

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Entwicklung molekularbiologischer
Methoden zum Nachweis
verschiedener Sclerotiniaceae**

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Steffen Hirschhäuser
geb. am 06.11.1972 in Limburg/Lahn

Mainz, 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1	
1.1	Phytopathogene Pilze	1
1.2	Identifikation von filamentösen Pilzen und Hefen	3
1.3	Die Systematik der Sclerotiniaceae	5
1.4	Extrazelluläre Polysaccharide	9
1.5	Biopolymerabbau im Termitendarm	12
1.6	Phenoloxidasen vom Laccase-Typ	14
1.7	Ziele der vorliegenden Arbeit	15
2. Material und Methoden	17	
2.1.	Chemikalien	17
2.2.	Biochemikalien, Enzyme und Kits	19
2.2.1.	Primersequenzen und Restriktionsendonukleasen	20
2.3.	Geräte und Hilfsmittel	21
2.4.	Organismen	22
2.5.	Medien	23
2.6.	Puffer und Lösungen	24
2.7.	Kultivierung	29
2.7.1.	Kultivierung und Sporenernte	29
2.8.	β -Glucan von <i>Botrytis cinerea</i>	29
2.8.1.	Synthese und Aufarbeitung des β -Glucans	29
2.8.2.	Enzymatische Bestimmung der Restglucose	30
2.8.3.	Fütterungsexperimente von verschiedenen Termiten	31
2.8.4.	Mikroorganismen aus Termitendärmen	32
2.8.5.	Lyse des β -Glucans	32
2.9.	DNA- und RNA-Extraktion	33
2.9.1.	Zellaufschluss	33
2.9.2.	DNA-Extraktion	34
2.9.3.	RNA-Extraktion	34

2.10.	Identifizierung ribosomaler Gensequenzen	34
2.10.1.	Identifizierung der Internal Transcribed Spacer Region	35
2.10.2.	Identifizierung der 18S rDNA-Sequenzen	36
2.11.	Nested Specific Amplification of Polymorphic DNA (nSAPD)	36
2.11.1.	Erste Amplifikationsrunde (nSAPD)	37
2.11.2.	Zweite Amplifikationsrunde (nSAPD)	38
2.12.	Identifikationsmethode für unbekannte Gensequenzen	38
2.12.1.	Amplifizierung und Identifikation neuer Laccase-Gene	39
2.12.2.	Amplifizierung der 3'- bzw. 5'-Randsequenzen	41
2.12.3.	Restriktionsanalyse	41
2.13.	Multiplex-PCR	42
2.14.	Analyse der PCR-Produkte	43
2.14.1.	Sequenzvergleiche	44
2.15.	Proteinchemische Untersuchungen	44
2.15.1.	Identifikation der Laccasen	44
2.15.2.	Proteinsequenzanalyse	44
2.15.3.	Untersuchungen zur Aktivität der Laccasen	45
2.15.4.	Isoelektrische Fokussierung der aktiven Laccase aus <i>M. fructigena</i> DSM2677	46
2.15.5.	Aktivitätsnachweis mittels SDS-Gelelektrophorese	47
2.15.6.	Glykoproteinfärbung	47
2.15.7.	Detektion der Laccase-codierenden mRNA	48
3. Ergebnisse		50
3.1.	Glucanbildung durch <i>Botrytis cinerea</i> ATCC90769	50
3.2.	Fütterung von Termiten und Isolierung glucanolytischer Mikroorganismen	51
3.2.1.	Identifizierung der einzelnen Isolate	52
3.2.2.	Glucanolytische Aktivitäten	53
3.3.	DNA-Sequenzanalysen der Sclerotiniaceae	54
3.3.1.	Internal Transcribed Spacer Regions	54
3.3.2.	18S rDNA-Sequenzen	56

3.4.	Nested Specific Amplification of Polymorphic DNA (nSAPD)	57
3.5.	Laccase-Sequenzen innerhalb der Sclerotiniaceae	58
3.6.	<i>lcc2</i> in verschiedenen Stämmen von <i>Botrytis cinerea</i>	60
3.6.1.	Restriktionsanalyse der Laccase-Gene	60
3.6.2.	Multiplex-PCR für verschiedene phytopathogene Pilze	61
3.7.	Analyse der vorhergesagten Proteinsequenzen	62
3.7.1.	Voraussagen über mögliche Glykosylierungspositionen	63
3.7.2.	Signalsequenzen für den intrazellulären Proteintransfer	63
3.7.3.	Hydrophobizitätsvorhersagen für die Lokalisation der Proteine	65
3.8.	Qualitativer Nachweis der einzelnen Laccasen	67
3.8.1.	Nachweis des Kaffeesäureabbaus mittels HPLC	68
3.8.2.	Laccase-Expression durch <i>Monilinia fructigena</i> DSM2677	69
3.8.3.	Isoelektrische Fokussierung der extrazellulären Proteine	70
3.8.4.	SDS-PAGE und Glykoproteinfärbung des Kulturüberstands	71
3.9.	Detektion der <i>Lcc2</i> -codierenden mRNA	72
4. Diskussion		73
4.1.	<i>Botrytis cinerea</i> ATCC90769 und die β -Glucansynthese	73
4.2.	Lyse des β -Glucans	73
4.3.	Immunologie des β -Glucans	75
4.4.	Das Glucan als Virulenzfaktor	76
4.5.	Laccasen innerhalb der Sclerotiniaceae	77
4.6.	Proteinsequenzen und deren postulierte Eigenschaften	78
4.7.	Laccase-Expression	79
4.8.	Identifikation von filamentösen Pilzen	80
4.9.	Ein Vorschlag zur Identifizierung verschiedener Sclerotiniaceae	83
4.9.1.	Problematik dieser Identifikationsmethode	84
4.10.	Mögliche Anwendungen	86

5. Ausblick	87
6. Zusammenfassung	88
7. Literaturverzeichnis	91
8. Anhang	107

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
Acc.	Zugriffsnummer in der NCBI-Datenbank
APS	Ammoniumpersulfat
ARDRA	Amplified rDNA Restriction Analysis
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenisontriphosphat
bp	Basenpaare
d	days (Tage)
deion.	deionisiert
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fa.	Firma
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
GC [%]	Guanin + Cytosin-Gehalt [%]
h	hour (Stunde)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
ITS	Internal Transcribed Spacer
kD	Kilodalton
M	Molar
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	Milliliter
NADP	Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCBI	National Center of Biotechnology Information
nSAPD	Nested Specific Amplification of Polymorphic DNA
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid (ribosomale Desoxyribonukleinsäure)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
S	Svedberg
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Sodium-Citrat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tm	melting temperature (Schmelztemperatur)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween80	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monooleat
V	Volt
U	Unit (Einheit)

Abkürzungen für die verwendeten Organismen

Sclerotiniaceae

<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>M. fructigena</i>	<i>Monilinia fructigena</i>
<i>M. fructicola</i>	<i>Monilinia fructicola</i>
<i>M. laxa</i>	<i>Monilinia laxa</i>
<i>S. minor</i>	<i>Sclerotinia minor</i>
<i>S. sclerotiorum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

Termiten

<i>C. havilandii</i>	<i>Coptotermes havilandii</i>
<i>I. marginipennis</i>	<i>Incisitermes marginipennis</i>
<i>I. tabogae</i>	<i>Incisitermes tabogae</i>
<i>M. darwiniensis</i>	<i>Mastotermes darwiniensis</i>
<i>Z. angusticollis</i>	<i>Zootermopsis angusticollis</i>

Filamentöse Pilze aus Termiten

<i>A. corymbifera</i>	<i>Absidia corymbifera</i>
<i>P. variotii</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>

1. Einleitung

1.1 Phytopathogene Pilze

Pflanzen sind ein Ziel verschiedener pathogener Mikroorganismen. Neben Insekten, Viren und Eubakterien stellen Pilze eine enorme Gefahr für Pflanzen und im Weiteren für pflanzliche Produkte dar. Landläufige Aussagen wie ‚Schimmel‘, ‚schimmelig‘ oder ‚verschimmelt‘ implizieren immer einen Verderb von Nahrungsmitteln durch verschiedenste Pilze.

Bislang ist eine Fülle von Pilzen bekannt, die unter bestimmten Bedingungen Pflanzen attackieren und gegebenenfalls zerstören können. So kennt man im Weinbau beispielsweise den Echten und Falschen Mehltau, die Schwarzfäule und Schwarzholzkrankheit von Reben oder den Grauschimmel auf Trauben. Kurioserweise kann der Erreger des Grauschimmels (franz. *pourriture grise*) unter bestimmten Bedingungen den berühmten Edelschimmel (franz. *pourriture noble*) hervorrufen, der dem späteren Wein eine edelsüße Note verleiht (Coley-Smith et al. 1980). Dazu muss die Frucht im intakten Zustand durch den filamentösen Ascomyceten *Botrytis cinerea* (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) infiziert und die Kutikula in der Folgezeit durch extrazelluläre Enzyme (Juge 2006) des Pilzes perforiert werden. Der anschließende Wasserverlust der Frucht erhöht den Zuckergehalt und somit den Öchslegrad des Mostes, was wiederum von entscheidender Bedeutung für die nachfolgende Fermentation durch Wildhefen ist. Der Grauschimmel entsteht dagegen bei Trauben, die durch Vogelfraß, Wespenstiche oder physikalische bzw. klimatische Bedingungen wie starke Feuchtigkeitsschwankungen bereits beschädigt sind. Neben *B. cinerea* entwickelt sich an den verletzten Stellen eine Mischpopulation verschiedener prokaryotischer sowie eukaryotischer Mikroorganismen, die letztendlich die Traube zerstören und von hier aus auch Nachbarfruchtstände befallen können.

Botrytis cinerea gehört zur Familie der Sclerotiniaceae, die eine der wichtigsten Familien weltweit verbreiteter Phytopathogene darstellen. Aufgrund ihres unspezifischen Wirtsspektrums verursachen sie große Schäden bei verschiedenen Pflanzen. So werden unter anderem Karotten, Sojabohnen, Sellerie, Zwie-

beln, Kartoffeln, Spinat, Raps, Gurken, Äpfel, Birnen, Trauben, Tomaten, Erdbeeren, Tabak, Rosmarin, Paprika und Pfeffer, aber auch Gräser und Bäume von diesen filamentösen Pilzen infiziert und geschädigt (Bolton et al. 2006, Melzer et al. 1997, Putnam 2004, Abb. 1). Die Folge sind durchweg Ernteverluste mit den damit verbundenen ökonomischen Einbußen. Dabei ist es nicht möglich, eine klare Wirtsspezifität für jede Gattung oder Spezies zu definieren. So infizieren Arten der Gattung *Ciboria* Edelkastanien während *B. cinerea* ebenfalls diese Pflanze befallen kann. Ein ähnliches Bild zeigt sich beispielsweise auch bei der Tabakpflanze. Hier steht *B. cinerea* mit *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in direkter Konkurrenz.

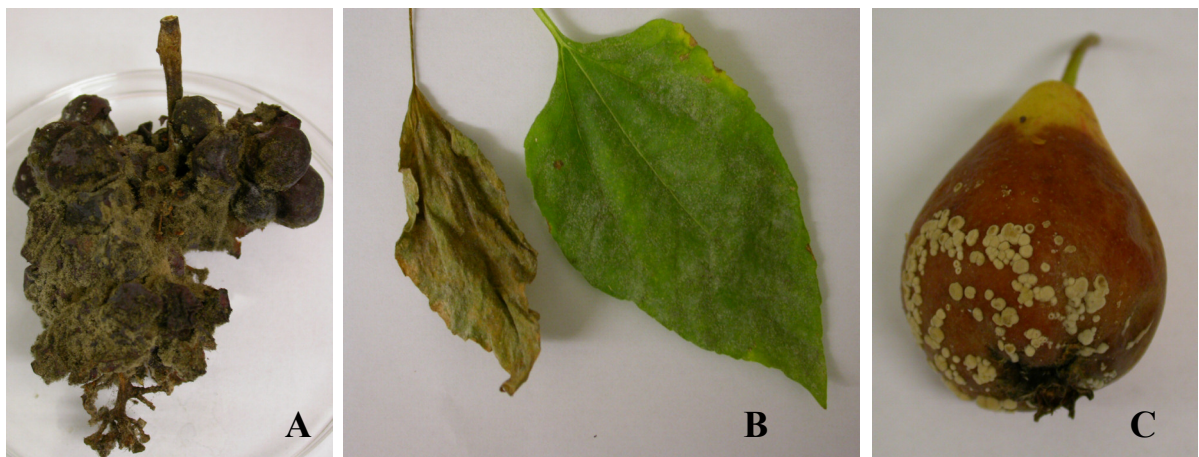


Abb. 1: Phytopathogene Sclerotiniaceae auf Traube, Sonnenblumenblättern und Birne. A. *Botrytis cinerea*, B. *S. sclerotiorum*, C. *M. fructigena*.

S. sclerotiorum (Abb. 1B) und *S. minor* sind in Deutschland Schädlinge von Sonnenblumen, Kartoffel- und Rapspflanzen. Im nördlichen und östlichen Niedersachsen kam es 2003 zu einem Befall von Kartoffelpflanzen von über 50% der Anbaufläche und einem Ernteverlust von bis zu 30% (Quentin 2004). Dabei spielen die Sklerotien eine entscheidende Rolle (Abb. 2). Diese typischen Dauerformen der Sclerotiniaceae gelangen über infizierte Pflanzen in den Boden, überwintern dort und können in den darauf folgenden Jahren einen erneuten Befall auslösen (Moyano und Melgarejo 2002). Dabei kommt den Ascomyceten bei einem Pflanzenwechsel auf einem Feld die Wirtsspezifität entgegen. So können im Folgejahr auch andere als die im Vorjahr dort angebauten Pflanzen befallen werden.



Abb. 2: Sklerotien (braun) von *S. sclerotiorum* auf einem infizierten Blatt einer Sonnenblume.

Kern- und Steinobstarten werden ebenfalls von bestimmten Spezies der Sclerotiniaceae befallen. Hier handelt es sich in Europa vornehmlich um *M. fructigena* (Abb. 1C) und seltener *M. laxa*. Indes findet man in den USA und Kanada vornehmlich eine weit aggressivere Spezies mit der Bezeichnung *M. fructicola*. Auch in diesem Teil der Erde kann in selteneren Fällen *M. laxa* gefunden werden. Während *M. fructigena* hauptsächlich eine Fruchtfäule verursacht, ist *M. laxa* für die so genannte Spitzendürre verantwortlich. Zu Beginn der Infektion zeigen betroffene Früchte meist lediglich eine lokal begrenzte Bräunung, die sich aber rasch ausbreitet. Die Früchte trocknen in der Folgezeit ein und verbleiben meist in Form von Fruchtmumien an der Pflanze. Problematisch erweist sich hier allerdings die genaue Identifikation des Erregers. Auch *M. laxa* kann diese Art der Fruchtfäule auslösen und in diesem Falle von *M. fructigena* nicht unterschieden werden. Allerdings ist *M. laxa* weitestgehend für die schnell fortschreitende Spitzendürre verantwortlich, die den Blütenstand befällt und abtötet (Bartels 1955).

1.2 Identifikation von filamentösen Pilzen und Hefen

Im Allgemeinen erfolgt die Identifikation von filamentösen Pilzen auf morphologischer Ebene (Paul 2000, Dugan et al. 2002, Harada et al. 2004, Cantrell et al. 2006). Dabei kommt das Vorhandensein und die Form von Frucht-

körpern innerhalb des sexuellen Stadiums eines Pilzes, die Pigmentierung, Art und Aussehen der Konidien, die Anzahl der Ascosporen innerhalb der Asci, die Ausprägung von Septen innerhalb der Hyphen oder auch der Wirt des einzelnen Organismus zur Anwendung.

Im Weiteren sind auch molekulargenetische Methoden zur Identifizierung etabliert worden. Das ribosomale Gencluster bei filamentösen Pilzen und Hefen umfasst die 18S rDNA und die 28S rDNA, die ihrerseits die 5.8S rDNA mit den flankierenden Sequenzen der Internal Transcribed Spacer Regions 1 und 2 (ITS1 und 2, Abb. 3) einrahmen. Während bei Bakterien die 16S rDNA zur Identifikation herangezogen wird, bestimmt man bei Hefen und Pilzen die Sequenzen der 5.8S rDNA mit den beiden ITS Regionen (White et al. 1990, Arlorio et al. 1999, Hughes et al. 2000, Phalip et al. 2006, Scupham et al. 2006).

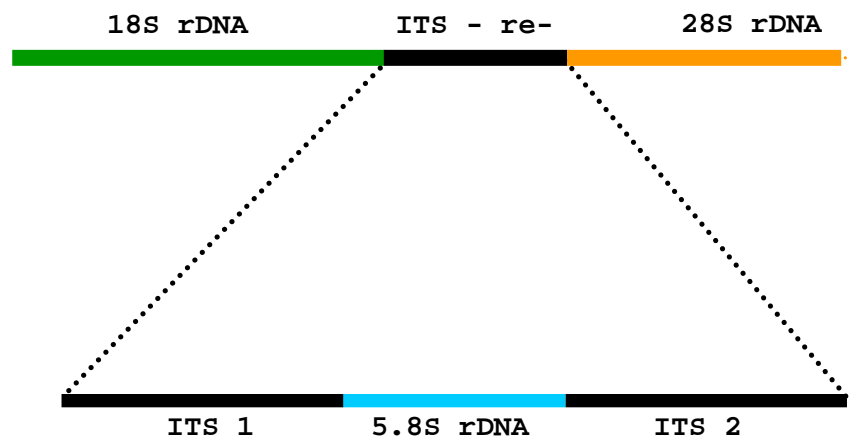


Abb. 3: Ribosomales Gencluster bei Eukaryoten.

