs&subgroup=proloc
Brenda	Bestimmung der Enzym-Nomenklatur http://www.brenda-enzymes.org/
blast2go	Vollautomatisiertes Annotationsprogramm, mit dessen Hilfe eine große Anzahl an Gen- bzw. Proteinsequenzen bearbeitet werden können http://www.blast2go.de/b2ghome
Genesis	Programm zur Auswertung von Expressionsdaten http://genome.tugraz.at/genesisclient/genesisclient_description.shtml

C. Ergebnisse

C.1. Vergleich zweier Inokulationssysteme mittels qRT-PCR

Vorangegangene Arbeiten (Diplomarbeit Fabian Weihmann, 2008; Diplomarbeit Christian Kröling, 2009) zeigten, dass die Sprühinokulation intakter Pflanzen eine Methode ist, die nur schwer zu reproduzieren war und auf Grund des hohen zeitlichen Aufwandes, die Untersuchung einer größeren Anzahl an Mutanten stark erschwert. Die Punktinokulation von Blattsegmenten hingegen bietet die Möglichkeit, eine große Anzahl an Experimenten parallel und in biologischen Wiederholungen durchzuführen. Bisher blieb ungeklärt, ob die befallenen Pflanzen die gleichen Abwehrreaktionen bei den beiden Inokulationsmethoden zeigen. Um dies zu überprüfen wurden die Transkriptgehalte verschiedener bekannter Abwehrgene in infiziertem Pflanzengewebe durch qRT-PCR gemessen. Die zu untersuchenden Pflanzengene sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht der durch qRT-PCR untersuchten Pflanzen- und Pilzgene.

Name	Beschreibung	Literatur
<i>ZmTubA</i> (α -Tubulin 3)	Referenzgen <i>Zea mays</i>	(Behr et al., 2010)
<i>ZmTubG</i> (γ -Tubulin 1)	Referenzgen <i>Zea mays</i>	(Behr et al., 2010)
<i>ZmH2B</i> (Histone 2B)	Referenzgen <i>Zea mays</i>	(Behr et al., 2010)
<i>CgH3</i> (Histon 3)	Referenzgen <i>Colletotrichum graminicola</i>	(Behr et al., 2010)
<i>ZmMPI</i> (Mais Proteinase Inhibitor)	Induziert durch mechanische Verwundung	(Cordero et al., 1994)
<i>ZmTPS</i> (Terpene Synthase 1)	Induziert durch Herbivore	(Feng, 2010)
<i>ZmPR2a</i> (Beta 1,3-Glucanase)	Abbau der pilzlichen Zellwand	(Wu et al., 1994)
<i>ZmAChit</i> (Chitinase)	Abbau der pilzlichen Zellwand	(Bravo et al., 2003)
<i>ZmPR4b</i> (<i>pathogenicity related</i>)	Induziert durch pilzliche Pathogene	(Vargas et al., 2012)
<i>ZmPR1</i> (<i>pathogenicity related</i>)	Induziert bei inkompatibler Interaktion	(Morris et al., 1998)
<i>ZmPR5</i> (<i>pathogenicity related</i>)	Induziert bei inkompatibler Interaktion	(Morris et al., 1998)

Da für die 7 verwendeten Kandidatengene noch keine in der Literatur veröffentlichten qRT-Primerpaare existierten, wurden diese erstellt und anschließend getestet. Dies wurde in einer Standard qRT-PCR (siehe → B.4.2.5) mit verschiedenen Matrizen (RNA und genomische DNA) durchgeführt. Eine Kontrolle ohne DNA- bzw. RNA-Matrize (NTC-Kontrolle) diente zur Überprüfung, ob Primer-Dimere entstanden. Die Ergebnisse dieses Primertestes sind in Abbildung 1 dargestellt.

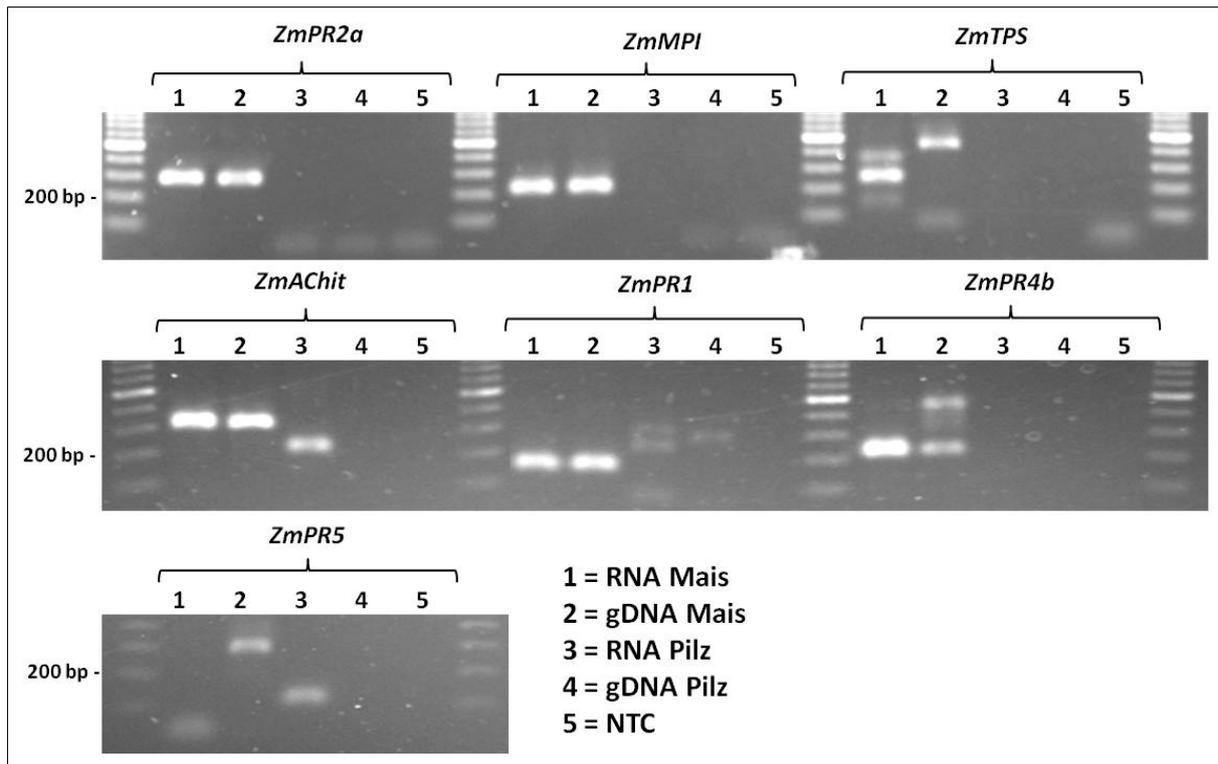


Abbildung 1: Spezifität der verwendeten qRT-Primer. Gesamtzyklenzahl der qRT-PCR betrug 50. Je 2 µl der Reaktion wurden in einem 2%igem NaBorat-Gel bei 300 V für 15 min aufgetrennt. Verwendete Pilz-DNA bzw. RNA wurde aus Myzel einer 7 d alten CM-Flüssigkultur isoliert. Verwendete Pflanzen-DNA bzw. RNA stammt aus Blatt Nr.3 einer 14 d alten nicht infizierten Maispflanze.

Die meisten verwendeten Primer zeigten keine Kreuzreaktion mit pilzlicher DNA bzw. RNA. Bei den Genen *ZmACHit*, *ZmPR1* und *ZmPR5* traten die Kreuzprodukte erst nach dem 40igsten Zyklus auf und wurden nicht gebildet, sobald pflanzliche RNA als Matrize vorhanden war. Bei den Primerpaaren für die Gene *ZmPR2a*, *ZmMPI* und *ZmTPS* traten Primer-Dimere in der NTC-Kontrolle auf. Bei Anwesenheit einer pflanzlichen Matrize konnten diese Dimere nicht nachgewiesen werden. Die Entstehung der multiplen Banden bei der pflanzlichen RNA-Probe von *ZmTPS* kann durch alternativ gespleißte mRNAs erklärt werden, da dieses Gen mindestens 14 Introns besitzt und die Struktur der nativen mRNA nicht eindeutig geklärt ist. Das erwartete Fragment von *ZmTPS* ist das am stärksten amplifizierte mittlere Fragment. Die Primerpaare für die Referenzgene von *Zea mays* und *C. graminicola* wurden hier nicht mehr getestet, da deren Funktionalität aus der Literatur bekannt ist (Krijger et al., 2008; Behr et al., 2010).

In Abbildung 2 sind die Ergebnisse der qRT-PCR der ausgewählten pflanzlichen Kandidatengene zu sehen.

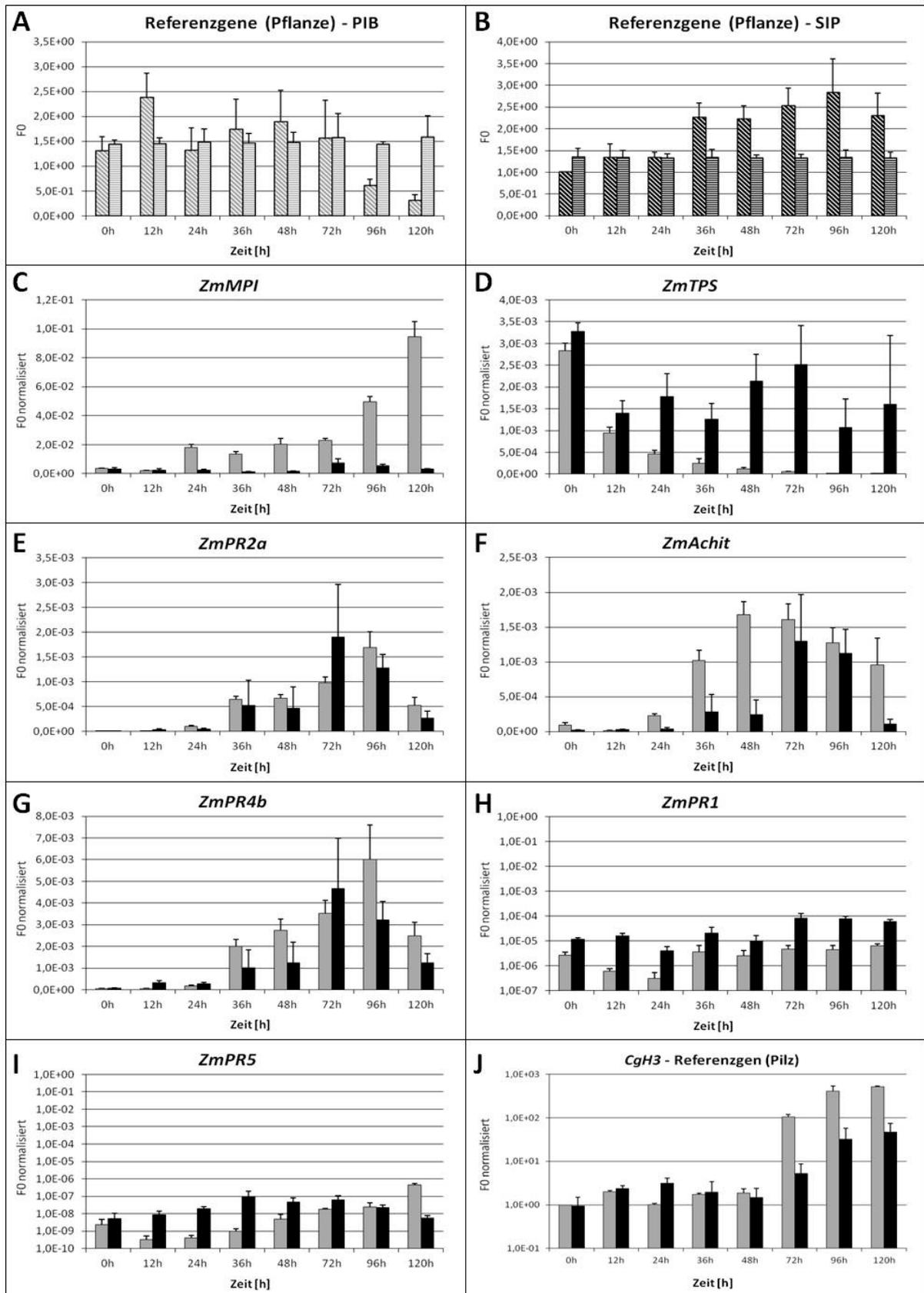


Abbildung 2: Expression pflanzlicher Abwehrgene nach Punktinokulation von Blattsegmenten (PIB) und Sprühinokulation intakter Pflanzen (SIP). Gemessen wurden für SIP 3 biologische Wiederholungen, wobei pro Zeitpunkt 6 Blätter vereinigt wurden. Inokuliert wurde jede Pflanze mit 2 ml einer Konidiensuspension (10⁶ Konidien/ml). Bei PIB wurden ebenfalls 3 biologische Wiederholungen gemessen, wobei pro Zeitpunkt 8 Inokulationspunkte mit einem 8 mm Korkbohrer ausgestochen und vereinigt wurden. Inokuliert wurde mit 10⁴

Konidien. Für beide Methoden wurde die dritte Blattetage einer 2 Wochen alten Maispflanzen der Sorte Mikado verwendet. **(A-B)** Mittelwerte der absoluten Transkriptmengen der 3 Referenzgene vor der Normalisierung (diagonal schraffiert) und nach der Normalisierung (waagrecht schraffiert) bei PIB und SIP. **(C-I)** absolute, normalisierte Transkriptmengen der pflanzlichen Kandidatengene im Vergleich von PIB (graue Balken) und SIP (schwarze Balken). **(J)** Referenzgen CgH3 von *C. graminicola*. Bei den Abbildungen H, I und J ist die Y-Achse zur besseren Darstellung logarithmiert worden.

Um zu erfassen, ob es sich bei den gemessenen Werten um eine spezifische Veränderung der Transkriptmengen als Folge der Infektion durch *C. graminicola* handelte, und nicht um eine systemische Veränderung der Transkriptgehalte, wurden zusätzlich drei Referenzgene (*ZmTubA*, *ZmTubG* und *ZmH2B*) gemessen. Die Abbildungen 2A und 2B zeigen den Mittelwert der 3 Referenzgene vor und nach der Normalisierung. Für die Kandidatengene sind nur die normalisierten Werte gezeigt (Abb. 2C-I). Die induzierte Verwundung durch das Abschneiden der Blätter ließ die Transkriptmenge von *ZmMPI* (Abb. 2C) von 0 hpi bis 120 hpi um das 30fache ansteigen. Im Gegensatz dazu zeigen die intakten Pflanzen einen maximalen Anstieg um das 2fache. Die Transkriptgehalte von *ZmTPS* in inokulierten Blattsegmenten nahmen über die Zeit kontinuierlich ab und waren bei 120 hpi kaum noch messbar (Abb. 2D). Im Vergleich dazu zeigten die intakten Pflanzen relativ konstante Transkriptgehalte für *ZmTPS* während des gesamten Versuchszeitraumes. Der zeitliche Verlauf der Transkriptgehalte von *ZmPR2a*, *ZmAChit* und *ZmPR4b* (Abb. 2E-G) war in beiden Inokulationssystemen ähnlich. Ab dem Zeitpunkt 24 hpi – 36 hpi kam es zum Anstieg der Transkriptgehalte, welche ihren Höhepunkt bei 72hpi – 96 hpi hatte und bis 120 hpi wieder absank. Im Falle des Genes *ZmPR1* (Abb. 2H) kommt es bei beiden Inokulationsmethoden zu einer 15fachen Erhöhung der Transkriptmenge von 0 hpi bis 120 hpi. Die absolute Menge ist im Falle der intakten Pflanzen deutlich höher als die der Blattsegmente. Die Transkription des Genes *ZmPR5* (Abb. 2I) zeigte geringe Unterschiede zwischen den beiden Inokulationssystemen. Es soll aber erwähnt werden, dass die absoluten Mengen der Transkriptgehalte von *ZmPR5* mit einem durchschnittlichen FO von 10^{-8} extrem gering waren und sich daraus hohe Meßschwankungen ergaben. Um die beiden Inokulationen bezüglich der Pilzentwicklung vergleichen zu können, wurde auch das pilzliche Gen (*CgH3*) gemessen. Es zeigte sich, dass es bis 48 hpi zu keiner eindeutigen Erhöhung dieses Referenzgenes kam. Erst mit dem Übergang in die nekrotrophe Phase, ab 72 hpi, und der damit verbundenen Vermehrung der Biomasse kam es zu einer Erhöhung der Transkriptmenge von *CgH3*. Dieser Anstieg war bei den Blattsegmenten stärker ausgeprägt als bei den intakten Pflanzen.

C.2. Identifizierung und Charakterisierung von Virulenzgenen

In den nachfolgenden Kapiteln werden die verschiedenen Ansätze, welche zur Identifizierung der Kandidatengene verwendet wurden, separat erklärt. Die Deletion einzelner bzw. mehrerer ausgewählter Kandidatengene und die anschließende Charakterisierung der erhaltenen Transformanten umfasste immer die homologe Integration einer Resistenzkassette am betreffenden genomischen Locus, sowie die Kontrolle der Integration der Deletionskassette durch PCR und Southern-Hybridisierung und die abschließende Überprüfung der Pathogenitäts- bzw. Virulenzeigenschaften der jeweiligen Transformanten im Vergleich zum Wildtypisolat. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für jedes Kandidatengen jeweils einzeln im Anhang (siehe → G.1) zusammengestellt.

C.2.1. Deletionsmutagenese von YSST-Kandidatengenen

Der erste Ansatz zur Bestimmung sekretierter Proteine von *C. graminicola* war der „Yeast-Secretion-Signal-Trap“. Dieses *Screening*-System macht sich die Eigenschaften des Signalpeptides zu Nutze, indem es ein intrazelluläres Markerprotein (Invertase aus *S. cerevisiae* = Suc2p, ohne SP), durch Fusion mit einem funktionsfähigen Signalpeptid, zur Sekretion befähigt und zum Überleben transformierter Hefekolonien auf Saccharose führt. Die Methode des YSST wurde an einer cDNA-Bibliothek von *C. graminicola* durchgeführt (Krijger et al., 2008). Die RNA für die Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde aus Myzel isoliert, welches *in vitro* in einem Flüssigmedium mit Mais-Zellwänden und Mais- Blattextrakten gewachsen war. Die Plasmide von 740 Hefeklonen wurden sequenziert und analysiert. Insgesamt wurden 103 Einzelgene mit Signalpeptiden gefunden, von denen 50 signifikante Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannter Funktion, 25 Ähnlichkeiten zu Proteinen unbekannter Funktionen und 28 keine Ähnlichkeiten mit Proteinen aus der NCBI Datenbank zeigten. Mit Hilfe von Macroarray-Hybridisierungen und zum Teil auch mit qRT-PCRs wurde gezeigt, dass alle 103 Einzelgene während der Infektion auf bzw. in der Pflanze transkribiert werden. Die einzelnen Gene konnten identifiziert werden, da die im YSST-Vektor eingebaute cDNA nicht nur die Information des Signalpeptides enthalten hat, sondern auch die darauf folgende DNA-Sequenz des zum Signalpeptides gehörenden Genes.

Die bis dato charakterisierten YSST-Gene sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Auswahl der Kandidatengene richtete sich vor allem nach Proteinen mit bekannter enzymatischer Funktion oder kleinen, Cystein-reichen Proteinen mit unbekannter Funktion. Der Vollständigkeit wegen sind nicht nur die Gene gelistet, die während der vorliegenden Dissertation einer Deletionsanalyse unterzogen wurden, sondern auch solche aus vorangegangenen Arbeiten.

Tabelle 2: Liste aller durch Gendeletion untersuchten YSST-Gene. Einzelheiten zu den in dieser Dissertation erzeugten YSST-Kandidaten (grau unterlegt) befinden sich im Anhang G.1.

YSST-Gen	Annotationsnummer	Beschreibung	Morphologie	Pathogenität	Bearbeitet von
<i>Cg878</i>	GLRG_10074	Hydrophobin Klasse II	wie WT	wie WT	R.Horbach (Dissertation)
<i>Cg908</i>	GLRG_08638	Laccase 2	wie WT	wie WT	F.Weihmann (Dissertation)
<i>Cg914</i>	GLRG_05336	8x Cys	wie WT	wie WT	R.Horbach (Dissertation)
<i>Cg1135</i>	GLRG_01006	8x Cys (CFEM)	wie WT	wie WT	R.Horbach (Dissertation)
<i>Cg152</i>	GLRG_11367	Rhamnogalacturan Acetylerase	wie WT	wie WT	F.Weihmann (Diplomarbeit)
<i>Cg869</i>	GLRG_05284	Hypothetisches Protein	wie WT	wie WT	F.Weihmann (Diplomarbeit)
<i>Cg1094</i>	GLRG_06317	Lustrin-ähnlich	wie WT	wie WT	F.Weihmann (Diplomarbeit)
<i>Cg1146</i>	GLRG_03376	Laccase 1	wie WT	wie WT	F.Weihmann (Diplomarbeit)
<i>Cg1204</i>	GLRG_10982	Peptidase M28	wie WT	wie WT	F.Weihmann (Diplomarbeit)
<i>Cg130</i>	GLRG_01704	klein, 8x Cys	wie WT	wie WT	C.Kröling (Diplomarbeit)
<i>Cg848</i>	GLRG_01439	klein, 8x Cys	wie WT	wie WT	C.Kröling (Diplomarbeit)
<i>Cg1031</i>	GLRG_05029	klein, 8x Cys	wie WT	wie WT	C.Kröling (Diplomarbeit)
<i>Cg1033</i>	GLRG_02090	klein, 8x Cys	wie WT	wie WT	C.Kröling (Diplomarbeit)
<i>Cg1124</i>	GLRG_02462	klein, 8x Cys (CFEM)	wie WT	wie WT	C.Kröling (Diplomarbeit)
<i>Cg1207</i>	GLRG_10167	klein, 8x Cys (CFEM?)	wie WT	wie WT	C.Kröling (Diplomarbeit)
<i>Cg1088</i>	GLRG_00821	Peptidase	wie WT	wie WT	E.O.Garcia
<i>Cg1049</i>	GLRG_05667	klein, 8x Cys	wie WT	wie WT	F.Weihmann (Dissertation)
<i>Cg1091</i>	GLRG_06590	Cerato-Platanin-ähnlich, 4x Cys	wie WT	wie WT	F.Weihmann (Dissertation)
<i>Cg1061</i>	GLRG_00416	Hypothetisches Protein	wie WT	wie WT	F.Weihmann (Dissertation)
Doppel-Deletion <i>Cg908/Cg1146</i>	GLRG_08638/ GLRG_03376	Laccase2/ Laccase1	wie WT	wie WT	F.Weihmann (Dissertation)

Die Deletion der Kandidatengene erfolgte in allen Fällen über homologe Rekombination (Abbildung 3B), wobei die Deletionskassetten mit Hilfe der Double-Joint-PCR (siehe → B.4.2.2) erzeugt wurden, welche wie folgt aufgebaut waren. Je 1000 bp –Flanken upstream und downstream des zu deletierenden ORF des Zielgenes wurden entweder mit dem *nat1* Resistenzgen (Nourseothricin-Acetyltransferase) aus *Streptomyces noursei*, das unter Kontrolle des Promotors oliC aus *Aspergillus nidulans* stand, oder mit dem *hph* Resistenzgen (Hygromycin-Phosphotransferase) aus *Streptomyces hygroscopicus*, das unter Kontrolle des Promotors *gpdA* aus *Aspergillus nidulans* stand, fusioniert

(Abbildung 3A). Das Fusionsprodukt wurde anschließend durch die Methode der Protoplastierung in den Pilz transformiert (siehe → B.4.5).

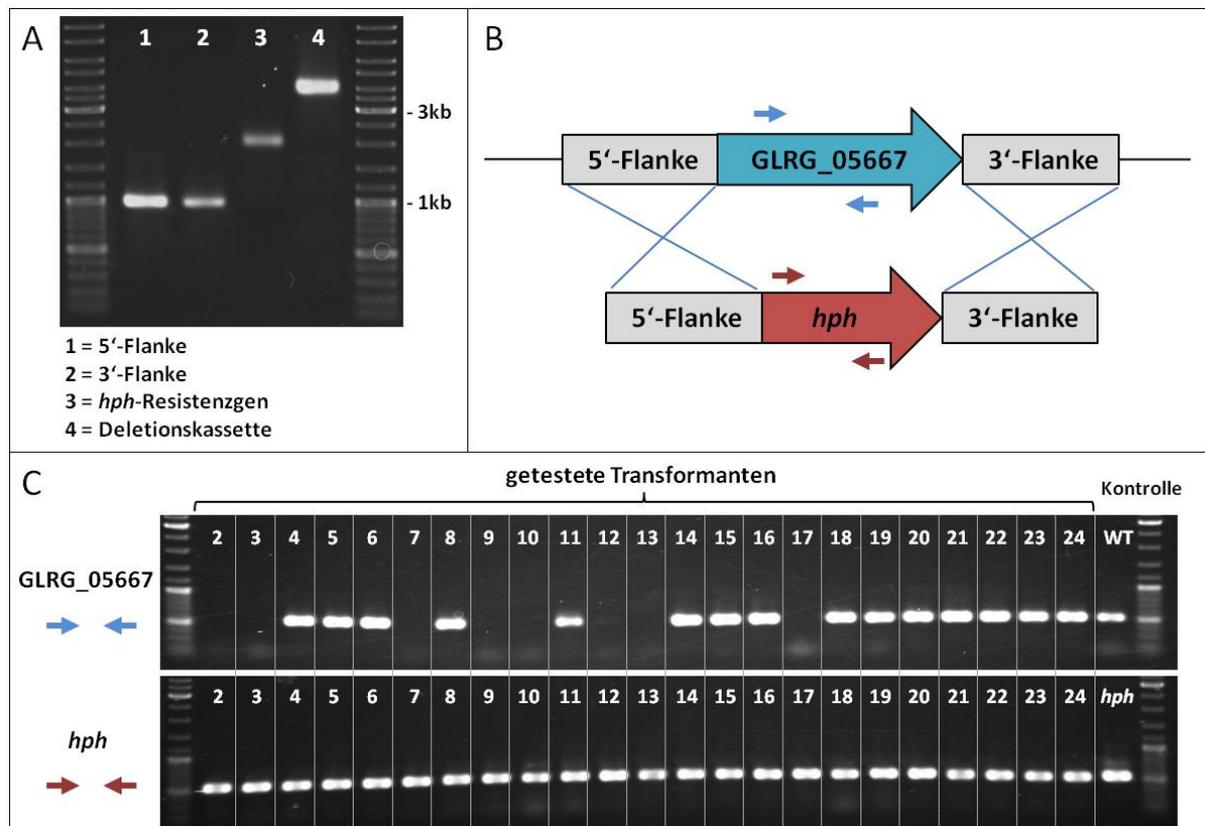


Abbildung 3: Deletionskassette, Integration und Transformantentest am Beispiel des Genes GLRG_05667 (A) Amplifikate der drei Teilreaktionen der Double-Joint-PCRs und die finale Deletionskassette (0,7 % TAE-Gel, 80 V, 60 min). **(B)** Schematische Darstellung der Integration der Deletionskassette über Doppel-Crossover am Wildtyp-Locus im Genom. Blaue und rote Pfeile stellen die verwendeten Primer für die Test-PCR dar. **(C)** Test-PCRs der verschiedenen Transformanten auf Anwesenheit des Wildtypgenes (oberes Gelbild) bzw. der Resistenzkassette (unteres Gelbild), (1,5 % NaBo-Gel, 300 V, 10 min).

Von den erzeugten Transformanten wurden Einzelsporlinien erzeugt, die mit Hilfe von PCR-Reaktionen vorselektiert wurden. Dafür wurde von jeder Transformante die DNA isoliert (siehe → B.4.1.1) und in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen sowohl auf die Anwesenheit des Wildtyp-Genes als auch auf die Anwesenheit der Resistenzkassette getestet (Abbildung 3C). Die anschließende Southern-Blot-Hybridisierung (siehe → B.4.4) wies dann die korrekte singuläre, homologe Integration der Deletionskassette nach. Zur Untersuchung der Pathogenität/Virulenz wurden Infektionsversuche (Punktinokulation von Blattsegmenten) durchgeführt, bei denen immer 3 unabhängige Transformanten mit der entsprechenden Gendeletion mit dem Wildtypisolat verglichen wurden (siehe → G.1). Keiner der in Tabelle 2 aufgeführten Gendeletionen führte zu klaren Unterschieden der Pathogenität bzw. Virulenz. Es waren auch keine qualitativen morphologischen (Farbe; Form der

Konidien und Hyphen; Ausbildung von Infektionsstrukturen; Wachstum) Unterschiede zwischen den Transformanten und dem Wildtypisolat zu dokumentieren.

C.2.2. Ableitung des Sekretoms von *C. graminicola* durch Bioinformatik

Neben experimentellen Ansätzen wie dem YSST bestand auch die Möglichkeit, sekretierte Proteine durch bioinformatische Ansätze zu bestimmen. Die Funktionsweise von Signalpeptiden ergibt sich aus ihrem Aufbau aus drei Elementen. Das Signalpeptid beginnt mit der N-Region, welche als aminoterminal polare Region vorrangig aus positiv geladenen Aminosäuren besteht. Es folgt die H-Region, die sich ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren zusammensetzt, und schließlich die carboxyterminale C-Region, welche die Schnittstelle für die Signalpeptidase trägt (von Heijne, 1990). Eine Konservierung bestimmter Aminosäuren in Signalpeptiden ist nicht zu erkennen, da ihre Funktion durch viele Aminosäuren vermittelt wird. Bestimmte Bioinformatik-Programme, wie TargetP (Emanuelsson et al., 2000) und SignalP (Petersen et al., 2011), berechnen die Wahrscheinlichkeit, ob in einem Protein N-terminal gelegene Peptidsequenzen die oben geschilderten Elemente besitzen.

Mit der Veröffentlichung der Genomsequenzierung im Juni 2009 und der daraus resultierenden Genomannotation im September 2010 wurde es möglich, sekretierte Proteine mit Hilfe der Bioinformatik zu identifizieren. Der erste Schritt war die Bestimmung des Sekretoms (Gesamtheit aller sekretierten Proteine) innerhalb des Proteoms (Gesamtheit aller Proteine) von *C. graminicola*. Gemäß der ersten Annotation besteht das Proteom von *C. graminicola* aus 12006 Proteinen. Diese Proteine wurden mit den Programmen SignalP2, SignalP3 und TargetP auf die Anwesenheit von Signalpeptiden überprüft. Die Kombination dieser drei Programme erhöht die Wahrscheinlichkeit für das tatsächliche Vorhandensein eines funktionellen Signalpeptides (Klee and Ellis, 2005). Es ergab sich eine Sekretomgröße von 1780 Proteinen (14,8 % des Proteoms). Vergleicht man dieses *in silico* bestimmte Sekretom mit der Kandidatenliste des YSST-Ansatzes, so findet man 94 der 103 YSST-Gene innerhalb des theoretisch abgeleiteten Sekretoms. Da mit dem YSST der Nachweis von funktionellen Signalpeptiden erbracht wurde und eine 92%ige Übereinstimmung der beiden Listen vorlag, ist davon auszugehen, dass die *in silico* Bestimmung des Sekretoms zuverlässig erfolgte. Innerhalb des so ermittelten Sekretoms wurden im Folgenden mit drei verschiedenen Ansätzen neue Kandidatengene abgeleitet, um sie durch Gendelektion funktionell zu untersuchen.

C.2.3. Gencluster für sekretierte Proteine

C.2.3.1. Identifizierung der Gencluster durch Bioinformatik

Das zuvor abgeleitete Sekretom wurde daraufhin untersucht, ob die entsprechenden Genloci linear hintereinander auf den Chromosomen angeordnet sind. Ein solcher Befund wurde zuvor vom Erreger des Maisbeulenbrandes *Ustilago maydis* berichtet. In diesem biotrophen Basidiomyzeten sind annähernd 20 % aller Gene des Sekretomes in 12 Genclustern angeordnet (Kaemper et al., 2006). Die Anzahl der Gene in diesen Clustern variierte dabei von 3 bis zu 19 Genen. Die Deletion der 12 vorhandenen Cluster führte in fünf Fällen zu einer veränderten Virulenz, wobei die Symptome völlige Apathogenität, verringerte und erhöhte Virulenz umfassten (Kaemper et al., 2006).

Die Identifizierung von Clustern in *C. graminicola* erfolgte über den Vergleich der Annotationsnummern der Proteine des Sekretoms. Proteine mit aufeinanderfolgenden Annotationsnummern entsprechen, in der Regel, colinearen Genen. Da die Reihenfolge mit der alle 12006 Gene bzw. Proteine numeriert worden sind, aber nicht gleichzusetzen ist mit der Anordnung der Gene auf den Chromosomen 1 bis 13, musste an einigen Stellen darauf geachtet werden, dass innerhalb eines Genclusters kein Chromosomensprung stattfand. Unter der Voraussetzung, dass ein Cluster mindestens drei solcher hintereinander liegender Gene auf demselben Chromosom enthalten muss, wurden 102 Cluster mit einer Gesamtzahl von 328 Genen identifiziert. Innerhalb der Cluster wurde unterschieden zwischen solchen, welche ausschließlich sekretierte Proteine kodieren und solchen, die zusätzlich ein Gen ohne Signalpeptid enthielten.

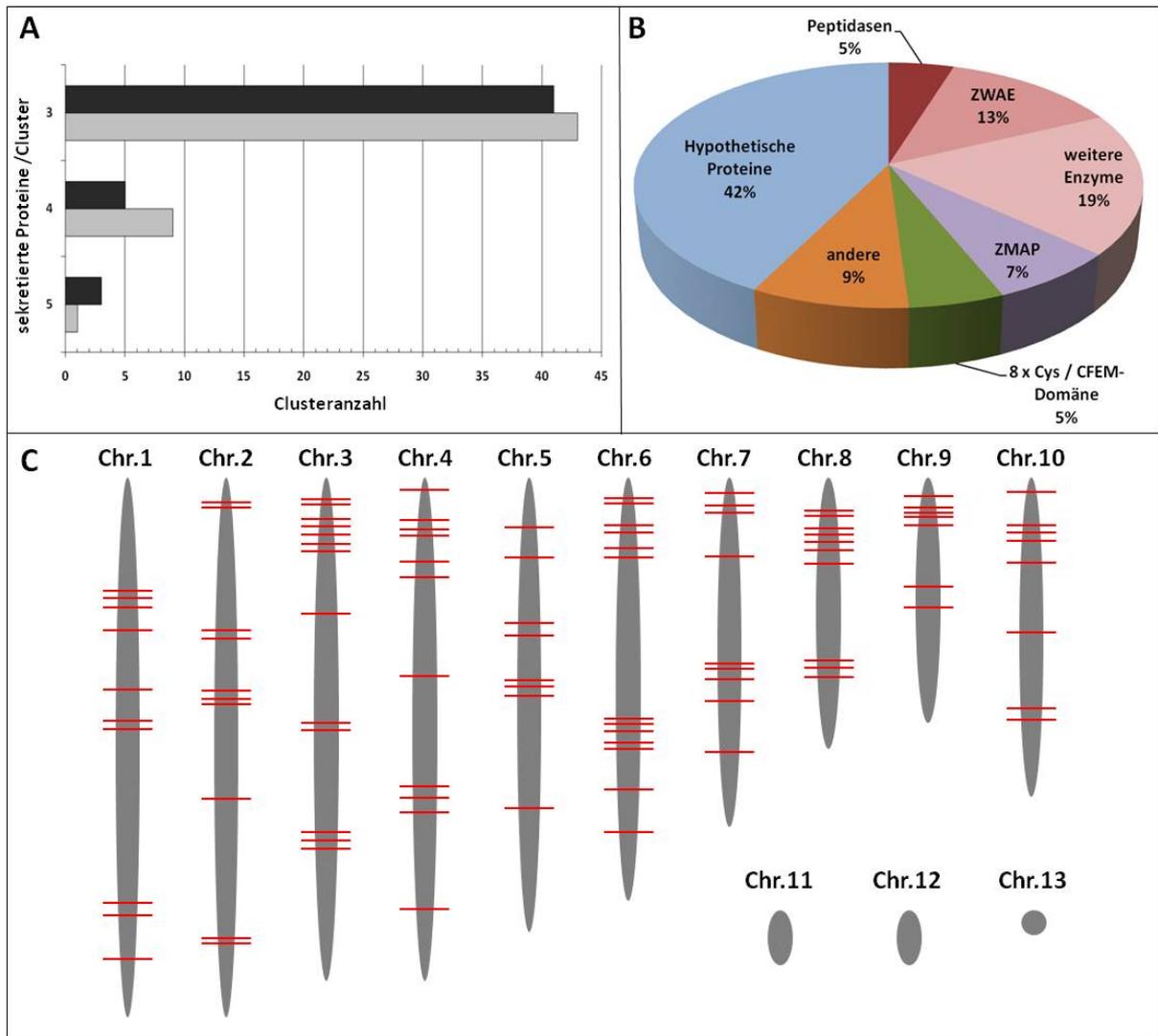


Abbildung 4: Cluster sekretierter Proteine (A) Gesamtanzahl verschiedener Clustergrößen im Genom von *C. graminicola*. Cluster, welche ausschließlich sekretierte Proteine enthalten, sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Cluster, welche maximal 1 nicht sekretiertes Proteine enthalten, sind durch graue Balken gekennzeichnet **(B)** Verteilung verschiedener Proteinklassen innerhalb der 328 Clusterproteine. ZWAE = Zellwand abbauende Enzyme, ZMAP = Zellwand und Membran assoziierte Proteine. **(C)** Verteilung der Cluster innerhalb der 13 Chromosomen von *C. graminicola*. Rote Striche kennzeichnen die relative Position eines Clusters auf dem Chromosom.

Die meisten gemäß dieser Kriterien gefundenen Cluster genügen der Minimalanforderung, d. h. sie bestehen aus genau drei Genen (Abbildung 4 A). In nur wenigen Fällen enthalten sie mehr Gene für sekretierte Proteine. Maximal umfassten diese Cluster fünf Gene. Unter den 328 von solchen Clustern codierten Proteinen gibt es einen relativ hohen Anteil putativer Enzyme ($\approx 38\%$), darunter viele Peptidasen und Zellwand-abbauende Enzyme (Abbildung 4 B). Neben Enzymen kamen auch Zellwand bzw. Plasmamembran assoziierte Proteine (7%), kleine Cysteinreiche Proteine mit und ohne CFEM-Domäne (5%) und Proteine anderer Funktionen (9%) vor. Die größte Gruppe stellten jedoch Proteine mit unbekannter Funktion bzw. fehlendem Datenbankvergleich, die hier als Hypothetische Proteine (42%) zusammengefasst wurden. Die Lokalisation der gefundenen Cluster im

Genom zeigt eine zufällige Verteilung auf den Chromosomen 1 bis 10. Die Chromosomen 11, 12 und 13 beinhalten keine der gefundenen Cluster (Abbildung 4 C).

C.2.3.2. Deletionsmutagenese und Charakterisierung ausgewählter Gencluster

Für die Auswahl der zu bearbeitenden Cluster wurden verschiedenen Kriterien zu Grunde gelegt. Da *C. graminicola* nur eine geringe Anzahl an größeren Genclustern aufweist und die Wahrscheinlichkeit bei der Deletion mehrerer Gene einen Phänotyp zu finden am höchsten ist, wurden bewusst größere Cluster ausgewählt. Dies traf bei Cluster 1 (5 Gene), Cluster 3 (4 Gene) und Cluster 5 (11 Gene) zu. Cluster 5 stellt eine Besonderheit dar, da es sich eigentlich um zwei einzelne Cluster mit jeweils 4 sekretierten Proteinen handelt, welche durch 3 nicht sekretierte Proteine getrennt werden. Die anderen hier untersuchten Cluster kodierten Proteine, von denen mindestens jeweils eines Homologe in anderen pathogenen Pilzen besaß, die bereits als Effektoren beschrieben waren. Dies betraf die Cluster 2 (3 Gene), 4 (4 Gene) und 6 (5 Gene). In Tabelle 3 sind alle charakterisierten Cluster aufgeführt.

Tabelle 3: Liste aller durch Gendeletion untersuchten Gencluster. Einzelheiten zu den in dieser Dissertation erzeugten Deletionsmutanten befinden sich im Anhang G.1. 5A, 5B und 5C bezeichnen die einzelnen Teile des gesamten Cluster 5. Clustergene, bei denen die homologen Proteinen bereits als Effektoren beschrieben waren und somit als Auswahlkriterium dienen sind mit einem Zitat versehen.

Cluster nummer	Größe	Annotations nummer	Beschreibung	Signal peptid	Pathogenität	
1	14 kb	GLRG_01791	hypothetisches Protein	ja	wie WT	
		GLRG_01792	Glucose Sorbosone Dehydrogenase	ja		
		GLRG_01793	hypothetisches Protein	ja		
		GLRG_01794	hypothetisches Protein	ja		
		GLRG_01795	GDSL-ähnliche Lipase/Acylhydrolase	ja		
2	5 kb	GLRG_06284	Biotrophie-assoziiertes sekretiertes Protein 2 (Mosquera et al., 2009)	ja	wie WT	
		GLRG_06285	Peptidase Familie M28	ja		
		GLRG_06286	Metalloprotease	ja		
3	13 kb	GLRG_08160	hypothetisches Protein	ja	wie WT	
		GLRG_08161	hypothetisches Protein	ja		
		GLRG_08162	hypothetisches Protein	ja		
		GLRG_08163	hypothetisches Protein	ja		
4	23 kb	GLRG_03571	hypothetisches Protein	ja	wie WT	
		GLRG_03572	putatives Zink-Finger Protein (Bignell et al., 2005)	nein		
		GLRG_03573	hypothetisches Protein	ja		
		GLRG_03574	Protein Disulphide Isomerase	ja		
5	5A	16 kb	GLRG_01061	GMC Oxidoreductase	ja	wie WT
			GLRG_01062	GMC Oxidoreductase	ja	
			GLRG_01063	hypothetisches Protein	ja	
			GLRG_01064	Integrales Membran Protein DUF6	ja	
	5B	5 kb	GLRG_01065	hypothetisches Protein	nein	wie WT
			GLRG_01066	ATP-NAD Kinase	nein	
			GLRG_01067	hypothetisches Protein	nein	
	5C	9 kb	GLRG_01068	FAD Binde-Domäne enthaltendes Protein	ja	wie WT
			GLRG_01069	hypothetisches Protein	ja	
			GLRG_01070	FAD Binde-Domäne enthaltendes Protein	ja	
GLRG_01071			Endonuclease/Exonuclease	ja		
6	23 kb	GLRG_04686	hypothetisches Protein (Saitoh et al., 2012)	ja	stark reduzierte Virulenz	
		GLRG_04687	hypothetisches Protein	ja		
		GLRG_04688	S1/P1 Nuklease	ja		
		GLRG_04689	hypothetisches Protein	ja		
		GLRG_04690	hypothetisches Protein	ja		

Die Deletion und Charakterisierung dieser Gencluster erfolgte analog zum Vorgehen wie es bei den YSST-Kandidaten beschrieben worden ist (siehe → C.2.1). Im Anhang befindet sich eine Übersicht der erhaltenen Deletionsmutanten in Form von Datenblättern (siehe → G.1).

Cluster 1 – 4

Die Deletionsmutanten der Cluster 1, 2 und 4 zeigten keine qualitativen Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und des vegetativen Wachstums im Vergleich zum Wildtypisolat (siehe → G.4). Auch im Bezug auf die pathogenen Eigenschaften der einzelnen Cluster-Deletionsmutanten zeigten sich keine erkennbaren Unterschiede im Vergleich mit dem Wildtypisolat (siehe → G.1). Die Deletionsmutanten des Cluster 3 zeigten im Vergleich mit dem Wildtypisolat eine signifikante Erhöhung der täglichen Wachstumsrate auf den Kohlenstoffquellen Glucose und Saccharose, aber nicht auf der Kohlenstoffquelle Malat. Auswirkungen auf das Verhalten während der Pathogenese der Deletionsmutanten von Cluster 3, wie z. B. ein verstärktes bzw. schnelleres Auftreten von Symptomen im Vergleich mit dem Wildtypisolat, konnte nicht gezeigt werden (siehe → G.1).

Cluster 5

Der Versuch den gesamten Cluster 5 zu deletieren, der 11 Gene enthält, führte zu 60 getesteten Transformanten, von denen keine eine homologe Integration der Deletionskassette aufwies. Dies wurde als ein Hinweis dafür gewertet, dass eines der Gene dieses Clusters eine wichtige Funktion kodieren könnte, deren Verlust lethal wäre. Um dies genauer zu untersuchen wurde der Cluster in 3 Teile aufgeteilt (5A, 5B, 5C) und diese einzeln deletiert (Tabelle 3). Deletionsmutanten für den Cluster 5A wuchsen auf PDA-Platten mit dem Antibiotikum Nourseothricin nur sehr langsam (Abbildung 5), obwohl sie das *nati*-Resistenzgen integriert hatten. Auf Medien ohne Nourseothricin und in den Infektionstests zur Erfassung der Virulenz zeigten die Deletionsmutanten für den Cluster 5A allerdings keine Unterschiede zum Wildtypisolat. Auch das axenische Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen der Cluster 5A Mutanten war mit dem des Wildtypisolates vergleichbar (siehe → G.4). Die Deletionsmutanten für den Clusters 5B hingegen zeigten ein stark verlangsamtes vegetatives Wachstum, unabhängig von der Anwesenheit des Antibiotikums. Überraschenderweise zeigten diese Transformanten keinen Virulenzverlust im Vergleich zum Wildtypisolat (siehe → G.1). Die Deletionsmutanten für den Cluster 5C zeigten keine Abweichungen hinsichtlich Morphologie, vegetativem Wachstum und Virulenz im Vergleich mit dem Wildtypisolat. Vermutlich war es nicht möglich, Transformanten mit einer Deletion des gesamten Clusters 5 zu gewinnen, weil sich die bei den Deletionsmutanten der Cluster 5A und 5B beobachteten Wachstumsdefekte additiv oder gar synergistisch auswirken und somit etwaige Deletionsmutanten

nicht oder nur sehr langsam anwuchsen, wodurch sie von Transformanten mit ektopischen Integrationen auf den Selektionsplatten überwuchert wurden. Auf Basis der Virulenzbestimmung durch Punktinokulation von Blattsegmenten haben die in Cluster 5 codierten Gene vermutlich keine entscheidende Bedeutung für die Pathogenese von *C. graminicola*, da die Deletionen der drei Teil-Cluster keine Effekte zeigten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise synergistische Effekte vorliegen, die zu einem anderen Ergebnis führen würden.