Auch Identifikationen mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), die arten- bzw. gattungsspezifische Sequenzen innerhalb der beiden großen ribosomalen Untereinheiten als Zielsequenz für die Hybridisierung nutzen, sind bei Hefen bereits erfolgreich angewandt worden (Inacio et al. 2003, Röder et al. 2007). Diese Methode hat bei bakteriellen Identifikationen bereits breite Anwendungen gefunden (Fuchs et al. 2000, Hirschhäuser et al. 2005) und ist innerhalb der Pilzidentifikation auf dem Vormarsch. Mit dieser schnellen und kostengünstigen Technik ist es möglich bestimmte bakterielle Arten innerhalb einer Mischpopulation oder Umweltprobe ohne aufwendige Vorbereitungen zu detektieren (da Silva et al. 2006). Im Bereich der Identifikation von Bakterien in Nahrungsmitteln und Starterkulturen (Blasco et al. 2003, Collado et al. 2006) sowie bei der Diagnose im

klinisch-medizinischen Bereich ist die FISH von großer Bedeutung (Hogart et al. 2000, Poppert et al. 2005).

Weitere molekulargenetische Methoden, wie die Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) oder Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA) bieten weitere Möglichkeiten zur Identifikation. Die Anwendung der beiden letzteren Techniken kann aber lediglich mit Reinkulturen durchgeführt werden. Bei der RAPD-PCR ist zudem eine aufwendige und sensible DNA-Extraktion erforderlich, da geringste DNA-Schäden oder Unsauberkeiten das Ergebnis der Analyse verfälschen können.

1.3 Die Systematik der Sclerotiniaceae

Taxonomisch gehören die Sclerotiniaceae mit 19 Gattungen zu den Helotiales innerhalb der Ascomycota (Schlauchpilze). Die bekanntesten und am weitesten verbreiteten Spezies werden den bereits beschriebenen Gattungen *Sclerotinia*, *Monilinia* und *Botryotinia* (anamorph *Botrytis*) zugeordnet. Diese stellen auch gleichzeitig die wichtigsten Phytopathogene innerhalb der Sclerotiniaceae weltweit dar. Die Mehrheit der bis heute bekannten Arten der Sclerotiniaceae wurde im 18., 19. bzw. in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts beschrieben. Wichtige morphologische Eigenschaften der einzelnen Gattungen innerhalb der Sclerotiniaceae sind bräunliche, gestielte Apothecien, die einem sklerotisierten Stroma entspringen, inoperkulate Asci und klar durchscheinende, einzellige Ascosporen (Holst-Jensen et al. 1998). Die einzelnen Arten einer Familie werden aufgrund der Mikroanatomie der Apothecien, der Anzahl von Ascosporen in einem Ascus, dem Auftreten eines Konidienstadiums, der Zahl, Größe und Anatomie der Sklerotien und dem jeweilig infizierten Wirt identifiziert. Dabei wurden bis heute alleine in der Gattung *Monilinia* 46 Spezies, in der Gattung *Sclerotinia* 236 und bei *Botrytis* 379 verschiedene Spezies beschrieben (Quelle: www.indexfungorum.org). Einige dieser Arten, wie z.B. *Botrytis arborescens* Berk. oder *Botrytis farinosa* Fr. wurden jedoch weitergehend klassifiziert und der Familie der Peronosporaceae neu zugeordnet.

Die morphologische Identifikation der Gattungen und Spezies gestaltet sich trotz der Unterschiede als schwierig. So ist beispielsweise von *S. sclerotiorum* bis

zum heutigen Tag kein Konidienstadium bekannt und die Fruchtkörperbildung unterbleibt im Labor vollständig. Für *Monilinia* spec. gilt ein ähnlicher Sachverhalt, mit dem Unterschied, dass zwar Konidien gebildet werden, die Fruchtkörperbildung in der Laborkultur nicht und in freier Natur seltener als bei *Sclerotinia* spec. auftritt. Auch ist die Anzahl, Form und Größe der Sklerotien kein sicheres Indiz für eine bestimmte Spezies und darüber hinaus auch zwischen verschiedenen Gattungen nicht eindeutig verifizierbar. Zudem kommt dem Alter der Kultur und dem verwendeten Medium eine enorme Wichtigkeit zu. In Abb. 4 sind Kulturen verschiedener Sclerotiniaceae gezeigt. Im Vergleich ist nur bei *M. fructigena* eine klare Unterscheidung möglich. *B. cinerea* und die *Sclerotinia*-Arten sind demgegenüber nicht eindeutig zu differenzieren und sehr leicht zu verwechseln.

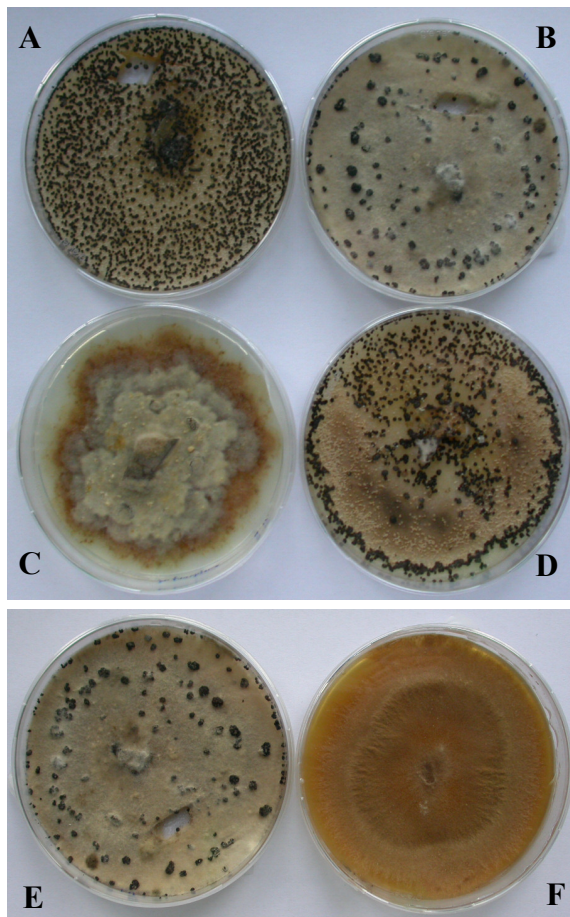


Abb. 4: Kulturen von verschiedenen Sclerotiniaceae auf PDA-Agar. Oben: A. *Sclerotinia minor*, B. *Botrytis cinerea*, C. *Monilinia fructigena*, D. *Sclerotinia sclerotiorum*. Unten: *B. cinerea* ATCC90769 auf PDA-Agar (E) und auf Lcc-Agar (F).

Molekularbiologisch erweist sich die Identifikation dieser artenreichen Familie ebenfalls als sehr problematisch. Die ITS-Regionen und die 18S rDNA-Sequenzen (Abb. 3) der unterschiedlichen Gattungen weisen wenige bis keine Variabilitäten auf. Aufgrund dessen ist die Anwendung dieser weit verbreiteten

Identifikationsmethode in diesem Fall limitiert. Von besonderem Interesse ist eine schnelle, kostengünstige und gleichzeitig sichere Nachweismethode aufgrund der Tatsache, dass Unterschiede im weltweiten Verbreitungsgebiet der *Monilinia*- und der *Sclerotinia*-Arten existieren. Während beispielsweise *M. fructicola* und *M. laxa* die dominierenden Arten der Gattung *Monilinia* in den USA und Kanada sind, befällt in Europa vorwiegend *M. fructigena* Kern- und Steinobstsorten. Des Weiteren hat die Europäische Union (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften 2000) *M. fructicola* als einen Quarantäneorganismus eingestuft, der nicht eingeschleppt werden darf und in Deutschland auch bislang nicht nachgewiesen werden konnte (Albert et al. 2004). Bei verschiedenen *Sclerotinia*-Arten gibt es ähnliche Verbreitungsunterschiede. Während *S. sclerotiorum* weltweit verbreitet ist, wurde *S. minor* noch nie in den skandinavischen Regionen beobachtet. Diese Beobachtungen sollten allerdings mit Vorsicht beurteilt werden, da bislang noch keine zweifelsfreie Identifikationsmöglichkeit vorhanden ist um diese sehr ähnlichen *Sclerotinia*-Arten voneinander abzugrenzen.

Dem Problem der speziesspezifischen Identifikation wurde in den letzten Jahren eine größere Aufmerksamkeit gewidmet und einige neuartige Techniken entwickelt. So beschränkten sich Iosifidis und Frey (2000) auf den Nachweis von *Monilinia*-Spezies ohne dabei die anderen Gattungen in den Vergleich mit einzubeziehen. Die von ihnen entwickelte Methode basiert auf der Amplifizierung des ITS-Bereiches mittels PCR und differenziert die Arten mit Hilfe einzelner spezifischer Basen. Dabei muss beachtet werden, dass aufgrund der ITS-Homogenität und bei mangelnder Stringenz die verwendeten Primer andere Gattungen als *Monilinia* nachweisen können. Fulton und Brown (1997) wiesen bei *Monilinia fructicola* eine 418 bp lange Intron-Sequenz innerhalb der 18S rDNA nach, die bis heute in *Monilinia laxa* und *Monilinia fructigena* nicht nachgewiesen werden konnte. Anschließende Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese Sequenz nicht bei allen Isolaten von *M. fructicola* vorhanden war (Cote et al. 2004a). Cote et al. (2004b) wiesen mit Hilfe der Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR; Welsh und McClelland 1990, Williams et al. 1990) spezifische Sequenzen innerhalb der Gattung *Monilinia* nach. Mit Hilfe dieser Sequenzen entwickelten sie eine Spezies-spezifische Detektionsmethode basierend auf einer Multiplex-PCR, die *M. fructicola*, *M. fructigena*, *M. laxa* und *Monilia polystroma* differenzieren kann. Nachteilig wirkt sich hier insbesondere der fehlende Nachweis für die nah ver-

wandten Gattungen aus. Weder *B. cinerea* noch *S. sclerotiorum* zeigen bei dieser Methode einen Nachweis und können zwar ausgeschlossen, nicht aber detektiert werden. Rigotti et al. (2002) erarbeiteten eine Amplifikationsmethode zum direkten Nachweis von *B. cinerea* auf Erdbeeren (*Fragaria x ananassa* Duch.) und Suarez et al. (2005) etablierten eine auf der real-time PCR basierende Methode zur Identifikation von mehreren Spezies der Gattung *Botrytis*. Diese beiden Methoden basieren lediglich auf dem Nachweis von *Botrytis* spec., zeigen aber weiterhin keinen eindeutigen Nachweis für die anderen Gattungen. In der letztgenannten Arbeit konnten nicht alle Arten nachgewiesen werden und es fehlte zudem ein Vergleich zur Gattung *Monilinia*.

Des Weiteren können Sequenzen wie die des Hitzeschockproteins 60 (HSP60), der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase oder DNA abhängigen RNA-Polymerase zur zweifelsfreien Identifizierung verwendet werden (Staats et al. 2004). Diese Marker wurden jedoch bislang nicht an Umweltproben getestet.

Abschließend ist festzuhalten, dass alle bisher etablierten Identifikationsmethoden der Sclerotiniaceae entweder den Nachweis von Sequenzen gemein haben, die in einer Gattung vorhanden und in anderen nicht vorhanden sind, oder Sequenzen nachweisen, die nicht in allen bislang kultivierten Spezies vorhanden sind. Ausgenommen sind hier die ITS- und 18S rDNA-Sequenzen, die durch die mangelnde Variabilität für eine Identifikation nicht in Betracht gezogen werden können (Staats et al. 2004).

Die aufgezeigte Problematik bei der molekularbiologischen Differenzierung der Sclerotiniaceae führt besonders im Weinbau zu erheblichen Problemen. Da *Botrytis cinerea* als Erreger der Edelfäule eine besondere Stellung im Prozess der qualitativen Aufwertung von Weinen einnimmt, kommt der Fragestellung nach einer zweifelsfreien Abgrenzung dieses positiv zu beurteilenden Organismus gegenüber anderen Sclerotiniaceae im Lesegut eine wichtige Bedeutung zu. Zudem sind *Monilinia*-, *Sclerotinia*- aber auch *Botrytis*-Arten dazu befähigt eine extrazelluläres Polysaccharid zu produzieren, dass den Filtrationsprozess des Weines massiv erschweren kann. Aus diesem Grund müssen Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, dass möglichst nur mit *B. cinerea* infizierte Weintrauben in den Most bzw. den Jungwein gelangen.

1.4 Extrazelluläre Polysaccharide

Die Fähigkeit extrazelluläre Polysaccharide zu bilden, ist ein schon lange bekanntes und weit verbreitetes Phänomen innerhalb der Pro- und Eukaryoten. So können Kapseln von *Streptococcus pneumoniae*, die die Zelloberfläche bedecken, nicht vom Immunsystem attackiert werden und dienen somit als Schutz vor feindlichen Einflüssen. Als ein Beispiel lassen sich hier die klassischen Experimente von Griffith (1928) und Avery et al. (1944) in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts anführen, die virulente Stämme anhand von Transformationsexperimenten erzeugten und damit Mäuse infizieren konnten. Bakterien, denen diese Schleimkapsel fehlte waren dagegen nicht virulent.

Auch die Bildung von extrazellulären Schleimen ist ein weit verbreitetes Charakteristikum vieler Mikroorganismen. Ein kommerziell genutztes Exopolymer ist beispielsweise das Xanthan des phytopathogenen Bakteriums *Xanthomonas campestris*. Dieses Makromolekül ist neben Gellan und Curdlan eines von drei bakteriell erzeugten Polymeren, das von der United States Food and Drug Administration als Nahrungsergänzungsmittel für den US-amerikanischen Markt zugelassen ist (Warrand 2006). Curdlan ist ein lineares Homopolymer aus β -1,3-D-Glukoseeinheiten (McIntosh et al. 2005), das in Korea, Taiwan und Japan als Nahrungsmittel bereits eine breite Anwendung gefunden hat und bei Einnahme eine Reihe von positiven Wirkungen auf den menschlichen Organismus wie beispielsweise die Senkung des Cholesterinspiegels in der Leber zeigt (Shimizu et al. 1999).

Aureobasidium pullulans, eine ubiquitär vorkommende Hefeart, synthetisiert ein α -1,4-1,6-D-Glucan aus Maltotriose und Maltotetraose, das in der Lebensmittelindustrie als Oxidationsschutz in Form von filmartigen Überzügen von Nahrungsmitteln und Gewürzen Verwendung findet (Sutherland 1998). Des Weiteren dient das, als Pullulan bezeichnete Polymer, als Teil von kalorienreduzierten Lebensmitteln (Deshpande et al. 1992).

Ein Curdlan-ähnliches extrazelluläres Polymer wird von den oben angesprochenen Sclerotiniaceae *M. fructigena*, *S. sclerotiorum* und *B. cinerea* gebildet (Abb. 5). Das Rückgrat dieses Glucans besteht aus β -D-Glukoseeinheiten, die β -

1,3-glykosidisch verknüpft sind (Santamaria et al. 1978, Ohno et al. 1986, Montant und Thomas 1977, 1978, Pielken et al. 1990).

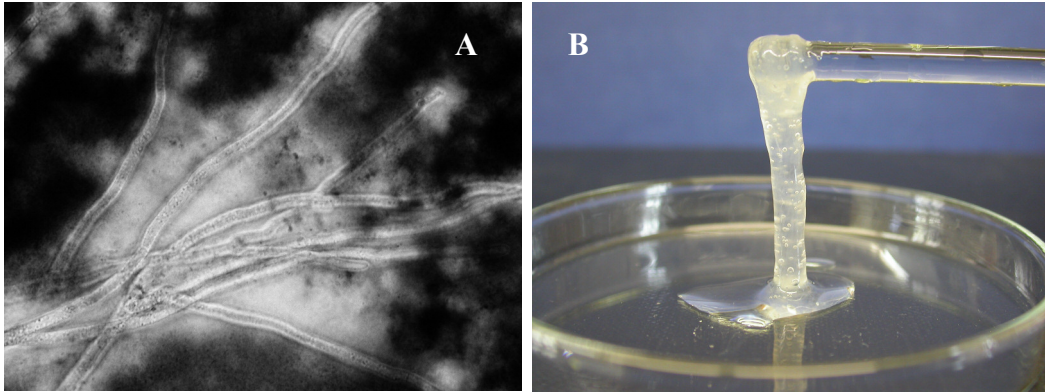


Abb. 5: A. Hyphen von *B. cinerea* mit adhärenem β -Glucan (Tuschefärbung, 400-fache Vergrößerung). B. Ausgefälltes β -Glucan aus dem Kulturüberstand von *B. cinerea*.