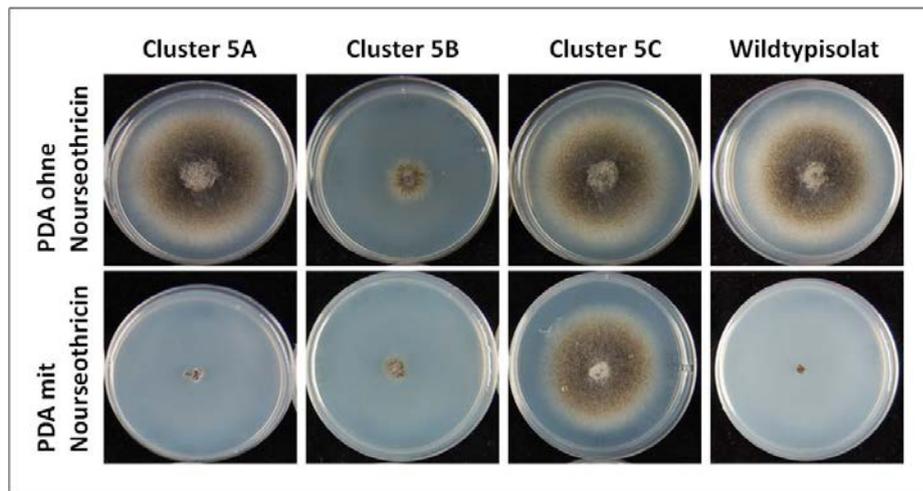


Abbildung 5: Wachstum von Transformanten mit Teildeletionen des Clusters 5. Es ist je eine repräsentative Deletionsmutante für die Cluster 5A, 5B, 5C sowie das Wildtypisolat gezeigt. Die Konzentration des Nourseothricins betrug in den Platten der unteren Reihe 100 µg/ml. Die Dokumentation erfolgte nach 6 d. PDA = potato dextrose agar.

Cluster 6

Übersicht des genomischen Lokus und Transkriptionsverhalten während der Pathogenese

Dieser Cluster besteht aus 5 Genen, welche ausschließlich für putative sekretierte Proteine kodieren. Abbildung 6 zeigt ein Schema des genomischen Lokus von Cluster 6 mit den flankierenden Genen und für jedes Gen das spezifische Transkriptionsmuster während der Infektion. Vergleicht man die publizierten Transkriptgehalte der Gene innerhalb des Clusters bzw. mit denen der flankierenden Gene während der drei Infektionsphasen (O'Connell et al., 2012), so ist kein einheitliches Muster zu erkennen. Die Gene GLRG_04686 und GLRG_04688 zeigen während der Phase der Appressorienbildung und der nekrotrophen Phase die höchste Transkriptmenge. Die Gene GLRG_04687 und GLRG_04690 scheinen am Beginn der Infektion erhöht transkribiert zu werden und fallen dann auf ein gleichbleibendes Niveau ab. Das Gen GLRG_04689 weist die größte Transkriptabundanz aller in Abb. 6 gezeigten Gene auf und belegt Platz 83 bei der Gesamttranskriptmenge aller 3 Phasen, bezogen auf das gesamte Transkriptom (12006 Gene). Während der Infektion fällt die Transkriptmenge von der Appressorienbildung und Penetration über die biotrophe Phase hin zur nekrotrophen Phase stetig ab.

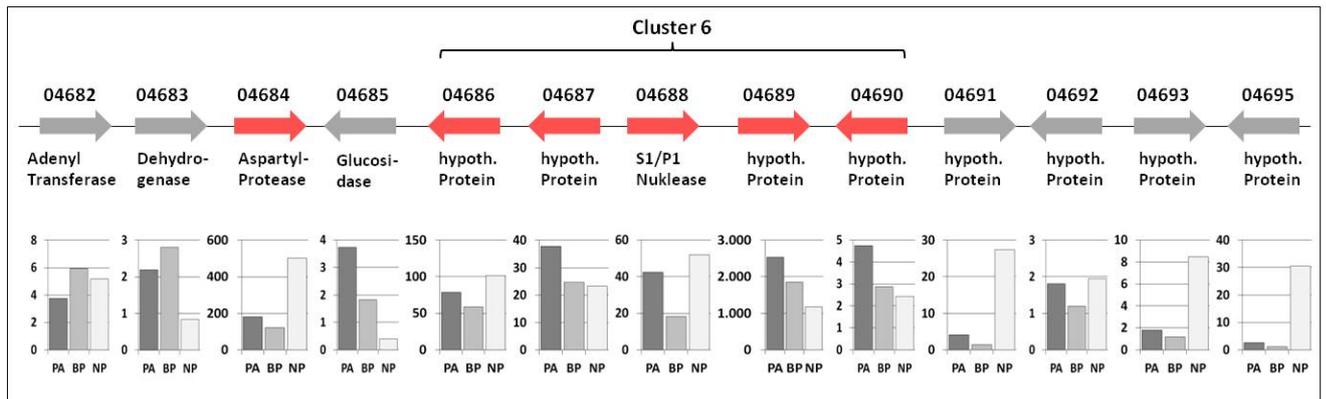


Abbildung 6: Schema des genomischen Lokus von Cluster 6 mit genspezifischen Transkriptionsmustern.

Dargestellt ist die Orientierung der einzelnen Gene auf dem Chromosom Nr. 8 durch die Pfeilrichtung sowie das Vorhandensein eines putativen Signalpeptids (rote Pfeile) bzw. die Abwesenheit (graue Pfeile). Die Säulendiagramme zeigen für jedes dargestellte Gen die absoluten Transkriptgehalte, die zu drei charakteristischen Zeiten der Pathogenese gemessen wurden (O'Connell et al., 2012). Die Y-Achse zeigt die gemessene Häufigkeit der jeweiligen Transkripte nach Normalisierung. PA = Appressorien auf Pflanzen (24 hpi), BP = biotrophe Phase (36 hpi), NP = nekrotrophe Phase (60 hpi).

Charakterisierung der Pathogenese

Die Deletion des gesamten genomischen Bereiches von Cluster 6 erzeugte eine extrem reduzierte Symptomatik bei drei unabhängigen Mutanten (Abbildung 7B). Da bei der Wahl des zu deletierenden Clusters die Homologie von GLRG_04686 zu dem bekannten Virulenzfaktor MC69 aus *Magnaporthe oryzae* eine Rolle spielte (Saitoh et al., 2012), sollte in einem weiteren Deletionsansatz geklärt werden, ob die Deletion dieses Gen alleine für das Ausbleiben der Infektion verantwortlich ist. Dafür wurden sowohl Mutanten mit einer Einzeldelation von GLRG_04686 erzeugt, als auch Mutanten bei denen die verbliebenen vier Gene des ursprünglichen Clusters 6 deletiert wurden (Abbildung 7A, Δ Cluster 6B).

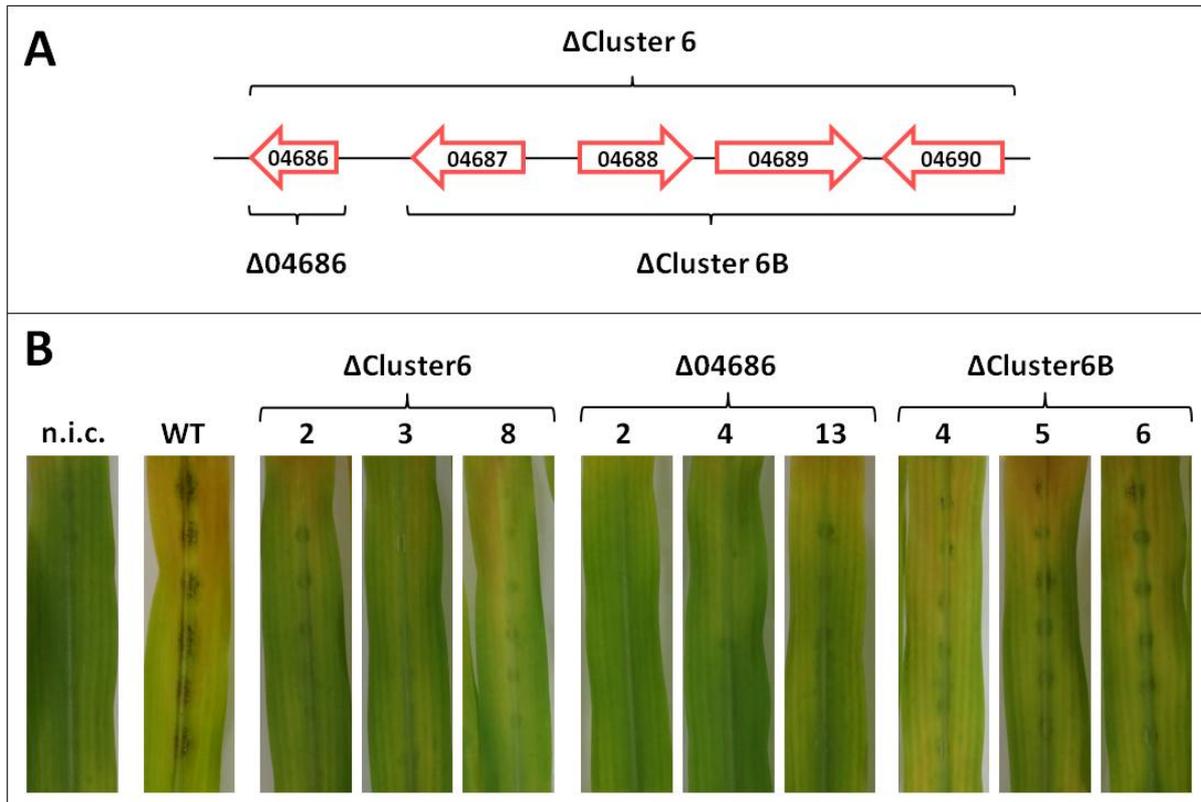


Abbildung 7: Blattsegment-Virulenztest der Deletionsmutanten von Δ Cluster6, Δ 04686 und Δ Cluster6B. (A) Schematische Darstellung der in den verschiedenen Deletionen betroffenen Gene. **(B)** Punktinokulation von Blattsegmenten mit den Deletionsstämmen, dem Wildtypisolat (WT) und einer nicht inokulierten Kontrolle (n.i.c.). Inokulation erfolgte mit 10 μ l Tropfen einer Konidien suspension (10⁶ Konidien/ml). Dokumentation erfolgte nach 5 dpi.

Die Symptomatik der Mutanten mit einer Einzeldelation von GLRG_04686 entspricht exakt dem der Mutanten, bei denen der gesamte Cluster 6 deletiert wurde. In beiden Fällen sind kaum sichtbare Infektionsstellen auf den Blättern zu erkennen. Überraschenderweise zeigten auch die Mutanten des Clusters 6B eine reduzierte Virulenz im Vergleich zum Wildtypisolat CgM2. Um nun zu klären, ob die reduzierte Virulenz der Δ Cluster6B-Mutanten auf das Fehlen von nur einem oder mehrerer Gene beruht, wurden Einzeldelation aller vier im Cluster 6B enthaltenen Gene erzeugt und die erhaltenen Mutanten anschließend auf ihre Virulenz hin untersucht (Abbildung 8).

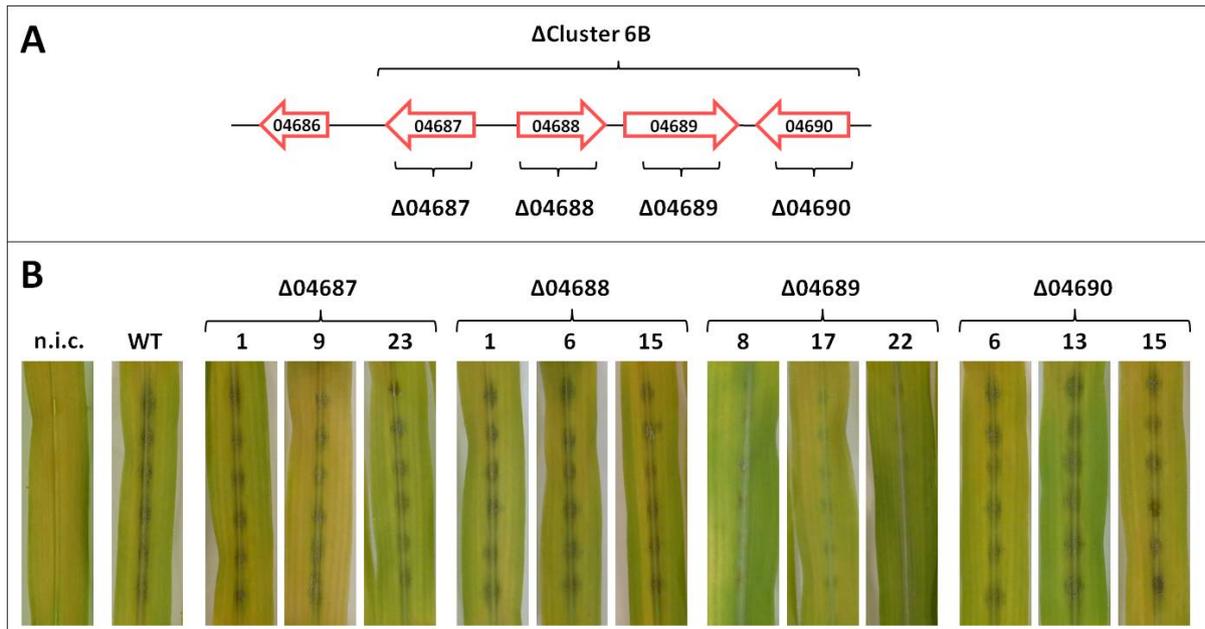


Abbildung 8: Blattsegment-Virulenztest der Deletionsmutanten von $\Delta 04687$, $\Delta 04688$, $\Delta 04689$ und $\Delta 04690$. (A) Schematische Darstellung der in den verschiedenen Deletionen betroffenen Gene. (B) Punktinokulation von Blattsegmenten mit den Deletionsmutanten, dem Wildtypisolates (WT) und einer nicht inokulierten Kontrolle (n.i.c.). Inokulation erfolgte mit 10 μ l Tropfen einer Konidiensuspension (10^6 Konidien/ml). Dokumentation erfolgte nach 5 dpi.

Die Mutanten mit den Einzeldelationen der Gene GLRG_04687, 04688 und 04690 sind bei der Ausprägung der Symptome nicht vom Wildtypisolat zu unterscheiden. Alleine die $\Delta 04689$ Mutanten zeigen eine reduzierte Virulenz, wie auch die Mutanten des Clusters 6B (vergleiche \rightarrow Abbildung 7B). Es ist daher anzunehmen, dass der Virulenzdefekt der Δ Cluster6B Mutanten nur auf der Abwesenheit des Genes GLRG_04689 beruhte.

Axenisches Wachstum

Um nachzuweisen, dass die beobachtete reduzierte Virulenz der verschiedenen Deletionsmutanten des Clusters 6 während der Infektion auf Mais nicht auf einen allgemeinen Wachstumsdefekt zurückzuführen ist, wurden Wachstumsexperimente auf Minimalmedium (siehe \rightarrow B.2.2) mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen durchgeführt (Abbildung 9).

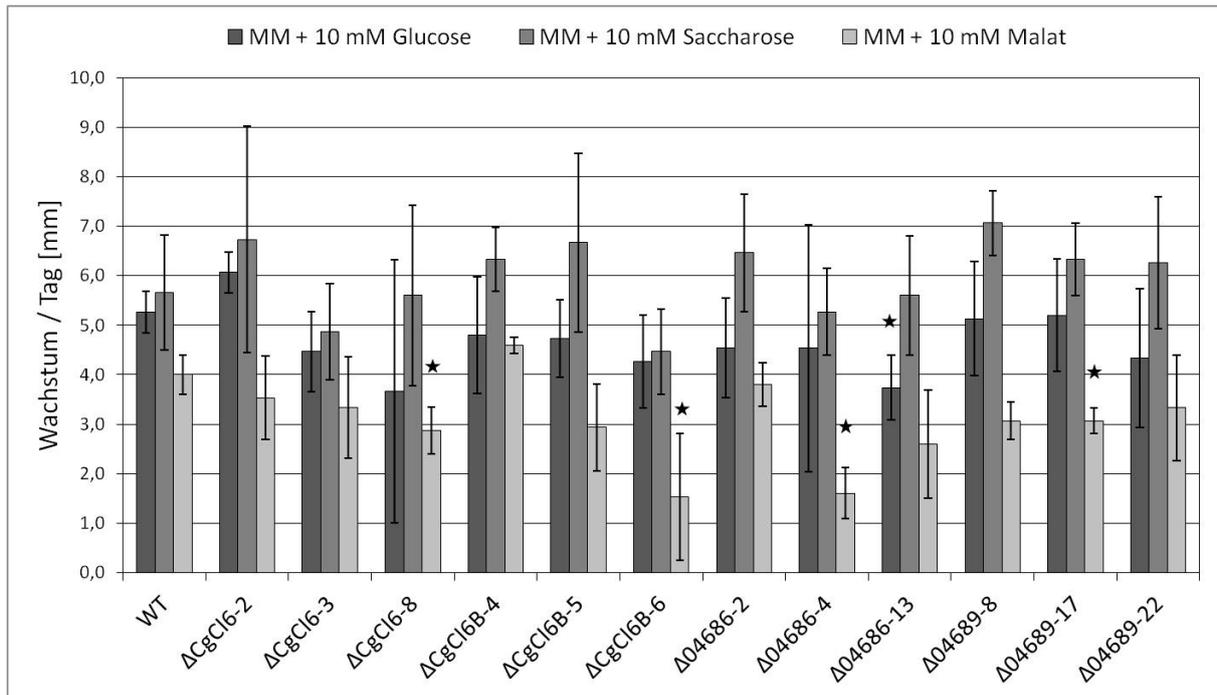


Abbildung 9: Wachstumsraten der unterschiedlichen Cluster 6 – Mutanten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Gemessen wurden bei 3 biologischen Wdh. pro Deletionsmutante das tägliche radiäre Wachstum von 3 dpi bis 10 dpi. Signifikante Unterschiede zwischen WT und Mutanten sind durch einen Stern gekennzeichnet (t-Test, p-Wert = 0,05).

Die getesteten Deletionsmutanten zeigten in den meisten Fällen keine quantitativen Unterschiede im Bezug auf die Wachstumsrate auf den Kohlenstoffquellen Glucose, Saccharose und Malat im Vergleich mit dem Wildtypisolat. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Virulenzdefekt nicht mit einem allgemeinen Wachstumsdefekt zu erklären ist.

In silico Analysen

Da diese beiden Gene innerhalb des Clusters 6 für die während der Infektion auftretenden Phänotypen verantwortlich sind, wurden sie bezüglich ihrer Gen bzw. Proteinstruktur und möglichen Funktionen durch Bioinformatik untersucht (Tabelle 4). Vergleiche der Proteinsequenzen beider Gene mit denen in der NCBI-Datenbank (Altschul et al., 1990) enthaltenen Proteinsequenzen anderer Pilzarten zeigten in beiden Fällen Ähnlichkeiten zu der nahe verwandten Art *Colletotrichum higginsianum* aber auch zu weiter entfernten Ascomycota wie *Magnaporthe oryzae*, *Gibberella zeae* und *Neurospora crassa*. Die drei homologen Proteine mit der größten Ähnlichkeit sind in Tabelle 4 angegeben. Beim Sequenzalignment von GLRG_04686p und den homologen Proteinen zeigt sich eine starke Konservierung über das gesamte Protein, einschließlich des Signalpeptides (siehe → G.2). Beim Vergleich des Proteins von GLRG_04689 und den homologen Proteinen zeigen sich mehrere Konservierungen im mittleren Bereich der Aminosäurekette, die auf bisher noch unbekannte funktionelle Domänen hinweisen könnten (siehe → G.3). Des Weiteren wurde geprüft, ob die

Proteine bereits bekannte funktionelle Domänen oder mögliche Signale für Transmembrandomänen, GPI-Ankern und Kernlokalisierung enthalten. Bei keinem der beiden Proteine konnten solche nachgewiesen werden.

Tabelle 4: *In silico* Analysen zur Struktur und Funktion von GLRG_04686 bzw. GLRG_04689.

Gennummer	GLRG_04686	GLRG_04689
Leserahmen	235 bp	1507 bp
mRNA Transkript	171 bp	1437 bp
Signalpeptid	18 AS	19 AS
natives Protein	38 AS	459 AS
Datenbankabgleich (BlastP)	hypothetisches Protein CH063_01205 <i>Colletotrichum higginsianum</i> e-Wert: $8e^{-22}$	hypothetisches Protein <i>Colletotrichum higginsianum</i> e-Wert: $3e^{-117}$
	sekretiertes Protein CoMC69 <i>Colletotrichum orbiculare</i> e-Wert: $1e^{-20}$	hypothetisches Protein <i>Macrophomina phaseolina</i> e-Wert: $6e^{-92}$
	hypothetisches Protein THITE_2149810 <i>Thielavia terrestris</i> e-Wert: $3e^{-16}$	hypothetisches Protein <i>Coccidioides immitis</i> e-Wert: $2e^{-91}$
funktionelle Proteindomänen	keine	keine
Transmembrandomänen	keine	keine
GPI-Anker	keine	keine
Kernlokalisierungssignal	keine	keine

Die Untersuchung der flankierenden Genombereiche der beiden Gene zeigte im Unterschied zu *C. graminicola* weder bei *C. higginsianum* noch bei *M. oryzae* eine Zusammenfassung innerhalb eines Genclusters auf.

Mikroskopische Analyse der Infektionsstrukturen

Über mikroskopische Analysen infizierter Blätter sollte nun geklärt werden, welche Infektionsstrukturen von den verschiedenen Mutanten des Clusters 6 noch gebildet werden und welchen Einfluss dies auf die verringerte Virulenz haben könnte. Dazu wurden die Bildungsraten folgender Infektionsstrukturen *in planta* gezählt: 1. Keimung der inokulierten Konidien 2. Ausbildung von Appressorien bzw. Hyphopodien aus den gekeimten Konidien 3. Penetration der Pflanzenzellen durch Appressorien bzw. Hyphopodien und die damit verbundene Entwicklung von Infektionsvesikeln bzw. Primärhyphen (Abbildung 10).

Für die Quantifizierung der Infektionsstrukturen wurden Maisblattsegmente mit Konidien des Wildtypisolates und den verschiedenen Deletionsstämmen inokuliert und die Blätter nach 1 – 4 dpi geerntet, ausgewertet (Abbildung 10) und dokumentiert (Abbildung 11). Die Δ 04686 und Δ Cluster6

Mutanten zeigten in Bezug auf die Keimungs- bzw. Appressorienbildungsrate keine wesentlichen Unterschiede zum Wildtypisolat. Im Gegensatz zum Wildtypisolat waren diese Mutanten aber nicht mehr in der Lage die Epidermiszellen der Maisblätter zu penetrieren. Um diese Penetrationsrate zu bestimmen wurde das Vorhandensein von Primärhyphen bzw. Infektionsvesikeln unter den Appressorien gezählt. Die Penetrationsraten der drei unabhängigen $\Delta 04686$ Mutanten betragen 0,5 % ($\pm 0,9$ %), 1,1 % ($\pm 1,0$ %) und 0,8 % ($\pm 1,4$ %). Die der drei unabhängigen Δ Cluster6 Mutanten betragen 1,3 % ($\pm 2,2$ %), 0 % (± 0 %) und 1,2 % ($\pm 1,1$ %). Das Wildtypisolat zeigte im Vergleich dazu nach 48 hpi eine Penetrationstrategie von 84,4 % ($\pm 5,7$ %) (Abbildung 11 A). Auch wenn die Appressorienbildung bei den $\Delta 04686$ und Δ Cluster6 Mutanten schon nach 24 hpi abgeschlossen war, verharteten diese ohne eine erfolgreiche Penetration bis 96 hpi auf den Blättern (Abbildung 11 D, J, K und L). Eine zeitliche Verzögerung bei der Keimung und Entwicklung der Appressorien im Vergleich zum Wildtypisolat war nicht zu erkennen. Die Entwicklung von neuen Sporenlagern auf der Blattoberfläche und somit die Beendigung des Lebenszykluses konnte bei den $\Delta 04686$ und Δ Cluster6 Mutanten nicht beobachtet werden.

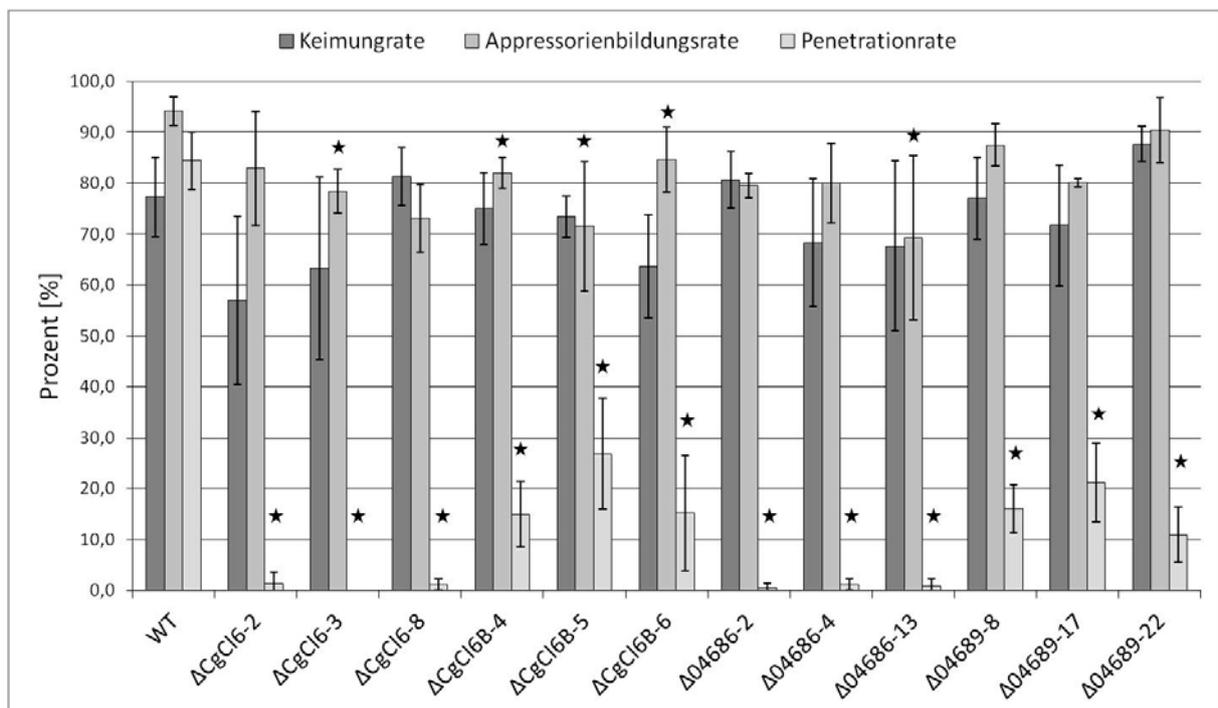


Abbildung 10: Quantifizierung der Infektionsstrukturen auf Mais. Für 3 mal 100 Konidien wurden vom Wildtypisolat bzw. den Mutanten die Keimungsraten zum Zeitpunkt 72 hpi bestimmt. Die Appressorien- bzw. Penetrationsraten beziehen sich prozentual auf den vorangegangenen Wert. Signifikante Unterschiede zwischen WT und Mutanten sind durch einen Stern gekennzeichnet (t-Test, p-Wert = 0,05).

Die $\Delta 04689$ und $\Delta \text{Cluster6B}$ Mutanten wiesen in Bezug auf die Keimungs- bzw. Appressorienbildungsrate ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede zum Wildtypisolat auf. Auch hier war nur die Penetrationsrate der Mutanten im Vergleich mit dem Wildtypisolat verringert. Diese betrug bei den drei unabhängigen $\Delta \text{Cluster6B}$ Mutanten 15 % ($\pm 6,5$ %), 26,8 % ($\pm 10,9$ %), 15,2 % ($\pm 11,3$ %). und bei den $\Delta 04689$ Mutanten 16,1 % ($\pm 4,7$ %), 21,2 % ($\pm 7,6$ %) und 11,0 % ($\pm 5,4$ %). Die $\Delta 04689$ und $\Delta \text{Cluster6B}$ Mutanten zeigten keine Verzögerung bei der Entwicklung der Infektionsstrukturen im Vergleich mit dem Wildtypisolat. Die Keimung der Konidien und die Bildung der Appressorien war nach 24 hpi beendet und die ersten erfolgreichen Penetrationsereignisse waren nach 48 hpi sichtbar (Abbildung 11 F, G, L und M). Rund 50 % der von den $\Delta 04689$ und $\Delta \text{Cluster6B}$ Mutanten gebildeten Appressorien verharrten, wie bei den $\Delta 04686$ und $\Delta \text{Cluster6}$ Mutanten, bis 96 hpi auf der Blattoberfläche ohne eine Penetration durchzuführen. Beim Wildtypisolat waren es im Vergleich nur 15 % aller gezählten Appressorien, die dieses Verhalten zeigten. Ab 72 hpi – 96 hpi war bei den $\Delta 04689$ und $\Delta \text{Cluster6B}$ Mutanten im Falle einer erfolgreichen Penetration, wie auch beim Wildtypisolat, die Bildung nekrotropher Sekundärhyphen zu beobachten (Abbildung 11 B, H, und N). Ab 96 – 120 hpi bildeten sich neue Sporenlager (Acervuli) auf der Blattoberfläche (Abbildung 11 B, H, und N, kleines Bild).

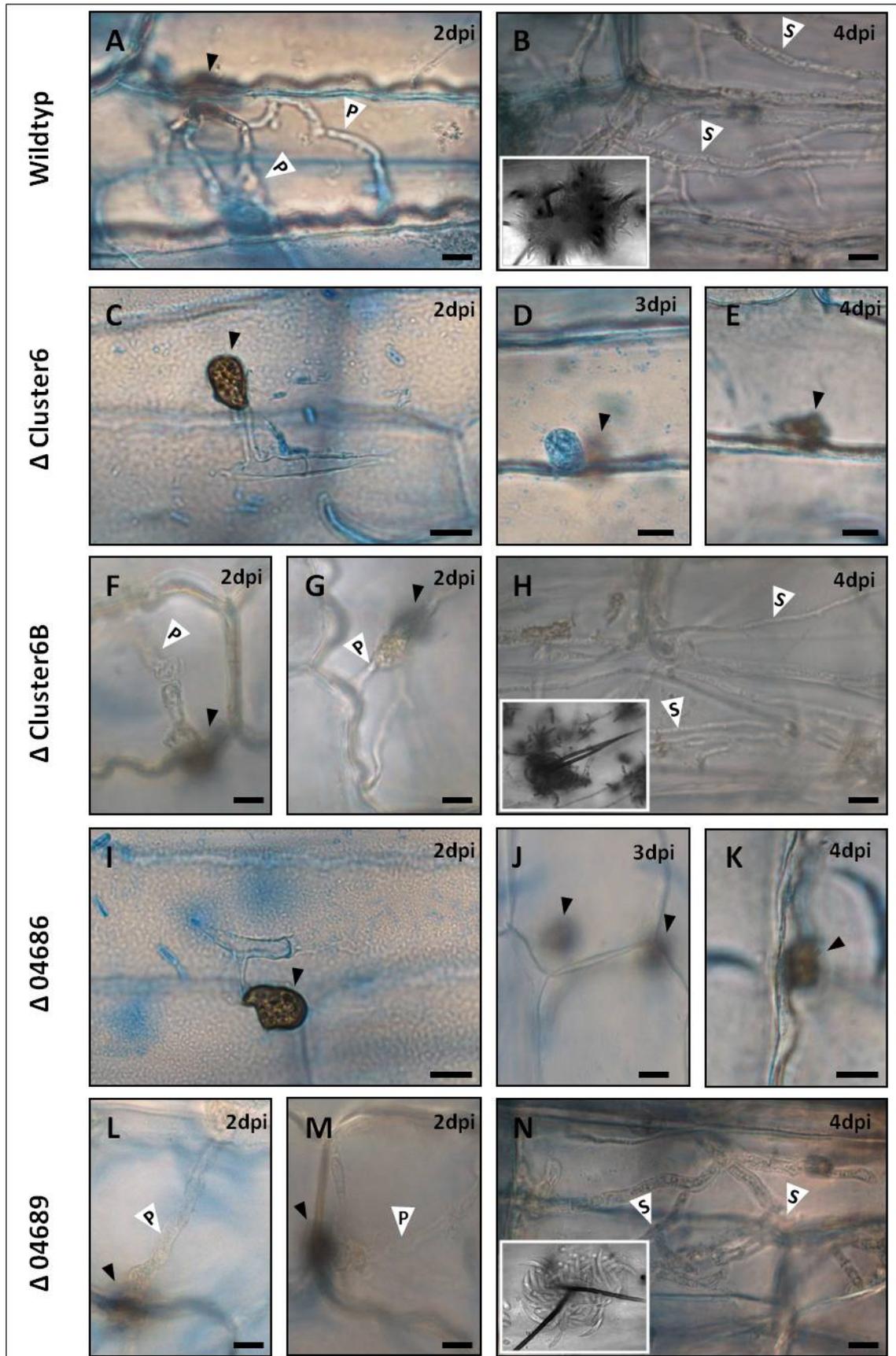


Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen der Infektionsstrukturen. Dargestellt sind die verschiedenen Infektionsstrukturen des Wildtypisolates und der verschiedenen Deletionsstämme von 2 dpi – 4 dpi. Bei den Bildern A, D, E, F, G, J, K, L und M befindet sich die Fokusebene direkt unter dem Appressorium (schwarzer Pfeil); primäre Hyphe (weißer Pfeil mit „p“); sekundäre Hyphe (weißer Pfeil mit „s“), Größenstandard = 10 µm.

Analyse der Papillenbildung als pflanzliche Abwehrreaktion

Pflanzen sind in der Lage, die Druckpenetration des Appressoriums durch die Bildung von Papillen, zu verhindern. Papillen sind Zellwandauflagerungen, welche aus Callose, Proteinen und verschiedenen phenolischen Komponenten bestehen können (Collinge, 2009).

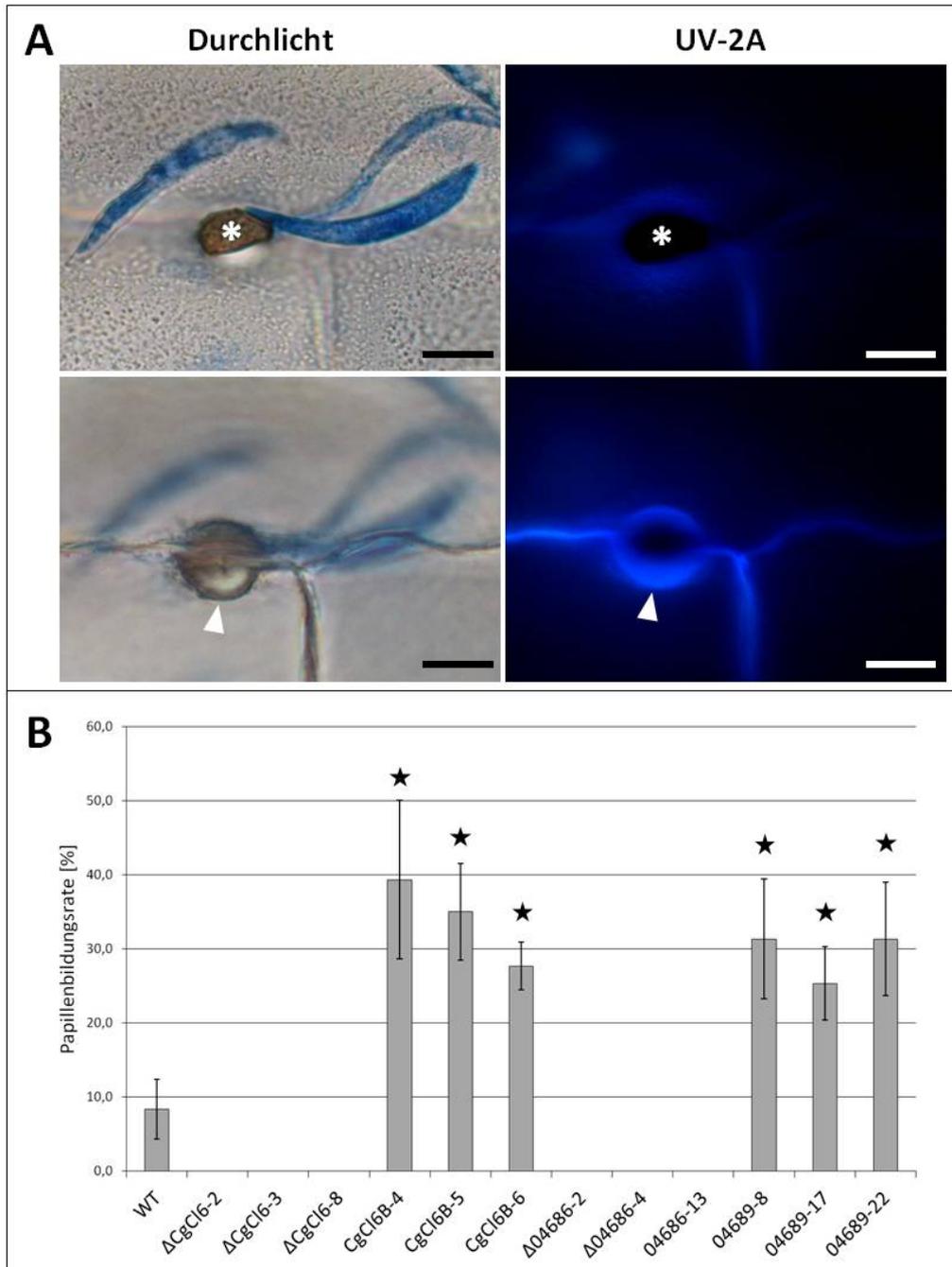


Abbildung 12: Papillenbildung in infizierten Maisblättern. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahme einer gebildeten Papille am Beispiel der Deletionsmutante Δ 04689-8. Die mit Anilin-Blau gefärbte Probe wurde sowohl im Durchlicht als auch unter UV-Licht fotografiert. Die gebildeten Appressorien (weißer Stern) erscheinen dabei schwarz, die gebildeten Papillen (weißer Pfeil) bläulich-weißlich. Größenstandard = 10 μ m **(B)** Papillenbildungsrate. Pro Mutante wurden 3 mal 100 Appressorien zum Zeitpunkt 72 hpi gezählt.

Bei den mikroskopischen Analysen der verschiedenen Mutanten während der Infektion konnte eine erhöhte Bildung von Papillen bei den $\Delta 04689$ und $\Delta \text{Cluster6B}$ Mutanten festgestellt werden. Abbildung 12A zeigt eine repräsentative Aufnahme einer direkt unter dem Appressorium gebildeten Papille am Beispiel der Deletionsmutante $\Delta 04689-8$. Das Appressorium ist nicht in der Lage, die Papille zu durchstoßen und verharrt in diesem Stadium der Entwicklung. Die Bildung von Papillen unter den Appressorien betrug bei den drei unabhängigen $\Delta \text{Cluster6B}$ Mutanten 39,3 % ($\pm 10,7$ %), 35 % ($\pm 6,6$ %), 27,7 % ($\pm 3,3$ %) und bei den $\Delta 04689$ Mutanten 31,3 % ($\pm 8,1$ %), 25,3 % ($\pm 4,9$ %) und 31,3 % ($\pm 7,6$ %) und war somit in allen Fällen signifikant unterschiedlich zum Wildtypisolat, welches eine Papillenbildungsrate von 8,3 % ($\pm 4,0$ %) aufwies (Abbildung 12B). Bei den $\Delta 04686$ und $\Delta \text{Cluster6}$ Mutanten konnte keine Papillenbildung nachgewiesen werden, obwohl vollständig entwickelte Appressorien auf den Blättern vorhanden waren.

Charakterisierung der Pathogenese auf verwundeten Maisblättern

Durch die mikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Deletionsstämme von $\Delta \text{Cluster6}$, $\Delta \text{Cluster6B}$, $\Delta 04686$ und $\Delta 04689$ einen Defekt während der Penetration der Epidermiszellen aufweisen und somit ihre verringerte Virulenz erklärt werden kann. Um aber zu klären, ob die verschiedenen Deletionsstämme überhaupt noch in der Lage sind das Wirtsgewebe zu besiedeln und ihren Lebenszyklus zu vollenden, wurden verletzte Maisblätter mit den Konidien der verschiedenen Deletionsstämme inokuliert (Abbildung 13). Die Verletzung erfolgte durch das Anstechen des intakten Maisblattes mit einer Nadel. Durch die Verletzung der Pflanzenepidermis ist die Penetration durch Appressorien bzw. Hyphopodien nicht mehr notwendig, um in das Wirtsgewebe einzudringen, wodurch die Nachteile, die durch die Penetrationsdefekte entstehen, aufgehoben werden und die generelle Fähigkeit das Wirtsgewebe zu besiedeln verglichen werden kann.

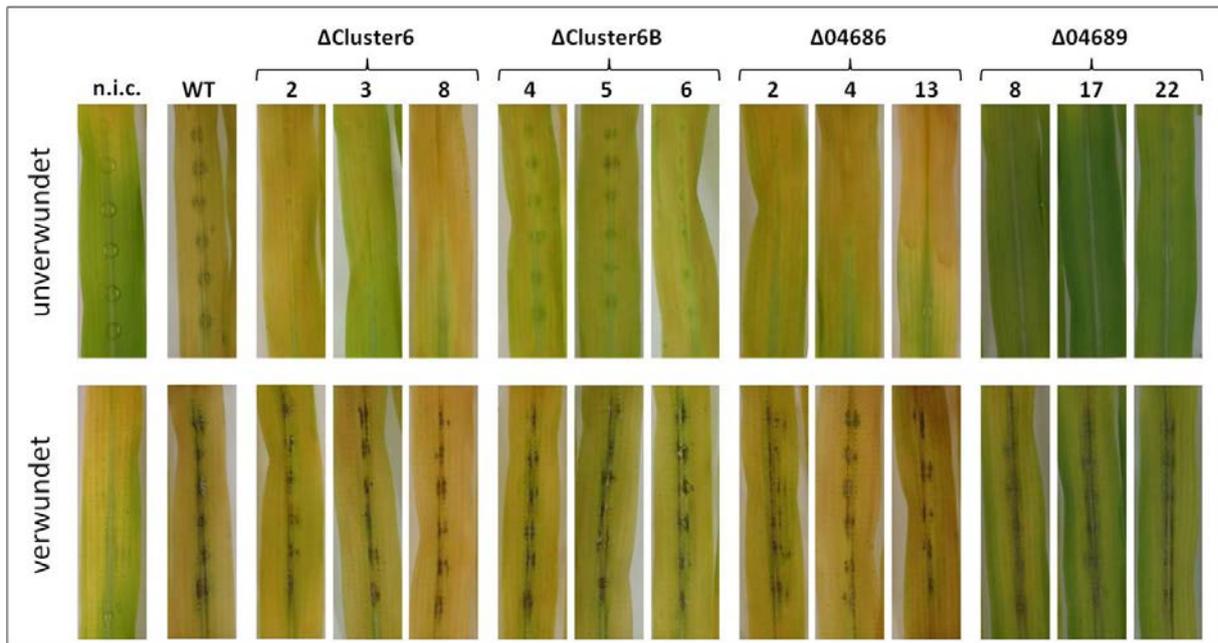


Abbildung 13: Blattsegment-Virulenztest auf verwundeten Maisblattsegmenten. Punktinokulation von Blattsegmenten der Deletionsstämmen, des Wildtypisolates (WT) und einer nicht inokulierten Kontrolle (n.i.c.) auf verwundeten sowie nicht verwundeten Blättern. Inokulation erfolgte mit 10 μ l Tropfen einer Konidiensuspension (10^6 Konidien/ml). Dokumentation erfolgte nach 5 dpi.

Alle getesteten Deletionsstämmen zeigten auf den verwundeten Maisblättern eine vergleichbare Symptomentwicklung wie das Wildtypisolat. Im Vergleich dazu waren wie bereits oben dargestellt keine Symptome auf den unverwundeten Blättern bei den $\Delta 04686$ und Δ Cluster6 Mutanten bzw. nur schwache Symptome bei den $\Delta 04689$ und Δ Cluster6B Mutanten zu erkennen. Hieraus kann geschlossen werden, dass die fehlende ($\Delta 04686$ und Δ Cluster6) bzw. verringerte Virulenz ($\Delta 04689$ und Δ Cluster6B) der Deletionsstämmen auf der fehlenden bzw. verminderten Penetration der intakten Wirtsoberfläche beruht.

C.2.4. Deletionsmutagenese von Genen mit Homologie zu Effektoren in *M. oryzae*

Im ebenfalls hemibiotrophen Pilz *Magnaporthe oryzae*, dem Erreger des Reisbrandes, wurden in einer Zufallsmutagenese mit dem ATMT-Verfahren Gene identifiziert, die sekretierte Proteine kodieren und durch die Integration der T-DNA im Leserahmen bzw. der Promotorregion des Genes zur verminderten Virulenz führten (Jeon et al., 2007). Für die entsprechenden Proteine wurde im Sekretom von *C. graminicola* nach Homologen gesucht, um die korrespondierenden Gene einer Deletionsanalyse zu unterziehen. In der erwähnten Veröffentlichung wurden mehr als 21000 Mutanten mittels ATMT (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation) erzeugt. Diese Mutanten wurden auf Wachstum, Pigmentation, Konidien-Morphologie, Keimung, Appressorienbildung und Pathogenität überprüft. 559 Mutanten zeigten innerhalb dieser Parameter Veränderungen im Vergleich zum Wildtypstamm. Von diesen wurden bei 203 Mutanten der Integrationsort der T-DNA bestimmt und somit auch die möglichen betroffenen Gene identifiziert. Von diesen wurden die Homologen in *C. graminicola* bestimmt und diese auf das Vorhandensein einer Signalpeptid-kodierenden Sequenz untersucht. Hierdurch wurden 28 homologe, putativ sekretierte Proteine identifiziert, von denen aber 9 redundant waren d. h. es konnte mehr als ein homologes Protein in *C. graminicola* identifiziert werden. Da solche Gene gegebenenfalls redundante Funktionen kodieren, besteht die Gefahr, dass bei Erzeugung einer Gendeletion die Aufdeckung möglicher Phänotypen nicht möglich ist. Daher sind nur die verbleibenden, nicht-redundanten 19 Kandidatengene in Tabelle 5 gelistet. Die entsprechenden ATMT-Mutanten in *M. oryzae* zeigten verschiedene Phänotypen. Interessant für diese Arbeit waren Gene, welche bei einer Mutation ausschließlich Phänotypen bei der Appressorienbildung und Pathogenität aufwiesen und keine weiteren Defekte. Deletionsmutanten wurden in *C. graminicola* für sieben dieser Gene erzeugt (Tabelle 5) und wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben charakterisiert. In keinem Fall zeigten die erhaltenen Deletionsmutanten einen vom Wildtypstamm abweichenden Phänotyp in Bezug auf ihre Pathogenität in den Infektionstests (siehe → G.1). Qualitative Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und des vegetativen Wachstums im Vergleich zum Wildtypisolat wurden ebenfalls nicht beobachtet.

Tabelle 5: Liste aller durch Gendeletion untersuchten ATMT-Homologen. Die grau unterlegten Gene wurden deletiert. Der angegebene e-Wert ist ein Maß für den Grad der Ähnlichkeit zwischen den Proteinen der beiden Pilze.

Annotationsnummer (<i>M.oryzae</i>)	phänotypische Ausprägung der ATMT-Mutanten von <i>M.</i> <i>oryzae</i>						BlastP, e-Wert	Homologes Protein aus <i>C. graminicola</i>	
	W	KB	KK	AB	KM	P		Annotationsnummer	Beschreibung
MGG_07520	+	+		+		+	2E-07	GLRG_01733	Glycosyl Hydrolase Familie 43
MGG_06203	+	+				+	0	GLRG_09216	hypothetisches Protein
MGG_11535	+					+	0	GLRG_09589	neutrale/alkalische nicht-lysosomale Ceramidase
MGG_00124		+	+	+		+	5E-14	GLRG_11050	Translation Initiation Faktor IF-2
MGG_09851		+	+	+		+	2E-10	GLRG_05945	hypothetisches Protein
MGG_11917		+	+	+		+	1E-09	GLRG_08323	Proline-reiches Protein
MGG_10510		+		+		+	5E-95	GLRG_06089	Ribonuklease T2 Familie Protein
MGG_10831		+		+		+	4E-120	GLRG_04023	hypothetisches Protein
MGG_09471		+			+	+	2E-21	GLRG_04384	Trehalase
MGG_04946		+				+	4E-07	GLRG_08757	hypothetisches Protein
MGG_06466			+	+		+	4E-61	GLRG_00640	Pyridoxal-Phosphate abhängiges Enzym
MGG_07729				+		+	8E-62	GLRG_06458	hypothetisches Protein
MGG_04128				+		+	3E-07	GLRG_05766	hypothetisches Protein
MGG_05948				+		+	2E-09	GLRG_08566	hypothetisches Protein
MGG_07973				+		+	4E-31	GLRG_08263	hypothetisches Protein
MGG_13347				+		+	2E-47	GLRG_06842	Integrales Membran Protein
MGG_04685				+		+	4E-07	GLRG_11030	hypothetisches Protein
MGG_07745					+	+	6E-129	GLRG_09350	hypothetisches Protein
MGG_01748						+	2E-144	GLRG_02846	eukaryotische Aspartyl Protease

W = Wachstum / KB = Konidienbildung / KK = Konidienkeimung / AB = Appressorienbildung / KM = Konidienmorphologie / P = Pathogenität (nach Jeon et al. 2007). Einzelheiten zu den in dieser Dissertation erzeugten Gendeletionen der ATMT-Homologen befinden sich im Anhang G.1

C.2.5. Identifizierung translozierter Proteine

Dieser Abschnitt der Arbeit befasste sich mit der Identifizierung solcher sekretierter Proteine, die während der Interaktion von *C. graminicola* auf Mais möglicherweise in die Pflanzenzellen transloziert werden. Die Identifizierung von Kandidatengenen stützte sich hierbei auf das Vorhandensein eines aus Oomyceten bekannten Translokationsmotives, das RXLR-Motiv. RXLR steht für die exakte Abfolge der Aminosäuren [Arginin (R) – eine zufällige Aminosäure (X) – Leucin (L) – Arginin(R)] im N-terminalen Bereich (Birch et al., 2006). Dieses Motiv wurde später auch für Ascomyceten und Basidiomyceten beschrieben (Kale et al., 2010). Die Autoren veröffentlichten ein degeneratives RXLR-Motiv: [RHK] – X – [LMIFYW] als Ergebnis der Vergleiche aller bekannten RXLR-Proteine. Diese Suche mit diesem Motiv im Sekretom von *C. graminicola* fand mehr als 1500 Proteine. Um diese Zahl zu verringern wurde das Motiv in Anlehnung an die Situation bei den Oomycota um eine Position verlängert, die ebenfalls die Degeneration [RHK] zugewiesen bekam, da es sich wie bei Position eins ebenso um die Aminosäure Arginin handelte. Auf diese Weise verringerte sich die Anzahl der gefundenen Proteine auf 986. Um diese Anzahl weiter einzugrenzen, wurden die bis heute in der Literatur beschriebenen Effektoren mit RXLR-Motiven verglichen und folgende Kriterien zur weiteren Beschränkung festgelegt:

- Lokalisation des RXLR-Motives im N-terminalen Teil des Proteins
- Gesamtgröße des Proteins kleiner als 400 Aminosäuren
- keine Transmembran-Domäne vorhergesagt (nach Phobius; siehe → B.6)
- Lokalisation als „extrazellulär sekretiert“ vorhergesagt (nach ProtComp 9.0; siehe → B.6)

Durch die Anwendung dieser Kriterien konnte die Anzahl an möglichen Kandidaten auf 129 beschränkt werden. Durch die kürzlich veröffentlichten Transkriptomdaten von *C. graminicola* (O'Connell et al., 2012) war es möglich, diese 129 Kandidatengene hinsichtlich Ihrer Expression während des Infektionszykluses zu untersuchen. Dafür wurden für folgende 3 Phasen die Transkriptgehalte analysiert: (1) gebildete Appressorien auf der Pflanzenepidermis innerhalb der ersten 24 Stunden (PA), (2) während der biotrophen Phase, 36 Stunden nach Infektion, (BP) und (3) während der nekrotrophen Phase, 60 Stunden nach Infektion, (NP). Die Auswertung der Expressionsdaten ist in Abbildung 14 dargestellt. Für die gezeigte hierarchische Verteilung wurden die Expressionsmuster der Gene in den verschiedenen Phasen miteinander verglichen, um anschließend Gene mit ähnlichem Expressionsverhalten in Gruppen zusammenzufassen. Es zeigte sich, dass zwei Hauptgruppen mit stark unterschiedlichem Transkriptionsmuster vorliegen. Die erste Gruppe zeigte eine Zunahme an Expression im Verlauf der Infektion. Innerhalb dieser Gruppe befinden sich vor allem Enzyme wie Lyasen, Proteinasen und Hydrolasen, welche wichtige

Funktionen, wie Zellwandabbau und Verwertung freigewordener Nährstoffe, während der nekrotrophen Phase bereitstellen. Die zweite Gruppe hingegen ist durch eine Abnahme der Expression im Verlauf der Infektion gekennzeichnet. Diese Gene zeigten die höchste Expression während der Appressorienbildung bzw. der biotrophen Phase. Diese Gruppe enthält viele hypothetische Proteine, bei denen mögliche enzymatische Funktionen bzw. eine Bedeutung für die Pathogenese unbekannt sind. Im Proteom von *C. graminicola* wurden 177 putative Effektoren identifiziert, welche ausschließlich in der Gattung bzw. Art vorkommen und als extrazellulärsekretiert vorhergesagt sind (O'Connell et al., 2012). 19 dieser Effektoren befinden sich innerhalb der Kandidatenliste mit putativem RXLR-Motiv (Abbildung 14). Interessanterweise zeigen alle diese Effektoren eine Abnahme der Expression im Verlauf der Infektion. Betrachtet man die absoluten Expressionsdaten, sind Kandidaten wie GLRG_04505, GLRG_04558, GLRG_01037, GLRG_09822, GLRG_11964 und GLRG_11926 besonders interessant, da hier sowohl eine hohe Expression als auch eine starke Abnahme der Expression gezeigt werden konnte.

Da das Hauptaugenmerk dieses Teilprojektes auf einer möglichen Translokation der Proteine in die Wirtszelle beruht, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit ein Test-System entwickelt, mit dessen Hilfe man die Translokation während der Interaktion nachweisen kann (Diana Gottschling, 2012). Mit diesem sollte es möglich werden, schnell und effektiv ausgewählte Kandidatengene zu testen und eine mögliche Translokation nachzuweisen.

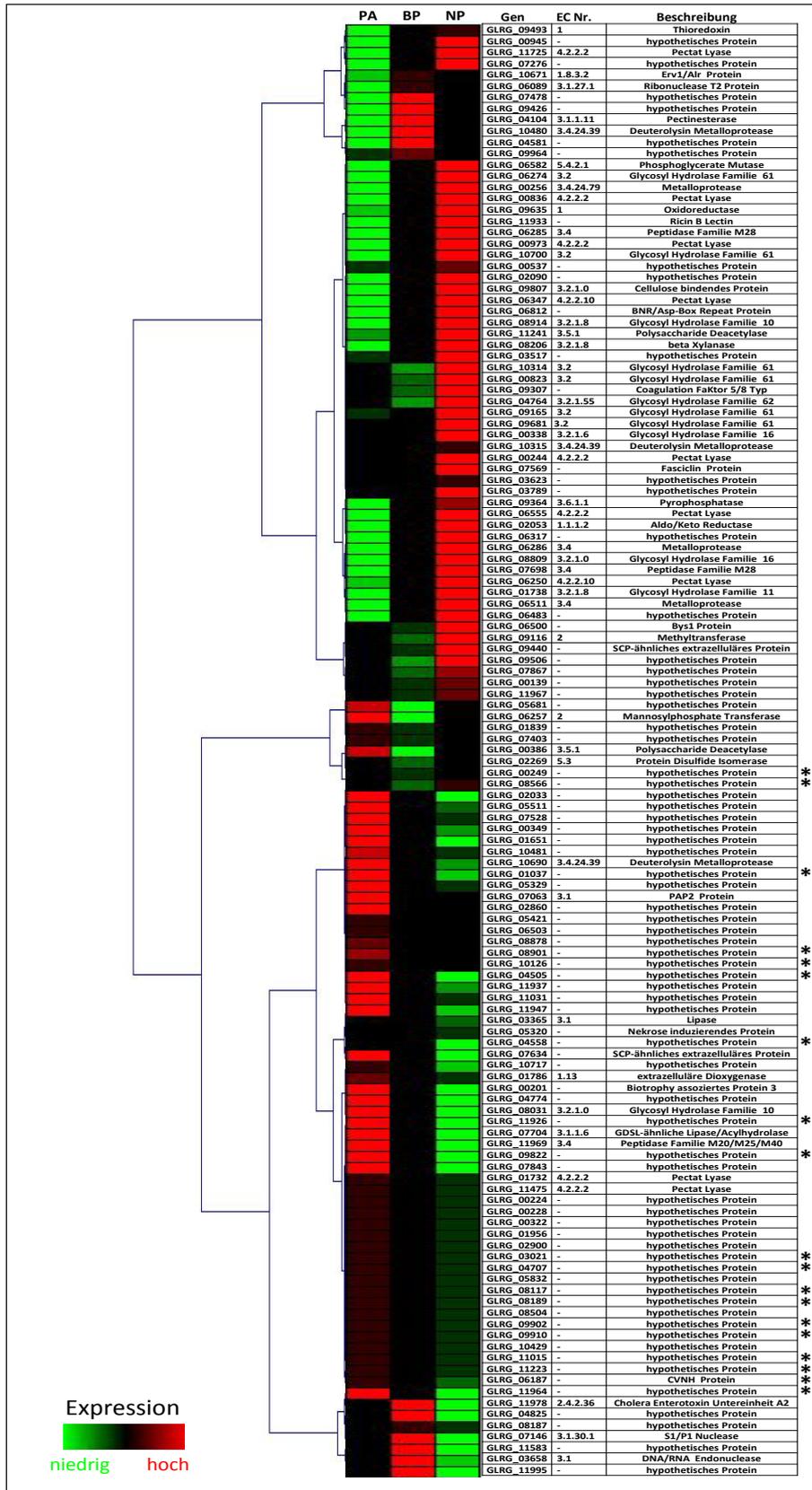


Abbildung 14: Hierarchische Verteilung der Expressionsmuster der 129 Kandidatengene mit putativem RXLR-Motiv. Die 19 als Effektoren vorhergesagten Proteine (O'Connell et al., 2012) sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte mit dem Programm „Genesis“. PA = Appressorien auf Pflanzen (24 hpi), BP = biotrophe Phase (36 hpi), NP = nekrotrophe Phase (60 hpi).

C.3. Entwicklung und Etablierung eines qPCR-basierten Detektionsverfahrens

Ein Hauptproblem bei der Identifizierung von Virulenzunterschieden zwischen Transformanten und Wildtyp besteht in der auftretenden hohen Variabilität, die sich trotz Optimierung nicht verhindern lässt. Da die Auswertung der Infektionsversuche auf der Beurteilung makroskopisch sichtbarer Symptome beruht und zusätzlich die Entwicklung der zur Infektion eingesetzten Konidien während der Infektion nicht synchron abläuft, besteht die Gefahr einer Fehleinschätzung der Pathogenitäts bzw. Virulenzeigenschaften. Daher wurde ein Verfahren entwickelt, das eine objektivere und genauere Beurteilung erlauben sollte. Es basiert auf der Methode der quantitativen PCR (qPCR), mit deren Hilfe die absolute Biomasse, durch Bestimmung der genomischen DNA des Pilzes, im infizierten pflanzlichen Gewebe ermittelt werden kann. Dabei wird angenommen, dass mit der Vermehrung von pilzlicher Biomasse ebenfalls eine Vermehrung von pilzlicher genomischer DNA einhergeht.

C.3.1. Bestimmung der Spezifität und der Sensitivität

Zur Bestimmung der genomischen DNA des Pilzes wurden die Primer (Cg_ITS2-F1.1 und Cg_ITS2-R1) verwendet. Diese hybridisierten innerhalb des „internal transcribed spacer 2“ des ribosomalen DNA-Clusters und erzeugten ein 98 bp großes Fragment. Für die Bestimmung des externen Standards pUC18 wurden die Primer (M13neu-For und M13neu-Rev) verwendet, welche ein 105 bp großes Fragment erzeugten und im Bereich der Klonierstelle des Plasmides hybridisierten. Die Kontrolle der Spezifität der verwendeten Primer ist in Abbildung 15 dargestellt. In Standard-PCR Reaktionen wurden exemplarisch Präparationen der in den späteren Tests verwendeten DNAs (Pilz, Pflanze, pUC18 Plasmid) und einer NTC-Kontrolle, bei der keine Template DNA im Ansatz vorhanden ist, überprüft. Sowohl die ITS2 Primer als auch die pUC18 Primer amplifizierten nur ihr jeweiliges Templates. Die Sequenzierung der entstandenen Banden bestätigte, die Identität des jeweiligen Produktes. In keinem der Fälle entstand ein Nebenprodukt mit einer Nicht-*Template*-DNAs. Die NTC (*non template control*) zeigten einen C_T -Wert von ≈ 37 . Für alle späteren Experimente wurde ein C_T -Wert von 35 als Ausschlussgrenze benutzt.

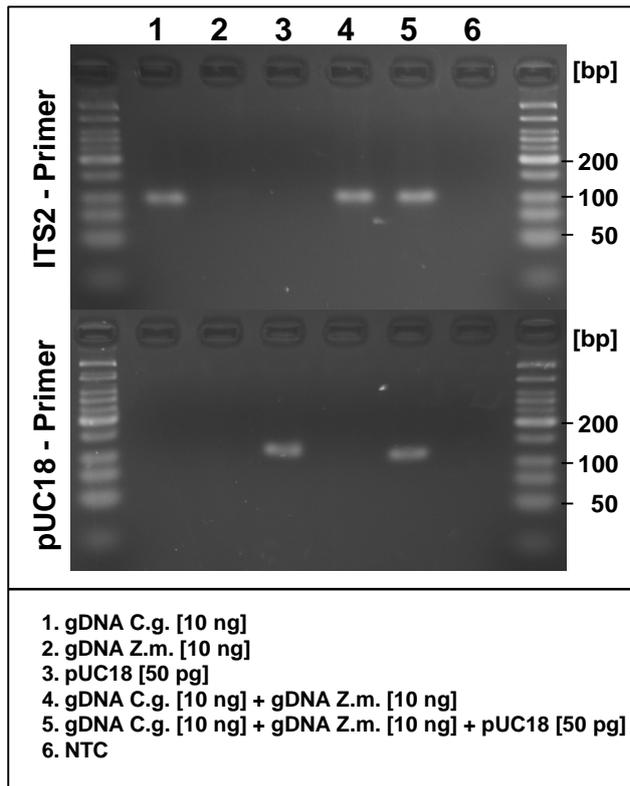


Abbildung 15: Spezifität der verwendeten qPCR-Primer. Gelbild aller Amplifikate gebildet von ITS2 und pUC18 Primern mit den verschiedenen DNAs als Matrize. Natrium-Borat-Gel mit einer Agarosekonzentration von 1,5 %. Der Gellauf erfolgte bei 250 V für 15 min. Gesamtzyklenzahl der PCR betrug 35.

Zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen in infizierten Gewebe, wurden für die beiden Ziel-DNAs Eichgeraden erzeugt (Abbildung 16). Zur Erstellung der Eichgerade für die ITS2 Primer des Pilzes wurden definierte gDNA Mengen von *C. graminicola* von 20 ng – 2 pg (serielle 10fach Verdünnungen) mit jeweils 10 ng gDNA *Zea mays* gemischt. Für die externe Kontroll-DNA pUC18 wurde ebenfalls eine Eichgerade erstellt bei dem Plasmid-DNA von 5 ng – 0,5 fg (serielle 10fach Verdünnungen) mit jeweils 10 ng gDNA *Zea mays* gemischt wurden. Die Berechnung der Effizienzen der PCR-Reaktionen erfolgte an Hand der Formel $E = 10^{-1/m}$, wobei m der Anstieg der Eichgeraden war. Die aus den Eichgeraden resultierenden Formeln dienten nachfolgend als Berechnungsgrundlage für die Menge an genomischer DNA bzw Plasmid-DNA in unbekanntem Proben .

Der Anstieg der Eichgerade des Pilzes war -3,389, was einer Amplifikations-Effizienz von 97 % entsprach. Bei der Eichgerade von pUC18 betrug der Anstieg -3,244, was einer Amplifikations-Effizienz von 103 % entspricht. Das geringe Überschreiten der Effizienz von mehr als 100 % kann bei der Verwendung von Sybr-Green durch die Entstehung von Primer-Dimeren oder durch geringste Mengen an Nebenprodukt erklärt werden. Anhand dieser Eichgeraden wurden auch die Treshhold-Grenzen für alle weiteren Experimente festgelegt. Für die Bestimmung der pilzlichen ITS-Sequenzen

wurde der Treshhold auf 59,3 RFU (*relative fluorescence unit*) und für die Bestimmung des externen Standards pUC18 auf 143,35 RFU gesetzt.

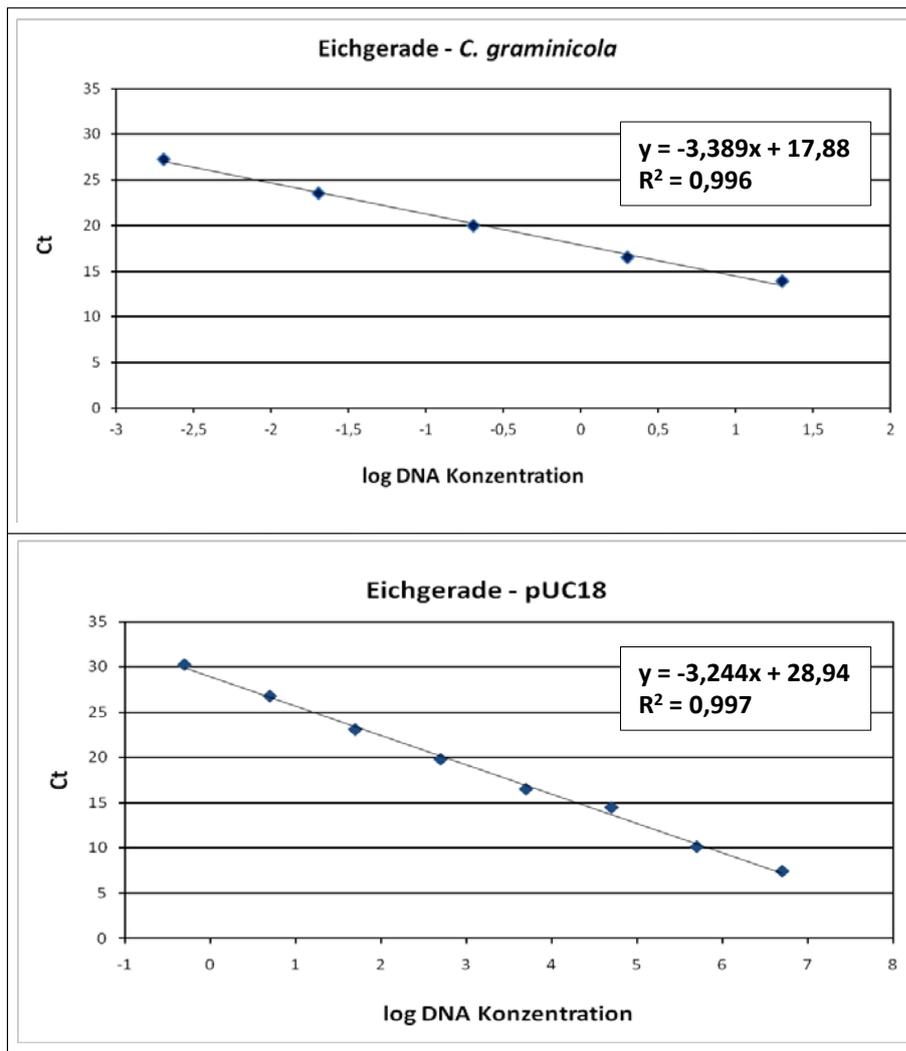


Abbildung 16: Eichgeraden für die genomische DNA von *C. graminicola* und die Plasmid-DNA von pUC18. Aufgetragen sind die gemessenen C_T -Wert gegen die logarithmierten Mengen an eingesetzter DNA.

C.3.2. Optimierung der Beprobung infizierter Blattsegmente

Da bei der Interaktion zweier Organismen eine Varianz der Symptomausprägungen zwischen den Replikaten auftreten kann, sollte zunächst die tatsächlich auftretende Varianz bei dem verwendeten Inokulationssystem, der Punktinokulation von Blattsegmenten, ermittelt werden. Hierfür wurden die zwischen verschiedenen Blättern und innerhalb von Blättern auftretenden Varianzen verglichen (Abbildung 17). Zwischen den einzelnen infizierten Blättern unterscheidet sich die entstandene pilzliche Biomasse nach 96 hpi beträchtlich, mit einer Varianz von 55 % (Abb. 17A). Betrachtet man aber die Verteilung der Biomasse innerhalb eines Blattes so sind systematische Unterschiede zu erkennen. Inokulationen in der Mitte des Blattes führten zur höchsten Biomasse, während die

geringste Biomasse an den abgeschnittenen Enden der Blätter auftrat. Die Varianz betrug hier 45 % (Abb. 17B). Da die Variabilität zwischen den Blättern sehr hoch war und die beste Infektion in der Mitte des Blattes auftrat, wurde für alle weiteren Experimente jedes Blatt nur einmal in der Mitte inokuliert und dann mindestens fünf solcher Infektionsstellen ausgestochen und für die DNA-Extraktion zusammengefaßt (Abb. 17C). Es zeigte sich, dass durch dieses optimierte Beprobungsverfahren die Varianz bis auf 30 % reduziert werden konnte.

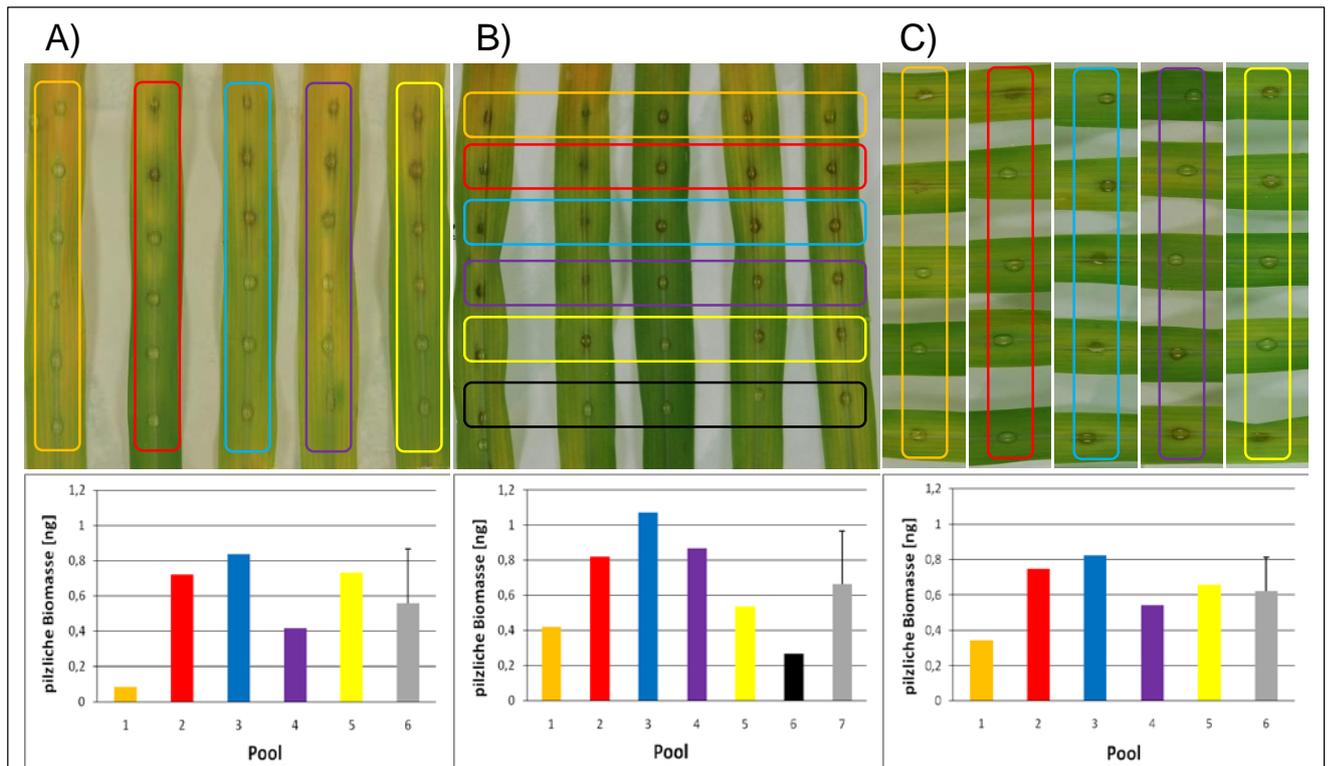


Abbildung 17: Optimierung der Beprobung infizierter Blattsegmente. Farbige Rechtecke umfassen die Inokulationsstellen, welche einzeln ausgestanzt, und dann wie angedeutet zusammengefasst wurden. Fotos wurden nach 96 hpi gemacht, danach wurde geerntet. Farbige Balken zeigen die Messwerte für den jeweiligen Pool. Der graue Balken gibt den Mittelwert und die Standardabweichungen aller farbigen Balken eines Diagramms wieder. **(A)** Pooling innerhalb von Blättern **(B)** Pooling über verschiedene Blätter **(C)** optimiertes Pooling-Verfahren.

Neben der Varianz war es notwendig, die optimale Inokulationsmenge zu bestimmen. Hierfür wurden Blätter mit Sporenkonzentration von 10^4 , 10^5 , 10^6 und 10^7 Sporen pro ml inokuliert und mit dem vorher beschriebenen optimierten Beprobungsverfahren nach 24 hpi geerntet. Abbildung 18 zeigt eine lineare Beziehung ($R^2 = 0.992$) zwischen den gemessenen C_T -Werten und der eingesetzten Konidienzahl. Die Nachweisgrenze lag bei etwa 100 eingesetzten Konidien pro Inokulationspunkt, da hier ein C_T - Wert von rund 35 auftrat, womit auch die oben definierte Ausschlussgrenze erreicht wurde. Die C_T -Werte der 10^5 - Konzentration befanden sich mit 30 Zyklen zwar vor der durch die NTC-Kontrollen vorgegeben Ausschlussgrenzen, liegen aber außerhalb der verwendeten Eichgerade

mit einem Minimum von 2 pg/PCR-Reaktion (vgl. Abb. 18). Im Falle der 10^6 -Konzentration befanden sich alle C_T -Werte innerhalb der eigenen Eichgerade. Bei den Inokulationspunkten mit einer 10^7 -Konzentration zeigte sich auf Grund der hohen eingesetzten Konidiendichte eine Inhibition der Keimung von über 90 %. Für alle Folgeexperimente wurde daher eine Inokulationsdichte von 10^6 Konidien/ml gewählt.

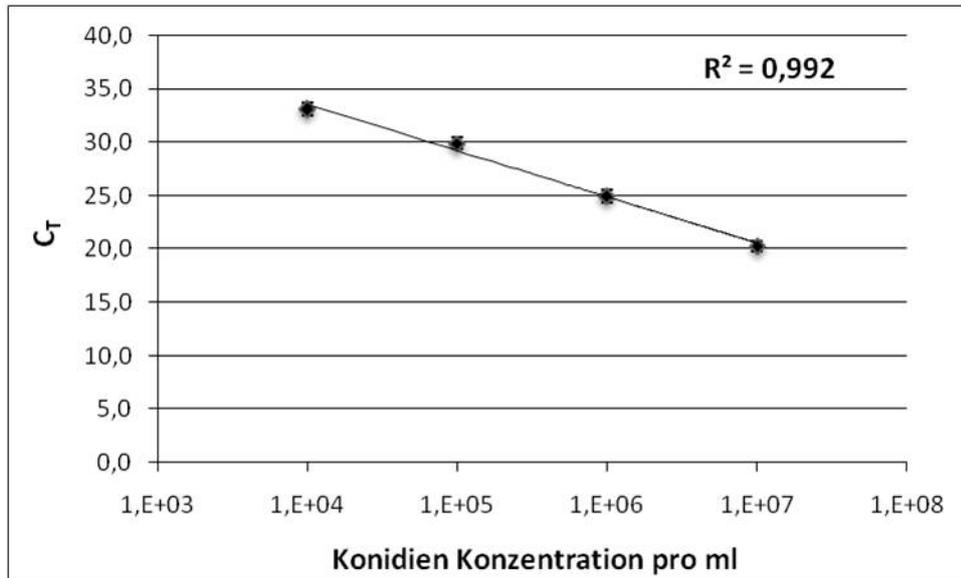


Abbildung 18: Einfluß der Inokulationsdichte auf den C_T -Wert. Aufgetragen sind die gemessenen C_T -Werte bei den jeweilig eingesetzten Konidien-Konzentrationen. Jeder Punkt repräsentiert 4 biologische Wiederholungen, bei denen je 5 Blätter bei 24 hpi zur Ernte zusammengefasst wurden.

C.3.3. Bestimmung der Virulenz von Mutantenstämmen

Da die oben geschilderte Entwicklung der qPCR zum Ziel hatte, die Symptomatik mit der Biomasseentwicklung von Mutantenstämmen zu vergleichen, wurden bereits vorhandene Mutanten mit Virulenzdefekten zur Validierung genutzt. Diese stammten aus einer Mutantenkollektion, welche durch *Agrobacterium* vermittelte Transformation erzeugt (Münch et al., 2011), aber nicht weiter charakterisiert worden waren. Abbildung 19A zeigt die Symptomausprägung der ATMT-Mutanten AT2.463, AT2.374 und AT2.276, welche im weiteren Verlauf als FW1, FW2 und FW3 bezeichnet werden, im Vergleich mit dem Wildtypisolat.

Charakterisierung der ATMT-Mutanten

Die Schwere der Symptomausprägung nahm in folgender Reihenfolge ab: WT > FW2 > FW1 > FW3. Des Weiteren wurde der Entwicklungszustand der Mutanten und des Wildtypes zu verschiedenen Zeitpunkten (24 hpi, 72 hpi, 120 hpi) mikroskopisch untersucht (Abbildung 19 B).

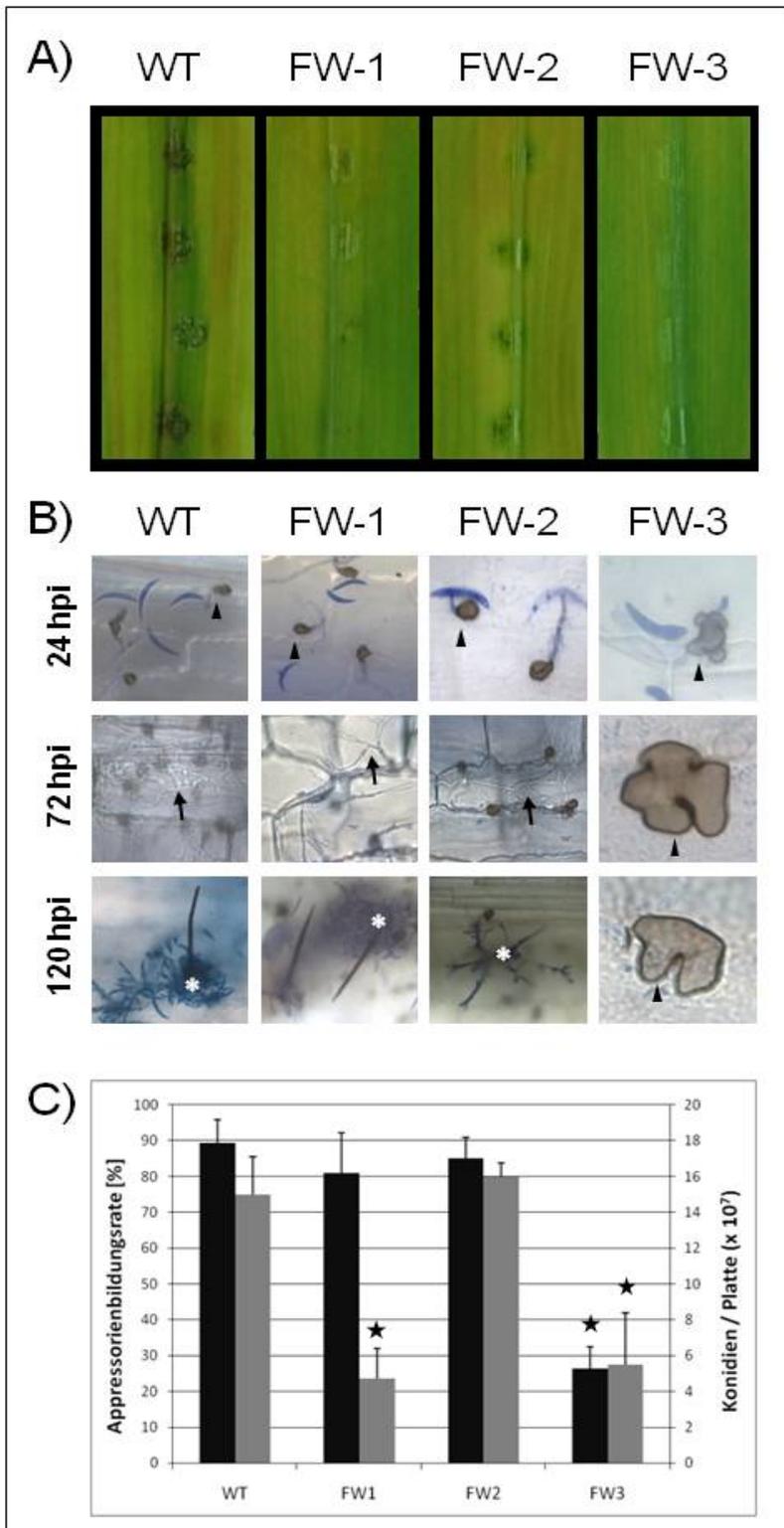


Abbildung 19: Charakterisierung der ATMT-Mutanten. (A) Makroskopische Symptomausprägung nach 120 hpi auf der Maissorte Mikado. Inokuliert wurde mit 10 µl einer 10⁶ Konidien/ml Sporensuspension. (B) Mikroskopische Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion. Schwarze Pfeilspitzen zeigen gebildete Appressorien nach 24 hpi. Schwarze Pfeile zeigen die invasiven nekrotrophen Hyphen. Sporenlager mit den dafür typischen Setae sind mit einem weißen Sternchen markiert. (C) Dargestellt sind die Zahl der gebildeten Appressorien bezogen auf die Zahl der eingesetzten Konidien (schwarze Balken) und die Zahl der auf einer OMA-Platte gebildeten Konidien (graue Balken). Signifikante Unterschiede zwischen WT und Mutanten sind durch einen Stern gekennzeichnet (t-Test, p-Wert = 0,05)

Sowohl die Mutante FW1 als auch FW2 durchlaufen den kompletten Lebenszyklus, da hier wie auch beim WT die Sporenlager inkl. der typischen Setae zu erkennen sind. Bei FW3 scheint dieser Ablauf gestört zu sein. Hier entwickeln sich aus den wenigen gekeimten Konidien nur deformierte Appressorien, welche nicht mehr in der Lage sind, die intakte Epidermis zu penetrieren und keine weitere Differenzierung zeigen. Die Zahl der *in vitro* gebildeten Appressorien (Abbildung 19 C, schwarze Balken) ist bei den Mutanten FW1 und FW2 ähnlich zum Wildtyp, während FW3 eine signifikante Reduktion von 70 % aufweist. Bei der Bildung von Konidien (Abbildung 19 C, graue Balken) weisen sowohl FW1 als auch FW3 eine signifikante Reduktion (ca. 65 %) im Vergleich zum Wildtyp auf.

Die verwendeten ATMT-Mutanten tragen alle eine Einzelintegration der T-DNA im Genom und somit war es möglich, den Integrationsort zu bestimmen (Abbildung 20). Für die Mutante FW1 war es nicht möglich, mit der Methode des „Genome-Walking“ (Münch et al., 2011) den Lokus der Integration zu bestimmen. Daher wurde eine weitere Methode, die RESDA-PCR (*restriction enzyme site directed amplification*), zur Identifizierung der genomischen Region um die T-DNA angewandt (Gonzalez-Ballester et al., 2005). Auch mit dieser Methode konnten wiederum nur die Integrationsorte für FW2 und FW3 bestimmt werden. Bei diesen beiden Mutanten ist die T-DNA im Bereich der Promotoren zweier divergierender Gene integriert. Auf Grund dieser Lage bleibt ungeklärt, welches der jeweils beiden Gene für die beobachteten Phänotypen verantwortlich war.

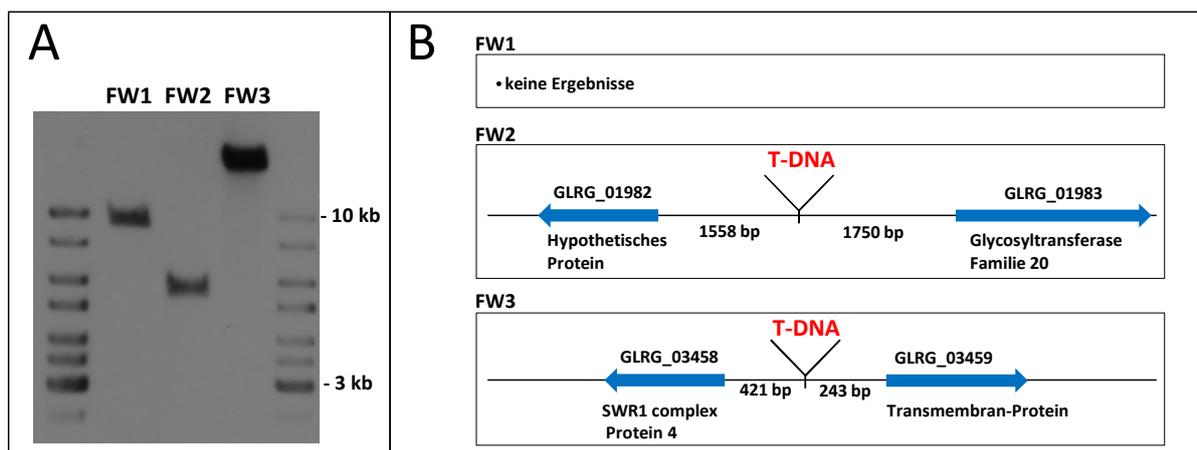


Abbildung 20: Integration der T-DNA. (A) Southern Hybridisierung der drei ATMT-Mutanten. Die verwendete 500 bp Sonde hybridisierte mit dem auf der T-DNA enthaltenen Hygromycin-Resistenzgen *hph*. Als Restriktionsenzym für alle Mutanten wurde HindIII benutzt. **(B)** Schematische Darstellung des Integrationsortes der T-DNAs.

Zeitlicher Verlauf der Infektion der ATMT-Mutanten und des WT-Isolates

Im nächsten Versuch sollte gezeigt werden, ob und wie die verringerte Virulenz der ATMT-Mutanten mit der Biomasseentwicklung korreliert und an welchen Zeitpunkten signifikante Unterschiede zum Wildtyp vorliegen. Abbildung 21 zeigt die Zunahme der pilzlichen DNA *in planta* während des Infektionsverlaufes des WT-Stammes und der Mutanten FW1, FW2 und FW3 über die Zeitspanne von 2 hpi bis 120 hpi. Während sich an den frühen Zeitpunkten (biotrophe Phase) wenig Unterschiede zeigten, traten mit Beginn der nekrotrophen Phase (ab 72 hpi) signifikante Unterschiede zwischen den ATMT-Mutanten und dem WT auf. Die Mutante FW3 zeigte wie zu erwarten keine Zunahme der pilzlichen DNA über den gesamten Zeitverlauf, da sie im Stadium der Appressorienbildung stehen blieb und es nicht zu einer Penetration der Epidermis kam. Die Mutanten FW1 und FW2 waren zwar noch in der Lage ihren Lebenszyklus zu vollenden (Vergleiche Abbildung 7B), zeigten aber im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Verringerung der Biomasse zum Zeitpunkt 120 hpi. Vergleicht man die makroskopische Symptomausprägung (Abb. 7A) mit den gemessenen Mengen an pilzlicher DNA zum Zeitpunkt 120 hpi, ergibt sich dieselbe Abstufung der Virulenz (WT > MB2 > MB1 > MB3).