Bei *B. cinerea* ist jede zweite bis dritte Glukoseeinheit des β -Glucans β -1,6-glykosidisch mit weiteren Glukosemolekülen verknüpft (Dubourdieu und Ribereau-Gayon 1981, Abb. 6) und bildet dadurch eine netzartige Oberflächenmatrix auf den Pilzhyphen.

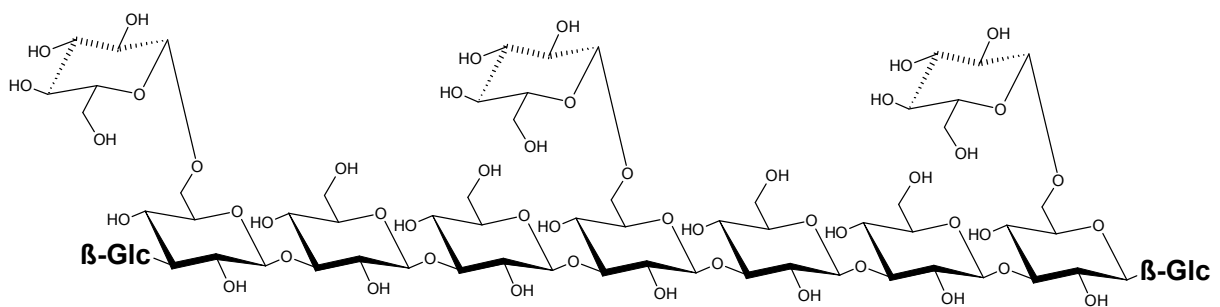


Abb. 6: Zweidimensionale Struktur des β -1,3-1,6-D-Glucan.

Ferner sind die einzelnen Stränge in einer dreifach-helikalen Struktur angeordnet (Gawronski et al. 1997). Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei dem β -Glucan um einen extrazelluläre Energiespeicher handelt (Stahmann et al. 1992) und der, darüber hinaus, auch als Schutzfilm gegenüber antifungalen Agen-

zien dient (Gil-ad et al. 2001). Diese Eigenschaft begünstigt wiederum dessen Pathogenität gegenüber verschiedenen Wirtspflanzen.

Für gewöhnlich sind diese β -1,3-1,6-D-Glucane in Zellwänden von Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* zu finden und eng mit Mannoproteinen und Chitin assoziiert (Leung et al. 2006). Von pharmazeutischem und industriellem Interesse sind sie aufgrund der Eigenschaft das angeborene Immunsystem beim Menschen über toll-like Rezeptoren (TLR) zu aktivieren (Czop und Austen 1985, Brown und Gordon 2001, 2003, Brown 2006). Diese positiv zu beurteilenden Sachverhalte stehen im Weinbau meist negativen Eigenschaften des Glucans gegenüber. Hier verursacht dieses Polymer erhebliche Probleme während der Weinbereitung. Wenn *B. cinerea* oder andere Vertreter der Sclerotiniaceae über infizierte Trauben in den Most gelangt und im fermentierenden Jungwein das β -Glucan bildet, kommt es während der Filtration zu Belegungen der Filtermembranen, die kostenintensiv regeneriert bzw. erneuert werden müssen (Wucherpfennig et al. 1984, Vernhet et al. 1999). Hier wurden in letzten Jahren Fortschritte in der enzymatischen Lyse durch β -Glucanasen erzielt. Diese β -Glucanasen wurden beispielsweise aus den Mycoparasiten *Trichoderma harzianum* (Noronha und Ulhoa 2000, de la Cruz et al. 1995a, de la Cruz et al. 1995b), *Trichoderma viridae* (Kulminskaya et al. 2001) oder *Trichoderma asperellum* (Bara et al. 2003) isoliert, charakterisiert und vermarktet. Dennoch wird weiterhin nach, bis dato, unbekanntem Mikroorganismen gesucht, die ebenfalls in der Lage sind, diese schwer zu hydrolysierenden Polymere abzubauen. In diesem Zusammenhang kann das Ökosystem Termitendarm mit den symbiontischen Mikroorganismen eine möglicherweise entscheidende Rolle spielen. Diese urtümlichen Insekten sind zum einen Spezialisten auf dem Gebiet des Polysaccharidabbaus und zum anderen beherbergen sie eine artenreiche Darmflora, die verschiedenste Homo- und Heteroglucane abzubauen vermag.

1.5 Biopolymerabbau im Termitendarm

Die derzeit ca. 2800 bekannten Termitenarten unterscheiden sich zwar erheblich in ihren Nahrungsmittelansprüchen, sie sind jedoch alle an einen umfangreichen Biopolymerabbau angepasst. Das komplexe organische Material, vornehmlich Holz, wird von diesen ursprünglichen Insekten aufgenommen und im Zuge der Darmpassage für die Termiten aufgeschlossen. Dabei kommt der so genannten Gärkammer eine besondere Bedeutung zu. Hier ist das komplexe Ökosystem verschiedener Mikroorganismen lokalisiert, die für die Lyse des organischen Materials verantwortlich sind. Dabei setzt sich diese Population aus verschiedenen eukaryotischen und prokaryotischen Organismen zusammen (König et al. 2002), die in unterschiedlicher Weise am Holzabbau beteiligt sind.

Holz besteht aus den drei Komponenten Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Cellulose ist ein lineares Polymer aus β -1,4 glykosidisch verbundenen Glucoseeinheiten. Die Hydrolyse verläuft über mehrere enzymatisch katalysierte Schritte. Dabei kommt es zur Spaltung der Cellulose in Cellodextrin und Cellobiose durch die Cellobiohydrolase und Endo- β -1,4-glucanase. Im weiteren Verlauf werden diese Oligomere bzw. Dimere (Cellobiose) durch die β -1,4-Glucosidase in die einzelnen Monomere überführt. Diese können dann von der Termitenart als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass neben den Symbionten auch Termiten über aktive Cellulasen verfügen, die in den cellulolytischen Prozess mit eingebunden sind (Li et al. 2003, Watanabe et al. 2006).

Hemicellulose ist ein Oberbegriff für mehrere, verschiedene Heteropolysaccharide, die sich aus Pentosen und Hexosen zusammensetzen. Dazu gehören beispielsweise Mannane, Galactane, Arabinane oder Xylane. Das Xylan ist am weitesten verbreitet und hier werden, ähnlich der Cellulose, mehrere Enzyme für den kompletten Abbau benötigt. Nachdem α -Glucuronidasen, α -Arabinosidasen, Acetylerasen, Geruloyl- und die p-Cumaroylerasen die unterschiedlichen Seitenketten des Polymers abgebaut haben, kann die Endo- β -1,4-Xylanase das Rückgrat des Polymers in Oligo- und Dimere und β -Xylosidase die Dimere in die Monomere (D-Xylose) hydrolysieren. Neben der Cellulose (Abbau bis zu 90%)

werden die Hemicellulosen zwischen 49% und 78% abgebaut und können somit nicht vollständig von Termiten genutzt werden (Varma et al. 1994).

Lignin gilt bis heute als eines der am schwersten abbaubaren Biopolymere. Auch in Termiten ist dieser Abbau bislang nicht beschrieben und gilt aufgrund der vorwiegend anoxischen Verhältnisse in der Gärkammer als unwahrscheinlich. Lignin trägt zur Verholzung der Pflanzen bei und ist im Wesentlichen aus den Phenylpropanen Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol aufgebaut. Dabei variiert das Vorkommen dieser einzelnen Monomere mit der Art des Holzes. So findet man im Hartholz der Angiospermen einen hohen Anteil Guaiacyllignin, im Weichholz der Gymnospermen hauptsächlich Guaiacyl-Syringyllignin und in Gräsern (Gramineae) vor allem Cumarylalkohol bzw. p-Hydroxyphenyllignin (Davin und Lewis 2005, Higuchi 2004, 2006).

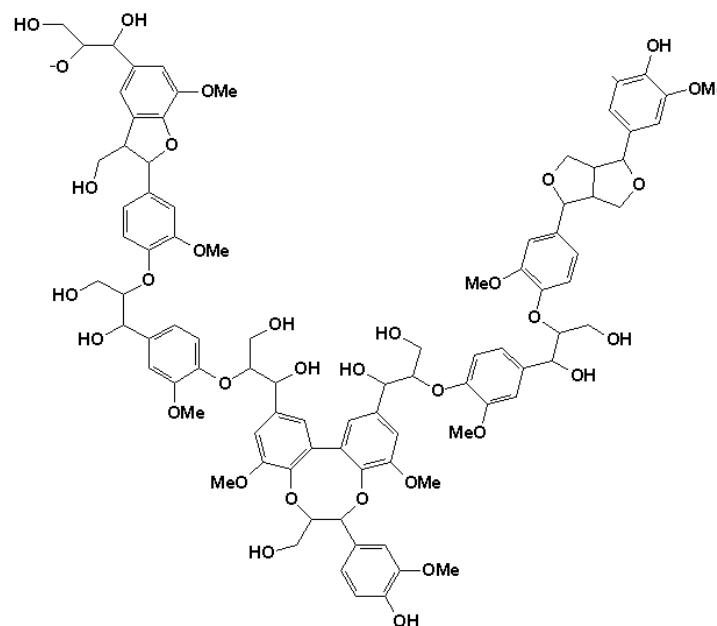


Abb. 7: Strukturmodell von Lignin (nach Higuchi 2004).

Die Synthese erfolgt ausgehend von Zimtsäure oder dessen Derivaten, wie Cumarin- oder Kaffeesäure, über mehrere enzymatisch katalysierte Reaktionen zu den jeweiligen Alkoholen (Chiang 2006).

Der Abbau dieses hochkomplexen, dreidimensionalen Polymers erfolgt radikalisch durch Lignin- oder Manganperoxidase und Laccasen. Diese Proteine

werden allerdings sterisch am Eindringen in das feine Netzwerk aus Lignin, Hemicellulose und Cellulose gehindert. Aus diesem Grund spielen in diesem Bereich sogenannte Mediatoren wie Veratrylalkohol und Mn^{3+} eine entscheidende Rolle. Die Enzyme oxidieren die Mediatoren, die dann wiederum in das Holz diffundieren und dort ungerichtet Elektronen aus dem Polymergerüst ziehen und es somit oxidieren können. Die Fähigkeit Lignin zu oxidieren und abzubauen ist im Bereich der Weissfäulepilze gut untersucht. Dazu gehören beispielsweise *Trametes versicolor* (Jönsson et al. 1997), *Phanerochaete chrysosporium* (Larrondo et al. 2003) oder *Nematoloma frowardii* (Hofrichter und Fritsche 1997). Der Begriff Weißfäule beschreibt das Aussehen von delignifiziertem Holz. Dieses erscheint durch die noch verbliebene Cellulose und Hemicellulose weiß. Braunfäulepilze bauen indes kein Lignin ab und dieses erscheint durch die Oxidation durch Luftsauerstoff braun.

1.6 Phenoxidasen vom Laccase-Typ

Laccasen gehören zur Gruppe der Polyphenoxidasen (p-Benzendiol: O_2 -Oxidoreduktase; EC1.10.3.2) und wurden erstmals von Yoshida 1883 aus dem Lackbaum *Rhus vernicifera* isoliert. Auf diese Pflanze geht auch der gebräuchliche Trivialname Laccase zurück. Einige Jahre später wurden diese Enzyme auch in den bereits genannten Weissfäulepilzen nachgewiesen (Bertrand 1896). Dabei fällt auf, dass die bisherigen fungalen Laccasen ausschließlich innerhalb der Ascomycota (Schlauchpilze) und Basidiomycota (Basidienpilze) gefunden wurden. Innerhalb der Zygomycota (Jochpilze) und Chytridiomycota (Töpfchenpilze) konnten bislang keine dieser Phenoxidasen dargestellt werden (Baldrian 2006). Laccasen sind in der Natur weit verbreitete Enzyme und bis zum heutigen Tag konnten dutzende Laccasen aus Eukaryoten und Prokaryoten isoliert und charakterisiert werden (Thurston 1994, Claus 2003, 2004). Das Enzym aus *Melanocarpus albomyces* wurde zudem kristallisiert und mittels Röntgenstrukturanalyse dreidimensional dargestellt (Hakulinen et al. 2002).

Laccasen gehören wie die Ascorbatoxidasen und das Plasmaprotein der Säugetiere Ceruloplasmin zu den Multi-Kupferoxidasen (Hoegger et al. 2006). Das katalytische Zentrum besteht aus vier Kupferatomen, die in drei Typen unterteilt

werden. Dabei findet die Oxidation des Substrates am Typ-1 Kupfer und die Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser an einem trinuklearen Cluster aus einem Typ-2 und zwei Typ-3 Kupferatomen statt. Des Weiteren verfügen diese Enzyme über ein sehr breites Substratspektrum, das sich teilweise mit Tyrosinasen deckt. Letztendlich gilt als gesichert, dass die Oxidation von Syringaldazin (Harkin und Obst 1973) und die Nicht-Oxidation von Tyrosin eine Laccase auszeichnet (Thurston 1994). Bei Betrachtung der Proteinsequenzen verschiedener Laccasen von Ascomyceten fällt auf, dass die Primärstrukturen nicht nennenswert konserviert sind (Scherer und Fischer 2001, Bulter et al. 2003). Einzig die Kupferbindepositionen lassen auf eine Konservierung der katalytischen Bereiche dieser Enzyme schließen (Schouten et al. 2002). Somit ist die Detektion neuer Laccasesequenzen innerhalb der Ascomyceten schwierig und in der Regel an zufällige Sequenzvoraussagen gebunden.

1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ein zentraler Aspekt in der vorliegenden Arbeit war die sichere Identifikation verschiedener Vertreter der Sclerotiniaceae. Hier wurden zunächst die heute üblichen molekularbiologischen Methoden zur Anwendung gebracht. Ferner konnte eine klare Abgrenzung dieser Organismen mit Hilfe der am Institut entwickelten nSAPD-PCR-Methodik unternommen werden. Auf der Basis dieser Ergebnisse erfolgte des Weiteren eine Darstellung neuer Laccase-Gene, die ebenfalls eine Spezies-spezifische Identifikation zuließ. Zum Abschluss wurden EDV-gestützte Vorhersagen über deren Eigenschaften und zelluläre Lokalisation getroffen.

Folgende Aspekte wurden diesbezüglich im Einzelnen verfolgt:

- Identifizierung verschiedener Sclerotiniaceae mit derzeit üblichen molekularbiologischen Methoden
- Anwendung der nSAPD PCR-Technik für die Differenzierung verschiedener Spezies innerhalb der Sclerotiniaceae (Fröhlich und Pfannebecker 2006, 2007)

- Identifizierung neuer Markergene zur zweifelfreien Identifizierung dieser Organismen
- Etablierung eines Multiplex-PCR-Nachweises für Vertreter aus der Familie der Sclerotiniaceae
- Charakterisierung und Darstellung der neuen Laccase-Gene
- Etwaige Voraussagen über die jeweiligen Genprodukte und deren mögliche primäre Proteinsequenz
- EDV-gestützte Charakterisierung dieser Proteine

Da das extrazelluläre β -Glucan von *B. cinerea* in der Kellerwirtschaft zu erheblichen Problemen führt, sollte in einem zusätzlichen Schwerpunkt dieser Arbeit eine mögliche Hydrolyse dieses Polymers erreicht werden. Hier wurde davon ausgegangen, dass Termiten an die Lyse natürlicher Polymere angepasst und möglicherweise ebenfalls in der Lage sind, mit Hilfe ihrer intestinalen Flora das β -Glucan hydrolysieren zu können.

Dazu wurde das Polysaccharid durch *B. cinerea* synthetisiert, in weiteren Schritten geerntet und an verschiedene Termiten verfüttert. Dies sollte zur Anreicherung potentiell glucanolytischer Mikroorganismen führen. Im Anschluss erfolgte die Isolierung, Kultivierung und Identifizierung der so angereicherten Mikroorganismen sowie der Nachweis auf deren postulierte hydrolytische Aktivität.