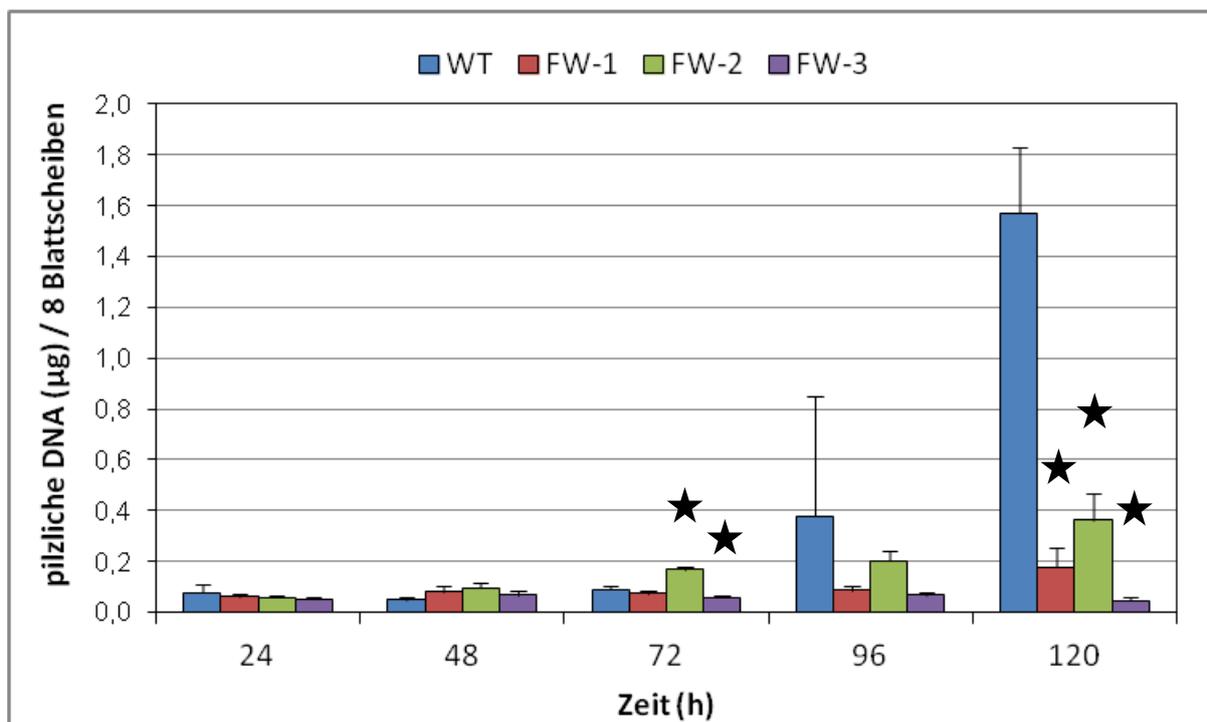


Abbildung 21: Kinetik der Biomasseentwicklung der ATMT-Mutanten *in planta*. Verwendet wurde die Maissorte Mikado, welche mit 10^4 Konidien/Inokulationspunkt der jeweiligen Mutanten bzw. dem WT-Isolate inokuliert wurden. Jede Säule repräsentiert den Durchschnitt und die Standardabweichung aus 5 biologischen Wiederholungen. Pro biologische Wiederholung wurden 8 Blattscheiben von 8 verschiedenen Blättern gepoolt (optimiertes Pooling). Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und den Mutanten sind durch einen Stern gekennzeichnet (t-Test, p-Wert = 0,05).

C.3.4. Bestimmung der Anfälligkeit verschiedener Maissorten

Der in dieser Arbeit entwickelte qPCR-Test wurde im folgenden zur Kärung der Frage genutzt, ob in verschiedenen Wirtshintergründen eine einheitliche Korrelation zwischen der auftretenden Symptomatik und der Biomasseentwicklung des Wildtypstammes von *C. graminicola* besteht. Um diese Frage zu klären wurden als erstes Punktinokulationen von Blattsegmenten von 37 Maissorten durchgeführt. Von diesen wurden anschließend Sorten ausgewählt, die deutliche Unterschiede in der Anfälligkeit aufwiesen, um in einer Zeitreihe die Biomassezunahme des Wildtypisolates über qPCR zu bestimmen.

Vortest

Nach Punktinokulationen von Blattsegmenten von 37 Maissorten ergab sich eine große Spannweite an makroskopisch sichtbaren Symptomen.

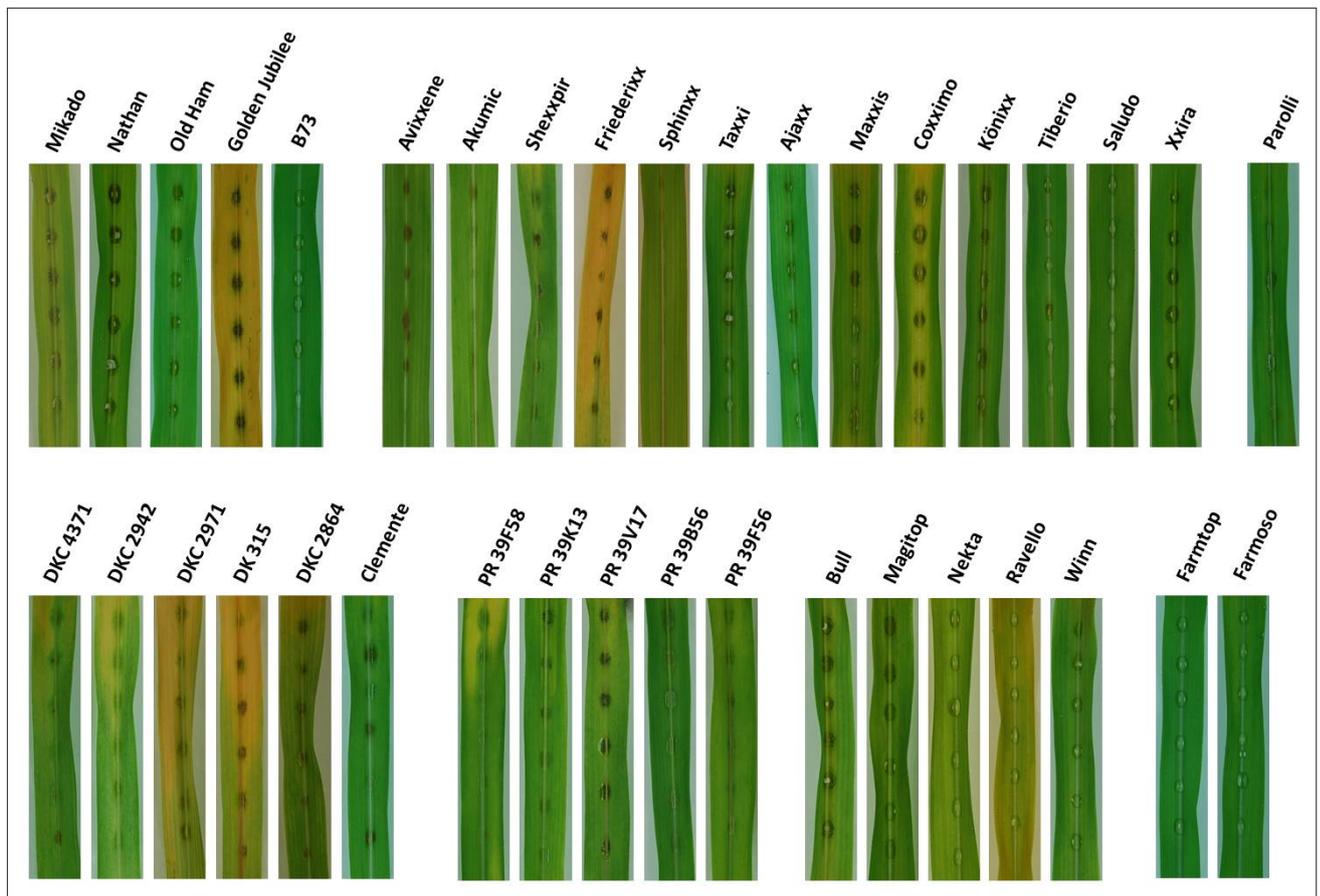


Abbildung 22: Vergleich der Anfälligkeit verschiedener Maissorten für *C. graminicola*. Repräsentativer Blattsegmenttest von 37 verschiedenen Maissorten. Inokuliert wurde mit 10 μ l-Tropfen einer Sporenkonzentration von 10^6 Konidien/ml. Die Dokumentation erfolgte nach 96 hpi.

Auf der Sorte Golden Jubilee traten die ersten Symptome bereits zwischen 60 h und 72 h nach der Inokulation (hpi) auf, während bei den meisten anderen Sorten frühestens ab 72 hpi die ersten Anthraknosensymptome sichtbar wurden. Bei den Sorten B73, Sphinx, Saludo, PR39F58, Farmtop und Famoso waren die Symptome erst ab 96 hpi zu erkennen. Keine der verwendeten Maissorten wies eine absolute Resistenz gegenüber dem Wildtypisolat auf.

Für weitere Experimente wurden die folgenden Maissorten ausgesucht.

1. Golden Jubilee, stark anfällige Sorte gegenüber *C. graminicola*.
2. Mikado, normal anfällige Sorte gegenüber *C. graminicola*.
3. Farmtop, schwach anfällige Sorte gegenüber *C. graminicola*.
4. B73, schwach anfällige Sorte gegenüber *C. graminicola*.

Zeitlicher Verlauf der Infektion an verschiedenen Maissorten

Mit Hilfe des neuen qPCR Testes wurde nun geklärt, mit welcher Geschwindigkeit der Wildtypstamm seine Entwicklung auf den ausgewählten Maissorten vollzieht, wobei der Zeitpunkt des Wechsels von der Biotrophie in die Nekrotrophie besonders interessierte. Die Infektion wurde auf den Maissorten Mikado, Golden Jubilee, B73 und Farmtop nach Punktinokulationen von Blattsegmenten über eine Zeitspanne von 24 hpi bis 120 hpi verfolgt. Aus den zusammengefaßten Gewebeproben wurde die Gesamt-DNA isoliert und durch qPCR analysiert (Abbildung 23). An den ersten beiden Zeitpunkten (24 hpi und 48 hpi) gab es zwischen den Sorten wenig Unterschiede in der Zunahme der pilzlichen Biomasse. Da in dieser frühen Phase der Infektion der Pilz nur wenige Zellteilungen durchlaufen hat, hat sich die Menge an seiner DNA noch nicht so weit von der Nachweisgrenze entfernt, dass mögliche Unterschiede nicht durch die Standardabweichungen verdeckt wurden. Ab dem Zeitpunkt 72 hpi war ein Anstieg der pilzlichen Biomasse in den Maissorten Golden Jubilee, Mikado und Farmtop zu erkennen (Abb. 14B). Betrachtet man aber die Blätter, so war nur bei der Sorte Golden Jubilee eine beginnende Verfärbung im Inokulationstropfen schwach zu erkennen (Abb. 14A). Die beschleunigte Entwicklung von *C. graminicola* auf dieser Sorte wurde auch durch die qPCR angezeigt, da die gebildete Biomasse bei 72 hpi und 96 hpi signifikant höher war als bei den anderen Sorten. Die Sorte B73 zeigte erst zum Zeitpunkt 96 hpi einen Anstieg der pilzlichen Biomasse, aber noch keine Symptome. Ab diesem Zeitpunkt wiesen auch die Sorten Mikado und Farmtop sichtbare Symptome auf. Die Gesamtmenge an pilzlicher Biomasse bei Golden Jubilee war zu diesem Zeitpunkt immer noch signifikant erhöht im Vergleich zu allen anderen Sorten, was auch mit den am stärksten ausgebildeten Anthraknosensymptomen korrelierte. Im Gegensatz dazu wies die Sorte Mikado eine geringere Biomasse im Vergleich zu Farmtop auf, obwohl die Ausprägung der Symptome bei Mikado

stärker war als bei Farmtop. Am letzten gemessenen Zeitpunkt von 120 hpi gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Sorten mehr, obwohl die Symptome zu diesem Zeitpunkt deutlich verschieden sind. Dies bedeutet, daß der Pilz auf der Sorte B73 in seiner Entwicklung aufgeholt haben muss. Interessanterweise gab es hier bei 120 hpi immer noch so gut wie keine Anthraknosen, obwohl ein Biomassegehalt vorlag, bei der alle anderen Sorten deutliche Symptome aufwiesen.

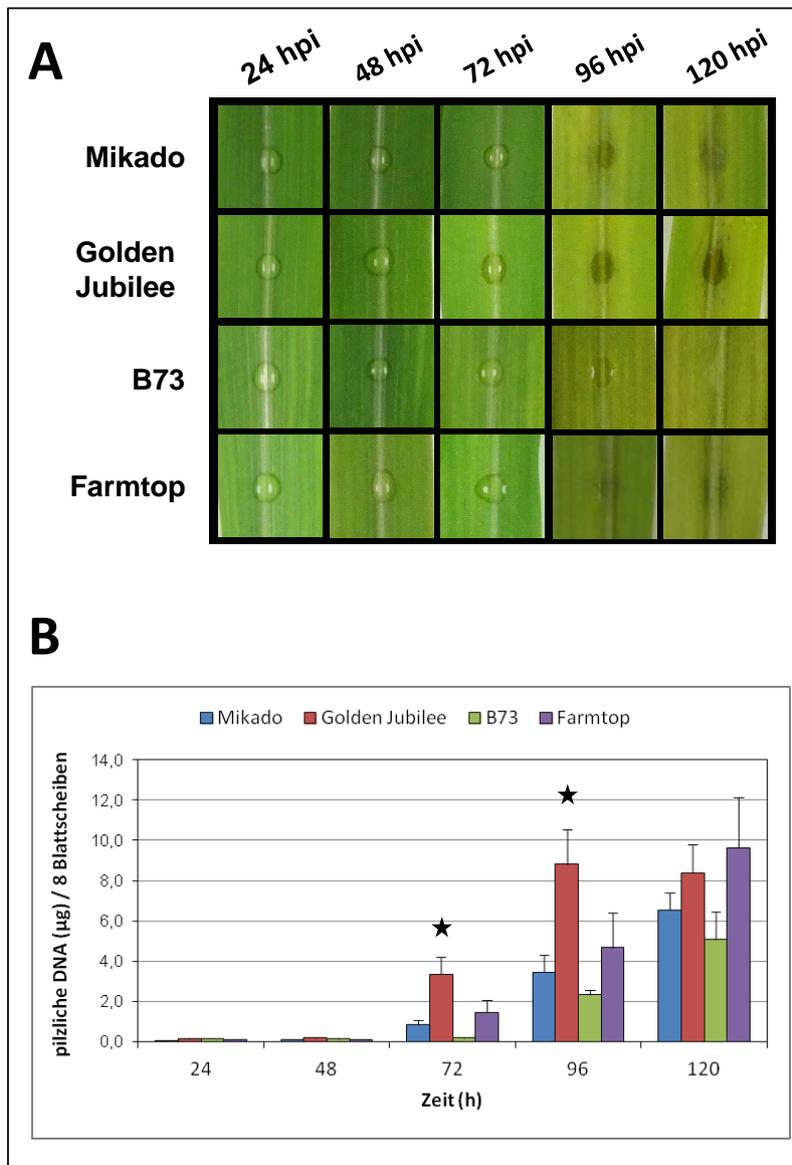


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Infektion des Wildtypstammes an verschiedenen Maissorten. (A) Makroskopische Symptomausprägung an den Inokulationspunkten während verschiedener Zeitpunkte. (B) Entwicklung der pilzlichen Biomasse, bestimmt durch qPCR, während der Infektion. Jede Säule repräsentiert den Durchschnitt und die Standardabweichung aus 5 biologischen Wiederholungen. Pro biologischer Wiederholung wurden 8 Blattscheiben von 8 verschiedenen Blättern zusammengefaßt (optimiertes *Pooling*). Signifikante Unterschiede zwischen einer Maissorte und allen anderen Sorten sind durch einen Stern gekennzeichnet (t-Test, p-Wert = 0,05).

D. Diskussion

D.1. Punktinokulation von Blattsegmenten als reproduzierbares

Testsystem

Durch die große Anzahl an erzeugten Deletionsstämmen innerhalb dieser Arbeit, welche hinsichtlich ihrer pathogenen Eigenschaften während der Interaktion untersucht worden sind, war es von zentraler Bedeutung, ein schnelles und reproduzierbares Testsystem zur Bestimmung der Virulenz zu benutzen. Dieses sollte aber nicht zu artifiziell sein, so dass mögliche Abwehrreaktionen der Pflanzen immer noch erkennbar und interpretierbar bleiben.

Die Punktinokulation von Blattsegmenten (PIB) wurde bereits mehrfach erfolgreich angewendet, um Virulenzunterschiede zwischen Mutanten und dem Wildtypisolat von *C. graminicola* aufzuzeigen (Münch et al., 2008; Horbach et al., 2009). Bisher ungeklärt blieb aber die Frage, ob infizierte Pflanzenzellen auf den abgeschnittenen Blattsegmenten molekular gleich reagierten wie solche in intakten Blättern. Bei Inokulationsversuchen an intakten Pflanzen konnte gezeigt werden, dass das Wildtypisolat von *C. graminicola* vermutlich nicht in der Lage ist aktiv die pflanzliche Abwehr zu unterdrücken. Typische pflanzliche Abwehrgene des Mais, wie Glukanasen (*ZmPR2a* und *ZmPR4b*), Chitinasen (*ZmAchit*) oder PR-Proteine mit unbekannter Funktion (*ZmPR1* und *ZmPR5*) wiesen bereits in der frühen Phase (ab 36 hpi) der Infektion eine stark hochregulierte Expression auf, welche auch in den späteren Zeitpunkten nicht supprimiert wurde (Vargas et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden in einer qRT-PCR Studie vergleichbare Ergebnisse für die Sprühinokulation intakter Pflanzen (SIP) erzeugt. Auch hier war eine Hochregulation der Transkripte der Gene *ZmPR2a*, *ZmPR4b*, *ZmAchit* und *ZmPR1* ab 36 hpi zu erkennen. Die Ergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Arbeit zeigen, dass sowohl die Blattinfektion als auch die Stängelinfektion durch *C. graminicola* eine systemische Abwehrreaktion in den Maispflanzen hervorruft (Balmer et al., 2013). Dabei wurden die Transkriptgehalte der gemessenen 44 Abwehrgene im Zeiraum von 0 hpi bis 96 hpi sowohl in den Blättern als auch im Stängel auf ähnliche Weise reguliert. Im Gegensatz zu *M. oryzae* wurde bei der Infektion des Maisstängels durch *C. graminicola* keine Runterregulation bestimmter Abwehrgene, auch 6 Tage nach Inokulation, beobachtet. Es konnte aber eine Runterregulation der 2 Abwehrgene *ZmBx1* und *ZmIGL* während der frühen Phase der Blattinfektion beobachtet werden. Da deren Genprodukte an der Synthese von Benzoxazinoiden beteiligt sind und BX1-defiziente Maismutanten eine geringere Penetrationsresistenz gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Setosphaeria turcica* zeigten, wurde vermutet, dass die Suppression von *CgBx1* und *CgIGL* die Entwicklung von *C. graminicola* auf den Blättern erleichtert.

Bei der biotrophen Interaktion von *Ustilago maydis* auf Mais kommt es ebenfalls schon während der Penetrationsphase (12 – 24 hpi) zu einer Erkennung durch die Wirtspflanze und zur Hochregulierung von Glukanasen und Chitinasen. Doch im Gegensatz zu *C. graminicola* scheint *U. maydis* in der Lage zu sein, nach erfolgreicher Penetration die Expression der meisten Abwehrgene runter zu regulieren (Doehlemann et al., 2008).

Die Erkennung des Pathogens durch den Wirt und die dadurch ausgelöste Erhöhung der Transkriptionsrate spezifischer Abwehrgene wurde genutzt um zu zeigen, dass das in dieser Arbeit verwendete in vitro Inokulationssystem, die Punktinokulation von Blattsegmenten, die gleiche Interaktion erlaubt, wie sie auch bei intakten Blättern auftritt. Der Vergleich zwischen PIB und SIP bezüglich der hier gemessenen Abwehrgene (*ZmPR2a*, *ZmPRAchit*, *ZmPr4b*, *ZmPR1* und *ZmPR5*) zeigt deutlich, dass im infizierten Pflanzengewebe sowohl der Zeitpunkt der Erhöhung als auch die Menge der betreffenden Transkripte annähernd gleich verändert waren. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Zell-für-Zell Interaktion, d. h. die Erkennung des Pathogens und die daraus resultierende Veränderung der Transkriptabundanz der spezifischen Abwehrgene über den gesamten Versuchszeitraum, innerhalb des pflanzlichen Gewebes, unabhängig davon ob, es sich um Blattsegmente oder intakte Blätter handelt, gewährleistet ist. Für die Untersuchung systemischer Reaktionen der Pflanze auf die Infektion durch *C. graminicola* sollten allerdings ganze Pflanzen inokuliert werden (Methode „SIP“ in dieser Arbeit oder Vargas et al. 2012). Die Punktinokulation von Blattsegmenten stellt ein schnelles und reproduzierbares Testsystem dar, bei dem, wie auf intakten Blättern, eine Erkennung durch die Pflanze und auch mögliche Abwehrreaktionen zu erkennen sind und sich auf einfache Weise eine große Anzahl verschiedener Pilzmutanten hinsichtlich der pathogenen Eigenschaften testen lassen.

D.2. Bewertung verschiedener Ansätze zur Identifizierung von Virulenzfaktoren

D.2.1. Deletionsmutagenese von YSST-Kandidaten

Alle innerhalb dieses Ansatzes untersuchten Kandidatengene stammen aus einem YSST-Screen, durch den Proteine mit einem funktionalen Signalpeptid identifiziert werden können (Krijger et al., 2008). Insgesamt wurden dabei 102 Kandidatengene von *C. graminicola* ermittelt, von denen bisher 19 durch Gendeletionen untersucht worden sind. Die Kriterien zur Auswahl der zu untersuchenden Gene waren zum einen die Zuordnung zu kleinen, cysteinreichen Proteinen als auch die Homologie zu bekannten Enzymen oder Proteindomänen. Die erzeugten Deletionsstämme dieser 19 YSST-

Kandidatengene zeigten keine reproduzierbaren Veränderungen in der Virulenz im Vergleich mit dem Wildtypisolat (Weihmann, 2008; Kröling, 2010).

Bei *Colletotrichum orbiculare* wurden homologe Proteine zu dem im YSST-Screen gefundenen Laccasen (Cg0908 + Cg1146), ebenfalls durch Gendeletionen untersucht. Im Falle der Laccase 1 von *C. orbiculare* (Homolog zu Cg1146) zeigten die erzeugten Mutanten keine Unterschiede in der Pathogenität oder Morphologie im Vergleich zum Wildtypisolat (Tsuji et al., 2001). Die Deletion des zweiten Laccasegens (Homolog zu Cg0908) führte allerdings zu apathogenen Mutanten (Lin et al., 2012). Bei *C. graminicola* zeigten die Mutanten mit Einzeldelationen der beiden Laccasen keine Unterschiede in Bezug auf Pathogenität zum Wildtypisolat. Das Fehlen infektionsspezifischer Phänotypen kann unter anderem durch Redundanz der Proteinfunktion der einzelnen Kandidatengene erklärt werden. Um solch eine Redundanz der beiden, im YSST-Screen gefundenen Laccasen Cg0908 und Cg1146 auszuschließen, wurde für diese beiden Gene eine Doppeldeletionsmutante erzeugt. Dieses Vorgehen führte ebenfalls nicht zu einem veränderten Phänotyp in Bezug auf die Pathogenität der Mutante. Dass die Identifizierung sekretierter Proteine und die anschließende Analyse durch Gendeletionen eine langwierige Arbeit ist, zeigte eine Veröffentlichung aus dem Jahre 2012. Hier wurden 78 Gene von *M. oryzae*, welche für putativ sekretierte Proteine kodieren, deletiert und die entstandenen Deletionsmutanten hinsichtlich ihrer Pathogenität, vegetativem Wachstum und Konidienbildungsrate untersucht (Saitoh et al., 2012). Bei 77 der 78 Gendeletionen wurden keine Veränderungen im Vergleich mit dem Wildtypisolat festgestellt.

Die für den YSST-Screen verwendete cDNA von *C. graminicola* stammte aus einer Flüssigkultur, welche durch die Zugabe von Maiszellwänden und löslichem Blattextrakt zur Bildung spezifischer Transkripte angeregt werden sollte. Ungeklärt blieb aber, ob die so transkriptionell induzierten Gene tatsächlich eine Rolle während der Interaktion spielen. Es wäre denkbar, dass manche der gefundenen YSST-Kandidatengene durch die Methode *per se* auf irgendeine Weise aktiviert und schlussendlich identifiziert wurden sind, ohne aber eine Bedeutung für die Interaktion bzw. Pathogenität zu haben. Um dies auszuschließen, hätten Induktionen mit verschiedenen Extrakten durchgeführt werden müssen, um diese vergleichen zu können. Beim Bohnenrost *U. fabae* konnte durch einen vergleichenden YSST-Screen des Sekretoms von Haustorien und Infektionsstrukturen, welche *in vitro* gewachsen waren, infektionsspezifische Proteine identifiziert werden (Link and Voegelé, 2008).

Dass unter den 102 YSST-Kandidatengenomen aber tatsächlich Proteine vorhanden sind, welche spezifisch für die Pathogenese sind, zeigt jedoch die vorliegende Arbeit. Das Gen *GLRG_04689*, welches durch die Deletion des *Gencluster 6* als Virulenzfaktor identifiziert werden konnte (s.u.), befindet sich auch in der YSST-Kandidatenliste. Innerhalb dieser Liste gehört es zu 28 Genen, deren Proteine zur Zeit keine Übereinstimmung mit den Datenbanken zeigten (hypothetische Proteine). Da das Gen bzw. Protein keine Besonderheiten (z. B. eine besondere Proteinstruktur) aufwies, wurde es nicht durch Gendeletionen weiter analysiert. Dieser Zufall zeigt aber, dass sich innerhalb der Kandidatenliste des YSST-Screens dennoch weitere interessante Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren befinden könnten.

D.2.2. Deletionsmutagenese von Clustern sekretierter Proteine

Insgesamt wurden 102 *Gencluster*, welche für sekretierte Proteine kodieren, identifiziert. Ein Cluster bestand aus mindestens drei solcher Gene, welche im Genom direkt aufeinanderfolgen oder durch maximal ein Gen ohne putatives Signalpeptid unterbrochen gewesen sind. Die größten *Gencluster* (3 Stück) enthielten dabei 5 direkt aufeinanderfolgende Gene, welche für sekretierte Proteine kodieren. Die einzelnen gefundenen Cluster erschienen zufällig auf den Chromosomen verteilt. Eine Situation, wie sie im Genom von *U. maydis* auftritt d. h., dass eine hohe Anzahl (bis zu 22) sekretierter Proteine in nur wenigen Clustern zusammengefasst ist, war bei *C. graminicola* nicht zu beobachten. Dennoch hat die Analyse solcher Cluster im Gegensatz zu Einzelgenen den entscheidenden Vorteil, dass durch eine einzige Deletion gleichzeitig die Funktion mehrerer Gene untersucht wird, wodurch die Wahrscheinlichkeit auf hervorgerufene Phänotypen ansteigt. Insgesamt wurden 6 Cluster mit zusammen 32 Genen deletiert. Die Größe der genomischen Regionen, welche durch die homologe Rekombination mit der Deletionskassette ausgetauscht wurden, betrug bei den einzelnen Clusterdeletionen 5 kb bis 23 kb.

Die Cluster 1, 3 und 5 wurden für die Deletion ausgewählt, da sie eine große Anzahl an Kandidatengenomen enthielten. Die meisten der in diesen Clustern deletierten Gene waren in den Datenbanken als hypothetische Proteine beschrieben. Bei den Mutanten mit einer Deletion der Cluster 1 bzw. 3 traten keine Unterschiede bezüglich Pathogenität im Vergleich zum Wildtypisolat auf. Die Deletion des Clusters 5 erwies sich als lethal, da nur Transformanten mit ektopischer Integration der Deletionskassette auf den Selektionsplatten wuchsen. Auf Grund dieser Tatsache wurde der Cluster in 3 Teile (5A + 5B + 5C) aufgeteilt, welche dann einzeln deletiert wurden. Die entstandenen Mutanten des Teilclusters 5A wiesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem verwendeten Antibiotikum Nourseothricin auf, das eigentlich durch die Nourseothricin N-Acetyltransferase, die durch das auf der Deletionskassette enthaltene *nat1*-Gen kodiert wird, inaktiviert

werden sollte (Krugel et al., 1993). Die im Cluster 5A enthaltenen GMC Oxidoreduktasen gehören zu einer Proteinfamilie welche sowohl Cholin-Dehydrogenasen, Methanol-Oxidasen als auch Cellobiose-Dehydrogenasen umfasst. Enzyme dieser Familie besitzen eine C-terminale Domäne mit bis heute ungeklärter Funktion. Auswirkungen solcher Proteine auf die Sensitivität gegenüber Selektionsmarkern wie Nourseothricin bzw. Wechselwirkungen mit dem Resistenzprotein sind nicht bekannt. Die Δ Cluster 5A Mutanten zeigten sowohl ein normales axenisches Wachstum bei Abwesenheit von Nourseothricin als auch einen normalen Infektionsverlauf im Vergleich mit dem Wildtypisolat. Die Mutanten des Clusters 5B zeigten ebenfalls ein reduziertes Wachstum, aber unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit des Selektionsmarkers. Die drei Gene dieses Clusters kodierten für nicht sekretierte Proteine, von denen zwei als hypothetische Proteine beschrieben waren. Das dritte Gen ist als ATP-abhängige Kinase in den Datenbanken annotiert. Die Deletion eines dieser Gene oder die Kombination der Gendeletionen erzeugen einen generellen Wachstumsdefekt in den Mutanten. Erstaunlicherweise zeigen die Mutanten bei der Symptomausprägung während der Infektion keine Unterschiede im Vergleich mit dem Wildtypisolat.

Die Cluster 2, 4 und 6 wurden für die Deletionsanalyse herangezogen, da sie Gene enthielten, deren Homologe bereits in anderen Pilzen beschrieben wurden. Bei dem Gen GLRG_06284 aus Cluster 2 handelte es sich um das Homolog des in *M. oryzae* beschriebenen BAS-2 Protein (*biotrophy-associated secreted*), welches während der biotrophen Phase exprimiert und in einer speziellen Struktur, dem BIC (*biotrophic interfacial complex*), lokalisiert ist (Mosquera et al., 2009). Die Deletion des BAS-2 Genes in *M. oryzae* führte nicht zu einer veränderten Pathogenität. Bei Cluster 4 ist das Homologe von GLRG_03572 der in *Aspergillus nidulans* beschriebene Transkriptionsfaktor PacC, welcher in einem alkalischen Milieu spezifische Gene aktiviert (Tilburn et al., 1995). Die Deletion dieses Genes führte zu einer verringerten *in vivo* Wachstumsrate des Pilzes bzw. zu einer geringeren Entzündungsrate bei den infizierten Mäusen. Im Gegensatz dazu zeigte die konstitutive Aktivierung von PacC eine erhöhte Sterblichkeit sowie starkes invasives Wachstum (Bignell et al., 2005). Im Falle von Cluster 6 wurde das Homologe des Genes GLRG_04686 in *M. oryzae* als Pathogenitätsfaktor MC69 beschrieben (Saitoh et al., 2012). Bei den Mutanten von Cluster 2 und 4 konnten keine Auffälligkeiten in Bezug auf die pathogenen Eigenschaften festgestellt werden. Schließlich führte die Deletion des Clusters 6 zu Mutanten, die eine extrem reduzierte Virulenz aufzeigten. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass das Gen GLRG_04686 für den annähernd apathogenen Phänotyp der Δ Cluster6 Mutanten verantwortlich ist. Überraschenderweise verursachte die Deletion eines weiteren Genes von Cluster 6, GLRG_04689, ebenfalls eine reduzierte Virulenz bei den erzeugten Deletionsmutanten (siehe → D.3 bzw. D.4).

D.2.3. Deletionsmutagenese homologer Gene von *M. oryzae*

Auf Grund der phylogenetischen Verwandtschaft und ähnlichen Lebensweise zwischen *M. oryzae* und *C. graminicola* konnte angenommen werden, dass homologe Proteine, die in einer der beiden Arten als mögliche Pathogenitäts bzw. Virulenzfaktoren beschrieben wurden, auch im jeweils anderen Pathosystem solch eine Funktion erfüllen könnten. Daher wurde zur Identifikation interessanter Kandidatengene eine bereits existierende ATMT-Datenbank von *M. oryzae* genutzt (Jeon et al., 2007). Der Vorteil solch einer durch Zufallsmutagenese erzeugten Datenbank besteht darin, dass durch die große Anzahl an erzeugten Mutanten die Wahrscheinlichkeit steigt, bis dato unbekannte Gene bzw. Proteine zu identifizieren, welche einen pathogenen Phänotyp auslösen.

Insgesamt wurden 28 Proteine in *C. graminicola* identifiziert, deren Homologe in *M. oryzae* auf Grund der T-DNA Integration, im Promotor oder Leserahmen, den jeweils beschriebenen Phänotyp möglicherweise hervorrufen. Bei 19 dieser Proteine war nur ein homologes Protein in *C. graminicola* vorhanden und somit zur direkten Charakterisierung durch Gendeletionen geeignet. Für 7 dieser Proteine wurden Deletionsmutanten erstellt. Die ATMT-Mutanten von *M. oryzae*, bei denen diese Gene möglicherweise betroffen sind, wiesen alle Auffälligkeiten bei der Appressorienbildung oder nachfolgenden Infektionsschritten auf. Die erzeugten Mutanten in *C. graminicola* hingegen zeigten keine Beeinflussung hinsichtlich der Appressorienbildung oder anderer Pathogenitätseffekte. Da die Integration der T-DNA sowohl in offenen Leserahmen als auch in intergenischen Regionen erfolgen kann, ist in vielen Fällen möglicherweise die Zuordnung des erhaltenen Virulenzdefektes zu einem bestimmten Kandidatengen nicht eindeutig. Wenn zum Beispiel die Integration zwischen zwei Gene erfolgte, die auf dem Chromosom „Kopf-an-Kopf“ angeordnet liegen, könnten Bindestellen für Repressoren, Aktivatoren oder anderer Proteine jedes der beiden Gene betroffen sein, was nicht ohne weitere Nachfolgeexperimente festgestellt werden kann. Leider können auch keine Rückschlüsse auf die in *M. oryzae* identifizierten Gene bzw. Proteine gezogen werden, da dort keine Einzeldelationen der in dieser Arbeit untersuchten 7 Gene erzeugt wurden.

Wenn die Expression der Gene durch die Integration der T-DNA in ihrer Quantität beeinflusst wurde und dies den beobachteten Phänotyp hervorruft, könnte es passieren, dass eine Deletion des Genes keinen oder nicht denselben Phänotyp hervorruft. Bei durch REMI-Mutagenese entstandenen Δ CPR1 Mutante von *C. graminicola* erfolgte die Integration des Selektionsmarkers in den 3' untranslatierten Bereich des Genes *CgCPR1*, exakt 19 Basenpaare hinter dem Stop-Kodon (Thon et al., 2002). Die Integration bewirkte eine Suppression der Translation von CPR1p und löste damit wahrscheinlich den in der Mutante beobachteten apathogenen Phänotyp aus. Eine Deletion von CPR1 war allerdings nicht möglich, da es sich bei CPR1p um eine essentielle Komponente des Signal-Peptidase-Komplexes handelt.

D.2.4. Identifizierung translozierter Proteine

Dieser Teil der Auswertung des durch *in silico* Analysen bestimmten Sekretoms von *C. graminicola* befasste sich mit der Identifizierung von Translokationsmotiven, welche eine Aufnahme in die Wirtszelle vermitteln sollen. Auf diese Weise sollten pilzliche Proteine identifiziert werden, welche nach erfolgreicher Sekretion in den Apoplasten in die pflanzliche Wirtszelle gelangen um als mögliche Effektoren zu wirken. Grundlage für diese Bestimmung sind Entdeckungen welche durch die Genomsequenzierungen einiger Arten von Oomyzeten gemacht wurden. Die Sekretome verschiedener Phytophthora Arten zeigten eine Anhäufung spezieller Proteinfamilien. Eine dieser Familien besitzt das sogenannte RXLR-Motiv im N-terminalen Teil der Aminosäurekette (Bhattacharjee et al., 2006). Andere Arbeiten zeigten, dass manche dieser Proteine als wichtige Effektoren während der Interaktion dienen (Rehmany et al., 2005; Whisson et al., 2007). Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass das in diesen Effektoren befindliche RXLR-Motiv benötigt wurde, um ihre Translokation vom Apoplasten in die pflanzliche Zelle zu vermitteln. Obwohl die Oomyzeten sich evolutionär von bestimmten Algen und nicht von echten Pilzen ableiten, konnten auch hier funktionale RXLR-ähnliche-Motive nachgewiesen werden (Dou et al., 2008; Kale et al., 2010; Rafiqi et al., 2010; Plett et al., 2011), was durch konvergente Evolution erklärt werden könnte. Bis heute ungeklärt ist, auf welche Weise RXLR- bzw. RXLR-ähnliche-Motive an der Translokation der Proteine beteiligt sind. Arbeiten an dem *Phytophthora sojae* Effektor Avr1b zeigen, dass durch gezielte Mutation des Motives sowohl die Bindung an Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PIP3) als auch die Aufnahme in die Wirtszelle verhindert werden kann (Kale et al., 2010; Sun et al., 2013). Ergebnisse weiterer Arbeiten an Avr1b und auch dem aus *P. infestans* stammenden Effektor Avr3a lassen vermuten, dass nicht das RXLR-Motiv selbst, sondern durch Faltung des Proteins entstandene positiv geladene Stellen der Aminosäurekette für die Bindung an das negativ geladene PIP3 verantwortlich seien (Yaeno et al., 2011). Neueste Untersuchungen in 3 voneinander unabhängigen Laboren konnten die autonome Aufnahme von fluoreszenten Proteinen, welche entweder das RXLR-Motiv des Effektors Avr1b aus *P. sojae* bzw. Avr3a aus *P. infestans* enthielten, nicht reproduzierbar nachweisen. Die Autoren konnten zeigen dass auch Kontrollproteine ohne RXLR-Motiv bei einer längeren Inkubationszeit in die Wirtszellen transloziert wurden, wohingegen bei kurzen Inkubationszeiten keine Translokation von Proteinen, mit oder ohne RXLR-Motiv, auftraten. Begründet wurde dieses Phänomen mit der deutlich zu hohen Proteinkonzentration welche für diese und frühere Experimente genutzt worden sind (Wawra et al., 2013). Um diese neuesten Erkenntnisse erneut zu widerlegen wurden alle früheren Experimente welche eine autonome Translokation von RXLR-Proteinen gezeigt hatten erfolgreich wiederholt (Tyler et al., 2013). Als mögliche Diskrepanz zwischen den verschiedenen Ergebnissen der einzelnen Arbeiten wurden unter anderem z. B. unterschiedliche Methoden der Proteinaufreinigung, die Verwendung verschiedener Kontrollen

sowie die Verwendung anderer Puffer als mögliche Gründe genannt (Tyler et al., 2013). Fest steht das die genaue biologische Funktion von RXLR- bzw RXLR-ähnlichen Motiven in Effektorproteinen von Oomyzeten bzw. echten Pilzen noch nicht geklärt ist und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen bleiben wird.

Insgesamt konnten im Sekretom von *C. graminicola* 129 Kandidatengene mit einem putativen degenerierten RXLR-Motiv (definiert nach Kale 2010) im N-terminalen Bereich identifiziert werden, was für eine umfassende Deletionsanalyse zu viel war. Erst durch die Veröffentlichung der Transkriptomdaten von *C. graminicola* (O'Connell et al. 2012) konnte die Anzahl an Kandidatengenen, durch die Untersuchung der Transkriptabundanz während der Interaktion, verringert werden. Da die Translokation eines Proteins in die pflanzliche Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit während der biotrophen Phase stattfindet, wurde nach Kandidaten gesucht welche während der Appressorienbildung bzw. Penetration eine erhöhte Transkriptionsrate im Vergleich mit der nekrotrophen Phase aufweisen. Etwa die Hälfte der Kandidatengene zeigte eine Abnahme der Transkriptmenge während der Infektion. *C. graminicola* besitzt 177 Proteine, welche ausschließlich in der Art bzw. Gattung *Colletotrichum* vorkommen und daher als mögliche Effektoren bezeichnet werden (O'Connell et al., 2012). Insgesamt 19 dieser Effektoren besitzen ein putatives RXLR-Motiv und weisen die zuvor erwähnte Abnahme der Transkriptmenge während der Infektion auf. Sechs dieser Kandidatengene sind besonders interessant, da hier eine besonders hohe Transkriptabundanz in der frühen Phase der Infektion zu erkennen war, welche zur nekrotrophen Phase hin aber stark abnimmt. Daraus könnte vermutet werden, dass diese Proteine eine spezifische Aufgabe in der biotrophen Interaktion haben.

Neben der bioinformatischen Analyse und Identifizierung geeigneter Kandidatengene wurde anlehnd an diese Promotion eine Diplomarbeit angefertigt, welche die Aufgabe hatte, die Translokation eines RXLR-Proteins, durch Fusion mit dem fluoreszenten Protein GFP, während der Interaktion von *C. graminicola* auf Mais nachzuweisen (Gottschling, 2012). Dafür wurde das aus *M. oryzae* stammende Avirulenzprotein AvrPITA, bei dem ein funktionales RXLR-Motiv nachgewiesen wurde (Kale et al., 2010), mit GFP fusioniert und heterolog in *C. graminicola* exprimiert. Dieses Fusionsprotein enthielt des Weiteren ein funktionelles Kernlokalisationsignal, so dass nach erfolgreicher Translokation in die Pflanzenzelle eine detektierbare Anreicherung des GFP-markierten Proteins im pflanzlichen Zellkern vorhanden sein sollte. Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass es während der biotrophen Phase zu einer Translokation des AvrPITA-GFP in die befallenen Pflanzenzellen kam, da wie erwartet die pflanzlichen Zellkerne grün fluoreszierten. Somit wurde bewiesen, dass eine grundsätzliche Translokation, abhängig oder unabhängig von RXLR-

Motiven, von Effektorproteinen im *Colletotrichum*-Mais System stattfinden kann. Durch diese Ergebnisse steht nun ein funktionsfähiges Testsystem zur Verfügung, mit dessen Hilfe die vielversprechendsten Kandidatengene mit einem putativen RXLR-Motiv auf ihre Lokalisation während der Pathogenese hin untersucht werden können.

D.3. Das Gen GLRG_04686 kodiert einen Virulenzfaktor

Das Gen GLRG_04686 kodiert für ein kleines Protein, welches nach der Abspaltung des putativ vorhergesagten Signalpeptides (18 AS) eine Gesamtlänge von 38 AS hat. Das Protein besitzt keine bekannten Enzymfunktionen oder Proteindomänen. Homologe Proteine von GLRG_04686p kommen sowohl in phytopathogenen als auch saprophytischen Pilzarten vor. Beim Vergleich der Proteinsequenzen fällt auf, dass zwei konservierte Bereiche vorhanden sind. Der erste Bereich umfasst die Aminosäuren 11 bis 25 und beinhaltet zum Teil das durch Bioinformatik vorhergesagte Signalpeptid. Eine so starke Konservierung im Signalpeptid ist eher ungewöhnlich, da die Funktionalität eines Signalpeptides auf den biochemischen Eigenschaften der Aminosäuren und nicht auf deren exakter Abfolge beruht. Es könnte daher vermutet werden, dass dieser konservierte Bereich eine zusätzliche Funktion für das Protein darstellt. Der zweite konservierte Bereich umfasst die Aminosäuren 39 bis 55 des unreifen Proteines. Innerhalb dieses Abschnittes befinden sich zwei Cysteinreste an Position 41 und 51, welche auch in anderen pilzlichen homologen Proteinen stets vorhanden sind. In *M. oryzae* konnte gezeigt werden, dass durch den Austausch eines der beiden Cysteine gegen ein Alanin kein funktionsfähiges Protein mehr gebildet werden konnte (Saitoh et al., 2012). Die Sekretion dieses modifizierten Proteins war allerdings durch den Aminosäureaustausch nicht gestört. Es konnte also vermutet werden, dass diese zwei Cysteine zur Ausbildung einer Disulfidbrücke dienen, welche die richtige Proteinfaltung bzw. Stabilität und somit auch die Funktionalität, aber nicht die Sekretion, beeinflussen.

In den Virulenztests wurden für die Mutanten mit der Einzeldelation von GLRG_04686 sowie den Mutanten mit der Deletion des gesamten Clusters 6 eine stark reduzierte Symptomausprägung im Vergleich mit dem Wildtypisolat festgestellt. Auch fünf Tage nach der Inokulation traten bei den Mutanten keine Symptome auf den Blättern auf. Im Gegensatz dazu waren beim Wildtypisolat die typischen schwarz-braun verfärbten Anthraknosen auf den infizierten Blättern zu erkennen. Mikroskopische Untersuchungen bewiesen, dass die Mutanten nicht mehr in der Lage waren, die epidermalen Maiszellen zu penetrieren. Trotz der annähernd gleichen Appressorienbildungsrate, verglichen mit dem Wildtypisolat, waren in über 99 % keine Infektionsvesikel bzw. Primärhyphen in den unter den Appressorien befindlichen Pflanzenzellen zu erfassen. In einigen seltenen Fällen konnten die Mutanten durch auf der Blattoberfläche befindlichen Verletzungen in das darunter

gelegene Pflanzengewebe eindringen. Wachstumsexperimente auf Medien mit definierten Kohlenstoff-Quellen zeigten, dass sowohl die $\Delta 04686$ Mutanten als auch die Δ Cluster6 Mutanten das gleiche vegetative Wachstum wie das Wildtypisolat besaßen. Auch die Symptomausprägung der Mutanten nach Inokulation verletzter Maisblätter war nicht vom Wildtypisolat zu unterscheiden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass kein genereller Fitnessverlust zwischen den $\Delta 04686$ - bzw. Δ Cluster6 Mutanten und dem Wildtypisolat bestand.