Diese Experimente gliederten sich in die folgenden Arbeitsschritten:

- Produktion des extrazellulären β -1,3-1,6-D-Glucans durch *B. cinerea* ATCC90769
- Fütterung von verschiedenen Termiten mit dem synthetisierten β -Glucan
- Isolierung potentiell glucanolytischer Mikroorganismen aus dem Intestinaltrakt der Termiten
- Identifizierung dieser isolierten Mikroorganismen
- Prüfung der glucanolytischen Aktivität

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

- ABTS (Sigma, Steinheim)
- Adenosintriphosphat (Roche, Mannheim)
- Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Agar (Difco, Detroit)
- Agarose: peqGold Standard-Agarose (Peqlab, Erlangen)
- Ammoniumpersulfat (Roth, Karlsruhe)
- Ampicillin (Sigma, Steinheim)
- Borsäure (Roth, Karlsruhe)
- Citrat-Dihydrat (Roth, Karlsruhe)
- Coomassie Brilliantblau (Merck, Darmstadt)
- Curdlan-Gum (Megazyme, Wicklow, Irland)
- Dialyseschläuche (Roth, Karlsruhe)
- Dinatriumhydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
- EDTA (Roth, Karlsruhe)
- Essigsäure (Roth, Karlsruhe)
- Ethanol (Roth, Karlsruhe)
- Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)
- Falcon-Gefäße (Beckton-Dickinson, NJ, USA)
- Glasperlen, Ø 0,3-0,5 mm (Roth, Karlsruhe)
- Glaswolle (Roth, Karlsruhe)
- Glucose (Roth, Karlsruhe)
- Glycin (Roth, Karlsruhe)
- Hefeextrakt (Marcor, NJ, USA)
- Isopropanol (Roth, Karlsruhe)
- Kaffeesäure (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Kaliumchlorid (Roth, Karlsruhe)
- Kaliumnitrat (Roth, Karlsruhe)
- Kongorot (Sigma, Steinheim)
- Kupfersulfat (Roth, Karlsruhe)
- Magnesiumsulfat (Roth, Karlsruhe)
- Malzextrakt (Merck, Darmstadt)
- Methanol (Roth, Karlsruhe)
- Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe)

- Natriumdihydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
- Natriumdodecylsulfat ((Roth, Karlsruhe)
- Natriumhydroxid (Roth, Karlsruhe)
- Natriumperchlorat (Merck, Darmstadt)
- Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (Roche, Mannheim)
- Membranfilter aus Nylon, 0,22 µm (GE Osmonics, Trevose, USA)
- β-Mercaptoethanol (Sigma, Steinheim)
- Pepton aus Sojabohnenmehl (Roth, Karlsruhe)
- Phosphorsäure (Roth, Karlsruhe)
- Saccharose (Roth, Karlsruhe)
- Salzsäure (Roth, Karlsruhe)
- Syringaldazin (Sigma, Steinheim)
- TEMED (Roth, Karlsruhe)
- Triethanolaminhydrochlorid (Roth, Karlsruhe)
- TRIS (Roth, Karlsruhe)
- Trypton (Roth, Karlsruhe)
- Vanillinsäure (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Wasser (deion.)
Milli RO Plus (Millipore, Eschborn)
Milli Q (Millipore, Eschborn)
- 2,5-Xylidin (Sigma, Steinheim)
- Zitronensäure (Roth, Karlsruhe)

2.2. Biochemikalien, Enzyme und Kits

- 10x PCR-Puffer (Peqlab, Erlangen)
- Ampholytlösung (Bio-Rad 163-1113, München)
- Chitinase von *Streptomyces griseus* (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Chitosanase (Testpräparat der Fa. Erbslöh, Geisenheim)
- DNA Walking SpeedUp™ Kit (Seegene, Rockville, MD, USA)
- DNA-Längenstandards (Fermentas, St. Leon-Rot)
- DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden)
- dNTP-Mix (je 2,5 nM dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Peqlab, Erlangen)
- E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, Erlangen)
- β -Glucanase aus *Trichoderma reesei* (Handelspräparat der Fa. Erbslöh, Geisenheim)
- Oligonukleotide/Primer (Operon, Köln)
- Pro-Fuchsia-Glycoprotein-Stain-Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
- Proteinase K (Merck, Darmstadt)
- Proteinstandard (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Ribonuklease A (Roche, Mannheim)
- Ribonuklease T1 (Sigma, Steinheim)
- RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe)
- *Taq*-Polymerase (5U/ μ l) (Peqlab, Erlangen)
- TOPO TA-Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

2.2.1. Primersequenzen und Restriktionsendonukleasen

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide und Restriktionsendonukleasen.

Oligonukleotide				
Primer	Sequenz	Länge (bp)	GC (%)	Tm (°C)
ITS1	TCC gTA ggT gAA CCT gCg g	19	63.2	64.80
ITS2	gCT gCg TTC TTC ATC gAT gC	20	55	62.45
ITS4	TCC TCC gCT TAT TgA TAT gC	20	45	58.35
ALLEU 5	AAA AAT gCg gCC gCT ACC Tgg TTg ATC CTg CC	32	56.3	67.30
ALLEU 3	AAA TAT gCg gCC gCT CTg CAg gTT CAC CTA C	31	54.8	66.30
ITS1R	CCg CAg gTT CAC CTA Cgg A	19	63.2	60.00
G-Not	AgC ggC CgC g	10	90	38.00
G-Not-A	AgC ggC CgC gA	11	82	40.00
G-Not-T	AgC ggC CgC gT	11	82	40.00
G-Not-G	AgC ggC CgC gg	11	91	42.00
G-Not-C	AgC ggC CgC gC	11	91	42.00
MF_lac1/2F	CTT CAA TAY* gS*T gAT ggA C	19	44.7	56.93
MF_lac1/2R	AAT CgT gR*C CgT ggA gAT g	19	55.2	61.24
Lcc2_Nde1F	CAT ATg ATg AAg TCC TTT ACA gTC TTT AC	29	34.5	61.80
Lcc2_Sal1R	gTC gAC CTA gAT ACC AgA ATC gTC	24	50	64.57
Uni_lcc2Nde1F	CAT ATg ATg AAg TM*Y TY*T ACA gTC TTT AC	29	32.8	61.09
Scl_lcc2Nde1	CAT ATg ATg AAg TgT TTT ACA TCA CTC AC	29	34.48	61.80
Uni_lcc2Sal1R	gTC gAC Y*TA gAT W*CC AgA ATC gTC	24	47.9	63.71
MF_TSP1F	TAC TTC ACC Tgg ACC ATC	18	50	57.62
MF_TSP2F	ATC CCA TCC ATC TCC ACg g	19	57.9	62.32
MF_TSP3F	gCT TTA ACC TCg TCA ATC CTC C	22	50	62.67
MF_TSP1R	ACC gAT ACC TAT gAg gAg	18	50	57.62
MF_TSP2R	AAT TTC TTA CCg CCA CCA ACg	21	47.6	60.61
MF_TSP3R	gAT TgA TgT gCC CAg TCT Tgg	21	52.4	62.57
SM_TSP1F	ATg TCg gTg ACT ATg CTC	18	50	57.62
SM_TSP2F	ATA ACC Tgg ACC ATC AAC AgC	21	47.6	60.61
SM_TSP3F	TTC CgC AAC gAA TCA ATC TTC C	22	45.4	60.81
SM_TSP1R	TAT ggg ACg ATA ggA ACA Ag	20	45	58.35
SM_TSP2R	TTT CTT ACC ACC ACC AAC gC	20	50	60.40
SM_TSP3R	ACC ACC AAC gCA CTg Agg	18	61.1	62.18
SS_TSP1F	ATg TTg gTA gCT ATg CTC	18	44.4	55.30
SS_TSP2F	TTg ACC Tgg ACC ATC AAC Ag	20	50	60.40
SS_TSP3F	TTC CgA AAC gAA TCC CTC TTC C	22	50	62.67
SS_TSP1R	TAT ggg ACg ATA ggA ACA Ag	20	42.9	58.35
SS_TSP2R	TTT TTT ACC ACC ACC AAC gC	20	45	58.35
SS_TSP3R	ACC ACC AAC gCA CTT Agg	18	55.6	59.90

Fortsetzung Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide und Restriktionsendonukleasen.

Primer	Sequenz	Länge (bp)	GC (%)	T _m (°C)
MP_BcF	CAT TGG CAT GGA ATT CGT CAA CTA GG	26	46.2	63.20
MP_MfF	GCA CGG GAT TCG TCA GCG AAG	21	61.9	63.70
MP_SsF	CTC CAC TAT AAC CCC TGA CGG G	22	59.1	64.00
MP_SmF	GGC CAC TTC ACA CCA AAA AGT GAC	24	50	62.70
MP_UniR	TCG AAT TTC TTA CCR* CCA CCA ACG C	25	50	63.80

Restriktionsendonukleasen	
	Sequenz
<i>EcoR</i> I	G [↓] AATTC
<i>Sal</i> I	G [↓] TCGAC
<i>Hind</i> III	A [↓] AGCTT

* R = A/G; S = G/C; W = A/T; Y = C/T; M = A/C

2.3. Geräte und Hilfsmittel

- Absaugvorrichtung (Schott, Mainz)
- Agarose-Elektrophorese-Einheit (Bio-Rad, München)
- Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)
- Geldokumentationseinheit (Polaroid, Offenbach) inkl. Bedienungssoftware (Intas, Göttingen)
- HPLC:
HPLC-System: Shimadzu LC6A
Trennsäule: RP C18 LI-Chromosphere 100
Controller: Shimadzu SCL-6B
Autoinjektor: Shimadzu SIL-10AD-Einheit
- IEF-Apparatur Rotofor (Bio-Rad, München)
- Lyovac GT2 (Leybold-Heraeus)
- Mikroskop: Laborlux 11 (Leitz, Wetzlar)
- Mastercycler *gradient* (Eppendorf, Hamburg)
- Mikrotiterplattenreader Multiscan Plus MKII (Dunn Labortechnik, Asbach)
- pH-Meter CG840 (Schott, Mainz)
- SDS-Elektrophorese-Einheit (Bio-Rad, München)
- Software:
ClustalX 1.8 Sequenzalignmenteditor (Thompson et al. 1997)
Microsoft Office
GeneDoc (Nicholas und Nicholas 1997)

- BIO-1D++ Geldokumentationssoftware (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex, Frankreich)
 Signal IP3.0 (www.expasy.org)
- Separationssäulen Vivaspin 20 (Vivascience, Hannover) und YM-50 (Millipore, Bedford, MA, USA)
 - Spectrophotometer UV-120-01 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
 - Thermocycler Techne (Labtech international, Burckhardtsdorf)
 - Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
 - Trocknungsofen (Heraeus, Hanau)
 - Ultra-Thurax T18 (IKA Labortechnik, Staufen)
 - UV-Leuchtmittel (Bachofer, Reutlingen)
 - Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim)
 - Vibrogen Zelmühle (Bühler, Bodelshausen)
 - Zentrifugen:
 - Centrifuge 5403 (Eppendorf, Hamburg)
 - Zentrifuge 2-16K (Sigma, Osterode)
 - Beckman Coulter J2-MC (Beckman Coulter, Krefeld)

2.4. Organismen

Sclerotiniaceae

<i>Botrytis cinerea</i>	DSM877, DSM4709, DSM5144, DSM5145, ATCC90769, Stamm1010
<i>Sclerotinia minor</i>	DSM63016
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	DSM1946
<i>Monilinia fructigena</i>	DSM2677

Isolate aus Termitendärmen

<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Isolat MD27 (filamentöser Zygomycet)
	<i>Absidia corymbifera</i> MD01
	<i>Absidia corymbifera</i> MD02
<i>Coptotermes havilandii</i>	Isolat COP47 (filamentöser Zygomycet)
<i>Zootermopsis angusticollis</i>	<i>Paecilomyces variotii</i> (Stamm AZ01)
<i>Incisitermes tabogae</i>	<i>Paecilomyces variotii</i> (Stamm IT01)
<i>Incisitermes marginipennis</i>	<i>Paecilomyces variotii</i> (Stamm IM01)
	<i>Chaetomium</i> spec. (Stamm IM02)

2.5. Medien

Glucansynthese-Medium

Glucose x 1H ₂ O	3 - 5 %
KH ₂ PO ₄	1,5 %
KNO ₃	1,25 %
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 %
FeSO ₄ x 7H ₂ O	500 µg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	500 µg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	20 µg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	20 µg
deion. Wasser	ad 500 ml

β-Glucan-Medium

pulverisiertes β-Glucan	0,2 %
KH ₂ PO ₄	1,5 %
KNO ₃	1,25 %
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 %
FeSO ₄ x 7H ₂ O	500 µg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	500 µg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	20 µg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	20 µg
Optional: Agar	1 %
deion. Wasser	ad 100 ml

Optional wurde anstelle des pulverisierten β-Glucan das handelsübliche Curdlan (0,2 %) dem Medium zugegeben.

LB-Medium (DSMZ 381; pH 7,0)

Trypton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	1 %
deion. Wasser	ad 1000 ml

Lcc-Medium (Laccase-Medium)

Malzextrakt	3 %
Pepton aus Sojabohnenmehl	0,3 %
Optional: Agar	1,5 %

PDA-Agar (DSMZ 129)

Kartoffelextrakt	1 000 ml
Glucose	2 %
Agar	1,5 %

Herstellung: 200 g Kartoffeln werden eine Stunde gekocht und anschließend durch ein Sieb gepresst. Der Presssaft (Kartoffelextrakt) wird als Grundsubstanz des Mediums verwendet.

2.6. Puffer und Lösungen**ABTS-Lösung**

ABTS	200 mM
deion. Wasser	ad 10 ml

APS-Lösung

Ammoniumpersulfat	10 %
deion. Wasser	ad 10 ml

Die Lösung wurde in 0,5 ml Portionen auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und bei -20 °C gelagert.

Adenosintriphosphat-Lösung (ATP-Lösung)

ATP	250 mg
Natriumhydrogencarbonat	250 mg
deion. Wasser	ad 5 ml

Citrat-Puffer (100 mM) zur Dialyse (pH 4,5)

Citronensäure	0,46 %
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	2,23 %
deion. Wasser	ad 1000 ml

Coomassie Brillantblau-Lösung

Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
Coomassie-Brillant-blau R250	2 g
deion. Wasser	ad 1000 ml

Coomassie Brillantblau-Entfärbelösung

Essigsäure	70 ml
deion. Wasser	ad 1000 ml

Elektrodenpuffer (SDS-PAGE)

SDS	10 ml
Glycin	14,4 g
Tris-Base	3,0 g
deion. Wasser	ad 1000 ml

Fixierlösung (pH 7,5)

Tris-Base	10 mM
Isopropanol	100 ml
β-Mercaptoethanol	175 µl
deion. Wasser	ad 1000 ml

Fixierlösung für die Glycoproteinfärbung

Methanol	50 %
deion. Wasser	ad 500 ml

HPLC-Puffer

Phosphorsäure	3,4 ml (0,17 %)
deion. Wasser	ad 2000 ml

Vor Gebrauch wird das deion. Wasser mit einem 0,2 µm Filter abfiltriert und anschließend mit der Phosphorsäure versetzt. Darauf folgt eine Entgasung im Exsikkator für 45 min.

Kongorot Färbelösung

Natriumhydroxid	2 mM
Kongorot	0,2 %
deion. Wasser	ad 1000 ml

Kongorot Entfärbelösung

NaCl	1 M
NaOH	2 mM
deion. Wasser	ad 1000 ml

Lyse-Puffer (pH 8,0)

Tris-Base	100 mM
NaCl	300 mM
Na-EDTA	20 mM
SDS	2 % (w/v)
deion. Wasser	ad 500 ml
β -Mercaptoethanol	2 % (v/v)
Proteinase K	100 μ g/ml
RNase A	12,5 μ g/ml
RNase T ₁	25 U/ml
Chitinase	5 mU/ml
5 M NaClO ₄	33 %

Die Enzyme, das β -Mercaptoethanol und das NaClO₄ wurden unmittelbar vor Gebrauch des Lyse-Puffers zugegeben.

Natriumacetat-Lösung

Natriumacetat	3 M
deion. Wasser	ad 500 ml

Natriumperchlorat-Lösung

NaClO ₄	5 M
deion. Wasser	ad 500 ml

Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat-Lösung (NADP⁺-Lösung)

NADP ⁺	50 mg
deion. Wasser	ad 5 ml

1x PBS-Puffer (pH 7,4)

NaH ₂ PO ₄	10 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
NaCl	130 mM
deion. Wasser	ad 1000 ml

Proteinase K-Puffer (pH 8,0)

Tris-Base	10 mM
Na-EDTA	1 mM
deion. Wasser	ad 50 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	1 g

Reaktionspuffer zur Glucosebestimmung (pH 7,6)

Triethanolaminhydrochlorid	8,4 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,15 g
deion Wasser	ad 150 ml

RNase A-Puffer (pH 5,0)

NaCl	150 mM
deion. Wasser	ad 100 ml
RNase A (1 mg/ml)	100 mg

RNase T₁-Puffer (pH 6,0)

Tris-Base	20 mM
deion. Wasser	ad 100 ml
RNase T ₁ (200 U/ml)	1 µl

Sammelgelpuffer (pH 5,9)

Tris-Base	1 M
-----------	-----

Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

Sporensuspensionslösung

NaCl	0,9 %
Tween 80	0,1 %
deion. Wasser	ad 1000 ml

0,1x SSC-Puffer (pH 7,0)

NaCl	15 mM
Trinatriumcitrat	1,5 mM
deion. Wasser	ad 500 ml

Syringaldazin-Lösung

Syringaldazine	500 µM
Ethanol	ad 50 ml

Trenngelpuffer (pH 8,8)

Tris-Base	1 M
-----------	-----

Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

10x Tris-Borat-EDTA (TBE-Puffer, pH 8,0)

Tris-Base	890 mM
Borsäure	890 mM
Na-EDTA	20 mM
deion. Wasser	ad 1000 ml

Waschpuffer (pH 7,5)

Tris-Base	50 mM
deion. Wasser	ad 1000 ml

Zellsuspension-Puffer (pH 8,0)

Tris-Base	10 mM
Na-EDTA	1 mM
Saccharose	350 mM
deion. Wasser	ad. 1000 ml

2.7. Kultivierung

2.7.1. Kultivierung und Sporenernte

Die Kultivierung der verschiedenen *B. cinerea*-Stämme erfolgte bei 20 °C auf PDA- bzw. Lcc-Medium (siehe 2.5). Die Sporenbildung wurde mit Hilfe von UV-Licht induziert. Dazu wurden die Ascomyceten 12 h im Dunkeln und weitere 12 h bei 365 nm inkubiert. Diesem Rhythmus wurden die Organismen 7 – 10 Tage unterzogen. Eine vollständige Sporenbildung war anhand eines grauen Raues auf der Agaroberfläche zu erkennen. Die Sporen wurden dann mit einer Impföse abgeschabt, in Sporensuspensionlösung überführt und anschließend über Glaswolle abfiltriert. Zuletzt wurden die Zellen zentrifugiert (8600 g), mehrmals mit 1x PBS-Puffer gewaschen und in 30% Glycerin bei -20°C gelagert. Der Sporentiter wurde in einer handelsüblichen Thoma-Zählkammer bestimmt.

Die Kultivierung der *Monilinia*- bzw. *Sclerotinia*-Spezies erfolgte ausschließlich in aktiv wachsenden Kulturen. Dazu wurden bewachsene Agarstücke auf frischen PDA-Agar bzw. Lcc-Agar überführt und für mehrere Tage bei 20 °C inkubiert.

2.8. β -Glucan von *Botrytis cinerea*

In der vorliegenden Arbeit wurde das von *B. cinerea* ATCC90769 gebildete β -Glucan als Substrat für die Termitenfütterung und die Anreicherung von potentiell lysierenden Organismen angewendet. Parallel zur Synthese wurde die Abnahme der Glucose im Medium enzymatisch bestimmt. Dies diente der Ermittlung des Endes der β -Glucansynthese und dem Zeitpunkt der Polysaccharidernte.

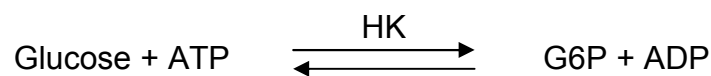
2.8.1. Synthese und Aufarbeitung des β -Glucans

Die β -1,3-1,6-Glucansynthese durch den Stamm *B. cinerea* ATCC90769 erfolgte in einem Kulturkolben mit 4 Schikanen. 500 ml

β -Glucansynthese-Medium wurden mit 5×10^5 Sporen/ml beimpft und bei 20 °C und 120 rpm zehn Tage kultiviert. Die Ernte des freien β -Glucans erfolgte durch Zentrifugation für 30 min bei 13800 g. Der klare, viskose Überstand wurde anschließend zwei Tage bei 4 °C gegen 100 mM Citrat-Puffer dialysiert. Anschließend wurde durch Zugabe des 0,6-fachen Volumens Methanol das Polysaccharid gefällt. Nach mehrmaligem starken Ausschütteln fiel das β -Glucan klumpig aus und konnte mit Hilfe einer Absaugvorrichtung über einen Membranfilter vom Medium abgetrennt werden. Anschließend erfolgte für zwei Tage die Trocknung bei 105 °C im Brutschrank. Zuletzt wurde das β -Glucan mit einem Mörser zerkleinert und für die Termitenfütterung verwendet.

2.8.2. Enzymatische Bestimmung der Restglucose

Die Bestimmung der freien Glucose wurde mit einem enzymatischen Test nach folgendem Prinzip durchgeführt:



Bei dieser Reaktion wird die monomere Glucose mit ATP zu Glucose-6-phosphat (G6P) phosphoryliert. Katalysiert wird die Reaktion durch das Enzym Hexokinase (HK). In der folgenden Reaktion wird G6P mit NADP^+ in Gegenwart von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) zu Gluconat-6-phosphat oxidiert und dabei das Reduktionsäquivalent NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ reduziert. Die Menge des reduzierten NADP^+ , das während der Reaktion gebildet wird, ist der Menge Glucose-6-phosphat und somit der Glucosemenge äquivalent.



In den hier durchgeführten Analysen wurde der Glucoseverbrauch während der β -Glucanbildung durch *B. cinerea* ATCC90769 bestimmt um auf das Ende der Glucansynthese schließen zu können. Die Messung erfolgte in einem

Photometer bei 365 nm (Spectrophotometer UV-120-01, Shimadzu, Kyoto, Japan).

Zur Bestimmung der Blindprobe wurden 625 µl Reaktionspuffer mit 25 µl der ATP-Lösung, 25 µl der NADP⁺-Lösung und 50 µl deion. Wasser bzw. 50 µl des Kulturüberstandes (oder der entsprechenden Verdünnung) vorgelegt und vermischt. Die Messung dieses Wertes erfolgte nach einer dreiminütigen Inkubation (E1). Anschließend wurden 5 µl der Enzymmischung (HK/G6PDH) zugegeben und erneut für 10 min inkubiert (E2). Es folgte die photometrische Bestimmung bei 365 nm. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel und wurde in [g/L] angegeben:

$$E2 - E1 = \Delta E$$

$$C = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

C = Konzentration [g x l⁻¹]
V = Volumen im Test (0,73 ml)
MG = Molekulargewicht Glucose (180 g x mol⁻¹)
ε = Extinktionskoeffizient NADP [L x mol⁻¹ x cm⁻¹]
d = Schichtdicke (1 cm)
v = Volumen der Proben (0,05 ml)

2.8.3. Fütterungsexperimente von verschiedenen Termiten

Zur Anreicherung von Mikroorganismen, die das β-Glucan von *B. cinerea* lysieren können, wurden Fütterungsexperimente mit verschiedenen Termitenarten durchgeführt. Dazu wurde das pulverisierte β-Glucan jeweils 15 Termiten jeder Art als Substrat angeboten. Den Fütterungs- und Anreicherungsexperimenten wurde folgende Termitenspezies unterzogen:

- *Mastotermes darwiniensis*
- *Coptotermes havilandii*
- *Zootermopsis angusticollis*
- *Incisitermes tabogae*
- *Incisitermes marginipennis*

Um die Aufnahme des Glucans zu erleichtern wurde das Substrat jeden zweiten Tag auf den Kopf und die Antennen der Tiere aufgetragen. Nach 21 Tagen wurden alle Termiten dekapitiert und die Därme entnommen. Anschließend wurden die Därme in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und mit einer Pinzette eröffnet. Der Darminhalt wurde zwei Mal in 1 ml 0,9% Kochsalzlösung gewaschen, zwischen jedem Waschschrift zentrifugiert (2 min, 11000 rpm) und in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-3} auf β -Glucanagar ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C für acht bis zehn Tage im Dunkeln. Mikroorganismen, die gewachsen waren, wurden durch mehrmaliges Überimpfen auf β -Glucanagar isoliert.

2.8.4. Mikroorganismen aus Termitendärmen

Es wurden ausschließlich filamentöse Pilze der Abteilungen Ascomycota (Schlauchpilze) und Zygomycota (Jochpilze) aus den verschiedenen Termitendärmen isoliert. Die Identifikation dieser Spezies erfolgte mit Hilfe der Sequenzierung der ITS Region. Dazu wurde zunächst die genomische DNA isoliert (s. 2.9.1. und 2.9.2.) und anschließend eine PCR mit dem Primerpaar ITS1 und ITS4 durchgeführt. Zur Durchführung der Amplifizierung und Sequenzanalyse siehe 2.10.1.

2.8.5. Lyse des β -Glucans

Der Nachweis für einen eventuellen β -Glucanabbau durch die isolierten filamentösen Pilze wurde zum einen auf β -Glucanagar und zum anderen in flüssigem β -Glucanmedium durchgeführt. Der Nachweis der Glucanolyse auf den Agarplatten erfolgte durch eine 20-minütige Kongorotfärbung und eine abschließende, 120-minütige, Entfärbung des Mediums mit Kongorot Entfärbe-Lösung. Bei vorliegendem Abbau des β -Glucans kann das Kongorot nicht in die triplehelikale Struktur des Polysaccharids interkalieren und diese Zone bleibt somit ungefärbt und ist als Lysehof sichtbar.

Zusätzlich wurde der Abbau in flüssigem β -Glucanmedium untersucht. Dazu wurden Reagenzgläser mit 10 ml Glucanmedium mit bewachsenen

Agarstücken der isolierten Organismen beimpft und bis zu acht Wochen bei 20 °C und 70 rpm inkubiert. Zum Ende wurde die Kultur durch Zentrifugation (10 min, 13 800 g) entfernt und der Überstand durch Fällung mit dem 0,6-fachen Volumen Methanol auf noch vorhandenes β -Glucan untersucht.

Bei den Färbenachweisen sowie den Suspensionstests wurde als Positivkontrolle eine handelsübliche Glucanase aus *Trichoderma viridae* der Fa. Erbslöh (Geisenheim) verwendet. Des Weiteren wurde eine Hydrolyse an einem handelsüblichen β -1,3-Homopolymer (Curdlan, Megazyme) durchgeführt. Hier wurden Curdlan-Agarplatten sowie Suspensionen mit fünf ml Volumen vorgegeben, die als Medium für die isolierten Pilze dienten. Als Positivkontrolle diente auch diesem Fall die β -Glucanase der Fa. Erbslöh.

2.9. DNA- und RNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte nach einem, für filamentöse Pilze abgeänderten Protokoll nach Marmur (1961). Dabei wurde auf Lysozym verzichtet und auf eine handelsübliche Chitinase zurückgegriffen. Des Weiteren wurde die Zellen vor der enzymatischen Lyse einer Ruptur mit einem Mörser und mehreren „freeze and thaw“-Zyklen unterzogen.

2.9.1. Zellaufschluss

Die Kultivierung der aus den Termitendärmen isolierten Ascomyceten und Zygomyceten sowie aller Sclerotiniaceae erfolgte für fünf bis sieben Tage in 50 ml flüssigem Lcc-Medium. Als Inokulum diente ein bewachsenes Agarblöckchen. Nachdem das junge Pilzmycel einen Rasen auf der Oberfläche gebildet hatte, wurde es mit einer Pinzette entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss mit einem Mörser zerrieben. Anschließend wurden die Kultur in dreimaligem Wechsel in flüssigem N₂ gefroren und bei 90 °C erhitzt. Dann wurde das Zellmaterial in 10 ml Lyse-Puffer aufgenommen und drei bis vier Stunden bei 45 - 50 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

2.9.2. DNA-Extraktion

Nach der Lyse wurde die Suspension mit ca. 5 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 8600 g. Der Überstand wurde so abgenommen, dass die Zelltrümmer, die sich an der Phasengrenze gesammelt hatten nicht aufgeschüttelt wurden. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis sich keine Zelltrümmer und Proteine mehr aus der wässrigen Phase absetzten.

Der klare Überstand wurde anschließend mit dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol versetzt und so lange vorsichtig geschüttelt bis die ausgefallene DNA aggregierte. Anschließend wurde die DNA zwei Mal mit 80% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und letztlich in zwei bis drei ml 0,1 x SSC-Puffer über Nacht gelöst. Die so isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.9.3. RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden). Dabei wurde unter Verwendung des Lyse-Puffers RLC nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen. Nach erfolgter Extraktion erfolgte sofort die Synthese der cDNA der genomischen Zielsequenzen mit dem SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Karlsruhe).

2.10. Identifizierung ribosomaler Gensequenzen

Im Gegensatz zu Bakterien werden Hefen und filamentöse Pilze in der Regel nicht über die kleine ribosomale Unterheit (18S rDNA), sondern über die Internal Transcribed Spacer Region (ITS-Region) identifiziert. Die vorhandenen und in Datenbanken hinterlegten 18S rDNA-Sequenzen sind dagegen zahlenmäßig limitiert und lassen nur in seltenen Fällen eine klare Identifizierung oder eine grobe taxonomische Einordnung zu.

2.10.1. Identifizierung der Internal Transcribed Spacer Region

Die Internal Transcribed Spacer Region umfasst die flankierenden Sequenzen der 5,8S rDNA, die mit ITS1 und ITS2 bezeichnet werden (Abb. 3). Diese wurden mit den konservierten Primern ITS1 und ITS4 (White et al. 1990) in einer Touchdown-PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (Tab. 2 und 3).

Tab. 2: Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

Lösung	Volumen [µl]
DNA	1 - 3
Forward-Primer (10 pmol/µl)	2
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	2
dNTP-Lösung (je 2,5 mM)	4
MgCl ₂ (25 mM)	4
PCR-Puffer (10 x Konzentrat)	5
DNA-freies Wasser	29 - 31
Polymerase (5 U/µl)	1
Gesamtvolumen pro Reaktion	50

Tab. 3: PCR-Protokoll zur Amplifizierung der ITS-Region.

Start	Denaturierung	94 °C	3 min
10 Zyklen	Denaturierung	94 °C	0,5 min
	Anlagerung	55 °C; -0,3 °C/Zyklus	0,5 min
	Elongation	72 °C	2,0 min
20 - 25 Zyklen	Denaturierung	94 °C	0,5 min
	Anlagerung	53 °C	0,5 min
	Elongation	72 °C	2,0 min
Abschluss	Abschließende Elongation	72 °C	10 min

2.10.2. Identifizierung der 18S rDNA-Sequenzen

Die Sequenzen der 18S rDNA wurden mit dem Primerpaar Alleu5 und ITS1R bzw. Alleu3 nach dem Protokoll in Tab. 2 und 3 amplifiziert. Hier erfolgte die Primer-Anlagerung in der Touchdown-PCR bei 61 °C (-0,3 °C/Zyklus). Anschließend wurden die PCR-Produkte mit dem TA Cloning Kit der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) in *Escherichia coli* (Vector pCR2.1) kloniert. Nach Kultivierung auf LB-Medium und anschließender Blau-Weiss-Selektion, Plasmidisolierung und erneuter Amplifikation mit dem Primerpaar Alleu5 (Forward) und ITS1R bzw. Alleu3 (Reverse) wurden die PCR-Produkte mit dem Forward-Primer sequenziert.

2.11. Nested Specific Amplification of Polymorphic DNA (nSAPD)

Mit den *B. cinerea*-Stämmen DSM877, DSM4709 und ATCC90769 sowie *S. minor* DSM1946 und *M. fructigena* DSM2677 wurde eine weiterführende Stammdifferenzierung mittels nSAPD-PCR (Fröhlich und Pfannebecker 2007) durchgeführt. Mit dieser am Institut entwickelten Technik sollte gezeigt werden, dass auch bei nahezu homologen ribosomalen Gensequenzen Variationen im Genom der verschiedenen Organismen auftreten und mit dieser Methode eine Speziesdifferenzierung möglich und erfolgreich durchzuführen ist.

Diese neuartige Technologie beruht auf der Amplifizierung der genomischen DNA mit einem kurzen Dekamer-Primer, der auf der Schnittstelle der *NotI*-Restriktionsendonuklease GCGGCCGC basiert. Im Gegensatz zur RAPD-PCR (Williams et al. 1990, Welsh und McClelland 1990), die auf der Amplifikation genomischer DNA mittels Zufallsprimern basiert, wird im Anschluss an die erste Amplifikation eine weitere Amplifikation mit Nested-Primern durchgeführt. Hier tragen die verwendeten Primer am 3'-Ende eine der vier möglichen Basen. Während für die erste Amplifikation lediglich ein Primer verwendet wird, kommen in der darauf folgenden Reaktion somit vier Primer zur Anwendung. Ziel dieser zweiten Amplifikation ist die Verstärkung der Produktausbeute aus der ersten PCR und gleichzeitig die Verringerung der Bandenvielfalt. Dies erhöht die Spezifität für die einzelnen genomischen Sequenzen und ermöglicht so eine Differenzierung auch zwischen phylogenetisch nah verwandten Spezies.

2.11.1. Erste Amplifikationsrunde (nSAPD)

In den hier durchgeführten Reaktionen wurde die nSAPD-PCR in der ersten Amplifikation mit dem Primer G-Not (AGCGGCCGCG) durchgeführt (Tab. 4 und 5).

Tab. 4: Zusammensetzung der PCR-Ansätze während der ersten PCR.

Lösung	Volumen [μ l]
genomische DNA	5
Primer (50 μ M)	1
dNTP-Lösung (40 mM)	1
MgCl ₂ (25 mM)	2
PCR-Puffer (10 x Konzentrat)	2,5
DNA-freies Wasser	12,5
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	1
Gesamtvolumen pro Reaktion	25

Tab. 5: Programm der ersten Amplifikationsrunde.

	Start	Denaturierung	95 °C	5 min
		Denaturierung	94 °C	1 min
35 Zyklen	15 Schritte	Anlagerung	35 °C	1 min
		Rampe	Inkrement +0,5 °C/Zyklus	12 sek
	20 Schritte	Anlagerung	42,5 °C	1 min
		Rampe	Inkrement +1,5 °C/Zyklus	12 sek
		Elongation	72 °C	5 min
	Abschluß	Abschließende Elongation	72 °C	10 min

2.11.2. Zweite Amplifikationsrunde (nSAPD)

Die nested Amplifikation (zweite Amplifikationsrunde; Tab. 6) wurde mit den Primern G-Not-A, G-Not-T, G-Not-G und G-Not-C (AGCGGCCGCG-N) durchgeführt. Die Ansätze hatten die identische Zusammensetzung wie in der ersten Amplifikationsrunde, hier wurde jedoch lediglich 1 µl template-DNA eingesetzt.

Tab. 6: Programm der zweiten Amplifikationsrunde (nSAPD).