Die Differenzierung und Funktionalität des Appressoriums stellt einen besonders kritischen Punkt bei der Pathogenese von *C. graminicola* dar und entscheidet über Erfolg bzw. Misserfolg der Infektion (Deising et al., 2000b). Im Laufe der letzten Jahre wurden einige Gene identifiziert welche einen Einfluss auf die Bildung bzw. Funktion von Appressorien bei *C. graminicola* besitzen. So führte z. B. die Deletion des Genes *Cgppt1*, welche für die Phosphopantetheinyltransferase 1 kodiert, bei den erzeugten Deletionsmutanten zu einer reduzierten Bildungsrate von Appressorien auf künstlichen und artifiziellen Oberflächen (Horbach et al., 2009). Des Weiteren lysierten einige der gebildeten Appressorien, wobei der cytoplasmatische Inhalt freigesetzt wurde. Die Autoren vermuteten, dass durch die Deletion von *Cgppt1* auch der Biosyntheseweg des für die Appressorien essentiellen Melanins gestört wurde. Die Deletion der Chitinsynthase V (*CgChsV*) von *C. graminicola* führte ebenfalls zu Mutanten, welche nicht mehr in der Lage waren, funktionelle Appressorien zu differenzieren (Werner et al., 2007). Es wird angenommen, dass diese Chitinsynthase essentiell für den Aufbau und die Funktionalität der appressorialen Zellwand ist. Überraschenderweise waren die Mutanten dazu befähigt, funktionelle Hyphopodien zu bilden. Diese ebenfalls zur Druckpenetration benutzten Strukturen werden normalerweise von vegetativen Hyphen gebildet. Untersuchungen zeigten, dass die durch die Δ *CgChsV* Mutanten gebildeten Hyphopodien die gleiche Kraft während des Penetrationsvorganges aufbauten wie die des Wildtypisolates (Werner et al., 2007). Bei den $\Delta 04686$ bzw. Δ Cluster6 Mutanten entwickeln sich, wie auch beim Wildtypisolat, sowohl Appressorien als auch Hyphopodien auf den intakten Maisblättern. Diese gebildeten Infektionsstrukturen verharren, im Falle der Mutanten, dann in 99 % aller Fälle bis zu 5 Tage ohne ein erkennbares Penetrationsereignis auf den Blättern. In seltenen Fällen wuchsen Keimschläuche oder bereits auf der Blattoberfläche gebildete Hyphen in Spaltöffnungen oder in kleine Verwundungen des Blattes ein. Die Vollendung des Lebenszykluses durch Bildung von neuen Sporenlagern auf der Blattoberfläche wurde aber nicht beobachtet. Die Appressorien bzw. Hyphopodien des Wildtypisolates hingegen penetrieren die epidermalen Zellen zwischen 24 bis 48 Stunden nach Inokulation. Eine Lyse der gebildeten Infektionsstrukturen, wie sie etwa bei den Δ *Cgppt1* Mutanten auftritt, ist auch nach 5 dpi bei den Cluster 6 Mutanten nicht zu erkennen. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch Deletionsmutanten von *M. oryzae* und *C. orbiculare*, bei denen jeweils das homologe

Protein von GLRG_04686p deletiert wurden ist (Saitoh et al., 2012). Auch in diesen Fällen waren die Mutanten nicht mehr in der Lage, mit den Appressorien die Epidermiszellen der Wirtspflanzen erfolgreich zu penetrieren. Auf Grund des gleichen Phänotyps, welcher durch die Deletion von GLRG_04686 in den unterschiedlichen Pilzarten hervorgerufen wird, kann angenommen werden, dass dieses Gen bzw. das daraus resultierende Protein eine entscheidende Rolle bei der Funktionalität des Appressoriums spielt. Möglicherweise stellt es eine strukturelle Komponente des Appressoriums oder der unter dem Appressorium gebildeten Penetrationspore dar.

Interessanterweise zeigten die $\Delta 04686$ - bzw. $\Delta \text{Cluster6}$ Mutanten eine geringere Induktion der Papillenbildung bei inokulierten Maisblättern. Während beim Wildtypisolat bei rund 8 % direkt unter dem auf der Blattoberfläche gebildeten Appressorium eine Papille gebildet wurde, waren bei den $\Delta 04686$ - bzw. $\Delta \text{Cluster6}$ Mutanten keine Papillen unter den ebenfalls voll entwickelten Appressorien zu erkennen. Das Ausbleiben der pflanzlichen Abwehr in Bezug auf die Ausbildung der Papillen könnte durch den appressorialen Arrest der $\Delta 04686$ - bzw. $\Delta \text{Cluster6}$ Mutanten während der frühen biotrophen Phase erklärt werden. Es ist vorstellbar, dass während der Appressorienbildung bzw. der Penetrationsphase des Wildtypisolates die Erkennung durch die pflanzliche Abwehr nicht mehr zu 100 % durch den Pilz verhindert werden kann und somit in einigen wenigen Fällen Papillen gebildet werden. Die Appressorien der $\Delta 04686$ - bzw. $\Delta \text{Cluster6}$ Mutanten hingegen erreichen diesen kritischen Punkt der appressorialen Penetration nicht mehr und lösen somit auch keine pflanzlichen Abwehrmaßnahmen aus. Eine andere Erklärungsmöglichkeit zur verminderten Induktion der Papillenbildung wäre das völlige Ausbleiben der PTI (PAMP-triggered-immunity), die bei der Infektion mit dem Wildtypstamm noch in geringem Maße abläuft.

So könnte es sich auch im Falle des Genproduktes von GLRG_04686 um einen Effektor handeln, der im Normalfall von den pflanzlichen Zellen erkannt wird und eine Papillenbildung auslöst. In den $\Delta 04686$ - bzw. $\Delta \text{Cluster6}$ Mutanten hingegen fehlt diese Erkennung und auch die damit verbundene pflanzliche Antwort.

D.4. Das Gen GLRG_04689 kodiert einen Virulenzfaktor

Das Gen GLRG_04689 kodiert für ein 459 Aminosäuren großes natives Protein. Der Leserahmen hat eine Gesamtgröße von 1507 bp und wird von einem Intron unterbrochen. Das durch bioinformatische Analysen bestimmte Signalpeptid, mit einer Größe von 19 AS, wurde bereits durch den im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten YSST-Screen, mit dessen Hilfe funktionsfähige Signalpeptide bestimmt wurden, identifiziert (Krijger et al., 2008). Eine Charakterisierung innerhalb der YSST-Gene erfolgte jedoch nicht, da das Gen selbst nur als hypothetisches Protein beschrieben worden war und eines von vielen Proteinen mit unbekannter Funktion darstellte. Die Identifizierung

als Virulenzfaktor erfolgte durch die Charakterisierung des in dieser Arbeit beschriebenen Cluster 6, welcher fünf im Genom aufeinanderfolgender Gene enthält, die alle für putativ sekretierte Proteine kodieren. Das Protein besitzt keine bekannten Enzymfunktionen oder Proteindomänen. Homologe Proteine finden sich auch in anderen phytopathogenen sowie saprophytischen Pilzarten. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz der verschiedenen homologen Proteine sind konservierte Bereiche zu erkennen, welche auf mögliche Proteindomänen mit unbekannter Funktion schließen lassen.

In den Virulenztests wurden für die Mutanten mit der Einzeldelation von GLRG_04689 sowie die Mutanten mit der Deletion des Clusters 6B, bei welchem zusätzlich die Nachbargene GLRG_04687, GLRG_04688 und GLRG_04690 deletiert wurden, eine verminderte Symptomausprägung im Vergleich mit dem Wildtypisolat festgestellt. Die Mutanten mit der Einzeldelation der drei erwähnten Nachbargene zeigten keine Unterschiede in der Symptomausprägung verglichen mit dem Wildtypisolat. Durch mikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Δ 04689- bzw. Δ Cluster6B Mutanten eine verminderte Penetrationsrate der epidermalen Maiszellen aufwiesen. Während beim Wildtypisolat ca. 84 % der gebildeten Appressorien eine erfolgreiche Penetration zeigten, waren es bei den Δ 04689- bzw. Δ Cluster6B Mutanten im Durchschnitt nur noch ca. 18 %. Wenn es zu einer erfolgreichen Penetration kam, waren sowohl die Δ 04689 als auch die Δ Cluster6B Mutanten im Stande Primärhyphen, Sekundärhyphen und neue Sporenlager auf der Oberfläche der infizierten Blätter zu bilden, was insgesamt zu einem milderem Virulenzphänotyp führte als bei den oben diskutierten Δ 04686 Mutanten. Eine zeitliche Verzögerung bei der Ausbildung der einzelnen Entwicklungsstadien zwischen Mutanten und Wildtypisolat bestand nicht. Wachstumsexperimente auf Medien mit definierten Kohlenstoff-Quellen zeigten, dass sowohl die Δ 04689 Mutanten als auch die Δ Cluster6B Mutanten das gleiche vegetative Wachstum wie das Wildtypisolat besaßen. Auch die Symptomausprägung der Mutanten bei der Inokulation von verletzten Maisblättern war nicht vom Wildtypisolat zu unterscheiden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass kein genereller Fitnessverlust zwischen den Δ 04689- bzw. Δ Cluster6B Mutanten und dem Wildtypisolat bestand.

Weitere mikroskopische Untersuchungen der Appressorien in infiziertem Blattgewebe zeigten, dass bei den Δ 04689- bzw. Δ Cluster6B Mutanten im Vergleich zum Wildtypisolat eine viermal häufigere Papillenbildung unter den Appressorien auftrat. Bei dieser Art von pflanzlicher Reaktion handelt es sich um eine unspezifische Abwehr gegen pilzliche Pathogene, wobei durch Auflagerungen auf die bestehende Zellwand ein Eindringen durch das Pathogen verhindert bzw. verzögert werden soll. Papillen setzen sich neben dem Hauptbestandteil Callose auch aus Lignin und anderen phenolischen Substanzen sowie Proteinen zusammen (Collinge, 2009; Underwood, 2012). Besonders die beiden Polymere Callose und Lignin, welche enzymatisch schwer aufzuschließen sind, bilden eine

physikalisch-mechanische Barriere, die die Appressorien von *C. graminicola* kaum zu durchdringen vermögen. Betrachtet man die Erhöhung der Papillenbildungsrate von 8 % des Wildtypisolates auf im Durchschnitt 33 % der $\Delta 04689$ - bzw. $\Delta \text{Cluster6B}$ Mutanten, ist zu vermuten, dass es sich bei dem Genprodukt von GLRG_04689 um ein Effektorprotein handelt, das die pflanzliche Abwehr supprimiert. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass es analog wie die so genannten. LysM-Effektoren (de Jonge and Thomma, 2009), zu denen es jedoch keine Ähnlichkeit hat, zur Maskierung von PAMPs bzw. MAMPs beiträgt.

In *C. graminicola* ist bereits eine Mutante mit ähnlichen Phänotypen beschrieben worden (Münch, 2012). Bei dem Gen *CgAAF1* handelt es sich um einen V-ATPase Assembly Faktor, welcher in der ER-Membran lokalisiert ist. V-ATPasen sind als membranständige Protonenpumpen für die Ansäuerung der Vakuole, der Endosomen, der Lysosomen, des Golgi Apparates und der sekretorischen Vesikel verantwortlich. Deletionsmutanten von ΔCgaaf1 zeigen eine verminderte Symptomausprägung im Vergleich mit dem Wildtypisolat, was auf eine reduzierte und zeitlich verzögerte Penetration des Wirtsgewebes durch die Appressorien zurückzuführen ist. Außerdem weisen die durch die ΔCgaaf1 Mutanten befallenen Wirtszellen eine erhöhte Papillenbildungsrate auf. Es wurde vermutet, dass durch die Deletion des *CgAAF1* Genes eine reduzierte Azidifizierungsleistung der V-ATPase hervorgerufen wurde, was eine möglicherweise falsche posttranslationale Modifikation von Transportern, Enzymen und Virulenzfaktoren zur Folge hatte. Des Weiteren wurde vermutet, dass der allgemeine Sekretionsweg durch beeinträchtigte Membranfusionsvorgänge gestört war. Die ΔCgaaf1 Mutanten wiesen eine 50%ige Penetrationsrate und 15%ige Papillenbildungsrate auf. Bei den $\Delta 04689$ - bzw. $\Delta \text{Cluster6B}$ Mutanten war ein Penetrationsrate von 18 % bzw. eine Papillenbildungsrate von 33 % zu verzeichnen. Es könnte angenommen werden, dass die Phänotypen der ΔCgaaf1 Mutanten in einer verminderten Sekretion des Proteins GLRG_04689p begründet liegen. Die Unterschiede in den quantitativen Daten könnten darauf zurückzuführen werden, dass das Protein in den ΔCgaaf1 Mutanten noch in hinreichendem Maße sekretiert werden konnte und somit höhere Penetrations- bzw. niedrigere Pappillenbildungsraten im Vergleich mit den der $\Delta 04689$ - bzw. $\Delta \text{Cluster6B}$ Mutanten erzielt werden konnten. Aber auch die Verwendung der verschiedenen Maissorten Nathan bzw. Mikado zwischen den beiden Arbeiten könnte Einfluss auf die Unterschiede der quantitativen Daten haben.

D.5. Biomassebestimmung mittels quantitativer PCR

Um die Interaktion zwischen phytopathogenen Pilzen und ihren Wirtspflanzen genauer verstehen zu können, ist es notwendig, die Entwicklung des Pathogens über die Zunahme der Biomasse während des Infektionsverlaufes messen zu können. Verschiedene Methoden zur Quantifizierung pilzlicher

Biomasse sind im Laufe der Jahre entwickelt worden. Die ersten Ansätze nutzten das nur in Pilzmembranen bzw. Pilzzellwänden vorhandene Ergosterol oder Chitin als Parameter zur Bestimmung von Biomasse (Plassard, 1981; Pacovsky, 1982; Martin, 1990; Gardner, 1992). Des Weiteren gibt es viele Beispiele, bei denen die Biomasse bodenbürtiger Saprophyten über immunologische Methoden nachgewiesen wurde (Otten et al., 1997; Thornton, 2008). Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern zur Biomassebestimmung während der Interaktion phytopathogener Pilze ist in einigen Fällen erfolgreich gewesen (Karpovich-Tate et al., 1998; Dewey and Meyer, 2003). Ein Nachteil dieser Methoden ist oft die geringe Sensitivität, um pflanzenpathogene Pilze auch in der frühen Phase, d.h. bei geringer Biomasse im Vergleich zur Wirtspflanze, nachzuweisen. Im Gegensatz dazu lassen sich durch die Verwendung von PCR-Techniken auch geringste Mengen genomischer DNA in unterschiedlichsten Proben identifizieren. Die Ausschlussgrenze des in dieser Arbeit verwendeten qPCR-Ansatzes betrug ca. 200 fg, was bezogen auf die Genomgröße von *C. graminicola* vier Genom-Äquivalenten entspricht. Einige Arbeiten verglichen die Verlässlichkeit von qPCR-basierter Biomasse Detektion mit denen Pilz-spezifischer Biomarker wie Chitin und Ergosterol (Eikenes et al., 2005; Lang-Yona et al., 2011). Dabei stellte sich heraus, dass die qPCR mindestens genauso verlässlich wie die klassischen Biomarker ist und manchmal weniger anfällig zu sein scheint. Allerdings haben alle erwähnten Methoden das Problem, dass sie Bezug auf Vergleichswerte typischerweise in Form einer Eichgeraden des verwendeten Biomarkers (strukturelle Komponenten, Proteine, DNA) nehmen müssen. Jeder dieser Vergleichswerte unterliegt einer natürlichen Schwankung, abhängig vom physiologischen Entwicklungszustand des Pilzes. Die Gegenüberstellungen solcher Vergleichswerte, ohne die Möglichkeit die tatsächliche Masse des Pilzes im Wirtsgewebe empirisch messen zu können, sind daher immer nur als Annäherungswerte zu betrachten.

Die Verwendung der ITS-Sequenzen als Zielsequenz für die Bestimmung der genomischen DNA von Pilzen der Gattung *Colletotrichum* ist schon in vorrangegangenen Arbeiten erfolgreich angewandt worden. Dabei zielten diese Arbeiten hauptsächlich auf artspezifische Nachweise, d. h. der Unterscheidung verschiedener Arten derselben Gattung, und nicht auf die Bestimmung der Biomasse während der natürlichen Interaktion mit ihren Wirten ab (Cano et al., 2004; Chen et al., 2006; Kuan et al., 2011). Da durch die im Genom vorkommende hohe Kopienzahl des ribosomalen DNA-Clusters eine hohe Sensitivität und ebenso durch die artspezifische DNA-Sequenz der ITS-Region eine hohe Spezifität zu erreichen ist, ist diese genomische Region ein gut geeigneter molekularer Marker. Des Weiteren konnte durch die Zugabe des externen Standards pUC18 eine positive Kontrolle des eingesetzten PCR-Enzym-Mix durchgeführt werden, als auch die Qualität der DNA-Säulenaufreinigung der einzelnen Proben zueinander abgeglichen werden. Neben der Verwendung

von ITS-Sequenzen und des externen Standards wurde zusätzlich die praktische Ausführung des Testes durch Vergleiche unterschiedlicher Beprobungsverfahren optimiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Varianz der gemessenen pilzlichen DNA in den Inokulationsstellen sowohl innerhalb eines Blattes als auch zwischen den Blättern meist mehr als 55 % betrug. Durch die Optimierung der Beprobung, indem einzelne Inokulationstropfen von der gleichen Position auf mehreren Blätter vereinigt wurden, konnte diese Varianz bis auf 35 % gesenkt werden. Dieser trotz allem noch hohe Prozentsatz zeigt die starke Abhängigkeit des biologischen Systems von unbekanntem, schwer zu kontrollierenden Faktoren, die auf die Interaktion Einfluss nehmen. Dennoch stellt das in dieser Arbeit entwickelte und optimierte Detektionssystem ein sehr sensitives, spezifisches und praktisch gut durchführbares Testsystem für die Bestimmung pilzlicher Biomasse dar.

Die Validierung des qPCR-Testsystems erfolgte durch die Biomassebestimmung von drei ATMT-Mutanten, welche unterschiedliche makroskopische Symptomausprägungen auf den Wirtspflanzen aufwiesen. Die Charakterisierung der ATMT-Mutanten zeigte, dass sowohl die Mutante FW-1 als auch FW-2 in der Lage waren, alle für den Lebenszyklus notwendigen Infektionsstrukturen zu bilden und die reduzierte Symptomausprägung auf einen möglicherweise generellen Wachstumsdefekt mit unbekannter Ursache zurückzuführen ist. Bei der Mutante FW-3 hingegen waren keine Symptome auf den Wirtspflanzen zu erkennen. Die Mutante wies eine stark reduzierte Appressorienbildungsrate auf und produzierte ausschließlich deformierte und funktionslose Appressorien. Beim Vergleich der makroskopischen Symptomausprägung bei der Punktinokulation der Blattsegmente mit Mutanten und Wildtypisolat mit den gemessenen Mengen an pilzlicher Biomasse durch die qPCR zeigte sich, dass sowohl die großen Symptomunterschiede zwischen Wildtypisolat und den Mutanten als auch die geringeren Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten durch die Bestimmung der Menge genomischer DNA gut wiedergespiegelt werden. Dadurch ist die Methode der qPCR-basierten Biomassebestimmung auch in der Lage, geringe Unterschiede zwischen Wildtypisolat und Mutanten, welche nur eine kleine Reduktion der Virulenz aufweisen und somit makroskopisch nicht mehr vom Wildtypisolat zu unterscheiden wären, zu detektieren.

Durch frühere Arbeiten wurde gezeigt, dass die Anfälligkeit von Maissorten in Bezug auf Geschwindigkeit der Symptomausprägung beziehungsweise Symptomstärke bei dem Befall von *C. graminicola* stark unterschiedlich sein kann. So wurden z. B. 183 Maissorten auf ihre Anfälligkeit gegenüber drei verschiedenen, aus den Vereinigten Staaten stammenden Isolaten von *C. graminicola* getestet und dabei festgestellt, dass es unter den getesteten keine absolut resistenten Sorten gab, aber die Art der Symptomausprägung stark unterschiedlich zwischen den Sorten und auch den Isolaten war (Nicholson and Warren, 1976). Auch die in dieser Arbeit getesteten 37 Maissorten,

welche nicht in den zuvor beschriebenen 183 Sorten enthalten waren, waren alle in gewissem Maße anfällig gegenüber *C. graminicola*. Eine Gen-für-Gen Beziehung, die im Falle einer inkompatiblen Interaktion typischerweise mit einer hypersensitiven Reaktion (HR) einhergeht, ist im *Colletotrichum*-Mais System nicht gefunden worden. Die grundlegende pflanzliche Abwehr, wie sie gemäß dem „Zig-Zag“ Modell beschrieben wird, stellt die „PAMP-triggered-immunity“ (PTI) dar (Jones and Dangl, 2006). Dabei werden allgemeine pathogene Moleküle, sogenannte PAMP's („pathogen-associated molecular pattern“), wie z. B. strukturelle Komponenten (Flaggelin, Chitin, Ergosterol) von pflanzlichen, meist membrangebundenen Rezeptoren erkannt und eine Immunantwort ausgelöst. Erfolgreiche Pathogene wiederum sind in der Lage, durch Art- bzw. Rassenspezifische Effektormoleküle die PTI zu supprimieren und somit Symptome auszulösen. Die Pflanzen ihrerseits erkennen durch spezialisierte, meist intrazelluläre Rezeptorproteine (NB-LRR proteins, „nucleotide binding-leucine rich repeats“) die Effektoren und lösen eine weitere Abwehrantwort aus, die „effector-triggered-immunity“ (ETI). In Folge dieser Immunantwort kommt es in den meisten Fällen zur HR, bei der die befallenen Wirtszellen an der Infektionsstelle absterben, wobei massiv ROS freigesetzt werden, die den Pilz abtöten. Die ursprünglich klare Abtrennung zwischen den in vielen Pathogenklassen konservierten PAMP-Molekülen und den Art- bzw. Rassenspezifischen Effektor-Molekülen ist in den letzten Jahren immer weiter aufgeweicht (Thomma et al., 2011). Bis heute ist nicht geklärt, ob und wie *C. graminicola* die PTI von Mais durch Supprimierung, Maskierung oder einer Mischung aus beiden verhindert bzw. umgeht.

Der Anstieg der pilzlichen Biomasse während des Infektionsverlaufes, welcher vermutlich den Wechsel zwischen biotropher und nekrotropher Lebensweise darstellt, fand in den vier getesteten Sorten zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Intensitäten statt. Während bei der Sorte Golden Jubilee eine massive Zunahme bereits ab 48 hpi zu erkennen war, zeigte die Sorte B73 eine wesentlich geringere Zunahme erst 24 bis 48 Stunden später. Eine verzögerte Zunahme, wie sie bei der gemessenen Biomasse in Form von pilzlicher DNA zu beobachten war, zeigte sich auch bei den auf den Blättern sichtbaren Symptomausprägungen. Während bei Golden Jubilee bereits zwischen ab 72 hpi eine nekrotische Verfärbung auf den Blättern zu sehen war, trat diese erst ab 120 hpi im B73 auf. Durch die beiden Methoden, qPCR und Sichtbonitur, wurden zwar dieselben Trends in der Entwicklung des Wildtypisolates auf den verschiedenen Maissorten beobachtet, jedoch war es mit Hilfe der Biomassebestimmung durch qPCR möglich bereits ab 48 hpi Sortenabhängige Unterschiede zu detektieren. Durch diese Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass das Infektionsverhalten von *C. graminicola* stark abhängig von der jeweils zu infizierenden Maissorte ist. Möglicherweise beeinflusst ein unterschiedlich physiologischer Zustand der einzelnen Sorten oder die Bereitstellung antifungaler Sekundärmetabolite die Pathogenese. So wurde bereits früher gezeigt, dass die unterschiedliche

Suszeptibilität von Maissorten mit einer unterschiedlich starken Anreicherung von phenolischen Substanzen in dem infizierten Pflanzengewebe einhergeht (Hammerschmidt and Nicholson, 1977). Im Laufe der Jahre sind in Mais mehrere antifungale Substanzen, sogenannte Phytoalexine, welche nach Infektion durch pilzliche Pathogene gebildet und akkumuliert werden, identifiziert worden (Oikawa et al., 2004; Huffaker et al., 2011; Schmelz et al., 2011). Neben diesen durch Infektion induzierten Sekundärmetaboliten besitzen Pflanzen auch konstitutiv vorhandene antimikrobielle Sekundärmetabolite, sogenannte Phytoanticipine (Gonzalez-Lamothe et al., 2009). Auch konnte im Rahmen einer in der AG Phytopathologie der MLU angefertigten Bachelorarbeit gezeigt werden, dass die Dauer zur Vollendung des vollständigen Lebenszykluses von *C. graminicola* beim Befall der Maissorte Mikado stark vom physiologischen Zustand der infizierten Blätter abhing (Müller, 2010). Dabei wurden gesunde, leicht seneszente, stark seneszente und bereits abgestorbene Blätter mit Konidien inokuliert und die Entstehung der einzelnen, für die Pathogenese typischen, Infektionsstrukturen dokumentiert. Es zeigte sich, dass *C. graminicola* auf den stark seneszenten und abgestorbenen Blättern in der Lage war innerhalb von 48 – 72 hpi neue Sporenlager auf der Blattoberfläche zu bilden. Bei gesunden grünen Blättern sind diese hingegen erst ab einem Zeitpunkt von 120 hpi zu entdecken gewesen. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass *C. graminicola* dazu befähigt ist seine biotrophe Phase auf ein Minimum zu reduzieren oder sie ganz und gar zu überspringen, möglicherweise abhängig davon, welche und wie viel verwertbare Nährstoffe oder toxisch wirkende Restsubstanzen in den verschiedenen Blättern enthalten sind. Durch zukünftige Experimente sollte daher geklärt werden, welche Sekundärmetabolite von den verschiedenen Maissorten während der Infektion gebildet werden und ob diese die unterschiedliche Biomasseentwicklungen erklären könnten.

E. Zusammenfassung

Die Aufklärung der Bedeutung und Funktion einzelner Gene für den Infektionsverlauf von Pathogenen stellt eine zentrale Aufgabe der molekularen Phytopathologie dar. Das größte Problem bei der Herangehensweise derartiger Untersuchungen ist dabei die Identifizierung solcher Gene innerhalb des Genoms, die auch tatsächlich Einfluss auf die Pathogenese haben. Ein erster Schritt bei der Minimierung der Anzahl möglicher Kandidatengene war hierbei die Beschränkung auf solche Gene, welche für sekretierte Proteine kodieren. In dieser Arbeit wurde sowohl durch praktische Ansätze wie dem YSST-Screen, durch den funktionelle Signalpeptide erkannt werden, als auch mit bioinformatischen Ansätzen wie der Identifizierung von Genclustern, der Suche nach homologen Proteinen bekannter Pathogenitätsfaktoren oder das Auffinden von Translokationsmotiven im Sekretom von *C. graminicola* nach Kandidatengenen gesucht. Insgesamt wurden bis heute 59 dieser Kandidatengene, davon 43 in der vorliegenden Arbeit, durch Gendeletionsanalysen untersucht. Dabei wurden von den einzelnen Genen bzw. Genclustern Deletionsmutanten im Wildtypisolat von *C. graminicola* erzeugt. Die Art der Integration wurde anschließend durch PCR und Southern-Hybridisierung festgestellt und die bestätigten Mutanten auf mögliche Phänotypen hin untersucht.

Virulenzunterschiede im Vergleich zum Wildtypstamm wurden unter den Deletionsmutanten dieser 59 Gene nur für die Gene GLRG_04686 und GLRG_04689 gefunden, weswegen sie genauer charakterisiert wurden. Beide Gene befinden sich im Gencluster Nummer 6 und sind als hypothetische Proteine, ohne bekannte Proteindomänen, beschrieben. Das Gen GLRG_04686 kodiert für ein 38 Aminosäuren großes Protein mit putativem Signalpeptid. Δ 04686 Mutanten weisen einen apathogenen Phänotyp bei Infektionsversuchen auf. Untersuchungen der Infektionsstrukturen zeigten, dass die Mutanten nicht mehr in der Lage waren, die epidermalen Wirtszellen zu penetrieren. Die Bildung von Infektionsstrukturen und von Symptomen im Wirtsgewebe bleiben daher weitestgehend aus. Des Weiteren scheinen die Mutanten im Vergleich mit dem Wildtypisolat keine Wirtsabwehr mehr in Form von Papillen auszulösen. Das vegetative Wachstum und die Symptomausprägung bei der Infektion von verwundeten Maisblättern waren nicht vom Wildtypisolat zu unterscheiden, was zeigt, dass es sich um einen spezifischen Effekt während der Penetration oder der frühen biotrophen Phase handeln muss. Das Gen GLRG_04689 kodiert für ein 459 Aminosäuren großes Protein. Da dieses Gen bereits im YSST-Screen identifiziert wurde, konnte somit die Funktionalität des Signalpeptides bestätigt werden. Δ 04689 Mutanten zeigen eine reduzierte Symptomausprägung bei den Infektionsversuchen. Ursache dafür ist die reduzierte Penetrationsrate der gebildeten Appressorien um ca. 80 % verglichen mit dem Wildtypisolat. Weitere Untersuchungen zeigten, dass bei den Δ 04689 Mutanten etwa viermal mehr Appressorien durch die Bildung einer

Papille an der Penetration gehindert werden als beim Wildtypisolat. Die Deletion des Genes GLRG_04689 verursachte eine Reduzierung der Penetrationsrate durch Auslösen einer stärkeren pflanzliche Abwehr. Das vegetative Wachstum und die Symptomausprägung bei der Infektion von verwundeten Maisblättern waren nicht vom Wildtypisolat zu unterscheiden, was zeigt, dass es sich um einen spezifischen Effekt während der Penetration oder der frühen biotrophen Phase handeln muß. In zukünftigen Experimenten sollte geklärt werden, ob die beiden Gene Einfluss auf weitere pflanzliche Abwehrreaktionen wie Transkriptabundanz pflanzlicher PR-Gene, Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies oder der Anreicherung von Sekundärmetaboliten während der Infektion haben. Auch dürfte es sehr interessant sein, das Vorhandensein der gefundenen Reaktionen in verschiedenen Maissorten zu vergleichen. Für die genauere Aufklärung der Funktion und Lokalisation der beiden von den Genen kodierten Proteine sollten Fusionskonstrukte mit Fluoreszenzmarkern wie z. B. GFP hergestellt werden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit stellte die Entwicklung und Etablierung eines qPCR-basierten Detektionsverfahrens der pilzlichen Biomasse während der Besiedelung des Wirtsgewebes dar. Dabei wurde die Biomasse als Menge genomischer DNA des Pilzes wiedergegeben. Als molekularer Marker wurde die ITS2-Region gewählt, da dadurch sowohl eine hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität gewährleistet werden konnte. Durch den Vergleich verschiedener Beprobungsverfahren wurde die Variabilität des artifiziellen Inokulationssystems auf ein vertretbares Minimum beschränkt. Durch die Messungen von drei verschiedenen ATMT-Mutanten, welche unterschiedliche Virulenzgrade bei der Infektion aufwiesen, konnte das System erfolgreich validiert werden. Des Weiteren wurde die Biomassezunahme des Wildtypisolates in vier verschiedenen Maissorten, welche aus einem Vortest mit insgesamt 37 Sorten ausgesucht wurden, gemessen und mit der makroskopischen Symptomausprägung verglichen. Hierbei ergab sich der Befund, dass die qPCR-basierte Detektion eine sensitivere Methode im Gegensatz zur Sichtbonitur darstellt, durch die feine Unterschiede zwischen genetisch erzeugten Pilzmutanten und dem Wildtypisolat aufgezeigt werden können, als auch eine verbesserte Unterscheidung der unterschiedlichen Entwicklung auf den verschieden anfälligen Maissorten ermöglicht wird.

F. Literatur

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Anderson, D.W., and Nicholson, R.L.** (1996). Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* **88**, 996-1002.
- Anderson, P.A., Lawrence, G.J., Morrish, B.C., Ayliffe, M.A., Finnegan, E.J., and Ellis, J.G.** (1997). Inactivation of the flax rust resistance gene M associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell* **9**, 641-651.
- Apel-Birkhold, P.C., and 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., and Hoch, H.C.** (2004). Quantification of substratum contact required for initiation of *Colletotrichum graminicola* appressoria. *Fungal Genetics and Biology* **41**, 1-12.
- Baines, A.C., and Zhang, B.** (2007). Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. *Trends Biochem Sci* **32**, 381-388.
- Balmer, D., de Papajewski, D.V., Planchamp, C., Glauser, G., and Mauch-Mani, B.** (2013). Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses. *Plant J.*
- Becher, R., Weihmann, F., Deising, H.B., and Wirsal, S.G.** (2011). Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. *BMC Genomics* **12**, 52.
- Bechinger, C., Giebel, K.F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H.B., and Bastmeyer, M.** (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285**, 1896-1899.
- Behr, M., Humbeck, K., Hause, G., Deising, H.B., and Wirsal, S.G.** (2010). The hemibiotroph *Colletotrichum graminicola* locally induces photosynthetically active green islands but globally accelerates senescence on aging maize leaves. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 879-892.
- Bergstrom, G.C., and Nicholson, R.L.** (1999). The biology of corn anthracnose. Knowledge to exploit for improved management. *Plant Dis* **83**, 596-608.
- Bergstrom, G.C., Croskey, B.S., and Carruthers, R.I.** (1983). Synergism between *Colletotrichum graminicola* and the European corn borer in stalk rot of corn in New York. *Phytopathology* **73**, 842.
- Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Liolios, K., Win, J., Kanneganti, T.D., Young, C., Kamoun, S., and Haldar, K.** (2006). The malarial host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog* **2**, e50.
- Bignell, E., Negrete-Urtasun, S., Calcagno, A.M., Haynes, K., Arst, H.N., Jr., and Rogers, T.** (2005). The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol Microbiol* **55**, 1072-1084.
- Birch, P.R., Rehmany, A.P., Pritchard, L., Kamoun, S., and Beynon, J.L.** (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol* **14**, 8-11.
- Blobel, G.** (1987). How proteins move across the endoplasmic reticulum membrane. *Hepatology* **7**, 26S-29S.
- Bölker, M., Böhnert, H.U., Braun, K.H., Görl, J., and Kahmann, R.** (1995). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**, 547-552.
- Bolton, M.D., van Esse, H.P., Vossen, J.H., de Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I.J.E., van den Berg, G.C.M., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H.L., de Koster, C.G., de Wit, P.J.G.M., Joosten, M.H.A.J., and Thomma, B.P.H.J.** (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector

- Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* **69**, 119-136.
- Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D., and Osbourn, A.** (2002). A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**, 889-892.
- Bravo, J.M., Campo, S., Murillo, I., Coca, M., and San Segundo, B.** (2003). Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. *Plant Mol Biol* **52**, 745-759.
- Brody, J.R., and Kern, S.E.** (2004). Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* **36**, 214-216.
- Brosch, G., Ransom, R., Lechner, T., Walton, J.D., and Loidl, P.** (1995). Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. *Plant Cell* **7**, 1941-1950.
- Bryan, G.T., Wu, K.S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H.P., McAdams, S.A., Faulk, K.N., Donaldson, G.K., Tarchini, R., and Valent, B.** (2000). A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. *Plant Cell* **12**, 2033-2046.
- Buzzell, R.I., and Anderson, T. R.** (1992). Inheritance and race reaction of a new soybean Rps1 allele. *Plant Dis* **76**, 600-601.
- Cano, J., Guarro, J., and Gene, J.** (2004). Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* **42**, 2450-2454.
- Chaky, J., Anderson, K., Moss, M., and Vaillancourt, L.** (2001). Surface Hydrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore Germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **91**, 558-564.
- Chen, L.S., Chu, C., Liu, C.D., Chen, R.S., and Tsay, J.G.** (2006). PCR-based Detection and Differentiation of Anthracnose Pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from Vegetable Soybean in Taiwan. *Journal of Phytopathology* **154**, 654-662.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.M., Simon, A., and Viaud, M.** (2007). Botrytis cinerea virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett* **277**, 1-10.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **86**, 2172-2175.
- Chung, K.R., Shilts, T., Li, W., and Timmer, L.W.** (2002). Engineering a genetic transformation system for *Colletotrichum acutatum*, the causal fungus of lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiol Lett* **213**, 33-39.
- Collinge, D.B.** (2009). Cell wall appositions: the first line of defence. *J Exp Bot* **60**, 351-352.
- Conesa, A., Punt, P.J., van Luijk, N., and van den Hondel, C.A.M.J.J.** (2001). The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology* **33**, 155-171.
- Cordero, M.J., Raventos, D., and San Segundo, B.** (1994). Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *Plant J* **6**, 141-150.
- de Jonge, R., and Thomma, B.P.** (2009). Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol* **17**, 151-157.
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.-R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.-H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.-H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.-J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E., and Birren, B.W.** (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**, 980-986.
- Deising, H.B., Werner, S., and Wernitz, M.** (2000a). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microb Infect* **2**, 1631-1641.
- Deising, H.B., Werner, S., and Wernitz, M.** (2000b). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection* **2**, 1631-1641.

- DeJong, J.C., McCormack, B.J., Smirnov, N., and Talbot, N.J.** (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**, 244-245.
- Dewey, F.M., and Meyer, U.** (2003). Rapid, quantitative Tube immunoassays for on-site detection of Botrytis, Aspergillus and Penicillium antigens in grape juice. Papers presented at the 3rd Symposium In Vino Analytica Scientia Aveiro, Portugal, 10-12 July 2003 **513**, 11-19.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y.D., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M., and Kahmann, R.** (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**, 395-398.
- Döbbeling, U., Böni, R., Häffner, A., Dummer, R., and Burg, G.** (1997). Method for simultaneous RNA and DNA isolation from biopsy material, culture cells, plants and bacteria. *Biotechniques* **22**, 88-90.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., and Ellis, J.G.** (2001). Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat beta-strand/beta-turn motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax. *Plant Cell* **13**, 163-178.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M., Ayliffe, M.A., and Ellis, J.G.** (2004). The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* **16**, 755-768.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., and Kahmann, R.** (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000290.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kuhnemann, J., Sonnewald, U., Kamper, J., and Kahmann, R.** (2008). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant Journal* **56**, 181-195.
- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Jiang, R.H., Bruce, N.A., Arredondo, F.D., Zhang, X., and Tyler, B.M.** (2008). RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* **20**, 1930-1947.
- Eikenes, M., Hietala, A.M., and Alfredsen, G.** (2005). Comparison of quantitative real-time PCR, chitin and ergosterol assays for monitoring colonization of *Trametes versicolor* in birch wood. In *Holzforschung*, pp. 568.
- El Gueddari, N.E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B.M., and 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.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-1016.
- Epstein, L., Lusnak, K., and Kaur, S.** (1998). Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* **23**, 189-203.
- Feng.** (2010). Effect of exogenous application of jasmonic acid and salicylic acid on the leaf and root induction of chemical defence in maize. *Allelopathy* **25**.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene for gene-concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275-296.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C.P., Kinsey, J.A., Braun, E.L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G.O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzner, R.L., Perkins, D.D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catchside, D., Li, W., Pratt, R.J., Osmani, S.A., DeSouza, C.P., Glass, L., Orbach, M.J., Berglund, J.A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D.O., Alex, L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D.J.,**

- Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M.S., Lander, E.S., Nusbaum, C., and Birren, B.** (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**, 859-868.
- Gardner.** (1992). Ergosterol determination in activated sludge and its application as a biochemical marker for monitoring fungal biomass **17**, 49-60.
- Gaynor, E.C., and Emr, S.D.** (1997). COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *J Cell Biol* **136**, 789-802.
- Gething, M.J., and Sambrook, J.** (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G.** (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-547.
- Gonzalez-Ballester, D., de Montaigu, A., Galvan, A., and Fernandez, E.** (2005). Restriction enzyme site-directed amplification PCR: A tool to identify regions flanking a marker DNA. *Analytical Biochemistry* **340**, 330-335.
- Gonzalez-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M.S., Malouin, F., and Bouarab, K.** (2009). Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int J Mol Sci* **10**, 3400-3419.
- Gottschling, D.** (2012). Entwicklung eines Nachweises zur Untersuchung von translozierten Effektoren in dem Pathosystem *Colletotrichum graminicola* - Mais. In *Molekulare Phytopathologie und Pflanzenschutz* (Halle(Saale): Universität Halle-Wittenberg).
- Govrin, E.M., and Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* **10**, 751-757.
- Hammerschmidt, R., and Nicholson, R.L.** (1977). Resistance of maize to anthracnose - Changes in host phenols and pigments. *Phytopathology* **67**, 251-258.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., and Doehlemann, G.** (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathog* **8**, e1002684.
- Herbert, C., O'Connell, R., Gaulin, E., Salesses, V., Esquerre-Tugaye, M.T., and Dumas, B.** (2004). Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genet Biol* **41**, 140-147.
- Hooker, A.L., and White, D.G.** (1976). Prevalence of corn stalk rot disease in Illinois. *Plant Disease Reporter* **60**, 1032-1034.
- Horbach, R., Graf, A., Weihmann, F., Antelo, L., Mathea, S., Liermann, J.C., Opatz, T., Thines, E., Aguirre, J., and Deising, H.B.** (2009). Sfp-Type 4 ¹-Phosphopantetheinyl Transferase Is Indispensable for Fungal Pathogenicity. *Plant Cell* **21**, 3379-3396.
- Houterman, P.M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M.J., Cornelissen, B.J., Takken, F.L., and Rep, M.** (2009). The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J* **58**, 970-978.
- Huang, C.C.a.L., P.** (1997). Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. *Euphytica* **93**, 145-153.
- Huffaker, A., Kaplan, F., Vaughan, M.M., Dafoe, N.J., Ni, X., Rocca, J.R., Alborn, H.T., Teal, P.E., and Schmelz, E.A.** (2011). Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize. *Plant Physiol* **156**, 2082-2097.
- Jeon, J., Park, S.Y., Chi, M.H., Choi, J., Park, J., Rho, H.S., Kim, S., Goh, J., Yoo, S., Choi, J., Park, J.Y., Yi, M., Yang, S., Kwon, M.J., Han, S.S., Kim, B.R., Khang, C.H., Park, B., Lim, S.E., Jung, K., Kong, S., Karunakaran, M., Oh, H.S., Kim, H., Kim, S., Park, J., Kang, S., Choi, W.B., Kang, S., and Lee, Y.H.** (2007). Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nature Genet* **39**, 561-565.
- Jeong, J.S., Mitchell, T.K., and Dean, R.A.** (2007). The Magnaporthe grisea snodprot1 homolog, MSP1, is required for virulence. *FEMS Microbiol Lett* **273**, 157-165.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Joosten, M.H., Cozijnsen, T.J., and De Wit, P.J.** (1994). Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* **367**, 384-386.

- Kaemper, J., Kahmann, R., Bolker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Muller, O., Perlin, M.H., Wosten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrugge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Munch, K., Rossel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkotter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., and Birren, B.W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kahmann, R., Basse, C., Feldbrugge, M., Kruger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., and Hartmann, A. (1999). Fungal-plant signalling in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 647-650.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11086-11091.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., Lawrence, C.B., Shan, W., and Tyler, B.M. (2010). External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* **142**, 284-295.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 41-60.
- Karpovich-Tate, N., Spanu, P., and Dewey, F.M. (1998). Use of monoclonal antibodies to determine biomass of *Cladosporium fulvum* in infected tomato leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 710-716.
- Kemen, E., Kemen, A.C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé, R.T. (2005). Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1130-1139.
- Khang, C.H., Park, S.Y., Lee, Y.H., and Kang, S.C. (2005). A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 483-492.
- Kim, S., Ahn, I.P., and Lee, Y.H. (2001). Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 1340-1346.
- Klee, E.W., and Ellis, L.B. (2005). Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. *BMC Bioinformatics* **6**, 256.
- Klein, R.D., Gu, Q., Goddard, A., and Rosenthal, A. (1996). Selection for genes encoding secreted proteins and receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7108-7113.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., and Winn, W.C. (1997). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed. . (Philadelphia, PA, USA: Lippincott-Raven Publishers).
- Kopito, R.R. (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* **88**, 427-430.
- Krijger, J.J., Horbach, R., Behr, M., Schweizer, P., Deising, H.B., and Wirsal, S.G. (2008). The yeast signal sequence trap identifies secreted proteins of the hemibiotrophic corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1325-1336.
- Kröling, C. (2010). Deletionsanalysen von sechs Genen kleiner, Cysteinreicher, sekretierter Proteine des Maispathogens *Colletotrichum graminicola*. In *Molekulare Phytopathologie und Pflanzenschutz* (Halle(Saale): Universität Halle-Wittenberg).

- Krugel, H., Fiedler, G., Smith, C., and Baumberg, S. (1993). Sequence and transcriptional analysis of the nourseothricin acetyltransferase-encoding gene *nat1* from *Streptomyces noursei*. *Gene* **127**, 127-131.
- Kuan, C.-P., Wu, M.-T., Huang, H.C., and Chang, H. (2011). Rapid Detection of *Colletotrichum lagenarium*, Causal Agent of Anthracnose of Cucurbitaceous Crops, by PCR and Real-time PCR. *Journal of Phytopathology* **159**, 276-282.
- Lang-Yona, N., Dannemiller, K., Yamamoto, N., Burshtein, N., Peccia, J., Yarden, O., and Rudich, Y. (2011). Annual distribution of allergenic fungal spores in atmospheric particulate matter in the eastern mediterranean; a comparative study between ergosterol and quantitative PCR analysis. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* **11**, 28689-28711.
- Laugè, R., Joosten, M.H.A.J., Van den Ackerveken, G.F.J.M., Van den Broek, H.W.J., and De Wit, P.J.G.M. (1997). The in planta-produced extracellular proteins ECP1 and ECP2 of *Cladosporium fulvum* are virulence factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 725 - 734.
- Lauring, B., Kreibich, G., and Weidmann, M. (1995). The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent-polyptide-associated complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9435-9439.
- Lawrence, G.J., Finnegan, E.J., Ayliffe, M.A., and Ellis, J.G. (1995). The L6 gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. *Plant Cell* **7**, 1195-1206.
- Leach, J., Lang, B.R., and Yoder, O.C. (1982). Methods for selection of mutants and *in vitro* culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *J Gen Microbiol* **128**, 1719-1729.
- Leite, B., and Nicholson, R.L. (1992). Mycosporine-alanine: A self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Exp Mycol* **16**, 76-86.
- Lin, S.Y., Okuda, S., Ikeda, K., Okuno, T., and Takano, Y. (2012). LAC2 encoding a secreted laccase is involved in appressorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare*. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 1552-1561.
- Lingner, U., Münch, S., Deising, H.B., and Sauer, N. (2011). Hexose Transporters of a Hemibiotrophic Plant Pathogen Functional Variations and Regulatory Differences at Different Stages of Infection. *J Biol Chem* **286**, 20913-20922.
- Link, T.I., and Voegelé, R.T. (2008). Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. *Mol Plant Pathol* **9**, 59-66.
- Liu, W., and Saint, D.A. (2002). Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 347-353.
- Liu, X., and Baird, V. (2001). Rapid Amplification of Genomic DNA Ends by *Nla*III Partial Digestion and Polynucleotide Tailing. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**, 261-267.
- Liu, Z., Zhang, Z., Faris, J.D., Oliver, R.P., Syme, R., McDonald, M.C., McDonald, B.A., Solomon, P.S., Lu, S., Shelver, W.L., Xu, S., and Friesen, T.L. (2012). The cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring *Snn1*. *PLoS Pathog* **8**, e1002467.
- Lu, S., Lyngholm, L., Yang, G., Bronson, C., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G. (1994). Tagged mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12649-12653.
- Maier, F.J., and Schäfer, W. (1999). Mutagenesis via insertional - or restriction enzyme-mediated - integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. *Biol Chem* **380**, 855-864.
- Malonek, S., Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P., and Tudzynski, B. (2004). The NADPH-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 25075-25084.
- Manning, V.A., and Ciuffetti, L.M. (2005). Localization of Ptr ToxA Produced by *Pyrenophora tritici-repentis* Reveals Protein Import into Wheat Mesophyll Cells. *Plant Cell* **17**, 3203-3212.