Start	Denaturierung	95 °C	5 min
35 Zyklen	Denaturierung	94 °C	1 min
	Anlagerung	41 °C	1 min
	Elongation	72 °C	5 min
Abschluss	Abschließende Elongation	72 °C	10 min

2.12. Identifikationsmethode für unbekannte Gensequenzen

Die Identifizierung unbekannter Laccase-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des DNA Walking SpeedUp™ Kits. Mit dieser Technik ist es möglich, unbekannte Gensequenzen in mehreren aufeinander folgenden PCR-Reaktionen zu identifizieren (Abb. 8). Zu Beginn wird mit einem konservierten Primerpaar (MF_lac1/2F und MF_lac1/2R) die Kernsequenz des gesuchten Gens amplifiziert und identifiziert. Auf Basis dieser Sequenz werden im Anschluss jeweils drei Primer generiert, die im Kernbereich Forward bzw. Reverse gerichtet sind (TSP 1-3F- bzw. TSP 1-3R-Primer, Tab. 7 - 9). Im Lieferumfang des Kits sind für jede der drei Reaktionen Zufallsprimer enthalten, die sich als eingerückte Primer ergänzen. Sie basieren auf der Sequenz: NGGTC-3'. Jede der aufeinander folgenden Amplifizierungsschritte wird mit einem TSP- und einem der Zufallsprimer durchgeführt, wobei nach dem dritten Schritt das gewünschte Produkt (3'- bzw 5'-Ende des gesuchten Gens) in, für eine Sequenzierung, ausreichender Konzentration vorliegen sollte. Nach der Identifizierung der einzelnen Sequenzen muss zusätzlich noch darauf geachtet

werden, dass die Forward-Sequenzen das 3'-Ende und die Reverse-Sequenzen das komplementäre 5'-Ende (antisense) des Zielgens identifizieren. Aus diesem Grund sind Editierschritte mit der Software Reverse und ClustalX unumgänglich.

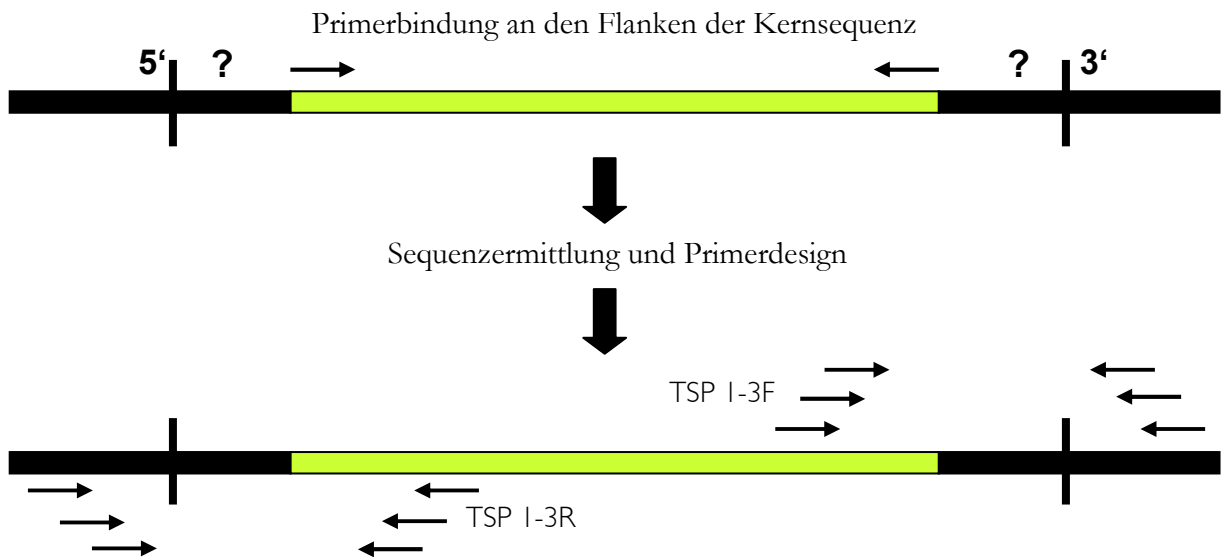


Abb. 8: Schematische Darstellung der Amplifizierung der unbekannt Laccase-Sequenzen.

2.12.1. Amplifizierung und Identifikation neuer Laccase-Gene

Tab. 7: Verwendete Primerpaare zur Amplifizierung der unbekannt Gensequenzen (vgl. Tab. 1).

Organismus	Zielgen	Amplifikationsschritt	Forward Primer	Reverse Primer
Alle Organismen	<i>lcc2</i> Kernsequenz	Kernsequenz-PCR	MF_lac1/2F	MF_lac1/2R
<i>M. fructigena</i>	<i>lcc2</i>	1. PCR-Schritt 2. PCR-Schritt 3. PCR-Schritt	MF_TSP1F MF_TSP2F MF_TSP3F	MF_TSP1R MF_TSP2R MF_TSP3R
<i>S. minor</i>	<i>lcc2</i>	1. PCR-Schritt 2. PCR-Schritt 3. PCR-Schritt	SM_TSP1F SM_TSP2F SM_TSP3F	SM_TSP1R SM_TSP2R SM_TSP3R
<i>S. sclerotiorum</i>	<i>lcc2</i>	1. PCR-Schritt 2. PCR-Schritt 3. PCR-Schritt	SS_TSP1F SS_TSP2F SS_TSP3F	SS_TSP1R SS_TSP2R SS_TSP3R

PCR-Ansatz zur Amplifizierung der jeweiligen Kernsequenz

Tab. 8: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für die Amplifikation der Kernsequenz verschiedener Laccase-Gene.

Lösung	Volumen [μ l]
DNA	1 - 3
MF_lac1/2F (10 pmol/ml)	2
MF_lac1/2R (10 pmol/ml)	2
dNTP-Lösung (je 2,5 mM)	4
MgCl ₂ (25 mM)	4
PCR-Puffer (10 x Konzentrat)	5
DNA-freies Wasser	29 - 31
Polymerase (5 U/ μ l)	1
Gesamtvolumen pro Reaktion	50

Tab. 9: PCR-Protokoll zur Amplifizierung der Kernsequenz verschiedener Laccase-Gene.

Start	Denaturierung	94 °C	5 min
10 Zyklen	Denaturierung	94 °C	1,0 min
	Anlagerung/Inkrement	57 °C; -0,3 °C/Zyklus	1,0 min
	Elongation	72 °C	2,0 min
25 Zyklen	Denaturierung	94 °C	1,0 min
	Anlagerung	54,5 °C	1,0 min
	Elongation	72 °C	2,0 min
Abschluss	Abschließende Elongation	72 °C	10 min

2.12.2. Amplifizierung der 3' bzw. 5'-Randsequenzen

Die einzelnen Amplifizierungsschritte erfolgten gemäß den Herstellerangaben (Seegene, Rockville, USA). Die Produktaufreinigung nach der ersten PCR wurde mit dem Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

2.12.3. Restriktionsanalyse

Das Vorhandensein der Laccase2-Gene in den unterschiedlichen *B. cinerea*-Stämmen wurden mittels PCR überprüft und die PCR-Produkte zusätzlich einem Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *EcoRI*, *SalI* und *HindIII* unterzogen. Dazu wurde jeweils die genomische DNA mit dem Forward-Primer Unilcc2_Nde1F und dem Reverse-Primer Unilcc2_Sal1R (Tab. 1) nach dem Schema in Tab. 9 amplifiziert und anschließend mit dem Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Restriktion wurde nach dem Schema in Tab. 10 mit dem für jede Endonuklease vorgeschriebenen Puffer durchgeführt.

Lösung	Volumen [μ l]
Aufgereinigtes PCR-Produkt	8
Enzym (10 U/ μ l)	1
Restriktionspuffer (10 x)	1
Endvolumen	10

Tab. 10: Zusammensetzung der Restriktionsansätze.

Die Reaktion wurde für 6 h bei 37 °C durchgeführt und die Restriktionsfragmente in einem 2%-igen Agarosegel (in 1 x TBE-Puffer) für 90 min bei 75 V aufgetrennt.

2.13. Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR ist eine Methode, die es ermöglicht in einem Ansatz verschiedene Amplifikate zu generieren. Dabei wird ein universeller Primer und mehrere, für bestimmte Organismen spezifische, Primer vermischt. Als Voraussetzung muss des Weiteren gewährleistet sein, dass die entstehenden Amplifikate eine unterschiedliche Länge aufweisen, sodass sie in einer nachfolgenden Elektrophorese voneinander zu unterscheiden sind. Die Amplifikationen von den jeweiligen Zielgenen ermöglicht so eine klare Identifikation des jeweiligen Organismus auf Basis der spezifischen Sequenzlänge.

Auf Basis der neuen Laccase-Sequenzen wurde eine derartige Multiplex-PCR etabliert. Dazu wurde ein universeller Reverse-Primer (Mp_UniR) mit, für jeweils *B. cinerea*, *S. minor*, *S. sclerotiorum* und *M. fructigena* spezifischen Forward-Primern (Tab. 11) gemischt und mit dem Multiplex-PCR Kit (Qiagen, Hilden) auf Spezifität und Funktionalität überprüft. Dabei wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers vorgegangen. Zusätzlich wurden befallene Fruchtproben aus der Umgebung von Mainz/Wiesbaden, aus Flomborn (Rheinhessen) und aus Stollberg (Sachsen) in den Test mit einbezogen. Die DNA aus diesen Proben wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach den Vorgaben des Herstellers isoliert und die Multiplex-PCR nach den Angaben in Tab. 12 und 13 durchgeführt.

Tab. 11: Bindungspositionen der Primer und die jeweilig erwarteten Produktlängen in der Multiplex-PCR.

Organismus	Forward-Primer	Reverse-Primer	Primerposition im Laccase-Gen		erwartete Produktlänge
			Forward	Reverse	
<i>B. cinerea</i>	MP_BcF	MP_UniR	530 - 555	1036 - 1060	531 bp
<i>S. sclerotiorum</i>	MP_SsF	MP_UniR	280 - 301	887 - 911	632 bp
<i>S. minor</i>	MP_SmF	MP_UniR	84 - 107	893 - 917	834 bp
<i>M. fructigena</i>	MP_MfF	MP_UniR	512 - 532	928 - 952	441 bp

Tab. 12: Zusammensetzung der Multiplex- PCR für die Amplifikation der *lcc2*-Sequenzen in einer Reaktion.

Lösung	Volumen [μ l]
Multiplex Master Mix (2x) (Qiagen, Hilden)	25
Primer-Mix (2 μ M je Primer)	5
DNA	1 - 3
DNA-freies Wasser	variabel
Gesamtvolumen pro Reaktion	50

Tab. 13: Programm der Multiplex-PCR.

Start	Denaturierung	94 °C	15 min
10 Zyklen	Denaturierung	94 °C	0,5 min
	Anlagerung/Inkrement	64,5 °C; -0,3 °C/Zyklus	1,5 min
	Elongation	72 °C	1,5 min
25 Zyklen	Denaturierung	94 °C	0,5 min
	Anlagerung	62 °C	1,5 min
	Elongation	72 °C	1,5 min
Abschluss	Abschließende Elongation	72 °C	10 min

2.14. Analyse der PCR-Produkte

Alle generierten PCR-Produkte wurden zunächst mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (1 - 2% Agarose in 1 x TBE-Puffer) bei 70 – 90 V aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt. Aufreinigungen von PCR-Produkten erfolgten mit dem Qiagen PCR Purification Kit nach den Vorgaben des Herstellers. Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxymethode von Sanger (Sanger et al. 1977) und wurden von der Fa. Genterprise, Mainz, durchgeführt. Die mit den Reverse-Primern identifizierten Sequenzen der Laccase-Gene wurden

mit der Software Reverse editiert und durch Alignments mit ClustalX mit der Kernsequenz bzw. Forward-Sequenz manuell zusammengestellt.

2.14.1. Sequenzvergleiche

Mit den Sequenzen der ITS-Region, der 18S rDNA sowie der neuen Laccase-Gene wurden multiple Alignments mit bereits hinterlegten Sequenzen aus Datenbanken erstellt. Hier wurde auf die Software ClustalX (Thompson et al. 1997) und GeneDoc (Nicholas und Nicholas 1997) zurückgegriffen. Zum einen wurden die Alignments in ausführlicher Form und zum anderen in Matrizen, die eine prozentuale Homologie der Sequenzen zueinander wiedergeben, im Ergebnisteil bzw. im Anhang dargestellt.

2.15. Proteinchemische Untersuchungen

2.15.1. Identifikation der Laccasen

Die ermittelten Gensequenzen für die verschiedenen Laccasen wurde mit dem „DNA-Protein translation tool“ von der Homepage www.expasy.org in die Proteinsequenz übersetzt und durch multiple Alignments mit dem ClustalX-Algorithmus (Thompson et al. 1997) und GeneDoc (Nicholas und Nicholas 1997) miteinander verglichen. Die Lage der Introns wurde durch einen jeweilige Vergleich mit der bereits untersuchten *lcc2*-Sequenz von *B. cinerea* (Acc. AF243855) abgeglichen.

2.15.2. Proteinsequenzanalyse

Da die Kupferbindepositionen die einzigen konservierten Bereiche von ascomycetischen Laccasen darstellen (Schouten et al. 2002), wurden alle Sequenzen auf das Vorhandensein dieser Aminosäuren hin untersucht. Zusätzlich

wurden mit Hilfe der Software SignalIP 3.0 (www.expasy.org) nach etwaigen Signalsequenzen gesucht und mit dem Kite-Doolittle-Algorithmus (www.expasy.org) Hydrophobizitätsplots für alle vorausgesagten Proteine ermittelt. Des Weiteren weisen Laccasen einen teilweise hohen Glykosylierungsgrad auf (Baldrian 2006). Aus diesem Grund wurde nach dem konservierten N-Glykosylierungsmotif (Asn-X-Ser/Thr; Nita-Lazar et al. 2005) gesucht und mögliche Positionen ermittelt.

2.15.3. Untersuchungen zur Aktivität der Laccasen

Um eine Aussage über die mögliche Expression dieser Proteine treffen zu können, wurden zunächst qualitative Aktivitätstests mit den Substraten Kaffeesäure und Syringaldazin durchgeführt. 500 µM Kaffeesäure wurde Lcc-Agar zugegeben und jeweils mit einem bewachsenen Agarblöckchen eines jeden Vertreters der Sclerotiniaceae beimpft. Eine sich entwickelnde Bräunung kann in diesem Fall bereits über eine exprimierte Phenoloxidase Auskunft geben (Bavendamm 1928). Weiterhin wurden 50 ml Glucansynthese-Medium mit 500 µM Kaffeesäure versetzt und über einen Zeitraum von 15 Tagen mit den Sclerotiniaceae kultiviert. In dieser Zeit erfolgte täglich eine Probenentnahmen für eine HPLC-Analyse. Mit Hilfe dieser Untersuchung (HPLC-System LC6A, Shimadzu) konnte überprüft werden, ob die Bräunung des Lcc-Agars mit einer Abnahme der Kaffeesäurekonzentration im Medium einherging. Hier wurden jeweils 20 µl Probenvolumen mit der Trennsäule RP C18 LI-Chromosphere 100 aufgetrennt. Als Controller diente eine Shimadzu SCL-6B- und als Autoinjektor eine Shimadzu SIL-10AD-Einheit.

Am Ende des Inkubationszeitraumes wurden jeweils 100 µl Kulturüberstand jeder Kultur mit 500 µl einer 500 mM Syringaldazinlösung vermischt und auf 5 ml mit deion. Wasser aufgefüllt. Eine eintretende rötliche Färbung gab dann den sicheren Beweis für eine aktiv exprimierte Laccase. Da lediglich *M. fructigena* einen positiven Nachweis für eine aktiv exprimierte Laccase zeigte wurde die Induzierbarkeit dieses Enzyms nur mit diesem Organismus weitergeführt.

Für eine Analyse der möglichen Induktion der von *M. fructigena* sezernierten Laccase wurden 500 ml Lcc-Medium mit den, in 10 ml Methanol gelösten, Substraten Vanillinsäure, Kaffeesäure und Xylidin (jeweilige Endkonzentration: 500 µM) versetzt. Als Kontrolle diente zum einen Kulturmedium ohne Substrat und

zum anderen Kulturmedium mit Methanol. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 38 Tagen bei 20 °C im Fernbachkolben. Nach 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 31 und 38 Tagen erfolgte eine Entnahme von einigen ml des Kulturüberstands. Diese Lösung wurde für die quantitative Expressionanalyse mit dem Substrat ABTS verwendet. Dazu wurden 90 µl Natriumacetat-Lösung mit 100 µl einer 200 mM ABTS-Lösung in einer Mikrotiterplatte vermischt und anschließend die Reaktion mit 10 µl Kulturüberstand gestartet. Die Analyse wurde nach 5 min Inkubation mit Hilfe eines Mikrotiterplattenreaders Multiscan Plus MKII (Dunn Labortechnik, Asbach) bei 420 nm gegen Wasser als Kontrolle gemessen. Die Auswertung erfolgte über die Extinktionsdifferenzen zwischen Probe und Leerwert.