- Martin-Hernandez, A.M., Dufresne, M., Hugouvieux, V., Melton, R., and Osbourn, A.** (2000). Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of *Septoria lycopersici* with tomato plants. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1301-1311.
- Martin.** (1990). An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas **94**, 1059-1064.
- Maruthachalam, K., Nair, V., Rho, H.S., Choi, J., Kim, S., and Lee, Y.H.** (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. *J Microbiol Biotechnol* **18**, 234-241.
- Mathioni, S.M., Belo, A., Rizzo, C.J., Dean, R.A., and Donofrio, N.M.** (2011). Transcriptome profiling of the rice blast fungus during invasive plant infection and in vitro stresses. *BMC Genomics* **12**, 49.
- Matsumura, H., Reich, S., Ito, A., Saitoh, H., Kamoun, S., Winter, P., Kahl, G., Reuter, M., Kruger, D.H., and Terauchi, R.** (2003). Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **100**, 15718-15723.
- McCafferty, H.R.K., and Talbot, N.J.** (1998). Identification of three ubiquitin genes of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, one of which is highly expressed during initial stages of plant colonization. *Current Genetics* **33**, 352-361.
- Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B.P., and Talbot, N.J.** (2012). Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* **24**, 322-335.
- Mercure, E.W., Kunoh, H., and Nicholson, R.L.** (1994a). Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiol Mol Plant P* **45**, 407-420.
- Mercure, E.W., Leite, E., and Nicholson, R.L.** (1994b). Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiol Mol Plant P* **45**, 421-440.
- Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Panabieres, F., Ricci, P., and Blein, J.P.** (1998). Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 133-139.
- Mims, C.W., and Vaillancourt, L.J.** (2002). Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*, and by a C-graminicola pathogenicity mutant. *Phytopathology* **92**, 803-812.
- Mims, C.W., Rodriguez-Lothar, C., and Richardson, E.A.** (2002). Ultrastructure of the host-pathogen interface in daylily leaves infected by the rust fungus *Puccinia hemerocallidis*. *Protoplasma* **219**, 221-226.
- Monteoliva, L., Matas, M.L., Gil, C., Nombela, C., and Pla, J.** (2002). Large-scale identification of putative exported proteins in *Candida albicans* by genetic selection. *Eukaryot Cell* **1**, 514-525.
- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C.C., Frederiksen, R.A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S., and Uknes, S.** (1998). Induced resistance responses in maize. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 643-658.
- Mosquera, G., Giraldo, M.C., Khang, C.H., Coughlan, S., and Valent, B.** (2009). Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as Biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. *Plant Cell* **21**, 1273-1290.
- Müller, C.** (2010). Untersuchung zur hemibiotrophen Lebensweise von *Colletotrichum graminicola* in Abhängigkeit von der Seneszenz der Wirtspflanze *Zea mays*. In *Molekulare Phytopathologie und Pflanzenschutz* (Halle(Saale): Universität Halle-Wittenberg).
- Münch, S.** (2012). Identifizierung von Virulenzgenen des Maispathogens *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson durch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation. In *Molekulare Phytopathologie und Pflanzenschutz* (Halle(Saale): Universität Halle-Wittenberg).
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N., and Deising, H.B.** (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *J Plant Physiol* **165**, 41-51.

- Münch, S., Ludwig, N., Floss, D.S., Sugui, J.A., Koszucka, A.M., Voll, L.M., Sonnewald, U., and Deising, H.B. (2011). Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Mol Plant Path* **12**, 43-55.
- Neumann, U., Brandizzi, F., and Hawes, C. (2003). Protein transport in plant cells: in and out of the Golgi. *Ann Bot (Lond)* **92**, 167-180.
- Nicholson, R.L., and Warren, H.L. (1976). Criteria for Evaluation of Resistance to Maize Anthracnose. *Phytopathology* **66**, 86-90.
- Nicholson, R.L., and Moraes, W.B.C. (1980). Survival of *Colletotrichum graminicola*: Importance of the spore matrix. *Phytopathology* **70**, 255-261.
- Nicholson, R.L., Butler, L.G., and 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., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Torres, M.F., Damm, U., Buiate, E.A., Epstein, L., Alkan, N., Altmüller, J., Alvarado-Balderrama, L., Bauser, C.A., Becker, C., Birren, B.W., Chen, Z., Choi, J., Crouch, J.A., Duvick, J.P., Farman, M.A., Gan, P., Heiman, D., Henrissat, B., Howard, R.J., Kabbage, M., Koch, C., Kracher, B., Kubo, Y., Law, A.D., Lebrun, M.H., Lee, Y.H., Miyara, I., Moore, N., Neumann, U., Nordstrom, K., Panaccione, D.G., Panstruga, R., Place, M., Proctor, R.H., Prusky, D., Rech, G., Reinhardt, R., Rollins, J.A., Rounsley, S., Schardl, C.L., Schwartz, D.C., Shenoy, N., Shirasu, K., Sikhakolli, U.R., Stuber, K., Sukno, S.A., Sweigard, J.A., Takano, Y., Takahara, H., Trail, F., van der Does, H.C., Voll, L.M., Will, I., Young, S., Zeng, Q., Zhang, J., Zhou, S., Dickman, M.B., Schulze-Lefert, P., Ver Loren van Themaat, E., Ma, L.J., and Vaillancourt, L.J. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat Genet* **44**, 1060-1065.
- Oikawa, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Mori, N., Tsuda, M., and Iwamura, H. (2004). Accumulation of HDMBOA-Glc is induced by biotic stresses prior to the release of MBOA in maize leaves. *Phytochemistry* **65**, 2995-3001.
- Orbach, M.J., Farrall, L., Sweigard, J.A., Chumley, F.G., and Valent, B. (2000). A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *Plant Cell* **12**, 2019-2032.
- Otten, W., Gilligan, C.A., and Thornton, C.R. (1997). Quantification of Fungal Antigens in Soil with a Monoclonal Antibody-Based ELISA: Analysis and Reduction of Soil-Specific Bias. *Phytopathology* **87**, 730-736.
- Pacovsky, (1982). Measurement of the extraradical mycelium of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil by chitin determination. *Plant and Soil* **68**, 143-147.
- Panaccione, D.G., Vaillancourt, L.J., and Hanau, R.M. (1989). Conidial Dimorphism in *Colletotrichum-graminicola*. *Mycologia* **81**, 876-883.
- Paris, N., and Neuhaus, J.M. (2002). BP-80 as a vacuolar sorting receptor. *Plant Mol Biol* **50**, 903-914.
- Perfect, S.E., O'Connell, R.J., Green, E.F., Doering-Saad, C., and Green, J.R. (1998). Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum*-bean interaction. *Plant J* **15**, 273-279.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8**, 785-786.
- Piper, R.C., Bryant, N.J., and Stevens, T.H. (1997). The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J Cell Biol* **138**, 531-545.
- Plassard. (1981). Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination **21**, 345-348.
- Plett, J.M., Kempainen, M., Kale, S.D., Kohler, A., Legue, V., Brun, A., Tyler, B.M., Pardo, A.G., and Martin, F. (2011). A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr Biol* **21**, 1197-1203.

- Pretsch, K., Kemen, A., Kemen, E., Geiger, M., Mendgen, K., and Voegelé, R. (2012). The rust transferred proteins—a new family of effector proteins exhibiting protease inhibitor function. *Mol Plant Pathol* **14**, 96-107.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Pouwels, P.H., and van den Hondel, C.A. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**, 117-124.
- Rafiqi, M., Gan, P.H., Ravensdale, M., Lawrence, G.J., Ellis, J.G., Jones, D.A., Hardham, A.R., and Dodds, P.N. (2010). Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *Plant Cell* **22**, 2017-2032.
- Redman, R.S., and Rodriguez, R.J. (1994). Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. *Experimental Mycology* **18**, 230-246.
- Rehmany, A.P., Gordon, A., Rose, L.E., Allen, R.L., Armstrong, M.R., Whisson, S.C., Kamoun, S., Tyler, B.M., Birch, P.R., and Beynon, J.L. (2005). Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two Arabidopsis lines. *Plant Cell* **17**, 1839-1850.
- Reiss, G., te Heesen, S., Gilmore, R., Zufferey, R., and Aebi, M. (1997). A specific screen for oligosaccharyltransferase mutations identifies the 9 kDa OST5 protein required for optimal activity in vivo and in vitro. *Embo J* **16**, 1164-1172.
- Rep, M., van der Does, H.C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., de Koster, C.G., and Cornelissen, B.J. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol Microbiol* **53**, 1373-1383.
- Rolland, S., Jobic, C., Fèvre, M., and Bruel, C. (2003). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Curr Genet* **44**, 164-171.
- Rooney, H.C., Van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A., Joosten, M.H., Jones, J.D., and de Wit, P.J. (2005). *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**, 1783-1786.
- Rose, J.K., Ham, K.S., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (2002). Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* **14**, 1329-1345.
- Saitoh, H., Fujisawa, S., Mitsuoka, C., Ito, A., Hirabuchi, A., Ikeda, K., Irieda, H., Yoshino, K., Yoshida, K., Matsumura, H., Tosa, Y., Win, J., Kamoun, S., Takano, Y., and Terauchi, R. (2012). Large-Scale Gene Disruption in *Magnaporthe oryzae* Identifies MC69, a Secreted Protein Required for Infection by Monocot and Dicot Fungal Pathogens. *PLoS Pathog* **8**, e1002711.
- Saitoh, K.-i. (2006). A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *Gen Plant Pathol*.
- Sakaguchi, M. (1997). Eukaryotic protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 595-601.
- Sakaguchi, M., Tomiyoshi, R., Kuroiwa, T., Mihara, K., and Omura, T. (1992). Functions of signal and signal-anchor sequences are determined by the balance between the hydrophobic segment and the N-terminal charge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 16-19.
- Sanger, F., Nickler, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Schmelz, E.A., Kaplan, F., Huffaker, A., Dafoe, N.J., Vaughan, M.M., Ni, X., Rocca, J.R., Alborn, H.T., and Teal, P.E. (2011). Identity, regulation, and activity of inducible diterpenoid phytoalexins in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5455-5460.
- Schottens-Thoma, I.M.J., and De Wit, P.J. (1988). Purification and primary structure of a necrosis-inducing peptide from the apoplastic fluids of tomato infected with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **33**, 59-67.
- Scott-Craig, J.S., Panaccione, D.G., Cervone, F., and Walton, J.D. (1990). Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *The Plant Cell* **2**, 1191-1200.

- Scott-Craig, J.S., Cheng, Y.Q., Cervone, F., De Lorenzo, G., Pitkin, J.W., and Walton, J.D.** (1998). Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1497-1503.
- Stephenson, S.A., Hatfield, J., Rusu, A.G., Maclean, D.J., and Manners, J.M.** (2000). CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 929-941.
- Sugui, J.A., Leite, B., and Nicholson, R.L.** (1998). Partial characterization of the extracellular matrix released onto hydrophobic surfaces by conidia and conidial germlings of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**, 411-425.
- Sukno, S.A., Garcia, V.M., Shaw, B.D., and Thon, M.R.** (2008). Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 823-832.
- Sun, F., Kale, S.D., Azurmendi, H.F., Li, D., Tyler, B.M., and Capelluto, D.G.** (2013). Structural basis for interactions of the *Phytophthora sojae* RxLR effector Avh5 with phosphatidylinositol 3-phosphate and for host cell entry. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 330-344.
- Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Farrall, L., Chumley, F.G., and Valent, B.** (1998). *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 404-412.
- Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Kang, S., Farrall, L., Chumley, F.G., and Valent, B.** (1995). Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *The Plant Cell* **7**, 1221-1233.
- Talbot, N.J., Ebole, D.J., and Hamer, J.E.** (1993). Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**, 1575-1590.
- Thomma, B.P., Nurnberger, T., and Joosten, M.H.** (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* **23**, 4-15.
- Thomma, B.P., HP, V.A.N.E., Crous, P.W., and PJ, D.E.W.** (2005). *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic *Mycosphaerellaceae*. *Mol Plant Pathol* **6**, 379-393.
- Thon, M.R., Nuckles, E.M., and 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., and Vaillancourt, L.J.** (2002). CPR1: a gene encoding a putative signal peptidase that functions in pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* to maize. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 120-128.
- Thornton.** (2008). Tracking fungi in soil with monoclonal antibodies. *European journal of plant pathology / European Foundation for Plant Pathology* **121**, 347-353.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M.A., and Arst, H.N., Jr.** (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *Embo J* **14**, 779-790.
- Tonukari, N.J., Scott-Craig, J.S., and Walton, J.D.** (2000). The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* **12**, 237-248.
- Tsuji, G., FUJIKAWA, J., ISHIDA, H., HORINO, O., and KUBO, Y.** (2001). Laccase Gene LAC1 of *Colletotrichum lagenarium* Is Not Essential for Melanin Biosynthesis and Pathogenicity. *Journal of General Plant Pathology* **67**, 182-190.
- Tyler, B.M., Kale, S.D., Wang, Q., Tao, K., Clark, H.R., Drews, K., Antignani, V., Rumore, A., Hayes, T., Plett, J.M., Fudal, I., Gu, B., Chen, Q., Affeldt, K.J., Berthier, E., Fischer, G.J., Dou, D., Shan, W., Keller, N.P., Martin, F., Rouxel, T., and Lawrence, C.B.** (2013). Microbe-Independent Entry of Oomycete RxLR Effectors and Fungal RxLR-Like Effectors Into Plant and Animal Cells Is Specific and Reproducible. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 611-616.

- Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R.H., Aerts, A., Arredondo, F.D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J.L., Chapman, J., Damasceno, C.M., Dorrance, A.E., Dou, D., Dickerman, A.W., Dubchak, I.L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S.G., Govers, F., Grunwald, N.J., Huang, W., Ivors, K.L., Jones, R.W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K.H., Lee, M.K., McDonald, W.H., Medina, M., Meijer, H.J., Nordberg, E.K., Maclean, D.J., Ospina-Giraldo, M.D., Morris, P.F., Phuntumart, V., Putnam, N.H., Rash, S., Rose, J.K., Sakihama, Y., Salamov, A.A., Savidor, A., Scheuring, C.F., Smith, B.M., Sobral, B.W., Terry, A., Torto-Alalibo, T.A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., and Boore, J.L. (2006). Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**, 1261-1266.
- Underwood, W. (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Front Plant Sci* **3**, 85.
- Valent, B., Farrall, L., and Chumley, F.G. (1991). *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. *Genetics* **127**, 87-101.
- Van den Ackerveken, G.F.J.M., Van Kan, J.A.L., Joosten, M.H.A.J., Muisers, J.M., Verbakel, H.M., and De Wit, P.J.G.M. (1993). Isolation and characterization of two putative pathogenicity genes of *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 210-215.
- van Esse, H.P., Bolton, M.D., Stergiopoulos, I., de Wit, P.J., and Thomma, B.P. (2007). The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1092-1101.
- van Esse, H.P., Van't Klooster, J.W., Bolton, M.D., Yadeta, K.A., van Baarlen, P., Boeren, S., Vervoort, J., de Wit, P.J., and Thomma, B.P. (2008). The *Cladosporium fulvum* Virulence Protein Avr2 Inhibits Host Proteases Required for Basal Defense. *Plant Cell* **20**, 1948-1963.
- Vargas, W.A., Martin, J.M., Rech, G.E., Rivera, L.P., Benito, E.P., Diaz-Minguez, J.M., Thon, M.R., and Sukno, S.A. (2012). Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotricum graminicola* in maize. *Plant Physiol* **158**, 1342-1358.
- Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Maume, B., Osman, H., and Blein, J.P. (1999). Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* **1419**, 335-342.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-487.
- Venard, C., and Vaillancourt, L. (2007). Colonization of fiber cells by *Colletotrichum graminicola* in wounded maize stalks. *Phytopathology* **97**, 438-447.
- Vernard, and Vaillancourt, L. (2007). Colonization of Fiber Cells by *Colletotrichum graminicola* in Wounded Maize Stalks. *Phytopathology* **97**, 438-447.
- Vijn, I., and Govers, F. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* **4**, 459-467.
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J Membr Biol* **115**, 195-201.
- Wahlberg, J.M., and Spiess, M. (1997). Multiple determinants direct the orientation of signal-anchor proteins: the topogenic role of the hydrophobic signal domain. *J Cell Biol* **137**, 555-562.
- Walter, P., and Blobel, G. (1983a). Signal recognition particle: a ribonucleoprotein required for cotranslational translocation of proteins, isolation and properties. *Methods Enzymol* **96**, 682-691.
- Walter, P., and Blobel, G. (1983b). Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. *Cell* **34**, 525-533.
- Walton, J.D. (2006). HC-toxin. *Phytochemistry* **67**, 1406-1413.
- Wan, J., Zhang, X.C., and Stacey, G. (2008). Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant Signal Behav* **3**, 831-833.
- Warren, L.H., Nicholson, R.L., Ullstrup, A.J., and Sharvelle, E.G. (1973). Observations of *Colletotrichum graminicola* on sweet corn in Indiana. *Plant Disease Reporter* **57**, 143-144.
- Wawra, S., Djamei, A., Albert, I., Nurnberger, T., Kahmann, R., and van West, P. (2013). In vitro translocation experiments with RxLR-reporter fusion proteins of Avr1b from *Phytophthora*

- sojae and AVR3a from *Phytophthora infestans* fail to demonstrate specific autonomous uptake in plant and animal cells. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 528-536.
- Weihmann, F.** (2008). Deletionsanalysen von fünf Genen sekretierter Proteine des Maispathogens *Colletotrichum graminicola*. In *Molekulare Phytopathologie und Pflanzenschutz* (Halle(Saale): Universität Halle-Wittenberg).
- Werner, S., Sugui, J.A., Steinberg, G., and 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*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1555-1567.
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I.K., Pritchard, L., and Birch, P.R.** (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**, 115-118.
- Wilson, G.W.** (1914). The identity of the anthracnose of grasses in the United States. *Phytopathology* **4**, 106-112.
- Wu, S., Kriz, A.L., and Widholm, J.M.** (1994). Nucleotide sequence of a maize cDNA for a class II, acidic beta-1,3-glucanase. *Plant Physiol* **106**, 1709-1710.
- Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S., and Shirasu, K.** (2011). Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14682-14687.
- Yoshino, K., Irieda, H., Sugimoto, F., Yoshioka, H., Okuno, T., and Takano, Y.** (2012). Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by a homologue of CgDN3. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 625-636.
- Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Dominguez, Y., and Scazzocchio, C.** (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**, 973-981.

G. Anhang

G.1. Liste aller Deletionsmutanten

Auf den folgenden Seiten sind alle in dieser Dissertation erzeugten Gendelektionen und die dazugehörigen Mutanten aufgeführt. Es wird verwiesen auf die Zugehörigkeit zu den einzelnen Teilprojekten, allgemeine Angaben zu den deletierten Genen und eine Übersichtsskizze des genomischen Lokus, an dem die homologe Rekombination stattfand. Die aus der Transformation entstandenen Mutanten wurden auf die Integration der Fremd-DNA hin überprüft, der daraus resultierende Southern-Blot ist für die untersuchten Mutanten der jeweiligen Gene gezeigt. Für die Überprüfung der Virulenzeigenschaften der getesteten Mutanten wird ein repräsentativer Infektionsversuch gezeigt (Punktinokulation von Blattsegmenten). In der Box „verwendete Primer“ sind alle Primer aufgeführt, welche für die Erzeugung der Deletionskassette verwendet wurden (5'-Flanke + 3'-Flanke + *natI*- bzw. *hphI* Resistenzgen), sowie diejenigen für den PCR-Test zur Überprüfung der Integration der Fremd-DNA (WT-Test). Ferner sind dort die Primer gelistet, die zur Erzeugung der Southern-Hybridisierungs sonden zum Nachweis des Genes in der Wildtyp-Situation (WT-Sonde) eingesetzt wurden, sowie diejenigen für den Nachweis des jeweiligen Resistenzgenes (*nat* bzw. *hph*-Sonde). Die Box „Beschreibung“ gibt die in der NCBI Datenbank angegebene vermutete Funktion des Proteines wieder.

<u>Annotationsnummer</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Projekt</u>
GLRG_00416	Hypothetisches Protein	YSST

<u>Schema genomischer Locus</u> 	<u>Größe ORF [bp]</u>	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u>
	851	1045
	<u>Größe mRNA [bp]</u>	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u>
	720	986
	<u>Größe Protein [aa]</u>	<u>Deletionskassette [bp]</u>
	240	3138
<u>Größe Signalpeptid [aa]</u>	<u>Selektionsmarker</u>	
20	Hygromycin	
<u>Anzahl Exons</u>		
3		

<u>Southern Blot</u> 	<u>Transformanten (Gesamt)</u>
	14
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u>
	3
	<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u>
	2

<u>Infektionstest</u> 	<u>Maissorte</u>
	Mikado 2W
	<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u>
	10 ⁶ Konidien/ml
	<u>Blattetage</u>
3. Folgeblatt	
<u>dokumentiert</u>	
5 dpi	

<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	Cg1061Pnest.F1 / Cg1061Phyg.R1	WT-Test:	Cg1061 TestF1 / Cg1061 TestR1
3'-Flanke:	Cg 1061Thyg.F1 / Cg 1061T-nest.R1	WT-Sonde:	Cg1061 TestF1 / Cg1061 TestR1
Hyg:	HygPromotor1000-neu / HygORF-Rev	Hyg-Sonde:	Hyg-Sonde-For / Hyg-Sonde-Rev

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_05667	<u>Beschreibung</u> kleines cysteinreiches Protein (8 x Cys)	<u>Projekt</u> YSST
----------------------------------------	--------------------------------------------------------------------	------------------------

<u>Schema genomischer Locus</u> 	<u>Größe ORF [bp]</u> 858	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u> 1029
	<u>Größe mRNA [bp]</u> 855	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u> 1037
	<u>Größe Protein [aa]</u> 285	<u>Deletionskassette [bp]</u> 4121
	<u>Größe Signalpeptid [aa]</u> 19	<u>Selektionsmarker</u> Hygromycin
	<u>Anzahl Exons</u> 1	

<u>Southern Blot</u> 	<u>Transformanten (Gesamt)</u> 31
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u> 12
	<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u> 4

<u>Infektionstest</u>						<u>Maissorte</u> Mikado 2W
n.i.c	WT	2	7	12	Ekt.	<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u> 10 ⁶ Konidien/ml
						<u>Blattetage</u> 3. Folgeblatt
						<u>dokumentiert</u> 5 dpi

<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	Cg 1049P-nest.F1 / Cg 1049Phyg.R1	WT-Test:	Cg1049-TestF1 / Cg1049-TestR1
3'-Flanke:	Cg 1049Thyg.F1 / Cg 1049T-nest.R1	WT-Sonde:	Cg-SQ_7 / Cg1049-SondeR1
Hyg:	HygPromotor1000-neu / HygORF-Rev	Hyg-Sonde:	Cg-SQ_7 / Cg1049-SondeR1

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_06590	<u>Beschreibung</u> Cerato-Platanin-ähnliches Protein	<u>Projekt</u> YSST
----------------------------------------	----------------------------------------------------------	------------------------

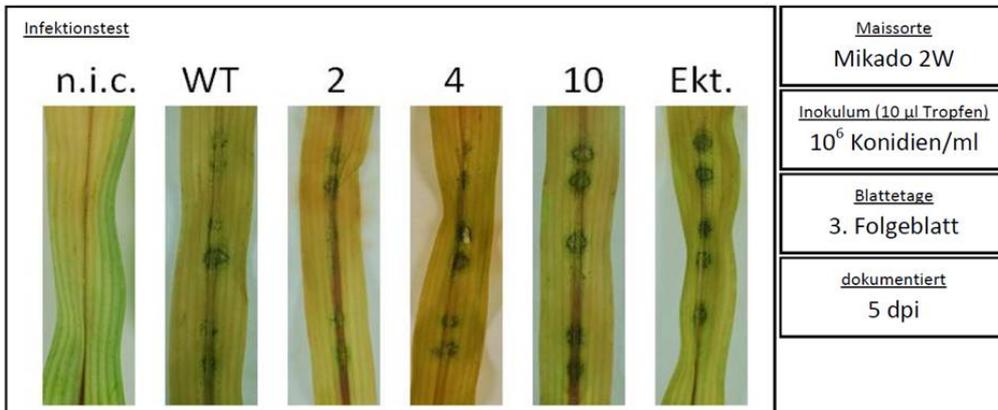
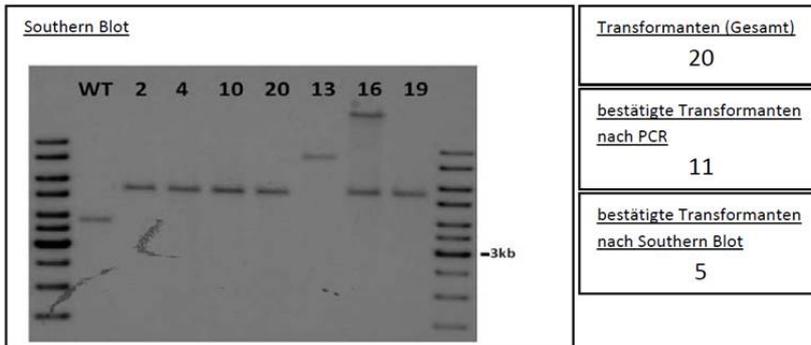
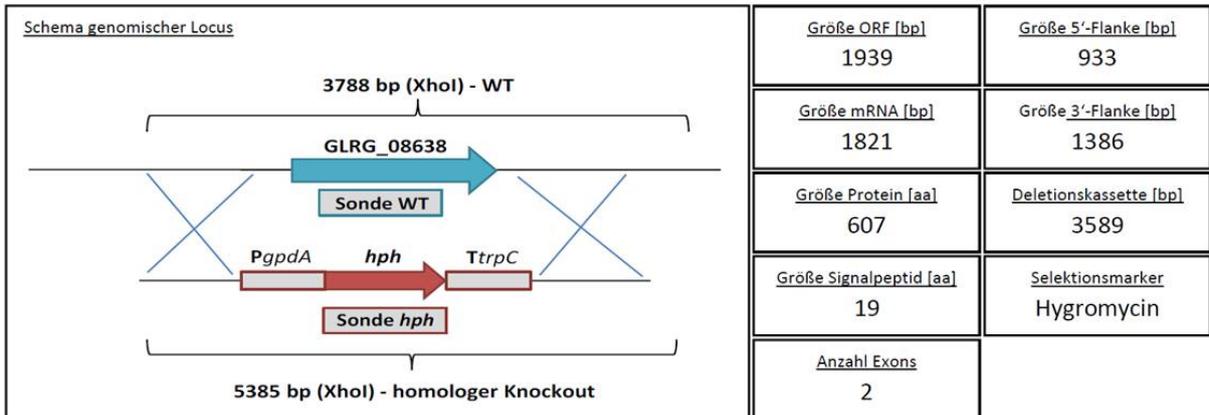
<u>Schema genomischer Locus</u> 	<u>Größe ORF [bp]</u> 538	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u> 879
	<u>Größe mRNA [bp]</u> 414	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u> 994
	<u>Größe Protein [aa]</u> 138	<u>Deletionskassette [bp]</u> 3911
	<u>Größe Signalpeptid [aa]</u> 18	<u>Selektionsmarker</u> Hygromycin
	<u>Anzahl Exons</u> 2	

<u>Southern Blot</u> 	<u>Transformanten (Gesamt)</u> 18
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u> 8
	<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u> 4

<u>Infektionstest</u> 	<u>Maissorte</u> Mikado 2W
	<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u> 10 ⁶ Konidien/ml
	<u>Blattetage</u> 3. Folgeblatt
	<u>dokumentiert</u> 5 dpi

<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	Cg 1091P-nest.F1 / Cg1091 5'-Flanke Rev	WT-Test:	Cg1091-TestF1 / Cg1091-TestR1
3'-Flanke:	Cg1091 3'-Flanke For / Cg 1091T-nest.R1	WT-Sonde:	Cg-SQ_7 / Cg1091-SondeR1
Hyg:	HygPromotor1000-neu / HygORF-Rev	Hyg-Sonde:	Cg-SQ_7 / Cg1091-SondeR1

<u>Annotationsnummer</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Projekt</u>
GLRG_08638	Laccase 1	YSST



verwendete Primer

5'-Flanke:	Lac KO1 / Lac rev2	WT-Test:	Lac1 KO test fw / Lac1 KO test rev
3'-Flanke:	Lac fw / Lac 3' rev	WT-Sonde:	Lac KO1 / Lac KO Sonde2
Hyg:	HygPromotor1000-neu / HygORF-Rev	Hyg-Sonde:	Hyg-Sonde-For / Hyg-Sonde-Rev

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_08638/ GLRG_03376	<u>Beschreibung</u> Laccase 1 / Laccase 2	<u>Projekt</u> YSST	<u>Besonderheit</u> Doppel-Knockout. Das Gen 03376 wurde in der Transformante 08638-10 zusätzlich deletiert.
---------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------	-------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<u>Schema genomischer Locus</u> 	<u>Größe ORF [bp]</u> 1939	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u> 933
	<u>Größe mRNA [bp]</u> 1821	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u> 1386
	<u>Größe Protein [aa]</u> 607	<u>Deletionskassette [bp]</u> 3554
	<u>Größe Signalpeptid [aa]</u> 19	<u>Selektionsmarker</u> Nourseothricin
	<u>Anzahl Exons</u> 2	

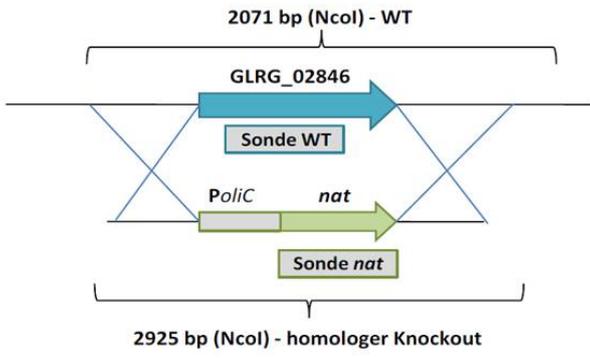
<u>Southern Blot</u> 	<u>Transformanten (Gesamt)</u> 60
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u> 14
	<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u> 5

<u>Infektionstest</u>	<u>Maissorte</u> Mikado 2W
n.i.c. 08638 - KO1 WT DKO42 DKO46 DKO57 DKO17	<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u> 10 ⁶ Konidien/ml
	<u>Blattetage</u> 3. Folgeblatt
	<u>dokumentiert</u> 5 dpi

<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	DJ-JJ1146-5'-Nested / DJ-JJ1146-Rev-nat	WT-Test:	JJ1146-F3 / JJ1146-R5
3'-Flanke:	DJ-JJ1146-For-nat / DJ-JJ1146-3'-Nested	WT-Sonde:	pNRr / Cg-SQ_7
Nours:	PoliC-For / Ttub-Rev	nat-Sonde:	pNRr / Cg-SQ_7

<u>Annotationsnummer</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Projekt</u>
GLRG_02846	Aspartyl-Protease	ATMT-Homologe

<u>Homolog aus <i>Magnaporthe grisea</i> (Annotationsnummer/Beschreibung/e-Wert (Ähnlichkeit))</u>		
MGG_01748.6	Hypothetisches Protein	2E ⁻¹⁴⁴

<u>Schema genomischer Locus</u>  <p>2071 bp (NcoI) - WT</p> <p>GLRG_02846</p> <p>Sonde WT</p> <p>PoliC nat</p> <p>Sonde nat</p> <p>2925 bp (NcoI) - homologer Knockout</p>	<u>Größe ORF [bp]</u>	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u>
	2730	1039
	<u>Größe mRNA [bp]</u>	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u>
	2538	1066
	<u>Größe Protein [aa]</u>	<u>Deletionskassette [bp]</u>
	846	3578
<u>Größe Signalpeptid [aa]</u>	<u>Selektionsmarker</u>	
17	Nourseothricin	
<u>Anzahl Exons</u>		
2		

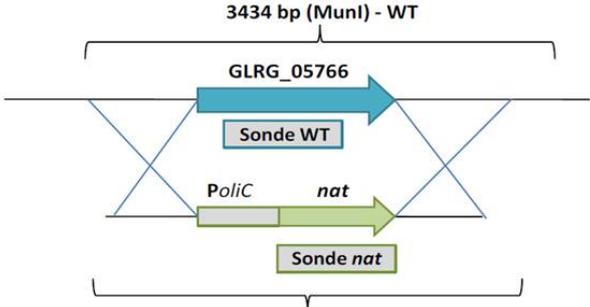
<u>Southern Blot</u>  <p>WT 1 2 6 8 9 11 12 16</p> <p>-3kb</p>	<u>Transformanten (Gesamt)</u>
	24
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u>
	8
<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u>	
4	

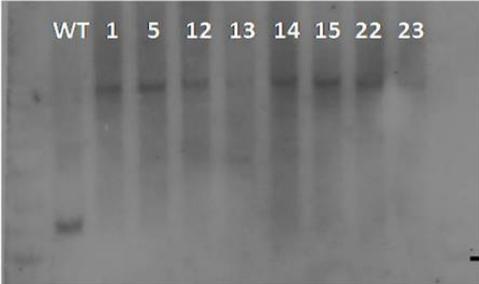
<u>Infektionstest</u>						<u>Maissorte</u>
n.i.c.	WT	1	9	12	Ekt.	Mikado 2W
						<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u>
						10 ⁶ Konidien/ml
						<u>Blatttage</u>
						3. Folgeblatt
						<u>dokumentiert</u>
						5 dpi

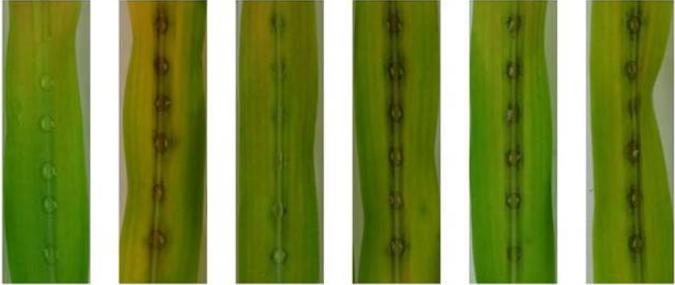
<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	02846-P-F1 / 02846-P-R1	PCR-Test:	02846-Test-F1 / 02846-Test-R1
3'-Flanke:	02846-T-F1 / 02846-T-R1	WT-Sonde:	02846-Test-F1 / 02846-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Projekt</u>
GLRG_05766	Hypothetisches Protein	ATMT-Homologe

<u>Homolog aus <i>Magnaporthe grisea</i> (Annotationsnummer/Beschreibung/e-Wert (Ähnlichkeit))</u>		
MGG_04128.6	Hypothetisches Protein	3E ⁻⁰⁷

<u>Schema genomischer Locus</u> 	<u>Größe ORF [bp]</u>	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u>
	1860	1073
	<u>Größe mRNA [bp]</u>	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u>
	1602	521
	<u>Größe Protein [aa]</u>	<u>Deletionskassette [bp]</u>
	534	3067
<u>Größe Signalpeptid [aa]</u>	<u>Selektionsmarker</u>	
22	Nourseothricin	
<u>Anzahl Exons</u>		
4		

<u>Southern Blot</u> 	<u>Transformanten (Gesamt)</u>
	24
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u>
	10
<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u>	
	8

<u>Infektionstest</u>						<u>Maissorte</u>
n.i.c.	WT	1	14	23	Ekt.	Mikado 2W
						<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u>
						10 ⁶ Konidien/ml
						<u>Blattetage</u>
						3. Folgeblatt
						<u>dokumentiert</u>
						5 dpi

<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	05766-P-F1 / 05766-P-R1	PCR-Test:	05766-Test-F1 / 05766-Test-R1
3'-Flanke:	05766-T-F1 / 05766-T-R1	WT-Sonde:	05766-Sonde-For / 05766-Sonde-Rev
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_06842	<u>Beschreibung</u> Membran-Protein	<u>Projekt</u> ATMT-Homologe
----------------------------------------	----------------------------------------	---------------------------------

<u>Homolog aus <i>Magnaporthe grisea</i> (Annotationsnummer/Beschreibung/e-Wert (Ähnlichkeit))</u>		
MGG_13347.6	Membran-Protein	2E ⁻⁴⁷

<u>Schema genomischer Locus</u> <p>4028 bp (EcoRV) - WT</p> <p>GLRG_06842</p> <p>Sonde WT</p> <p>PolIC nat</p> <p>Sonde nat</p> <p>2503 bp (EcoRV) - homologer Knockout</p>	<u>Größe ORF [bp]</u> 1552	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u> 574
	<u>Größe mRNA [bp]</u> 1305	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u> 933
	<u>Größe Protein [aa]</u> 435	<u>Deletionskassette [bp]</u> 2980
	<u>Größe Signalpeptid [aa]</u> 28	<u>Selektionsmarker</u> Nourseothricin
	<u>Anzahl Exons</u> 3	

<u>Southern Blot</u> <p>WT 2 3 5 8 9 10 11</p> <p>3kb</p>	<u>Transformanten (Gesamt)</u> 12
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u> 7
	<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u> 5

<u>Infektionstest</u>						<u>Maissorte</u> Mikado 2W
n.i.c.	WT	3	8	11	Ekt.	<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u> 10 ⁶ Konidien/ml
						<u>Blattetage</u> 3. Folgeblatt
						<u>dokumentiert</u> 5 dpi

<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	06842-P-F1 / 06842-P-R1	PCR-Test:	06842-Test-F1 / 06842-Test-R1
3'-Flanke:	06842-T-F1 / 06842-T-R1	WT-Sonde:	06842-Test-F1 / 06842-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Projekt</u>
GLRG_08263	Hypothetisches Protein	ATMT-Homologe

<u>Homolog aus <i>Magnaporthe grisea</i> (Annotationsnummer/Beschreibung/e-Wert (Ähnlichkeit))</u>		
MGG_07973.6	surface protein 1	4E ⁻³¹

<u>Schema genomischer Locus</u> <p>3659 bp (HindIII) - WT</p> <p>GLRG_08263</p> <p>Sonde WT</p> <p>PolIC nat</p> <p>Sonde nat</p> <p>4586 bp (HindIII) - homologer Knockout</p>	<u>Größe ORF [bp]</u>	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u>
	441	966
	<u>Größe mRNA [bp]</u>	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u>
	438	1012
	<u>Größe Protein [aa]</u>	<u>Deletionskassette [bp]</u>
	146	3450
<u>Größe Signalpeptid [aa]</u>	<u>Selektionsmarker</u>	
19	Nourseothricin	
<u>Anzahl Exons</u>		
	1	

<u>Southern Blot</u> <p>WT 1 3 4 5 6 7 8 9</p> <p>-3kb</p>	<u>Transformanten (Gesamt)</u>
	20
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u>
	11
<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u>	
	8

<u>Infektionstest</u> <p>n.i.c. WT 1 6 8 Ekt.</p>	<u>Maissorte</u>
	Mikado 2W
	<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u>
	10 ⁶ Konidien/ml
	<u>Blatttage</u>
	3. Folgeblatt
<u>dokumentiert</u>	
	5 dpi

<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	08263-P-F1 / 08263-P-R1	PCR-Test:	08263-Test-F1 / 08263Test-R1
3'-Flanke:	08263-T-F1 / 08263-T-R1	WT-Sonde:	08263-Test-F1 / 08263Test-R1
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Projekt</u>
GLRG_08566	Hypothetisches Protein	ATMT-Homologe

<u>Homolog aus <i>Magnaporthe grisea</i> (Annotationsnummer/Beschreibung/e-Wert (Ähnlichkeit))</u>		
MGG_05948.6	zinc knuckle domain-Protein	$2E^{-144}$

<u>Schema genomischer Locus</u> <p>2527 bp (Clal) - WT</p> <p>GLRG_08566</p> <p>Sonde WT</p> <p>PolIC nat</p> <p>Sonde nat</p> <p>3085 bp (Clal) - homologer Knockout</p>	<u>Größe ORF [bp]</u>	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u>
	834	1026
	<u>Größe mRNA [bp]</u>	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u>
	831	1045
	<u>Größe Protein [aa]</u>	<u>Deletionskassette [bp]</u>
	277	3544
<u>Größe Signalpeptid [aa]</u>	<u>Selektionsmarker</u>	
18	Nourseothricin	
<u>Anzahl Exons</u>		
1		

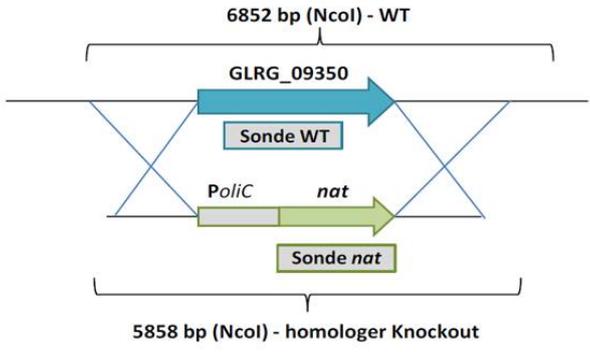
<u>Southern Blot</u> <p>WT 3 6 8 12 13 16 23 24</p> <p>-3kb</p>	<u>Transformanten (Gesamt)</u>
	24
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u>
	16
<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u>	
	4

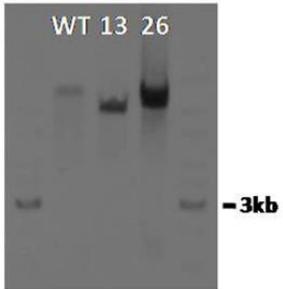
<u>Infektionstest</u>						<u>Maissorte</u>
n.i.c.	WT	3	13	23	Ekt.	Mikado 2W
						<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u>
						10^6 Konidien/ml
						<u>Blattetage</u>
						3. Folgeblatt
						<u>dokumentiert</u>
						5 dpi

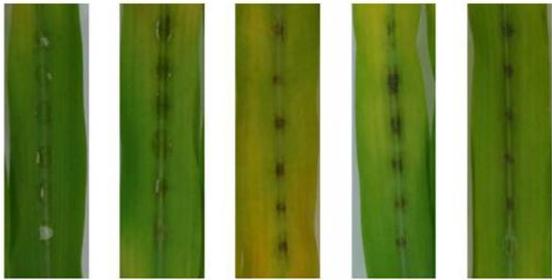
<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	08566-P-F1 / 08566-P-R1	PCR-Test:	08566-Test-F1 / 08566-Test-R1
3'-Flanke:	08566-T-F1 / 08566-T-R1	WT-Sonde:	08566-Test-F1 / 08566-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Projekt</u>
GLRG_09350	Hypothetisches Protein	ATMT-Homologe

<u>Homolog aus <i>Magnaporthe grisea</i> (Annotationsnummer/Beschreibung/e-Wert (Ähnlichkeit))</u>		
MGG_07745.6	Dipeptidyl Aminopeptidase B	6E ⁻¹²⁹

<u>Schema genomischer Locus</u>  <p>6852 bp (NcoI) - WT</p> <p>5858 bp (NcoI) - homologer Knockout</p>	<u>Größe ORF [bp]</u>	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u>
	2459	1006
	<u>Größe mRNA [bp]</u>	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u>
	2331	1022
	<u>Größe Protein [aa]</u>	<u>Deletionskassette [bp]</u>
	777	3497
<u>Größe Signalpeptid [aa]</u>	<u>Selektionsmarker</u>	
20	Nourseothricin	
<u>Anzahl Exons</u>		
	2	

<u>Southern Blot</u>  <p>WT 13 26</p> <p>-3kb</p>	<u>Transformanten (Gesamt)</u>
	45
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u>
	2
<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u>	
	1

<u>Infektionstest</u> <p>n.i.c. WT 13 26 Ekt.</p> 	<u>Maissorte</u>
	Mikado 2W
	<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u>
	10 ⁶ Konidien/ml
	<u>Blatttage</u>
3. Folgeblatt	
<u>dokumentiert</u>	
5 dpi	

<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	09350-P-F1 / 09350-P-R1	PCR-Test:	09350-Test-F1 / 09350-Test-R1
3'-Flanke:	09350-T-F1 / 09350-T-R1	WT-Sonde:	09350-Test-F1 / 09350-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_11030	<u>Beschreibung</u> Hypothetisches Protein	<u>Projekt</u> ATMT-Homologe
----------------------------------------	-----------------------------------------------	---------------------------------