Die verbliebene Kultur mit Kaffeesäure als Substrat wurde nach Abschluss der Untersuchungen bei 20 000 rpm zentrifugiert und der zellfreie Überstand (400 ml) mit der Separationssäule Vivaspın 20 (Vivascience, Hannover) auf ein Volumen von 20 ml eingengt. Davon wurden 14 ml für eine präparative isoelektrische Fokussierung (IEF) verwendet und die einzelnen Fraktionen auf Laccaseaktivität mit ABTS als Substrat hin untersucht. Die aktiven Fraktionen wurden anschließend vereinigt und mit der Separationssäule YM-50 (Millipore, Bedford, MA, USA) auf ein Volumen von ca. 100 µl eingengt. Diese wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und parallel einem Aktivitätsnachweis mit ABTS sowie einer Glykosylierungsfärbung des aktiven Enzyms unterzogen.

2.15.4. Isoelektrische Fokussierung der aktiven Laccase aus *M. fructigena* DSM2677

Während einer isoelektrischen Fokussierung wird ein pH-Gradient in einem elektrischen Feld aufgebaut in dem sich die Proteine gemäß ihrer Ladung ausrichten. Bei dieser präparativen IEF wurde als Anodenpuffer 100 mM H₃PO₄ und als Kathodenpuffer 100 mM NaOH verwendet. Die 14 ml Probe wurden mit 3 ml Ampholytlösung (pH 3-15; Biorad 163-1113) und 5 ml reinem Glycerin vermischt und mit Wasser (Milli-Q) auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 15 Watt und einer Anfangsspannung von 450 V für sechs h bei 10 °C (Rotofor, Biorad).

2.15.5. Aktivitätsnachweis mittels SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit einem 12,5-%igen vertikalen Acrylamid/Bisacrylamidgel durchgeführt (Tab. 14). Dabei wurde die aufgetragene Probe in einem Sammelgel angereichert und anschließend in einem 12,5-%igen Trenngel separiert. Die Elektrophorese wurde bei 80 V für 120 min durchgeführt. Nach der Auftrennung wurde das Gel halbiert und ein Teil mit Coomassie Brillantblau-Lösung gefärbt. Die zweite Hälfte wurde mit dem spezifischen Laccase-Substrat ABTS (in 1% verflüssigte Agarose und 1 mM CuSO₄ eingebettet) überschichtet. Nach dem Aushärten der Substrat-Agarose-Mischung wurde das überschichtete Gel für eine h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Erscheinen von grünen Bereichen auf der Geloberfläche zeigte dabei die Laccase-Aktivität im SDS-Gel an.

Tab. 14: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels.

Lösungen	Sammelgel	Trenngel (12,5%)
deion. Wasser	1,23 ml	1,05 ml
Sammelgel-/Trenngelpuffer	0,2 ml	1,5 ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)	0,2 ml	1,25 ml
10% SDS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
10% APS	50 µl	50 µl

2.15.6. Glykoproteinfärbung

Nach der Auftrennung des angereicherten Kulturüberstandes von *M. fructigena* durch die SDS-PAGE wurde das mit Coomassie Brillantblau gefärbte Stück des Polyacrylamidgels (siehe 2.15.5) einer Glykoprotein-Färbung mit dem

Pro-Fuchsia-Glycoprotein-Stain-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) unterzogen. Die Vorgehensweise richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

Hier wurde das Gel 30 min in einer Fixierlösung inkubiert und anschließend 10 min in Waschlösung geschüttelt. Im Folgenden wurde das Gel 25 min in Oxidationslösung (im Dunkeln) inkubiert und erneut drei Mal in Waschlösung gewaschen. Anschließend folgte eine 25-minütige Inkubation mit Pro-Q Fuchsia Lösung und eine 60-minütige Entwicklung des Gels mit der Reduzierlösung.

2.15.7. Detektion der Laccase-codierenden mRNA

Zur Isolierung der Laccase-codierenden mRNA wurde *M. fructigena* für 20 Tage in Lcc-Medium mit 500 µM Kaffeesäure kultiviert. Die RNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden). Dabei wurde unter Verwendung des Lyse-Puffers RLC nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen. Nach erfolgter Extraktion erfolgte sofort die Synthese der cDNA der genomischen Zielsequenzen. Als Zielsequenz diente hier zum einen der Poly-A-Schwanz von codierenden mRNAs mit einem Poly-T-Oligonukleotid des Kits und zum anderen die *lcc2*-spezifischen Primer Lcc2_Sal1R und Uni_lcc2Sal1R. Eine dritte cDNA-Synthesevariante wurde mit hexameren Zufallsprimern durchgeführt. Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe). Die genaue Vorgehensweise der cDNA-Synthese ist in Abb. 9 dargestellt.

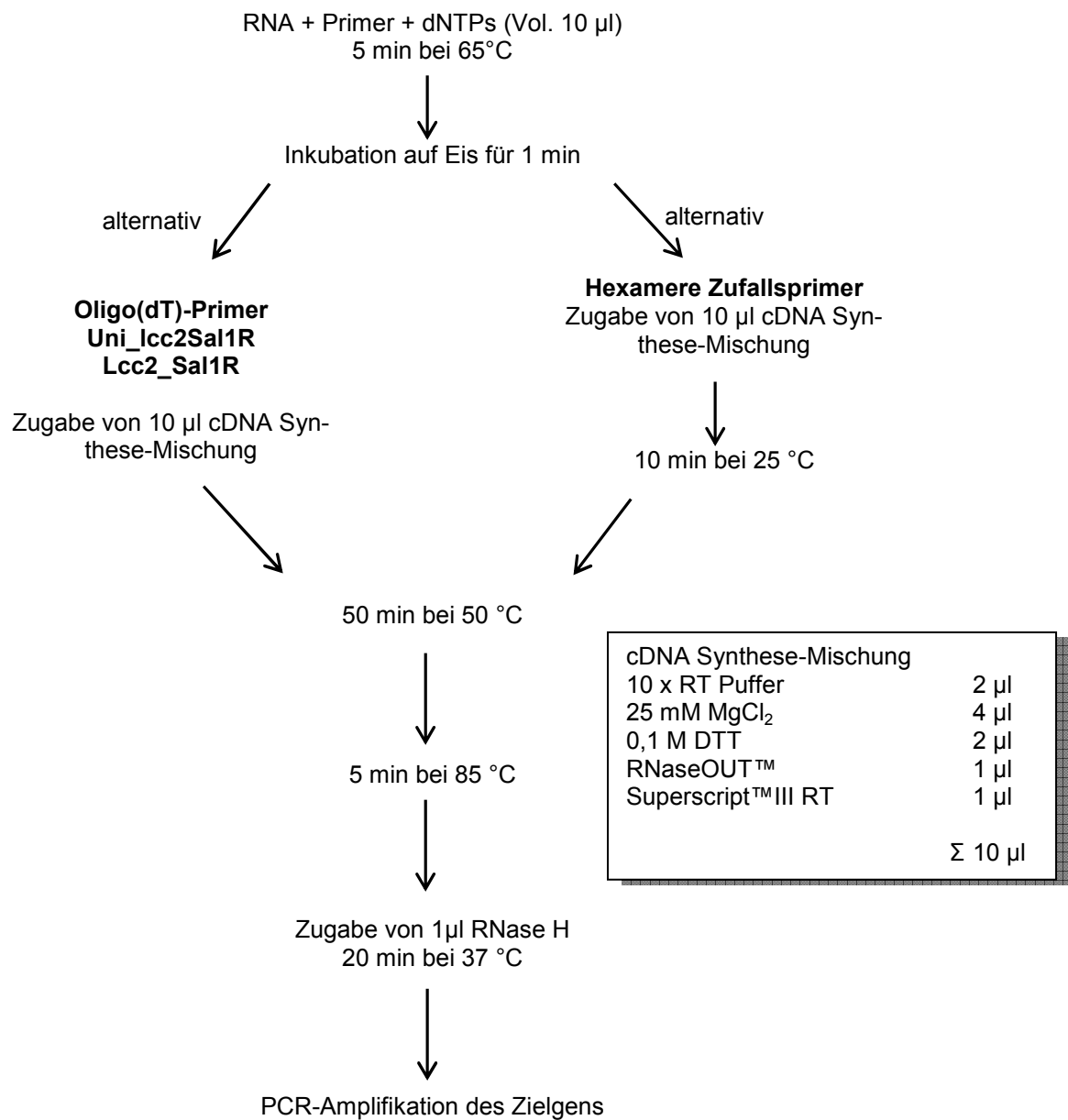


Abb. 9: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese.

3. Ergebnisse

3.1 Glucanbildung durch *B. cinerea* ATCC90769

Da das β -Glucan in der Kellerwirtschaft ein nicht zu unterschätzendes Problem bei der Filtration von Weinen darstellt, wurde die Bildung dieses extrazellulären Polysaccharides in zeitlicher Auflösung verfolgt und das synthetisierte Polymer anschließend zur Anreicherung von potentiell glucanolytischen Mikroorganismen in Termitendärmen verwendet.

Die Tab. 15 und die Abb. 10 zeigen, dass parallel zum Glucoseverbrauch die β -Glucanproduktion durch *B. cinerea* ATCC90769 startet. Dabei wird deutlich, dass die β -Glucansynthese nach etwa ein bis zwei Tagen beginnt und nach zirka 11 Tagen ihren Höhepunkt erreicht. Ebenfalls zu erkennen ist ein Rückgang des Exopolysaccharidgehaltes in den Tagen 11 bis 15 und wahrscheinlich auch darüber hinaus. Da sich zu diesem Zeitpunkt keine Glucose mehr im Medium befindet, kann hier davon ausgegangen werden, dass der Organismus bereits damit begonnen hat, das β -Glucan als extrazellulären Kohlenstoff- und Energiespeicher zu nutzen. Aus diesem Grund wurden die durchgeführten β -Glucanproduktionen nach zehn Tagen gestoppt und das nicht adhäsive Polymer aus dem Überstand für die Fütterungsexperimente von Termiten aufgearbeitet und verwendet.

Tab. 15: Glucoseverbrauch und β -Glucansynthese durch *B. cinerea* ATCC90769.

Zeit [d]	Konzentration [g/l]	Konzentration [mM]	β -Glucan [g/l]
0	31,63	175,7	0
1	29,34	163	0,1
3	21,72	120,6	1,2
5	2,78	15,4	1,4
7	1,16	6,4	2,1
9	0,27	1,5	2,2
11	0,14	0,77	2,6
15	0,04	0,02	2,1

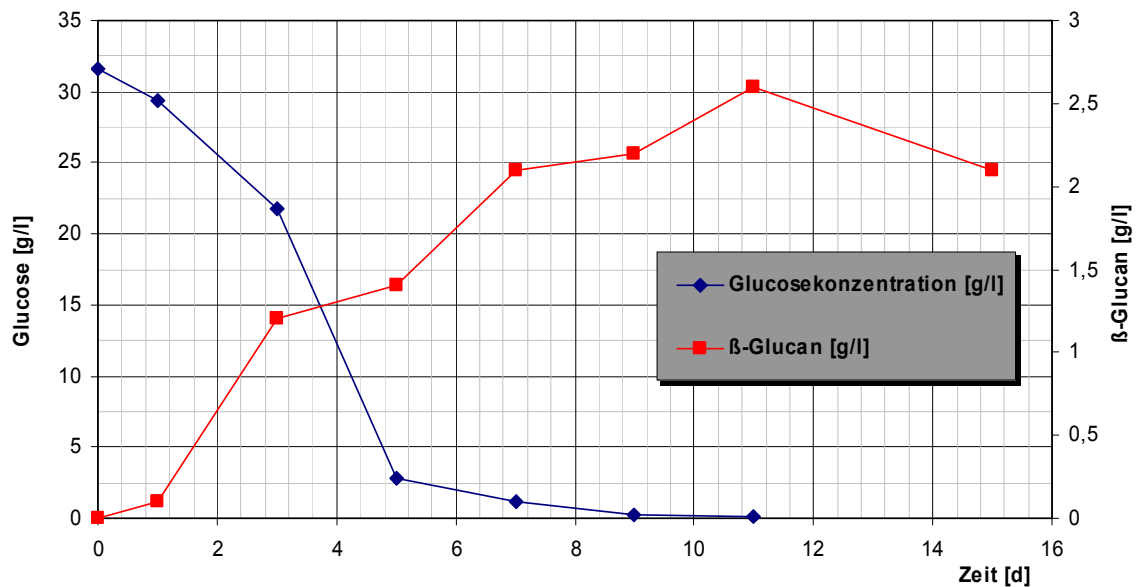


Abb. 10: Glucoseverbrauch und gleichzeitige β-Glucansynthese durch *B. cinerea* ATCC90769 in zeitlicher Auflösung.

3.2 Fütterung von Termiten und Isolierung glucanolytischer Mikroorganismen

Da das pulverisierte Exopolysaccharid nicht die eigentliche Nahrungsquelle von Termiten darstellt, gestaltete sich die Fütterung als problematisch. Die Tiere nahmen das β-Glucan nicht aktiv als Nahrung auf. Aus diesem Grund wurde das Polymer jeden zweiten Tag auf Kopf und Antennen gestreut und erst durch Säubern der Extremitäten von den Tieren aufgenommen.

Diese Konditionierung des Darmes auf β-glucanolytische Organismen wurde nach 21 Tagen abgebrochen und der Termitendarm zwecks Isolierung der Mikroflora entnommen. Dazu wurde der Darminhalt dekadisch bis 10^{-3} verdünnt und ausplattiert. Nach der Kultivierung konnten verschiedene filamentöse Pilze (vgl. 2.8.4, S. 31) isoliert und anschließend identifiziert werden. Dabei fiel auf, dass in keinem Fall eine Mischpopulation auf den Medien zu erkennen war. Auch die kultivierten unverdünnten Kulturen zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Mischung verschiedener Organismen. Die Organismen, die bei der Verdünnung 10^{-3} ge-

wachsen waren, wurden isoliert und anschließend weitergehenden Untersuchungen unterzogen.

3.2.1 Identifizierung der einzelnen Isolate

Alle isolierten Organismen aus dem Termitendarm wurden durch eine Sequenzierung der ITS-Regionen und 5.8S rDNA identifiziert (Tab. 16). Hier stellte sich heraus, dass die beiden Isolate MD27 und COP47 nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Aufgrund dessen wurde zusätzlich ein Teil der 18S rDNA ermittelt.

Bei dem Isolat MD27 zeigte sich lediglich im Bereich der 5.8S rDNA eine Homologie von 96% (161/170 bp) zu dem filamentösen Zygomyceten *Absidia corymbifera* Stamm FSU787 (Acc. AY944897). Die beiden zugehörigen ITS-Regionen konnten jedoch keinem Organismus eindeutig zugeordnet werden. Auf Basis der 18S rDNA zeigte dieser Organismus dagegen eine Homologie von 95% (1136/1189) zu dem Zygomyceten *Absidia repens* (Acc. AF113410).

Bei dem Isolat COP47 handelte es sich ebenfalls um einen filamentösen Zygomyceten dessen 5.8S rDNA eine Homologie von 98% (172/175 bp) zu dem Organismus *Absidia spinosa* Stamm FSU550 (Acc. AY944886) zeigte. Auch in diesem Fall konnten die beiden ITS-Regionen keinem eindeutig identifizierten Organismus zugeordnet werden. Die partielle 18S rDNA dieses Organismus zeigte eine Sequenzübereinstimmung von 96% zu *Absidia blakesleeana* (935/966 bp) und *Absidia corymbifera* (938/972 bp).

Bei den anderen vier Isolaten handelte es sich um filamentöse Schlauchpilze, die mit Hilfe der ITS-Sequenzen eindeutig zu differenzieren waren. Dabei fiel auf, dass aus den Termiten *I. tabogae*, *I. marginipennis* und *Z. angusticollis* wiederholt *Paecilomyces variotii* isoliert werden konnte. Zusätzlich konnte aus *I. marginipennis* eine Spezies der Gattung *Chaetomium* isoliert werden.

Tabelle 16: Isolierte Organismen aus verschiedenen Termiten.

Termite	isolierter Pilz (Sequenzhomologie in %)
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	<i>Absidia</i> spec. (MD27) <i>Absidia corymbifera</i> MD01 <i>Absidia corymbifera</i> MD02
<i>Coptotermes havilandii</i>	<i>Absidia</i> spec. (COP47)
<i>Zootermopsis angusticollis</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>
<i>Incisitermes tabogae</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>
<i>Incisitermes marginipennis</i>	<i>Paecilomyces variotii</i> <i>Chaetomium</i> spec.

3.2.2 Glucanolytische Aktivitäten

Der Nachweis auf eine glucanolytische Aktivität der isolierten Pilze wurde zum einen auf β -Glucanagar und zum anderen in flüssigen β -Glucan-Medium untersucht. Über einen Inkubationszeitraum von bis zu acht Wochen wurden die Organismen kultiviert. Weder in den Kulturröhrchen mit flüssigem β -Glucan-Medium noch auf dem β -Glucanagar konnte zu einem Zeitpunkt eine Lyse dieses Polymers beobachtet werden. Die Kontrolle mit dem β -Glucan und der β -Glucanase zeigte dagegen schon nach sechs Stunden einen eindeutigen Abbau, der mit Hilfe einer Kongorotfärbung deutlich nachgewiesen werden konnte (Abb. 11). Im flüssigen β -Glucanmedium konnte der Abbau durch eine Abnahme der Viskosität des Kulturmediums ebenfalls deutlich beobachtet werden.