<u>Homolog aus <i>Magnaporthe grisea</i> (Annotationsnummer/Beschreibung/e-Wert (Ähnlichkeit))</u>		
MGG_04685.6	Hypothetisches Protein	4E ⁻⁷

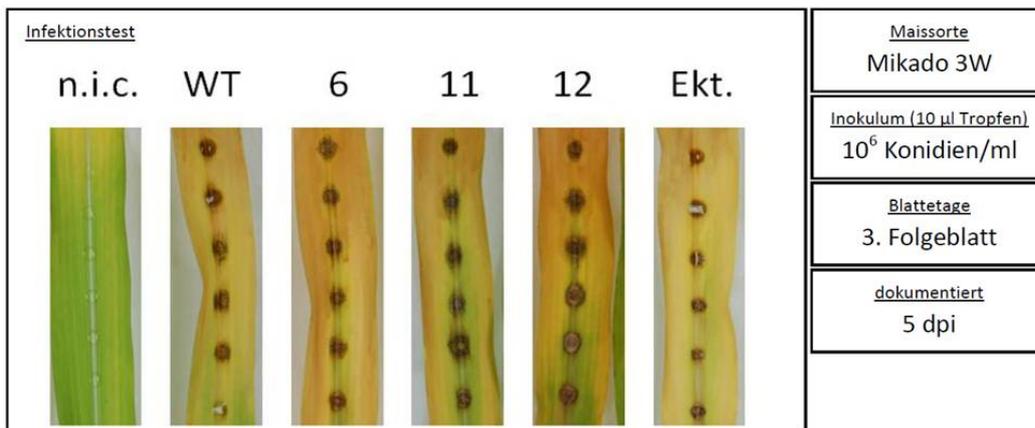
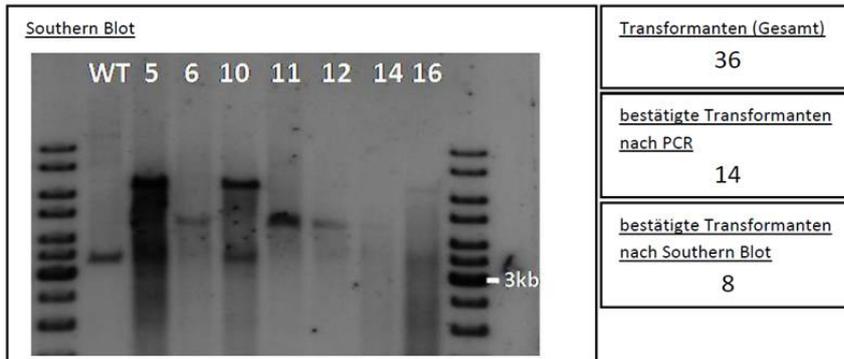
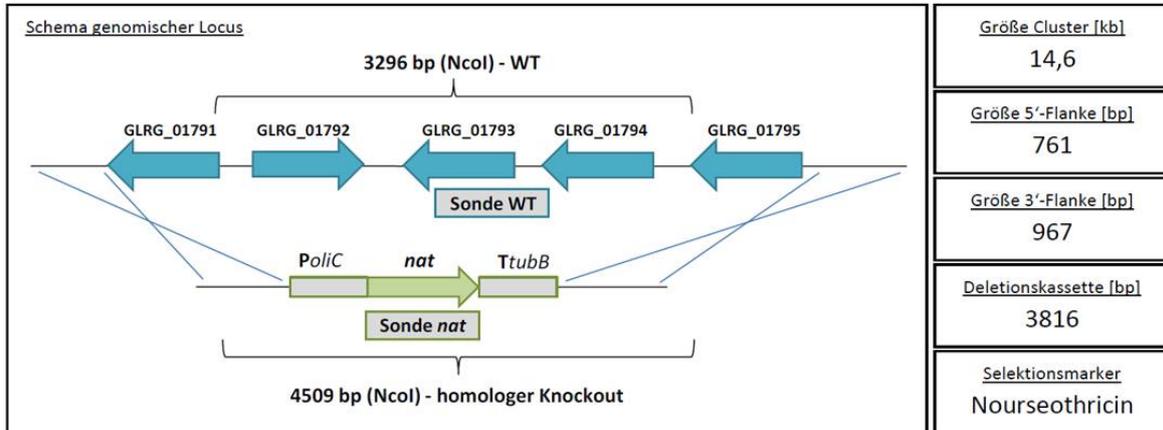
<u>Schema genomischer Locus</u> <p>3772 bp (NcoI) - WT</p> <p>GLRG_11030</p> <p>Sonde WT</p> <p>PolIC nat</p> <p>Sonde nat</p> <p>5426 bp (NcoI) - homologer Knockout</p>	<u>Größe ORF [bp]</u> 2203	<u>Größe 5'-Flanke [bp]</u> 1019
	<u>Größe mRNA [bp]</u> 1956	<u>Größe 3'-Flanke [bp]</u> 1062
	<u>Größe Protein [aa]</u> 652	<u>Deletionskassette [bp]</u> 3554
	<u>Größe Signalpeptid [aa]</u> 21	<u>Selektionsmarker</u> Nourseothricin
	<u>Anzahl Exons</u> 4	

<u>Southern Blot</u> <p>WT 4 9 12 18 19 21</p> <p>-3kb</p>	<u>Transformanten (Gesamt)</u> 24
	<u>bestätigte Transformanten nach PCR</u> 6
	<u>bestätigte Transformanten nach Southern Blot</u> 3

<u>Infektionstest</u> <p>n.i.c. WT 18 19 21 Ekt.</p>	<u>Maissorte</u> Mikado 2W
	<u>Inokulum (10 µl Tropfen)</u> 10 ⁶ Konidien/ml
	<u>Blattetage</u> 3. Folgeblatt
	<u>dokumentiert</u> 5 dpi

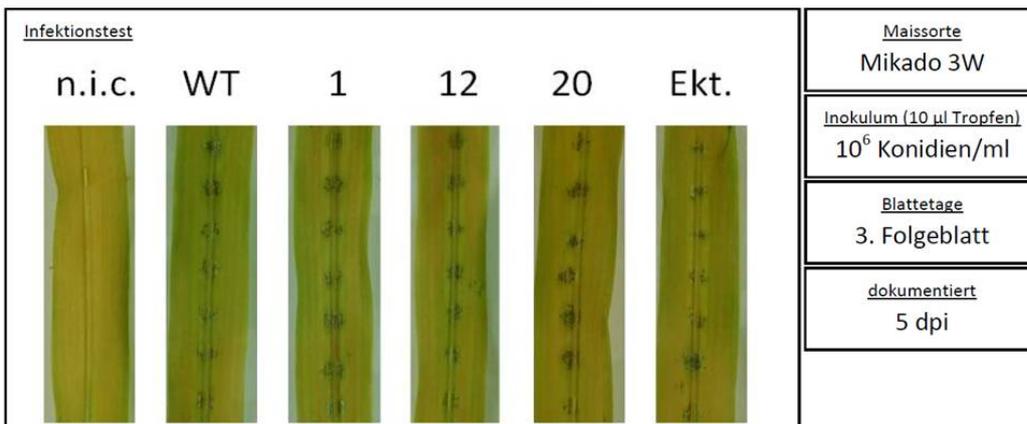
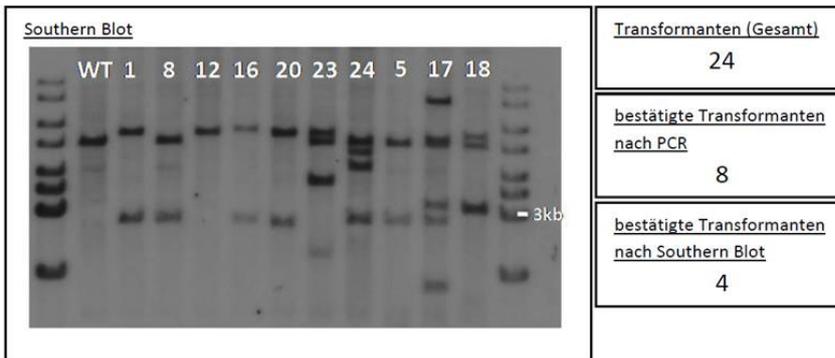
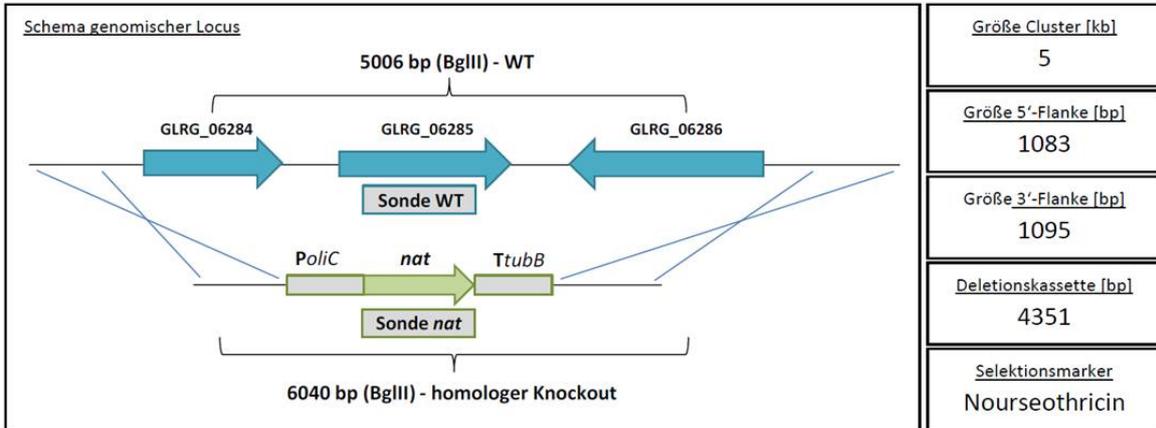
<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	11030-P-F1 / 11030-P-R1	PCR-Test:	11030-Test-F1 / 11030-Test-R1
3'-Flanke:	11030-T-F1 / 11030-T-R1	WT-Sonde:	11030-Test-F1 / 11030-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_01791 GLRG_01792 GLRG_01793 GLRG_01794 GLRG_01795	<u>Beschreibung</u> Hypothetisches Protein Dehydrogenase Hypothetisches Protein Hypothetisches Protein Acylhydrolase	<u>Projekt</u> Cluster- knockout <u>Clusternummer</u> 1
------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------



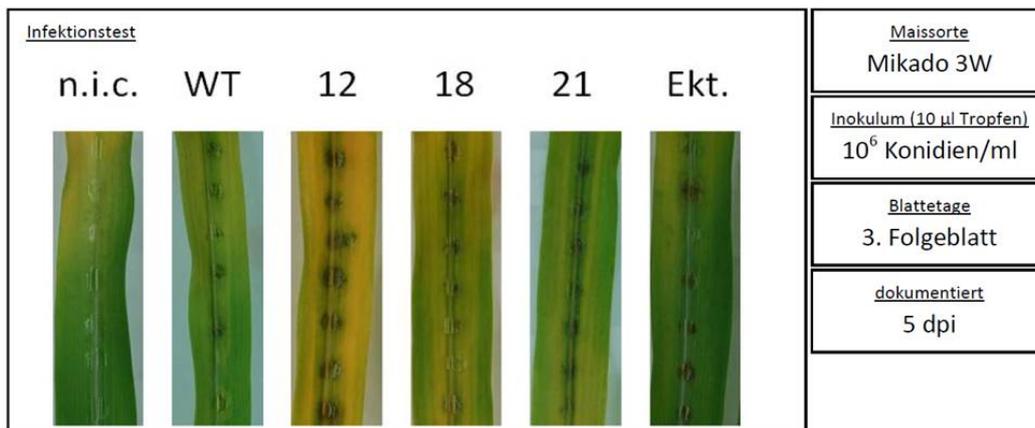
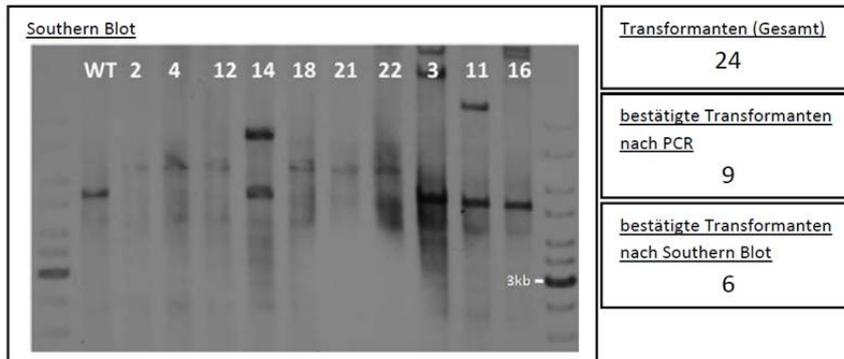
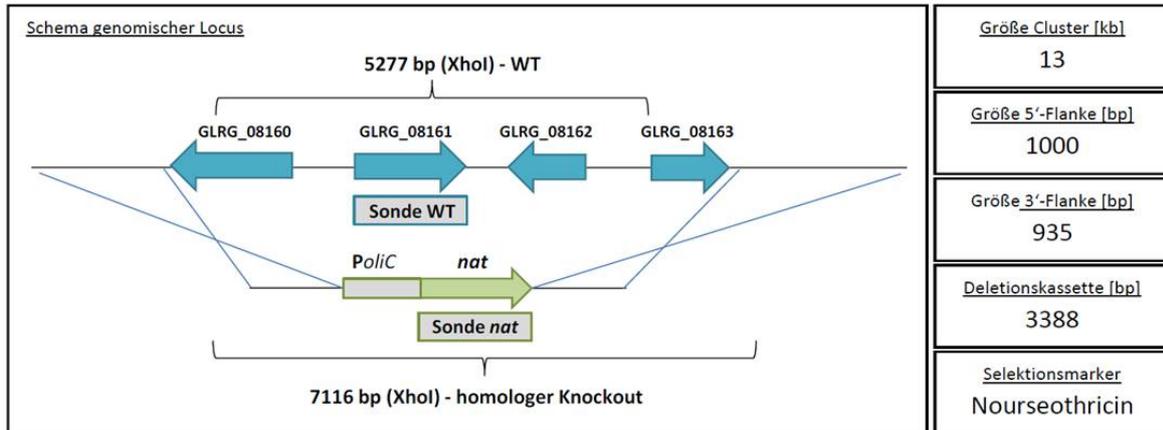
<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	CgCl1-P-F2 / CgCl1-P-R1	PCR-Test:	CgCl1-WT-F1 / CgCl1-WT-R1
3'-Flanke:	CgCl1-T-F1 / CgCl1-T-R2	WT-Sonde:	CgCl1-Sonde-For / CgCl1-Sonde-Rev
Nours:	uni-nours.F1 / Nours-T-Neu	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_06284 GLRG_06285 GLRG_06286	<u>Beschreibung</u> Biotrophy assoziiertes Protein 2 Peptidase M28 Metalloprotease	<u>Projekt</u> Cluster-knockout
		<u>Clusternummer</u> 2



<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	CgCl2-P-F2 / CgCl2-P-R1	PCR-Test:	CgCl2-Sonde-For / CgCl2-Sonde-Rev
3'-Flanke:	CgCl2-T-F1 / CgCl2-T-R2	WT-Sonde:	CgCl2-Sonde-For / CgCl2-Sonde-Rev
Nours:	uni-nours.F1 / Nours-T-neu	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

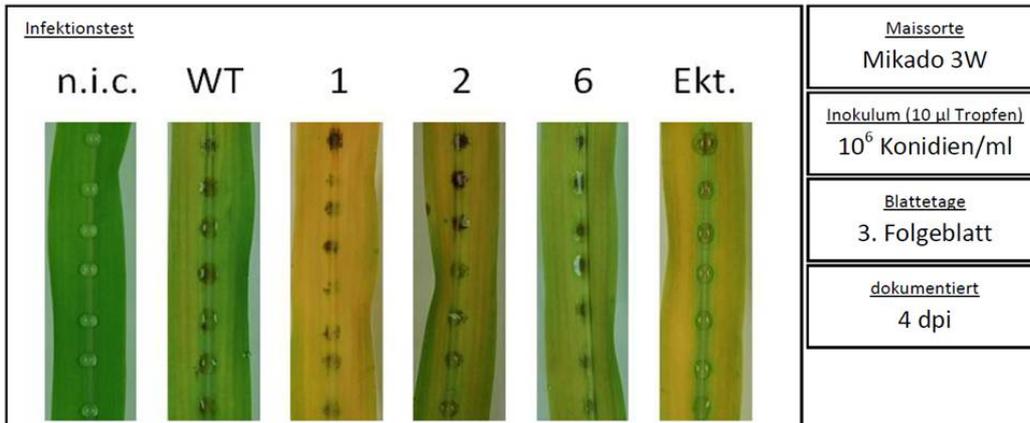
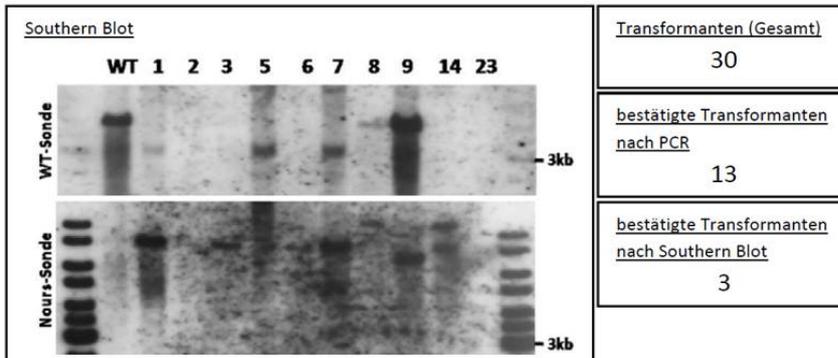
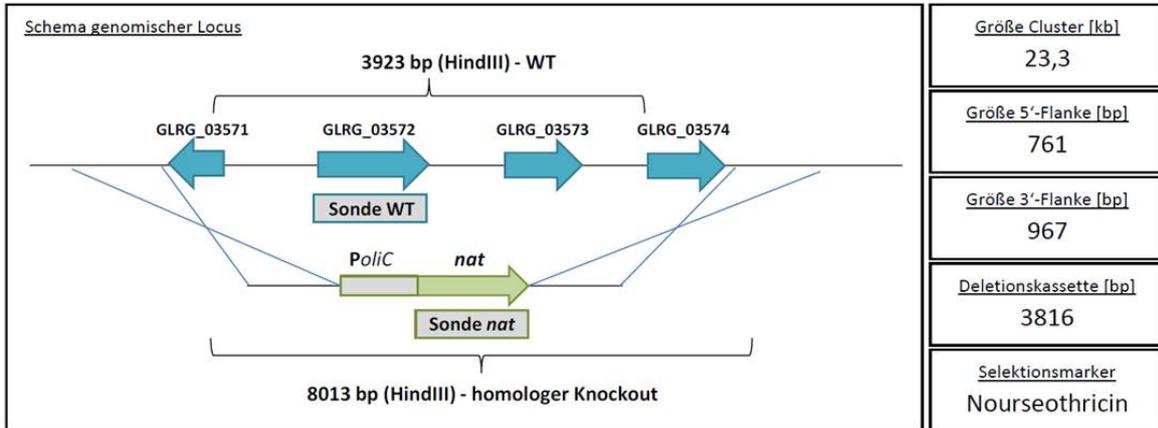
<u>Annotationsnummer</u> GLRG_08160 GLRG_08161 GLRG_08162 GLRG_08163	<u>Beschreibung</u> Hypothetisches Protein Hypothetisches Protein Hypothetisches Protein Hypothetisches Protein	<u>Projekt</u> Cluster- knockout
		<u>Clusternummer</u> 3



verwendete Primer

5'-Flanke:	CgCl3-P-F2 / CgCl3-P-R1	PCR-Test:	CgCl3-TestF2 / CgCl3-TestR2
3'-Flanke:	CgCl3-T-F1 / CgCl3-T-R2	WT-Sonde:	CgCl3-Sonde-For / CgCl1-Sonde-Rev
Nours:	uni-nours.F1 / Nours-T-Neu	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_F02

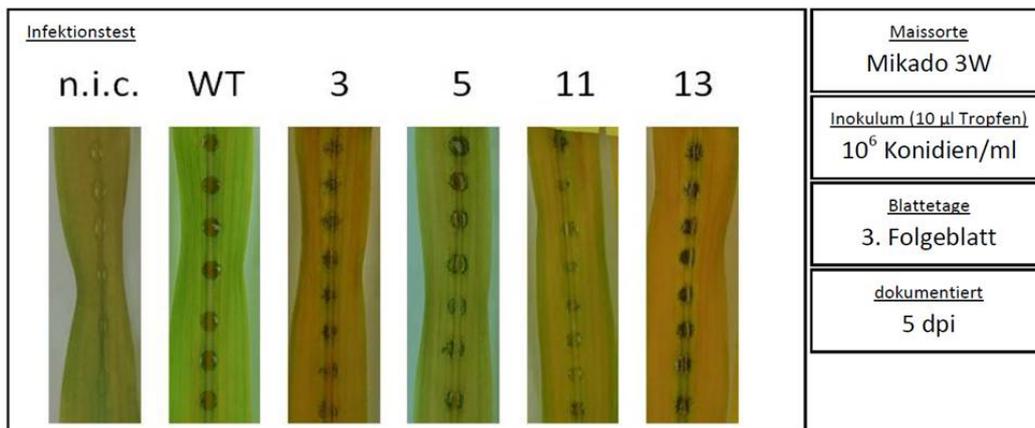
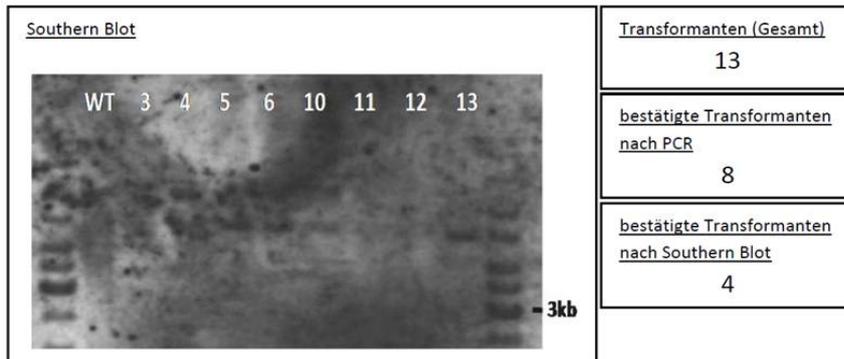
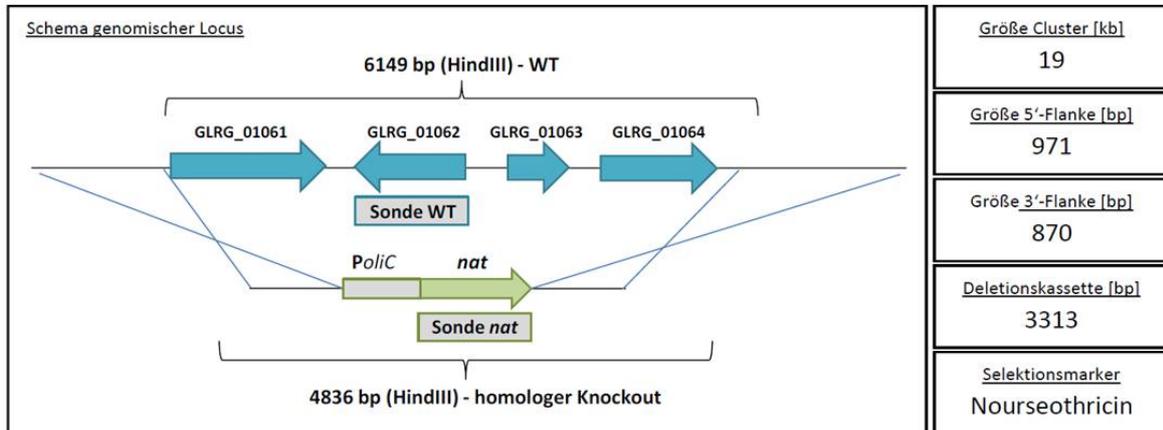
<u>Annotationsnummer</u> GLRG_03571 GLRG_03572 GLRG_03573 GLRG_03574	<u>Beschreibung</u> Hypothetisches Protein Pac1- Protein Hypothetisches Protein Disulphide Isomerase	<u>Projekt</u> Cluster- knockout
		<u>Clusternummer</u> 4



verwendete Primer

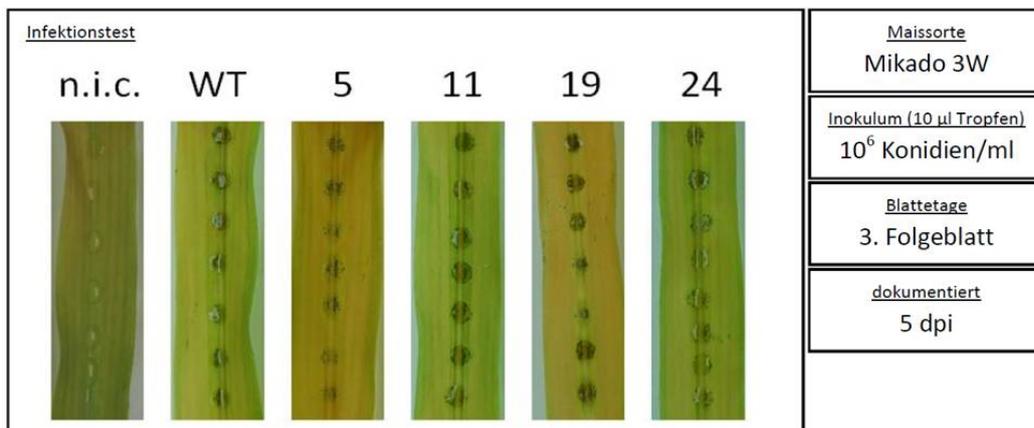
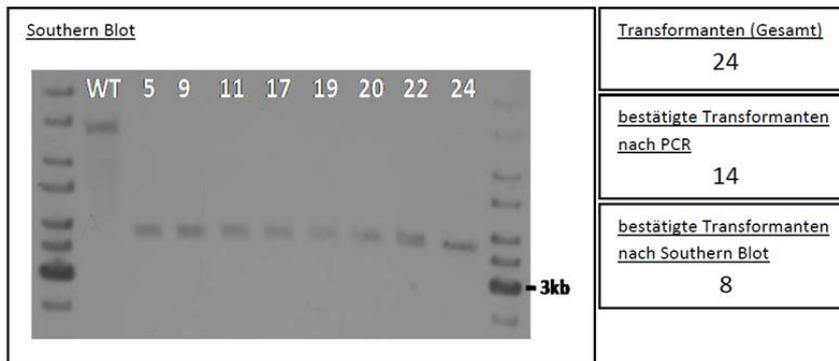
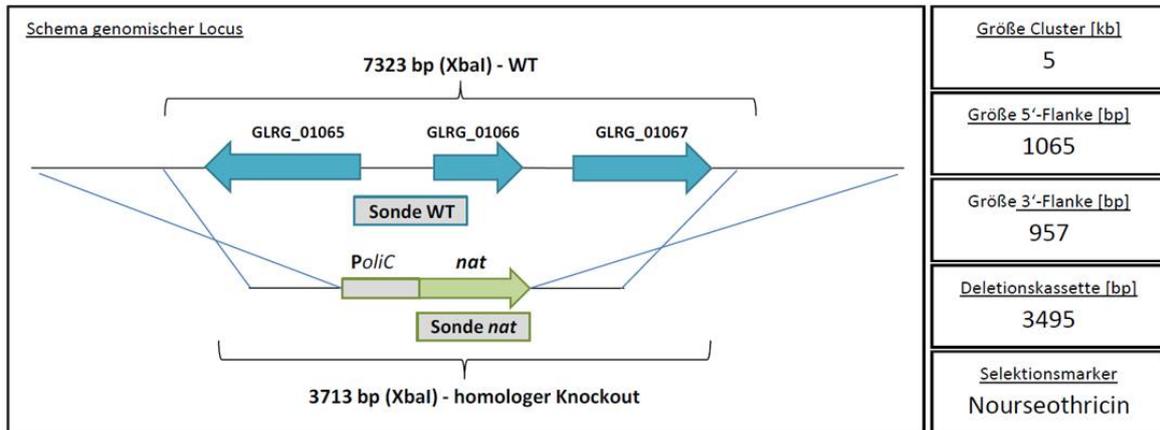
5'-Flanke:	CgCl4-P-For2 / CgCl4-P-Rev	PCR-Test:	CgCl4-TestF2 / CgCl4-TestR2
3'-Flanke:	CgCl4-T-For / CgCl4-T-Rev3	WT-Sonde:	CgCl4-Sonde-For / CgCl4-Sonde-Rev
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_01061 GLRG_01062 GLRG_01063 GLRG_01064	<u>Beschreibung</u> GMC Oxidoreductase GMC Oxidoreductase Hypothetisches Protein Membran Protein DUF6	<u>Projekt</u> Cluster- knockout
		<u>Clusternummer</u> 5 (A)



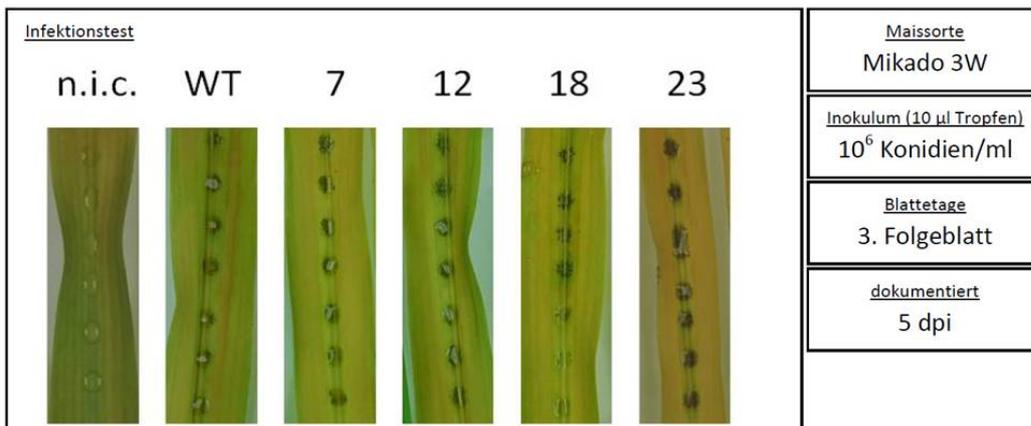
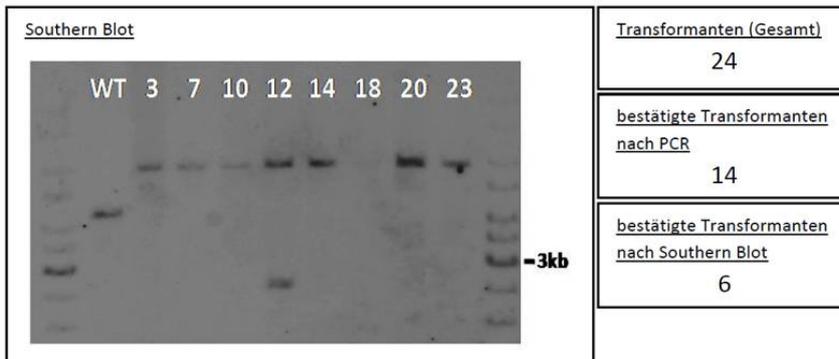
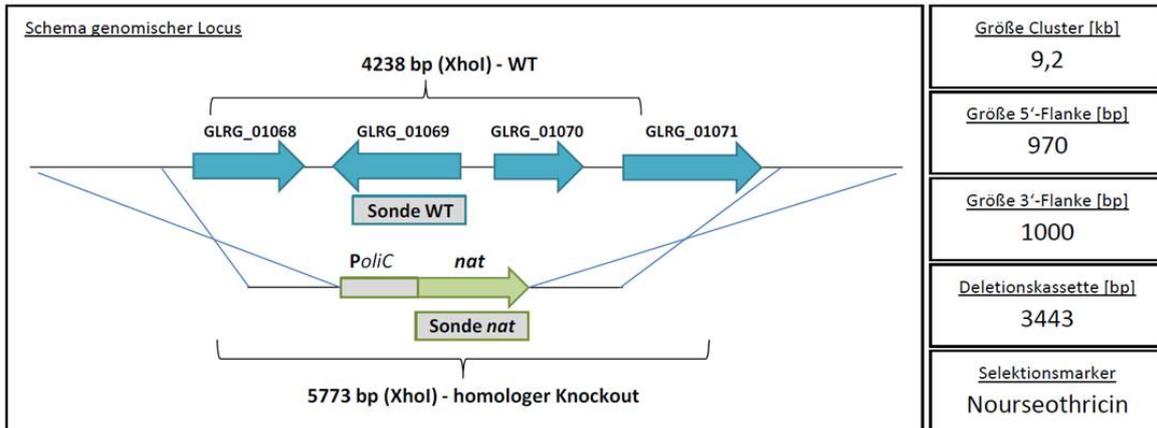
<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	CgCI5-P-F2 / CgCI5-P-R1	PCR-Test:	CgCI5-TestF1 / CgCI5-TestR1
3'-Flanke:	CgCI5A-T-F1 / CgCI5A-T-R2	WT-Sonde:	CgCI5A-Sonde-F1 / CgCI5A-Sonde-R
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_01065 GLRG_01066 GLRG_01067	<u>Beschreibung</u> Hypothetisches Protein ATP-NAD Kinase Hypothetisches Protein	<u>Projekt</u> Cluster- knockout
		<u>Clusternummer</u> 5 (B)



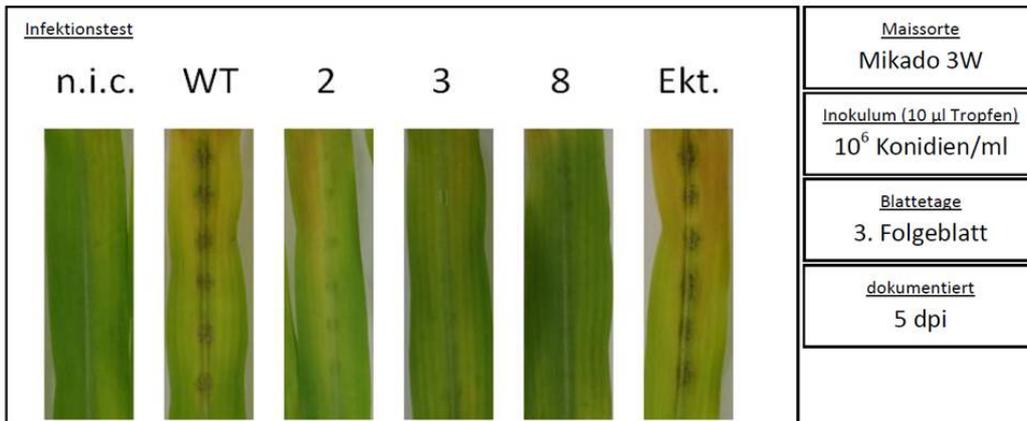
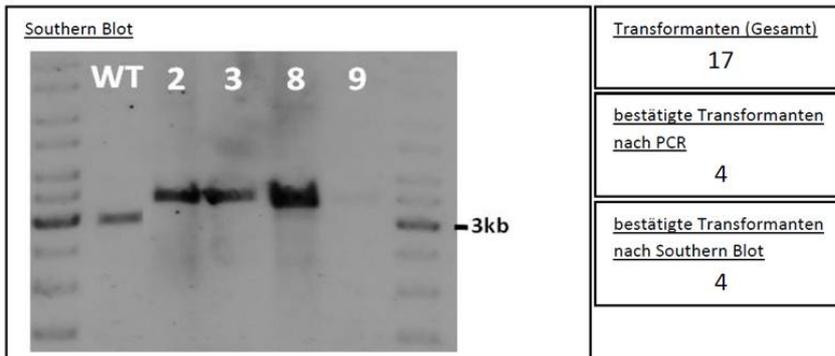
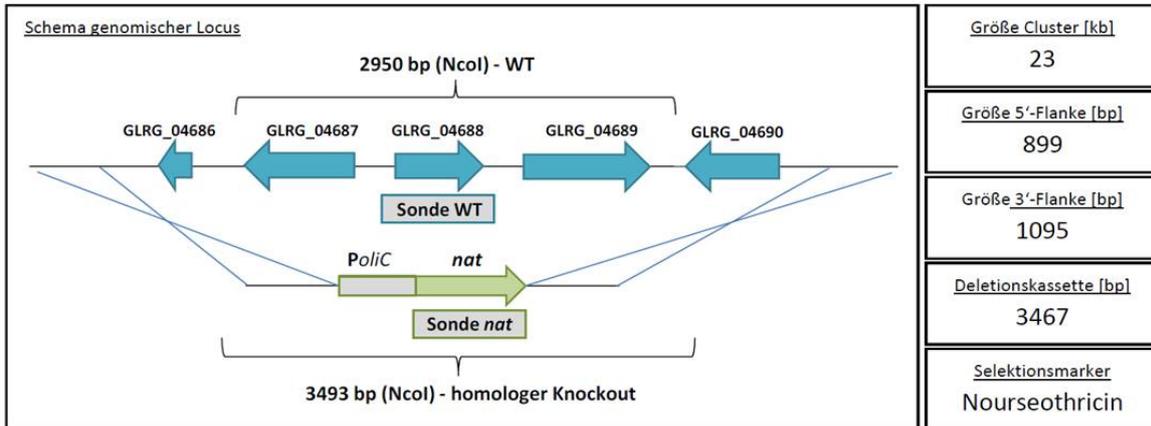
<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	CgCL5B-P-F2 / CgCL5B -P-R1	PCR-Test:	CgCI5B-Test-F1/ CgCI5B-Test-R1
3'-Flanke:	CgCI5B -T-F1 / CgCI5B -T-R2	WT-Sonde:	CgCI5B-Test-F1/ CgCI5B-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_F02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_01068 GLRG_01069 GLRG_01070 GLRG_01071	<u>Beschreibung</u> Isoamylalkohol Oxidase Hypothetisches Protein Oligosaccharide Oxidase Nuklease/Phosphatase	<u>Projekt</u> Cluster- knockout
		<u>Clusternummer</u> 5 (C)



<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	CgCI5C-P-F2 / CgCI5C-P-R1	PCR-Test:	CgCI5-TestF2 / CgCI5-TestR2
3'-Flanke:	CgCI5-T-F1 / CgCI5-T-R2	WT-Sonde:	CgCI5C-Sonde-F / CgCI5C-Sonde-R
Nours:	uni-nours.F1 / uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02 / Nours_R02

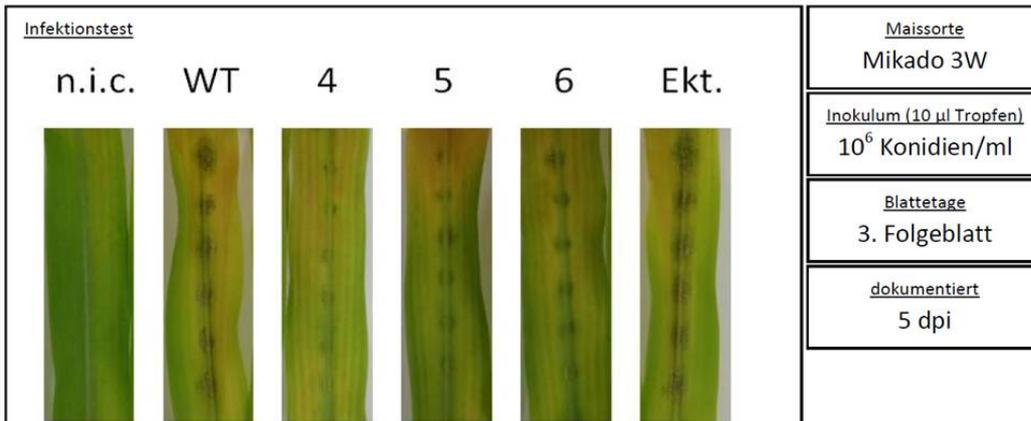
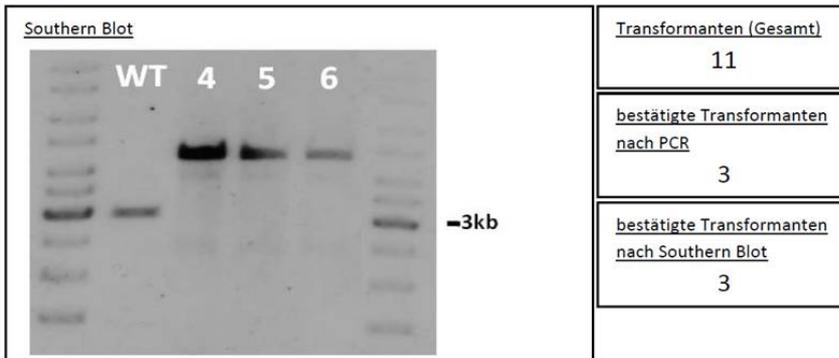
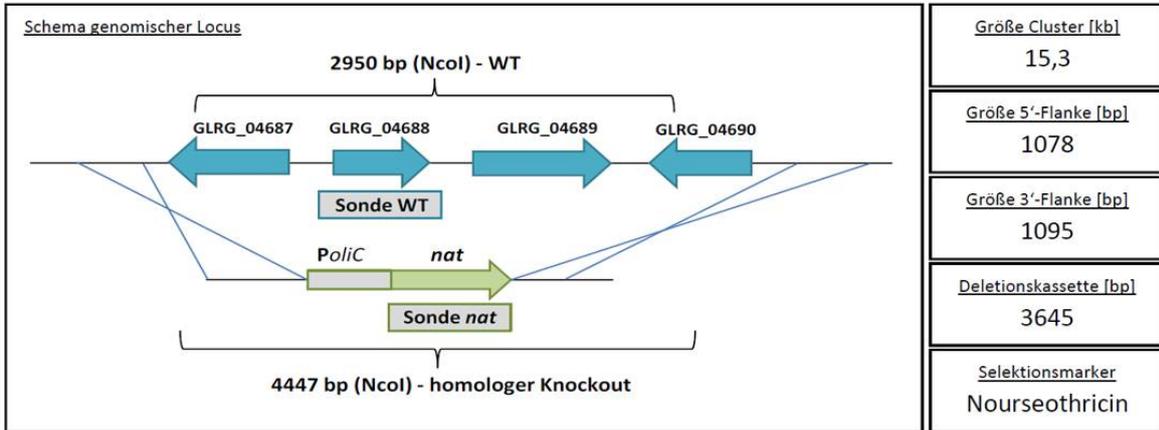
<u>Annotationsnummer</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Projekt</u>
GLRG_04686	Hypothetisches Protein	Cluster-knockout
GLRG_04687	Hypothetisches Protein	
GLRG_04688	S1/P1 Nuclease	<u>Clusternummer</u> 6
GLRG_04689	Hypothetisches Protein	
GLRG_04690	Hypothetisches Protein	



verwendete Primer

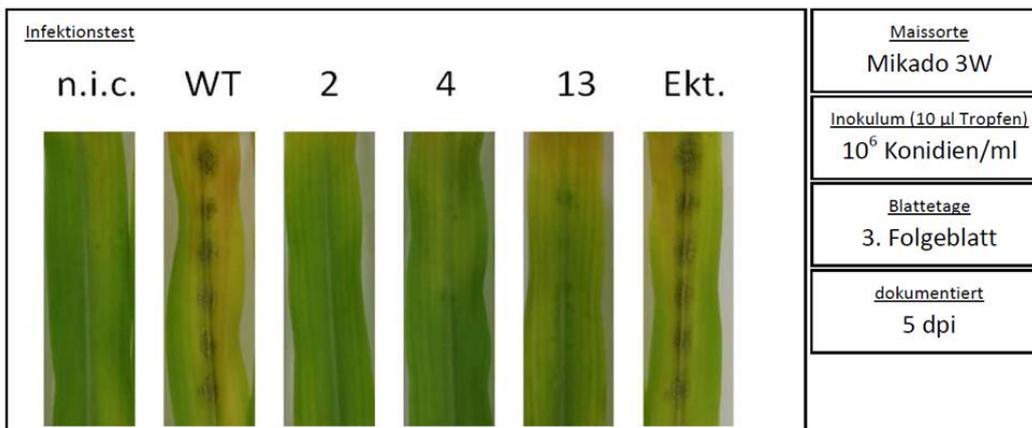
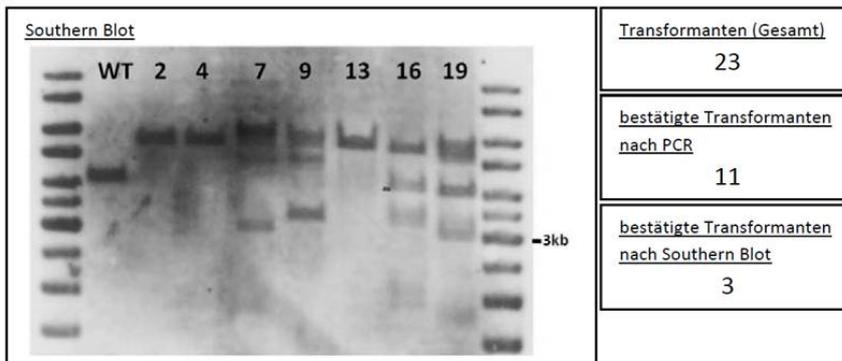
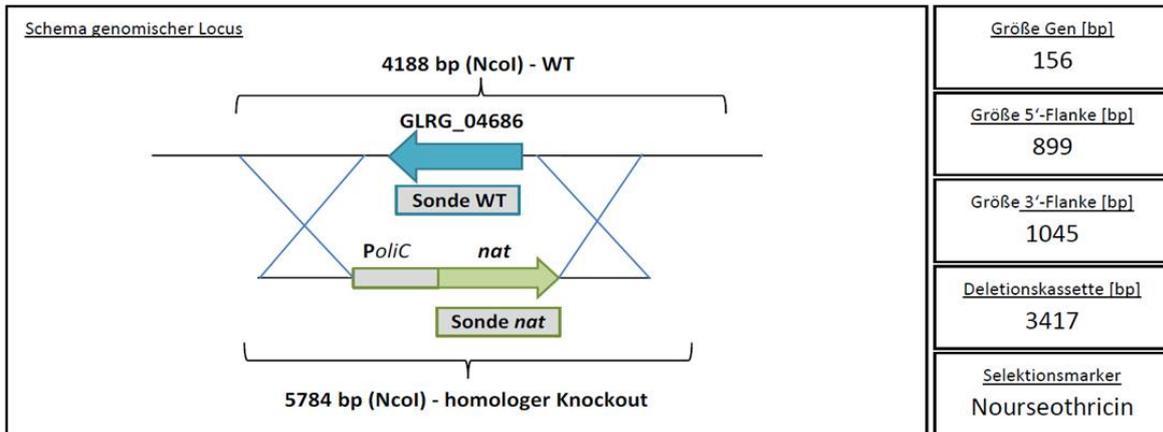
5'-Flanke:	CgCl6-P-F1/CgCl6-P-R1	PCR-Test:	CgCl6B-Test-F1/ CgCl6B-Test-R1
3'-Flanke:	CgCl6-T-F1/CgCl6-T-R2	WT-Sonde:	CgCl6B-Test-F1/ CgCl6B-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1/ uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02/Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_04687 GLRG_04688 GLRG_04689 GLRG_04690	<u>Beschreibung</u> Hypothetisches Protein S1/P1 Nuclease Hypothetisches Protein Hypothetisches Protein	<u>Projekt</u> Cluster- knockout <u>Clusternummer</u> 6 (B)
----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------



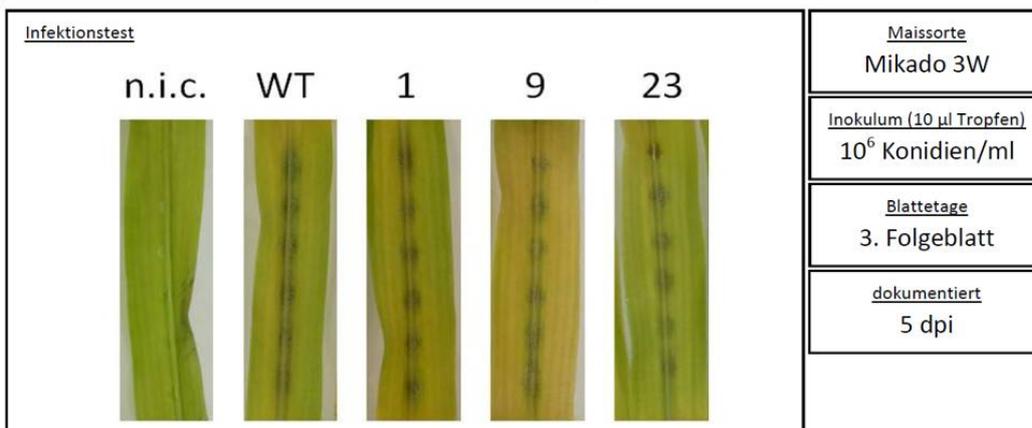
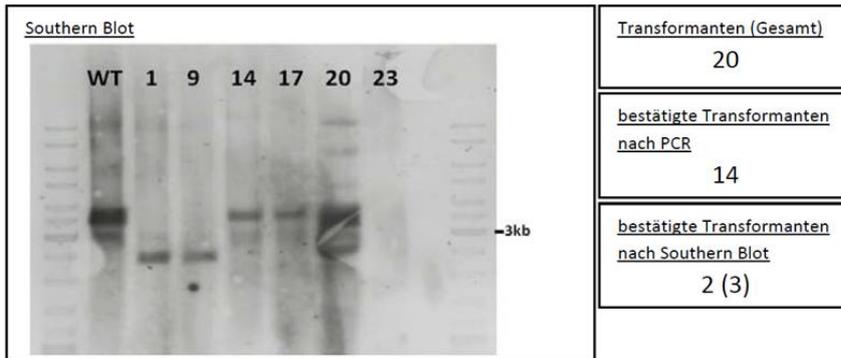
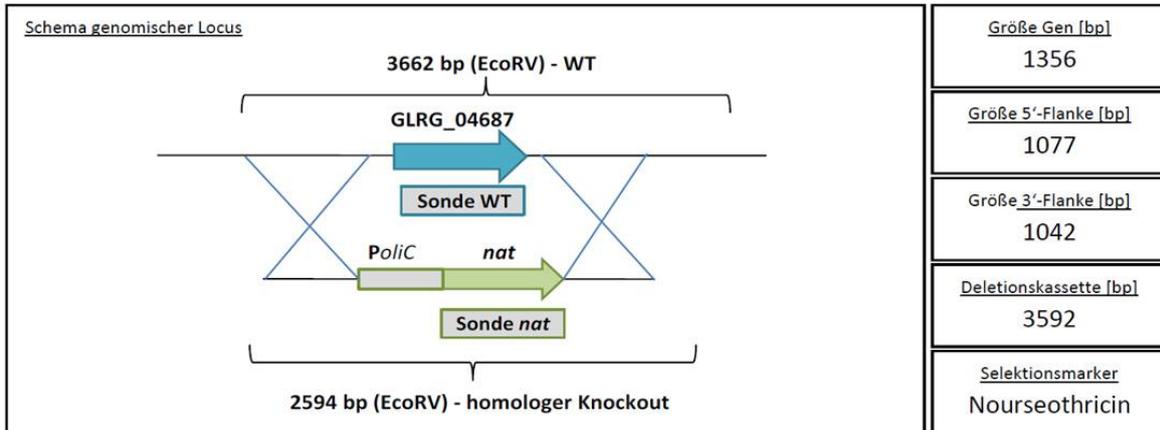
<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	CgCl6B-P-F1/CgCl6B-P-R1	PCR-Test:	CgCl6B-Test-F1/ CgCl6B-Test-R1
3'-Flanke:	CgCl6-T-F1/CgCl6-T-R1	WT-Sonde:	CgCl6B-Test-F1/ CgCl6B-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1/ uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02/Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_04686	<u>Beschreibung</u> Hypothetisches Protein	<u>Projekt</u> Cluster-knockout
		<u>Clusternummer</u> 6



<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	CgCl6-P-F1/CgCl6-P-R1	PCR-Test:	04686-Test-F1/ 04686-Test-R1
3'-Flanke:	Cg04685-T-F1/ Cg04685-T-R1	WT-Sonde:	Nours_F02/04686-Sonde-Rev
Nours:	uni-nours.F1/ uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02/04686-Sonde-Rev

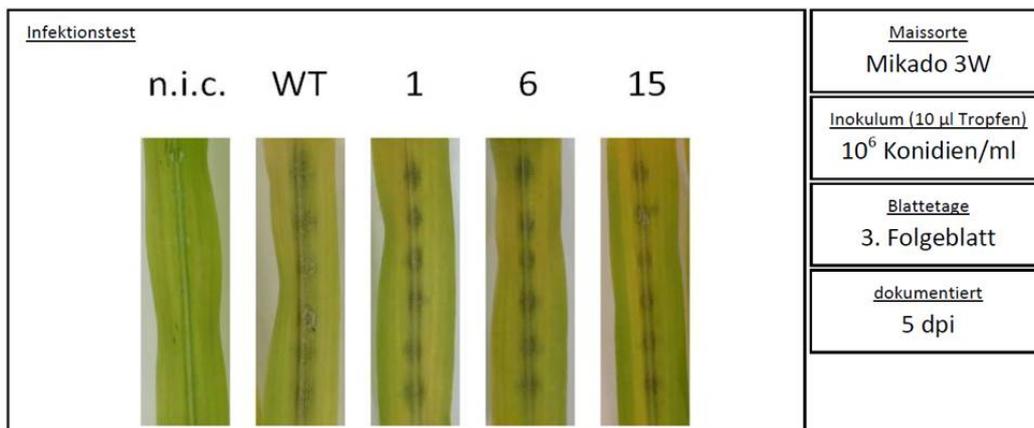
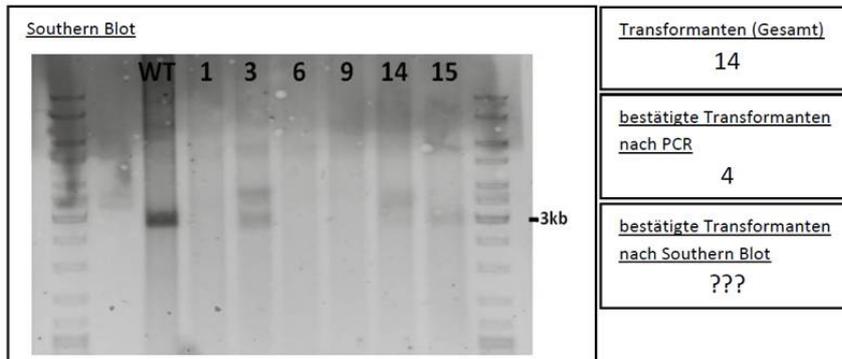
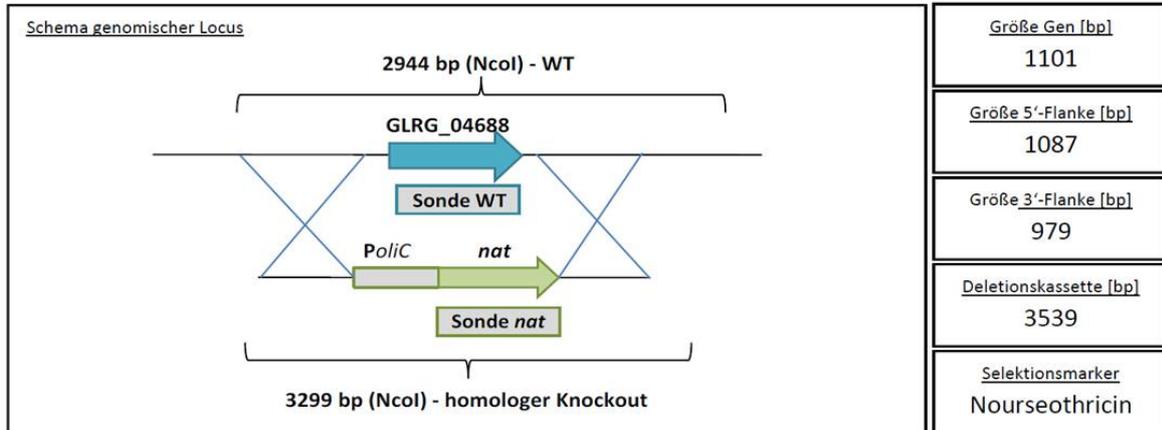
<u>Annotationsnummer</u> GLRG_04687	<u>Beschreibung</u> Hypothetisches Protein	<u>Projekt</u> Cluster-knockout
		<u>Clusternummer</u> 6



verwendete Primer

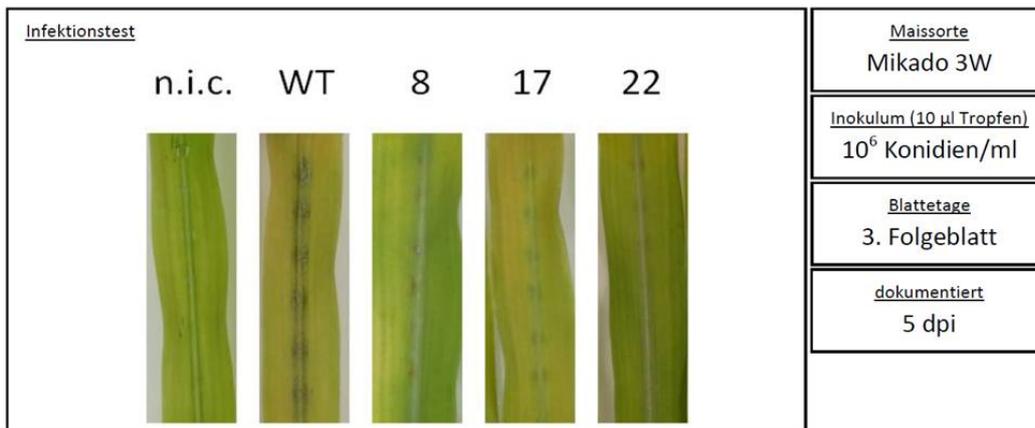
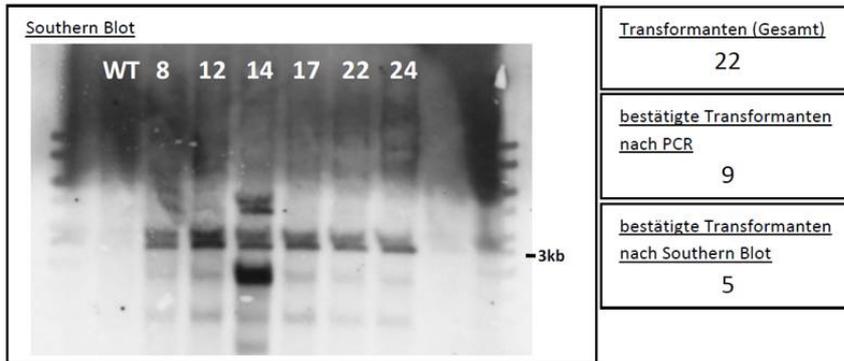
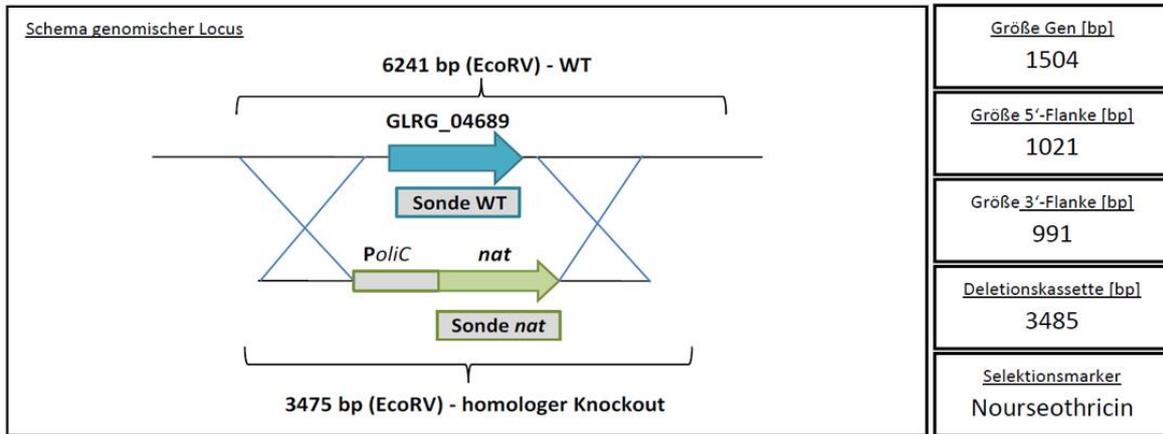
5'-Flanke:	CgCl6-P-F1/CgCl6-P-R1	PCR-Test:	CgCl6B-Test-F1/ CgCl6B-Test-R1
3'-Flanke:	Cg04687-T-F1/ Cg04687-T-R1	WT-Sonde:	CgCl6B-Test-F1/ CgCl6B-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1/ uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02/Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_04688	<u>Beschreibung</u> S1/P1 Nuclease	<u>Projekt</u> Cluster-knockout
		<u>Clusternummer</u> 6



<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	Cg04688-P-F1/ Cg04688-P-R1	PCR-Test:	04688-Test-F1/ 04688-Test-R1
3'-Flanke:	Cg04688-T-F1/ Cg04688-T-R1	WT-Sonde:	04688-Test-F1/ 04688-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1/ uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02/Nours_R02

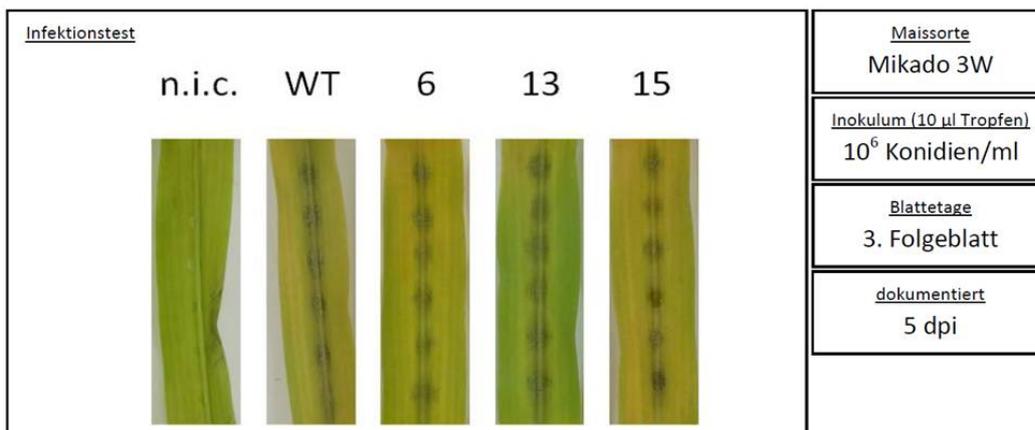
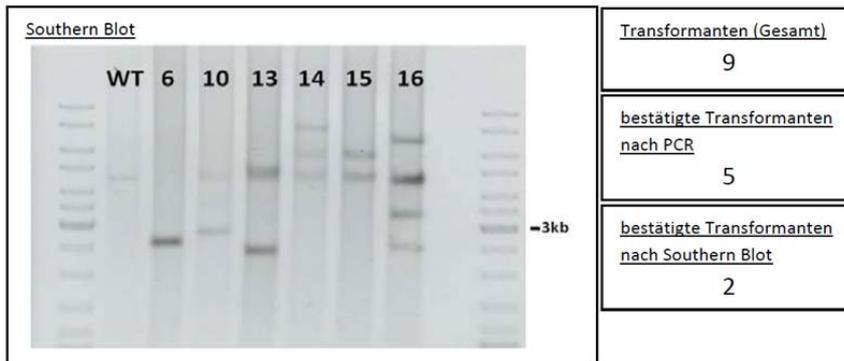
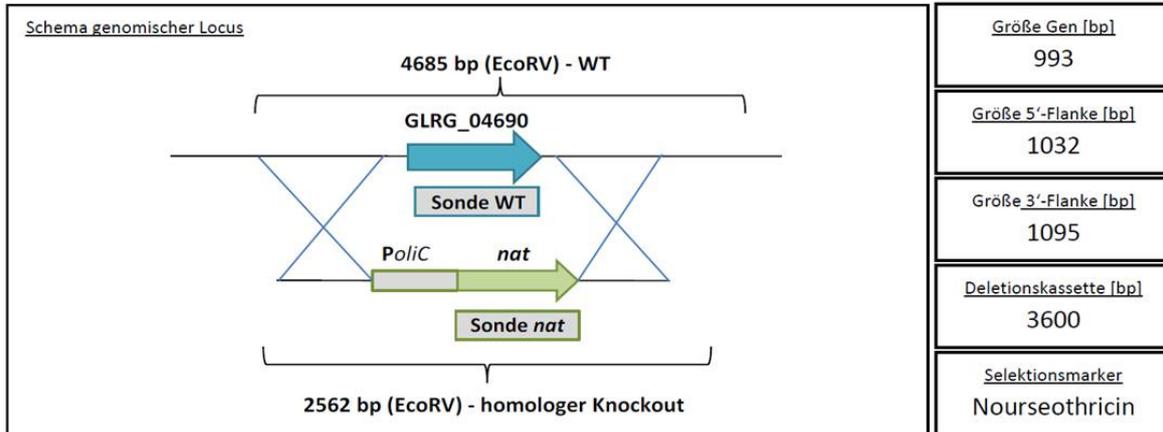
<u>Annotationsnummer</u> GLRG_04689	<u>Beschreibung</u> Hypothetisches Protein	<u>Projekt</u> Cluster-knockout
		<u>Clusternummer</u> 6



verwendete Primer

5'-Flanke:	Cg04689-P-F1/ Cg04689-P-R1	PCR-Test:	04689-Test-F1/ 04689-Test-R1
3'-Flanke:	Cg04689-T-F1/ Cg04689-T-R1	WT-Sonde:	04689-Test-F1/ 04689-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1/ uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02/Nours_R02

<u>Annotationsnummer</u> GLRG_04690	<u>Beschreibung</u> Hypothetisches Protein	<u>Projekt</u> Cluster-knockout
		<u>Clusternummer</u> 6



<u>verwendete Primer</u>			
5'-Flanke:	Cg04690-P-F1/ Cg04690-P-R1	PCR-Test:	04690-Test-F1/ 04690-Test-R1
3'-Flanke:	Cg04690-T-F1/ Cg04690-T-R1	WT-Sonde:	04690-Test-F1/ 04690-Test-R1
Nours:	uni-nours.F1/ uni-nours.R1	nat-Sonde:	Nours_F02/Nours_R02

G.2. Sequenzvergleiche der Proteinsequenzen von GLRG_04686p mit anderen pilzlichen Homologen

Ähnlichkeiten, im Bezug auf die Konservierung der Position der Aminosäuren, zwischen den homologen Proteinen mit über 70% sind grün unterlegt. *Colletotrichum graminicola* (Cg), *Colletotrichum higginsianum* (Ch), *Colletotrichum orbiculare* (Co), *Magnaporthe oryzae* (Mo), *Fusarium oxysporum* (Fo), *Gibberella zeae* (Gz), *Neurospora crassa* (Nc), *Thielavia terrestris* (Tt)

```

Cg -----
Ch -----
Co -----
Mo -----
Fo -----
Gz -----
Nc -----
Tt 1 mrparsaralqgssqpawrterseispgfgaggrpldykellyefqnhvknqrdrtpalvsvsnrivdtvqralkkheeedespadiwivfievpagggg

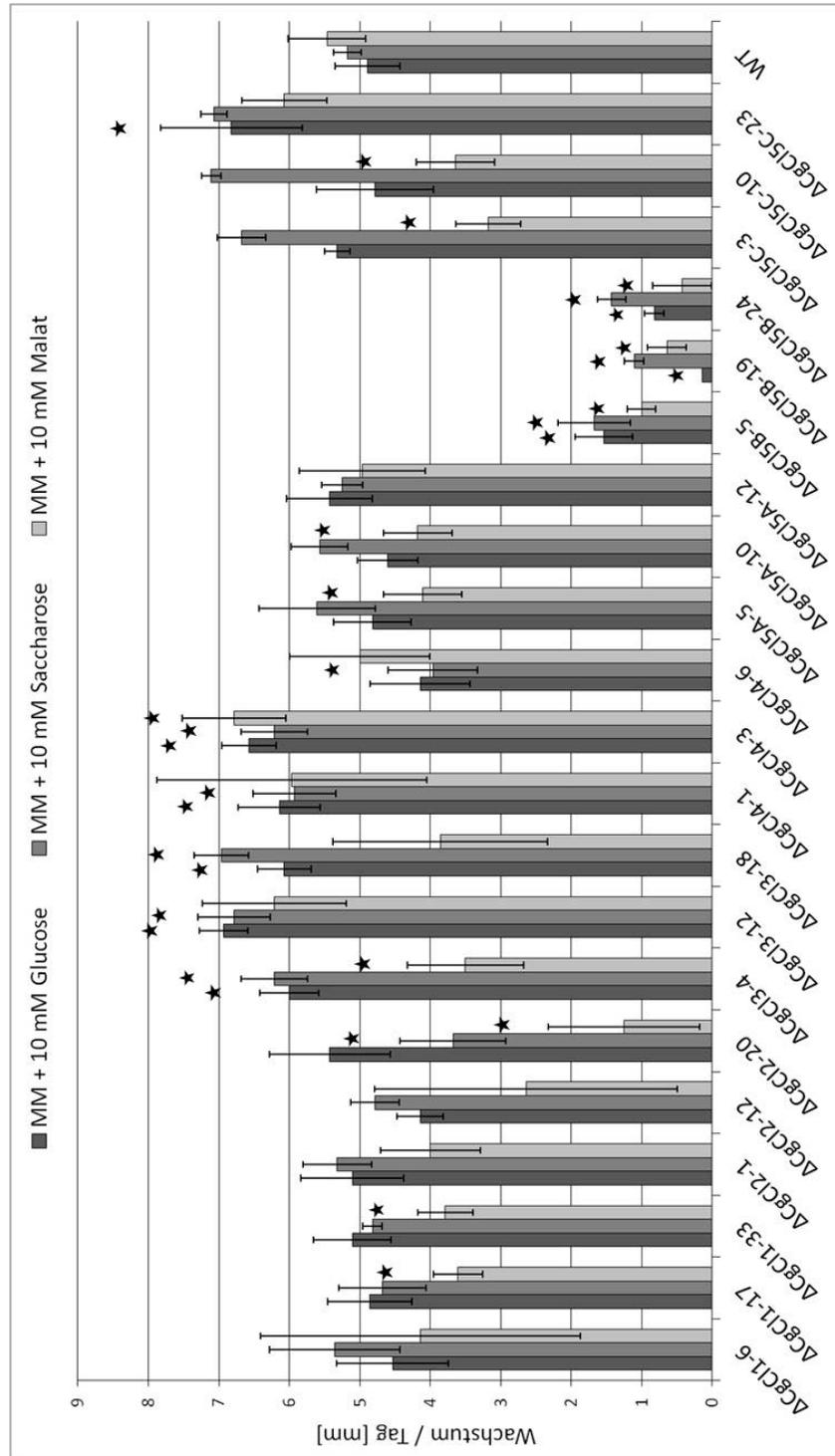
Cg -----
Ch -----
Co -----
Mo -----
Fo -----
Gz -----
Nc -----
Tt 101 aparfhaarhlaeqighrnpalfhhetvfewaipheyvhrvslqtllsrgldrelgtqasfpttrelrcslaagferrdpwelgldgffakcfgarap

Cg -----
Ch -----
Co -----
Mo -----
Fo -----
Gz -----
Nc -----
Tt 201 lkwiairlycdcvaarfdehtltdfleyahglretvdatffravddgldtavfdwiltdeflddyeffkswqthmlegdtvsqrddieaveqeavldrry

Cg 1 -----mk-vstl-laticaslasagvvtphqdqvpaacqvagdcffgvvtpggca-----
Ch 1 -----mk-vsal-ltticaslasagvvtprpndiipdqvsgdcffgvvtpggca-----
Co 1 -----mk-ftlal-ltticaslasagvvtprpnyigan---sgdcffgvvtpggca-----
Mo 1 -----mk----afv-lalcaslasagvvtptkemy---drspdcffgvvtpggcg-----
Fo 1 -----mk-ttvfvtilsaaslvsaqivvtpvffndiv---eklsgdcpfgvvtpggcapqrg-----
Gz 1 -----mk-ttifvtlisaaslvsaqivvtpvffndiv---eklsgdcpfgvvtpggcaqrviseastvktilyphilmkvf-----
Nc 1 -----mkpvtlaaalalicaslvsaqivvtpikpeqvvp---knagdcffgvtplqcg-----
Tt 301 lsrkaahsllrrhsqvkqkvpaaalaaalslsvslasagvvtipkdvvp---ksggdcffgvtppggcg-----

Cg 53 -----slrt-----
Ch 54 -----sepdgekmapq-----
Co 50 -----slrks-----
Mo 48 -----slgppak-----
Fo -----
Gz 75 lpktlcvsnliahteysqevvsggieftsshqhsearshiaahevtslrriv-----
Nc 52 -----rkmgdplgadvedvdrdqdrwmnglv-----
Tt 374 -----slrsn-----
    
```


G.4. Axenisches Wachstum der Deletionsmutanten von Cluster 1 – 5



G.5. Liste aller verwendeten Primer

Primername	Genlocus	Primersequenz 5' – 3'
02846-P-F1	02846	GGTCGGTAGTGCTTCGTTACAG
02846-P-R1	02846	GTGCAACTGACAGTCGTACAATCCGGCTGGCGGTTTCATTC
02846-Test-F1	02846	GCGCCTCTCCTTCTTAACCC
02846-Test-R1	02846	TGACTCGGCTACCTGGTTGC
02846-T-F1	02846	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTGAATTGAGAACGCGCTGACCG
02846-T-R1	02846	AGATGGCGCGTGCTGTCAAG
05766-P-F1	05766	CTACGCCTAGTTCAGGAAGCC
05766-P-R1	05766	GTGCAACTGACAGTCGTACACACGAGGCATGAAAGACAGAAG
05766-Sonde- For	05766	GGTTTCCCTTGGCCTCTTGG
05766-Sonde- Rev	05766	CAGTACGGCGACTCGATAACG
05766-Test-F1	05766	GCTGCCAGTAAACCGCTGAG
05766-Test-R1	05766	TGCCAGCGCCAAGAAATGC
05766-T-F1	05766	TGTCTGGAGTCTCACTAGCTTCGATTGCCCGACTAGATGTGG
05766-T-R1	05766	TCATTGGCCACGGTGGTCAG
06842-P-F1	06842	CAAGGTTCCGGTCCCTCTC
06842-P-R1	06842	GTGCAACTGACAGTCGTACAGATGACCACCAAGGGCTCTG
06842-Test-F1	06842	CAGAGCCCTTGGTGGTCATC
06842-Test-R1	06842	ACCGGCACCTCGATGAAGAC
06842-T-F1	06842	TGTCTGGAGTCTCACTAGCTTGTGAGCGATGACGTCTAGAG
06842-T-R1	06842	CTCCCGAGACGACCTTCTTC
08263-P-F1	08263	GGTTGGCCCAACACCTTACAC
08263-P-R1	08263	GTGCAACTGACAGTCGTACATAAAGGACTGGCATCCCGAAC
08263-Test-F1	08263	ACATCTTCTACCCGTTCTGG
08263-Test-R1	08263	CTCTGGTCAGGGCTGACAAC
08263-T-F1	08263	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTTCCGCGAAAGAAGGATTGACG
08263-T-R1	08263	ACCCTTTAAGCCCTACGTCTG
08566-P-F1	08566	GGATGGCATTTCGCGCAAC
08566-P-R1	08566	GTGCAACTGACAGTCGTACAGGTAAGAGGTGCTTGGCTCTG
08566-Test-F1	08566	GCCGAAGGTTGTGCAAGCTC

08566-Test-R1	08566	TCGCCGCGAGTTTAGCAAG
08566-T-F1	08566	TGTCTGGAGTCTCACTAGCTTCTCGCTCGTCAGCCTATTGTC
08566-T-R1	08566	GTTCCGGTAACTCGCGTCCAG
09350-P-F1	09350	TCCGCCACGTGATGATCACC
09350-P-R1	09350	GTGCAACTGACAGTCGTACATCTCGAATGCCTGGCCTCTC
09350-Test-F1	09350	ACATTGTCTCGGGCGCCAAC
09350-Test-R1	09350	GCGCGACCTTCTGTTTGTCC
09350-T-F1	09350	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTGCTCCTTCTCCTCGCTCTTG
09350-T-R1	09350	GGCGGACAAGCCAAAGTACG
11030-P-F1	11030	AGGCCGAGGGAGGCTATAAC
11030-P-R1	11030	GTGCAACTGACAGTCGTACAGAGCCATTACGAAGGGTCAAC
11030-Test-F1	11030	CGCGGCAGAAATTGGGAAGG
11030-Test-R1	11030	GACATGACGCCGTTGGTCAC
11030-T-F1	11030	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTGCATGGCGGATAATGTGGTTG
11030-T-R1	11030	CTATTAACGGCGCGATGGAGC
AatWalk	deg.Primer	GGAGACTGACATGGACTGAAGGAGTAAAGGGIIGGGIIGGGIIGGGACGTC
Cg 1049Phyg.R1	05667	CTCGCTCTACCTACTTCGGAGAAGGCTTGGATAACTGTGATAGTGTAGTA TGC
Cg 1049P-nest.F1	05667	CTTCATACCAAGCAGTGTCG
Cg 1049Thyg.F1	05667	GGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGGCGAGTGGCGTTTTG
Cg 1049T-nest.R1	05667	CTACATATGGACTAATCCTTCAACAC
Cg 1061Phyg.R1	00416	CTCGCTCTACCTACTTCGGAGAAGGTTTGACAGATTTTATAGCGAAACG
Cg 1061P-nest.F1	00416	GCTTCAGCCAAGGAAAGTG
Cg 1061Thyg.F1	00416	GGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGGATTCCGATATAATTGGTGCC
Cg 1061T-nest.R1	00416	GACAGTGTAATAAGCCCTTTGC
Cg 1091P-nest.F1	06590	GGTAGTTCAGAAAGATACGGATG
Cg 1091T-nest.R1	06590	TGTCATGTAATTGCTGTCAATG
Cg1049-	05667	GACAGGACGAACGGCATAAC

SondeR1		
Cg1049-TestF1	05667	AGCCCGCTGTCACTCTTTCC
Cg1049-TestR1	05667	TCATCGTGGCGGATTGGTGG
Cg1061 TestF1	00417	CCTTCACTCCTCGCAACATAAC
Cg1061 TestR1	00418	CATCCGGGACCGATGTTACC
Cg1091 3'- Flanke For	06590	GAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCAAATGGCCGACCGGAAGA CG
Cg1091 5'- Flanke Rev	06590	TTCTATAGGAAGATCCAGGCACCGGTCATATTTGAGGGCGGTGAGAGTG G
Cg1091-TestF1	06590	CTCGCCTCGTCGGAAACATC
Cg1091-TestR1	06590	GATTGAACAGCGCCGTTCC
CgCl1-P-F2	Cluster 1	CTCCTCGCATTATAGGTAGC
CgCl1-P-R1	Cluster 1	GTGCAACTGACAGTCGTACAGATGGCGGTTGACAGCGAAG
CgCl1-Sonde- For	Cluster 1	CGGCCTGTCTTCTTGTGCTC
CgCl1-Sonde- Rev	Cluster 1	GAGAGGATGGCAGGGTCAAAC
CgCl1-T-F1	Cluster 1	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTTCCTCGATGCCGAAGCCAAG
CgCl1-T-R2	Cluster 1	AACCTGGGACCTCTCCCAAAC
CgCl1-WT-F1	Cluster 1	GCGGTTCTCGCACAGGAATG
CgCl1-WT-R1	Cluster 1	GGCCTTGGACATGACCAACG
CgCl2-P-F2	Cluster 2	GCTGCCGACCCTTCTTATGG
CgCl2-P-R1	Cluster 2	GTGCAACTGACAGTCGTACAAATGCGACGCCAGGTCGTTCC
CgCl2-Sonde- For	Cluster 2	TTCTTGCGGCCTCGTTGCTG
CgCl2-Sonde- Rev	Cluster 2	TCACGGCCTGGTTGTAGAGC
CgCl2-T-F1	Cluster 2	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTGAACGAGGGAGACCGGATTAG
CgCl2-T-R2	Cluster 2	CCCAACCCGGCAATTCATCC
CgCl3-P-F2	Cluster 3	CTTGTGACTCTGCCGCCTTTC
CgCl3-P-R1	Cluster 3	GTGCAACTGACAGTCGTACAGGGTCCTAGTTCAGCCCTAC
CgCl3-Sonde- For	Cluster 3	ACAACCTGCTCGCCAACCTC
CgCl3-Sonde- Rev	Cluster 3	CCGCGCCTCAGATGATTTCCG

Rev		
CgCl3-TestF2	Cluster 3	CTCGCGCCAAATCACACTCG
CgCl3-TestR2	Cluster 3	GTGCTTGGTCCGTGACATTGG
CgCl3-T-F1	Cluster 3	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTCGGCTCCGCCGATATCATTG
CgCl3-T-R2	Cluster 3	GGAGCCCTTACTAAACCCTTGG
CgCl4-P-For2	Cluster 4	GGTGACAACCTCGTCGAGATCAG
CgCl4-P-Rev	Cluster 4	GTGCAACTGACAGTCGTACATCTGGCTGTGCACGTGTGAG
CgCl4-Sonde- For	Cluster 4	GGAACGCCTGCAACCTCAAG
CgCl4-Sonde- Rev	Cluster 4	GAAGGCGGCCGAGTTAGTTC
CgCl4-TestF2	Cluster 4	CAATCCGCAACCTCCTTCCG
CgCl4-TestR2	Cluster 4	TATCCAGGGCCAGTCTGTCCG
CgCl4-T-For	Cluster 4	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTTGGCCCACCCTGCTTTGATG
CgCl4-T-Rev3	Cluster 4	GGTCCAATCGCAGCCTGTTTC
CgCl5A-Sonde- F1	Cluster 5A	ACGCCATGCTCTGCGAAAGTC
CgCl5A-Sonde-R	Cluster 5A	GCGCGTTTTCGTTGCGAAAGG
CgCl5A-T-F1	Cluster 5A	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTGAAAGCACAGTGTGGCTAACTC
CgCl5A-T-R2	Cluster 5A	TGAGACGGGAGACGAGCAAC
CgCl5B-P-F2	Cluster 5B	CTTGCCCCAACACTCAAGAGG
CgCl5B-P-R1	Cluster 5B	GTGCAACTGACAGTCGTACAGGCCAGTGGAAGATTTGTCTC
CgCl5B-Test-F1	Cluster 5B	TCCTCCTGATGCCGAAGCTG
CgCl5B-Test-R1	Cluster 5B	GCAGCACCAGAGGTGCGAAAG
CgCl5B-T-F1	Cluster 5B	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTGGGTTGTAACGAGGTAGGC
CgCl5B-T-R2	Cluster 5B	GTTTCCTGTCCCCTCAACCC
CgCl5C-P-F2	Cluster 5C	GAGACACTAGCCCACCATGC
CgCl5C-P-R1	Cluster 5C	GTGCAACTGACAGTCGTACACGGCCACAGCCTTGAACCTG
CgCl5C-Sonde-F	Cluster 5C	GGTTCACATTGCCTGGGTTTC
CgCl5C-Sonde-R	Cluster 5C	ATCGCTTTGGCGGGTAGTG
CgCl5-P-F2	Cluster 5A	AAGGGACGAGCCTCTCATGG
CgCl5-P-R1	Cluster 5A	GTGCAACTGACAGTCGTACAGCGAGCGGGTAAACACAAGC
CgCl5-TestF1	Cluster 5A	GCCCCGTAGCATTCTGATCG
CgCl5-TestF2	Cluster 5C	CTGCGGCATCACCAAGTCTC

CgCl5-TestR1	Cluster 5A	GTAGTGCCTAGGGTCGATGC
CgCl5-TestR2	Cluster 5C	TTGGTCTTGCCGCCGTCTAC
CgCl5-T-F1	Cluster 5C	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTAGCCCTGCTCGGACTAATTTTC
CgCl5-T-R2	Cluster 5C	GACTGTCGGGTACCAGATG
Cg-ITS2-F1.1	ITS2- Region	CGTCGTAGGCCCTTAAAGGTAG
Cg-ITS2-R1	ITS2- Region	TTACGGCAAGAGTCCCTC
Cg-SQ_20	pPK2	AATCGCCTTGACGACATCC
Cg-SQ_5	pPK2	GGCGAATGAGCTTGAGCTTG
Cg-SQ_7	Hyg	ACAGCGGTCATTGACTGGAG
Cg-SQ_rev20	pPK2	GGTTTGCCTATTGGCTAGAG
Cg-SQ_rev7	pPK2	CGACGTATTTAGTGTCAAAG
DJ-JJ1146- 3'Flanke-Nested	03376	TCTCGGCACTTTTGGCTGCTG
DJ-JJ1146- 5'Flanke-Nested	03376	GCCATGTGATGCCGGCTTTC
DJ-JJ1146-For- nat	03376	TGATTACTAACAGATATCAAGCTTGAGCATCACAGGCAGCACCG
DJ-JJ1146-Rev- nat	03376	CGGGAATGCGGCTCTAGAGCGGGGTGAGAGTGGAAGAACAACGAG
HygORF-Rev	Hyg	GGTCGGCATCTACTCTATTCC
HygPromotor10 00-neu	Hyg	TGACCGGTGCCTGGATCTTC
JJ1146-F3	03376	TCGTAGGGCAGAGTTTAGCG
JJ1146-R5	03376	GGTGGGTGTGGCTGCTTTAC
KpnWalk	deg.Primer	GGAGACTGACATGGACTGAAGGAGTAAAGGGIIGGGIIGGGIIGGGGTACC
Lac 3' rev	08644	GCCGACAAAGTGA AAAAGATGGC
Lac fw	08643	TCAGCCGGACCCAGAGAGGCAC
Lac KO Sonde2	08640	CCGTCTTATTGTCCGTTGGG
Lac KO1	08638	GTCAAGGTTGCAACCGAGGG
Lac rev2	08641	GGTGAGCTCGAAGGTCTTCGGCC
Lac1 KO test rev	08642	TCCACCGGTAGACGAAGCTCGC
Lac1KO test fw	08639	GGATTGGTTGGGTATGCTTCGG

M13neu-For	CloneJet- Plasmid	GTAAAACGACGGCCAGTGC
M13neu-Rev	CloneJet- Plasmid	CACAGGAAACAGCTATGACC
Nours_F02	Nours	CTCTTGACGACACGGCTTAC
Nours_R02	Nours	GGCAGGGCATGCTCATGTAG
Nours-T-Neu	Nours	AAGCTAGTGAGACTCCAGACGCGGCACTGGCAATAACAAGC
pNRr	Nours	CGAAGAATCCACTTACCTCCG
PoliC-For	Nours	CCGCTCTAGAGCCGCATTC
PvuWalk	deg.Primer	GGAGACTGACATGGACTGAAGGAGTAAAGGGIIGGGIIGGGIIGGGATCG
Tail-Nested-neu	Tail-Primer	GGAGACTGACATGGACTGAAGGAGT
Ttub-Rev	Nours	AAGCTTGATATCTGTTAGTAATCATCATTAAAG
uni-nours.F1	Nours	TGTACGACTGTCAGTTGCACATTCGGGCCGGATTG
uni-nours.R1	Nours	AAGCTAGTGAGACTCCAGACACCGATGAAACGATTCTCAAC

G.6. Liste aller verwendeten Maissorten

Sorten	Firma
PR39B56	Pioneer
PR39V17 GVO	
PR39K13	
PR39F58	
PR39F56 GV	
Clemente	Monsanto
DKC2971	
DKC2864	
DKC4371	
DKC2942	
DK315	RAGT
Sphinxx	
Akumic	
Avixxene	
Friederixx	
Shexspir	
Saludo	
Ajaxx	
Maxxis	
Tiberio	
Coxximo	
Xxira	
Taxxi	
Könixx	
NK Bull	Syngenta
NK Magitop	
NK Nekta	
NK Winn	
NK Ravello	
ES Paroli	Euralis
Farmtop	Freiherr von Moreau
Farmoso	
Mikado	KWS Saat AG
Nathan	
OldHam	
Golden Jubilee	West Coast Seed

G.7. Erklärung an Eides statt

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale) 28.11.2013

Unterschrift

G.8. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. H. B. Deising für die Möglichkeit, dieses Thema bearbeiten zu können.

Mein Dank gilt ferner Herrn Professor Dr. E. Peiter und Herrn Professor Dr. R.T. Vögele für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Dr. Stefan G. R. Wirsal für die intensive Betreuung während der gesamten Arbeitszeit und seinem unerschütterlichen Korrekturwillen meiner Niederschriften und an Herrn Dr. Jorrit-Jan Krijger, ohne dessen Hilfe ich heute nicht mein umfangreiches Wissen und Können hätte.

Ebenfalls ein riesiges Dankeschön an alle, die bei der Umsetzung des doch umfangreichen Projektes geholfen haben. Danke an Andrea Beutel, ohne die ich die riesige Anzahl an erzeugten Transformanten nie hätte bearbeiten können. An Elke Vollmer für die professionelle Anzucht und Pflege der abertausenden Pflanzen und für die Unterstützung bei all den anderen Problemen. An Steffen, Rayko, Christian, Ralf und die anderen Mitarbeiter der AG Phytopathologie für den stets regen Gedankenaustausch, die fachlichen Diskussionen und das überaus angenehme und freundliche Arbeitsklima.

Danke an meine Freundin und meine Eltern für Ihre uneingeschränkte Unterstützung.

G.9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor und Familienname: Fabian Weihmann
Geburtsdatum und Ort: 13.10.1981 in Leipzig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

08/1993 – 08/2000 Georg-Christoph-Lichtenberg-Gymnasium
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/2001 – 09/2008 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Abschluss: Diplom-Biologe
Diplomarbeit: „Deletionsanalysen von fünf Genen sekretierter Proteine des Maispathogens *Colletotrichum graminicola*“

01/2009 – 12/2012 **Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Angestellt als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe „molekulare Phytopathologie und Pflanzenschutz“ und tätig im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 648.

G.10. Liste eigener Publikationen

Horbach, R., Graf, A., Weihmann, F., Antelo, L., Mathea, S., Liermann, J.C., Opatz, T., Thines, E., Aguirre, J., and Deising, H.B. (2009). Sfp-Type 4 '-Phosphopantetheinyl Transferase Is Indispensable for Fungal Pathogenicity. *Plant Cell* 21, 3379-3396.

Becher, R., Weihmann, F., Deising, H.B., and Wirsal, S.G. (2011). Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. *BMC Genomics* 12, 52.

Behr, M., Motyka, V., Weihmann, F., Malbeck, J., Deising, H.B., and Wirsal, S.G. (2012). Remodeling of cytokinin metabolism at infection sites of *Colletotrichum graminicola* on maize leaves. *Mol Plant Microbe Interact* 25, 1073-1082.