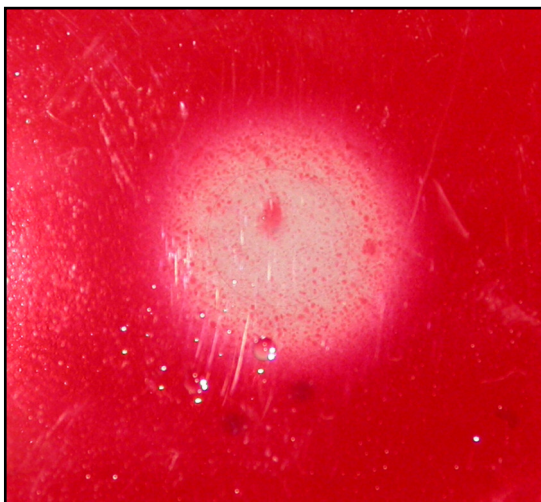


Abb. 11: Lyse des β -Glucans durch eine β -Glucanase aus *Trichoderma viridae*. Der Nachweis wurde mit Hilfe einer Kongorotfärbung geführt. Während das nicht abgebaute Polymer rot eingefärbt ist, erscheint der lysierte Bereich als farbloser Lysehof (125 μ g/5 μ l Enzym, Inkubationsdauer: 6 h bei Raumtemperatur).

3.3 DNA-Sequenzanalysen der Sclerotiniaceae

3.3.1 Internal Transcribed Spacer Regions

Die ITS-Sequenzen der fünf verschiedenen *B. cinerea*-Arten DSM 877, DSM4709, DSM5144, DSM5145 und ATCC90769 sowie von *S. sclerotiorum* DSM1946, *S. minor* DSM63016 und *M. fructigena* DSM2677 wurden mit den Primern ITS1 und ITS4 (White et al. 1990) ermittelt. Die Analyse wurde zusätzlich mit in Datenbanken hinterlegten Sequenzen (Altschul et al. 1997) durchgeführt. Die Darstellung erfolgte in einem Alignment, das mit ClustalX (Thompson et al. 1997) generiert und mit GeneDoc (Nicholas und Nicholas 1997) editiert wurde (Anhang 4). Zusätzlich wurde eine Matrix mit einem prozentualen Sequenzvergleich erstellt (Tab. 17).

In dem 448 bp langen Sequenzvergleich im Anhang 4 ist zu erkennen, dass die einzelnen ITS-Regionen eine starke Homogenität zeigen. Innerhalb dieses Alignments existiert lediglich eine Gattungsspezifische Base an Position 95. Hier trägt *Botrytis* spec. ein Cytosin während *Sclerotinia* spec. ein Thymin und *Monilinia* spec. ein Adenin tragen. Ansonsten finden sich zwei zusätzliche Baseneinschübe in Position 63 und 68, die *Sclerotinia* spec. von den anderen Gattungen differenzieren könnten, diese untereinander aber nicht unterscheiden würde.

Vergleicht man die einzelnen Spezies untereinander, so fällt auf, dass deutlich mehr Spezies-spezifische als Gattungsspezifische Basenpositionen innerhalb der ITS-Region existieren. *Monilinia fructigena* zeigt beispielsweise zehn Spezies-spezifische Basen.

Bei Untersuchung der ITS-Sequenzen der verschiedenen Gattungen der Sclerotiniaceae muss angeführt werden, dass die Variabilität keine stichhaltige und zweifelsfreie Identifikation dieser Arten zulässt. Auch phylogenetische Analysen würden aufgrund des Mangels an aussagekräftigen Sequenzinformationen keine eindeutigen Zuordnungen ermöglichen. Aus diesem Grund wurde der ITS-Bereich in der phylogenetischen Analyse dieser Familie von Staats et al. (2004) ausgenommen.

Tab. 17: ITS-Sequenzvergleich verschiedener Vertreter der Sclerotiniaceae (Angaben in % Homologie).
 Stammbezeichnungen bzw. Zugriffsnummern in der NCBI Datenbank mit den zugehörigen Organismen von oben nach unten: *Botrytis cinerea*: DSM877, ATCC90769, DSM4709, DSM5144, DSM5145, AY550976, AY686867; *Botrytis elliptica*: AY684918; *Sclerotinia sclerotiorum*: DSM1946, DQ059577; *Sclerotinia minor*: DSM63016, Z99673; *Sclerotinia trifoliorum*: AY547267, Z99676; *Monilinia laxa*: AF150676; *Monilinia fructicola*: Z73778, *Monilinia fructigena*: DSM2677, AF150680.

	DSM877	ATCC90769	DSM4709	DSM5144	DSM5145	AY550976	AY686867	AY684918	DSM1946	DQ059577	DSM63016	Z99673	AY547267	Z99676	AF150676	Z73778	DSM2677	AF150680
DSM877	100%																	
ATCC90769	100%	100%																
DSM4709	100%	100%	100%															
DSM5144	100%	100%	100%	100%														
DSM5145	100%	100%	100%	100%	100%													
AY550976	100%	100%	100%	100%	100%	100%												
AY686867	99%	99%	99%	99%	99%	99%	100%											
AY684918	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	100%										
DSM1946	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	100%									
DQ059577	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	99%	100%								
DSM63016	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	99%	99%	100%							
Z99673	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	99%	99%	100%	100%						
AY547267	98%	98%	98%	98%	98%	98%	97%	98%	99%	99%	98%	98%	100%					
Z99676	98%	98%	98%	98%	98%	98%	97%	98%	99%	99%	98%	98%	100%	100%				
AF150676	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	97%	97%	98%	98%	100%			
Z73778	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	98%	100%		
DSM2677	96%	96%	96%	96%	96%	96%	96%	96%	95%	96%	95%	95%	95%	95%	97%	96%	100%	
AF150680	96%	96%	96%	96%	96%	96%	96%	96%	95%	96%	95%	95%	95%	95%	97%	96%	100%	100%

3.4 Nested Specific Amplification of Polymorphic DNA (nSAPD)

Da die ribosomalen DNA-Sequenzen keine zweifelsfreie Identifikation von Vertretern der Familie der Sclerotiniaceae zuließen, wurde mit Hilfe der neuartigen nSAPD-Technologie (Fröhlich und Pfannebecker 2007) eine Unterscheidung einzelner Spezies unternommen. Auf der Basis dieser Technologie konnten alle untersuchten Organismen bis auf das Stammniveau differenziert werden.

Die Amplifikation der genomischen DNA mit dem dekameren Primer G-Not und die darauf folgende spezifische nested-Amplifikation der PCR-Produkte aus der ersten Amplifikationsrunde mit den Primern G-Not-A, G-Not-T, G-Not-G und G-Not-C (Tab. 1) zeigte deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Sclerotiniaceae (Abb. 12).

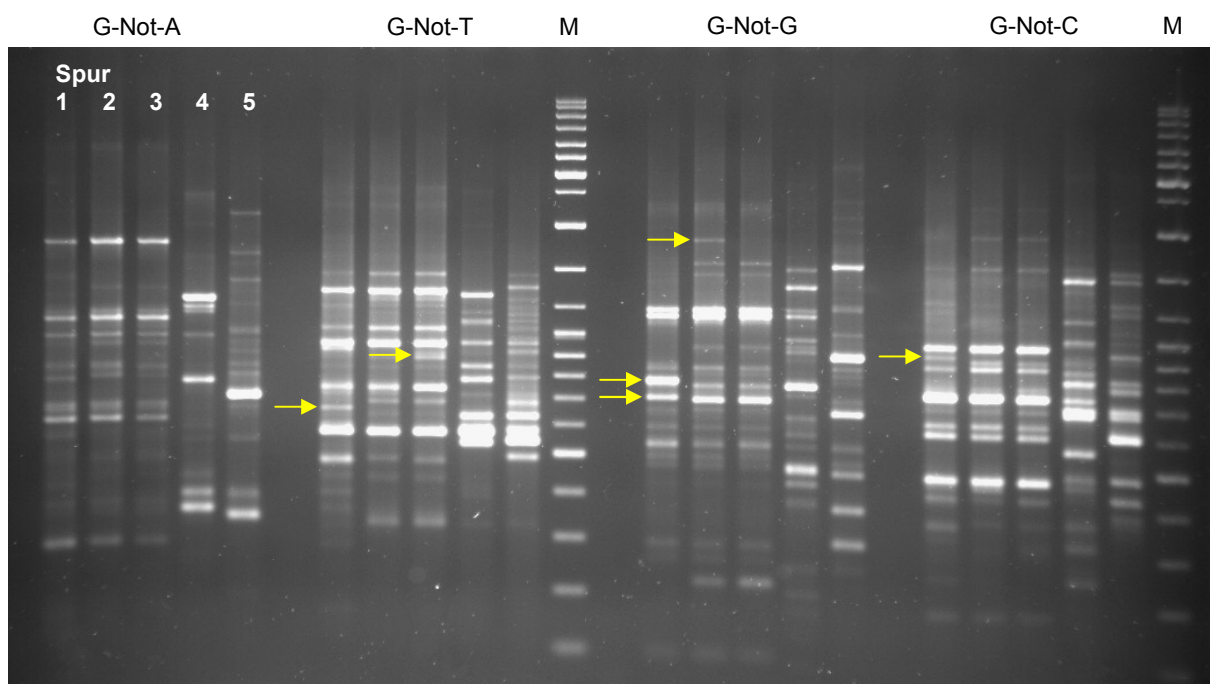


Abb. 12: nSAPD-PCR (Primer: G-Not-A/-T/-G/-C) mit den *B. cinerea*-Stämmen DSM877, DSM4709 und ATCC90769 (jeweils Spur 1-3) im Vergleich mit *S. minor* DSM63016 (jeweils Spur 4) und *M. fructigena* DSM2677 (jeweils Spur 5), M: Marker.

Mit allen verwendeten Primern war eine eindeutige Unterscheidung zwischen den untersuchten Spezies möglich. Diese neuartige Methode erlaubt zudem die Stammdifferenzierung für die untersuchten Organismen. In diesem Fall konn-

ten einzelne Unterschiede innerhalb der verschiedenen *B. cinerea*-Stämme dargestellt werden (Abb. 12, gelbe Pfeile). Hier zeigte die Anwendung des Primers G-Not für die erste Amplifikationsrunde und die nested-PCR mit den Primern G-Not-T und G-Not-G herausragende Ergebnisse. Die Anwendung des Primers G-Not-A zeigte dagegen zwar eine Speziesunterscheidung, die Stammdifferenzierung von *B. cinerea* war indes nicht möglich. Hier zeigte sich ein nahezu identisches Bandenmuster für die einzelnen *B. cinerea*-Stämme.

3.5 Laccase-Sequenzen innerhalb der Sclerotiniaceae

Parallel zur Unterscheidung der Organismen mittels der nSAPD-Technik wurde nach homologen Sequenzen innerhalb der Sclerotiniaceae gesucht, die eine ähnlich eindeutige Differenzierung ermöglichen konnten. Der Nachweis einer spezifischen genomischen Sequenz hat gegenüber der oben beschriebenen Analyse den Vorteil, dass keine Reinkulturen vorhanden sein müssen und Kultivierungsschritte im Vorfeld der PCR-Amplifikationen umgangen werden können. Aus diesem Grund wurden die homologen Gensequenzen der Laccase2 von *B. cinerea* in den anderen untersuchten Sclerotiniaceae näher analysiert.

Die Amplifikation mit den konservierten Primern MF_lac1/2F und MF_lac1/2R (Tab. 1) erbrachte für *S. sclerotiorum* DSM1946, *S. minor* DSM63016 und *M. fructigena* DSM2677 jeweils PCR-Produkte, die sequenziert werden konnten. Die Sequenzanalyse zeigte die Homologie der Sequenz zu *lcc2* von *B. cinerea*. Auf Basis dieser Sequenzen konnten die benötigten Primer zur Amplifikation der Randsequenzen stromaufwärts und stromabwärts der Kernsequenzen generiert werden. Mit Hilfe des DNA Walking SpeedUp™ Kits (Seegene, Rockville, MD, USA) war es dann möglich die flankierenden Bereiche der unbekannt Genen zu ermitteln und analysieren zu können.

Die Gensequenzen inklusive der nicht codierenden Intronsequenzen wurden durch Sequenzalignments mit der bekannten mRNA der Lcc2 von *B. cinerea* und Übersetzungen in die zugehörige Proteinsequenz ermittelt. Die Intron umfassenden Basenpaare sind in Tab. 19 zusammengefasst.

Tab. 19: Länge der Intronsequenzen bei den untersuchten Sclerotiniaceae.

	Intron 1	Intron 2	Intron 3
AF243855	52 bp	105 bp	139 bp
DSM1946	52 bp	101 bp	0 bp
DSM63016	55 bp	101 bp	0 bp
DSM2677	52 bp	73 bp	54 bp

Während die bekannte Laccase2 von *B. cinerea* (Schouten et al. 2002) eine Länge von 2039 bp mit den drei nicht codierenden Sequenzabschnitten aufweist, zeigten die verglichenen Arten diesbezüglich Unterschiede. Bei *M. fructigena* handelt es sich um ein 1931 bp langes Gen mit den drei, auch in *B. cinerea* vorhandenen Intronsequenzen. Bei *S. sclerotiorum* umfasst das Gen 1893 bp mit lediglich den ersten beiden der drei konservierten Intronpositionen. Für *S. minor* konnte eine Sequenzlänge von 1896 bp und ebenfalls diese ersten zwei Intronsequenzen ermittelt werden.

Ein Vergleich der Gensequenzen ohne die Intronabschnitte ist in Tab. 20 dargestellt. Im Gegensatz zu den ribosomalen Sequenzabschnitten sind hier größere Unterschiede innerhalb der verschiedenen Gattungen zu erkennen.

Tab. 20: Vergleich der *lcc2* codierenden Sequenzen verschiedener Sclerotiniaceae (Angaben in [%] und [bp] Homologie).

	AF243855	DSM1946	DSM63016	DSM2677
AF243855	1743	1372	1350	1399
DSM1946	78%	1740	1587	1357
DSM63016	77%	91%	1740	1338
DSM2677	79%	77%	76%	1752

3.6 *Icc2* in verschiedenen Stämmen von *Botrytis cinerea*

Der Analyse der *Icc2*-Sequenzen bei *M. fructigena*, *S. minor* und *S. sclerotiorum* folgte ein Nachweis des entsprechenden Gens in sechs verschiedenen *B. cinerea*-Stämmen. Dazu wurde die Zielsequenz mit dem Primerpaar Unilcc2_Nde1F und Unilcc2_Sal1R amplifiziert und elektrophoretisch nachgewiesen (Abb. 13). Für alle untersuchten Organismen der Gattung *Botrytis* konnte dieses Gen nachgewiesen werden. Des Weiteren ist hier deutlich die homogene Sequenzlänge von 2039 bp zu erkennen.

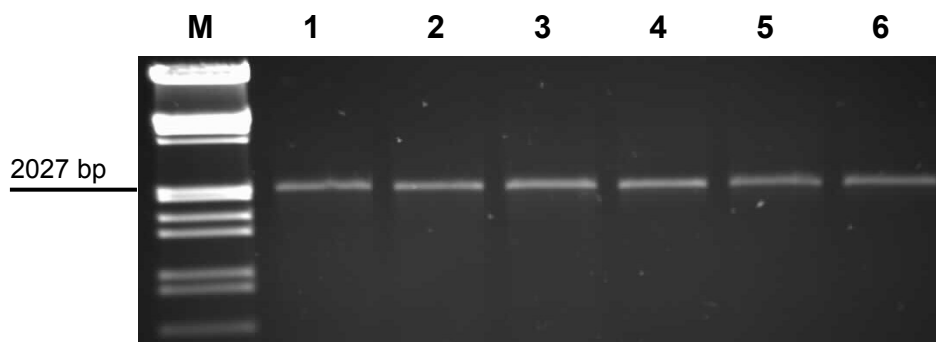
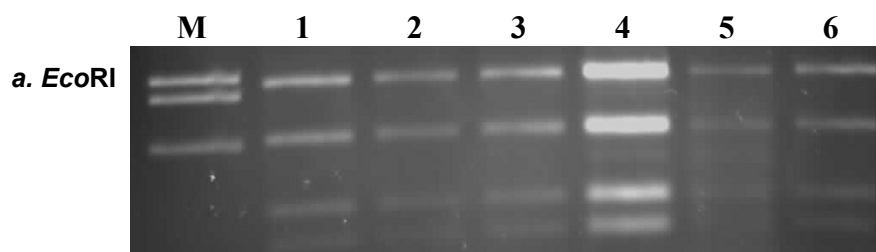


Abb. 13: PCR-Produkt der *Icc2*-Gene verschiedener *Botrytis cinerea*-Stämme. Spur M: Marker (2027 bp-Bande ist hervorgehoben); Spur 1: DSM877; Spur 2: ATCC90769; Spur 3: DSM4709; Spur 4: DSM5144, Spur 5: DSM 5145, Spur 6: Stamm1010.

3.6.1 Restriktionsanalyse der Laccase-Gene

Mit den *Icc2*-Genen der verschiedenen *B. cinerea*-Stämme wurden Restriktionsanalysen mit den Endonukleasen *EcoRI*, *Sall* und *HindIII* durchgeführt. In Abb. 14 ist zu erkennen, dass alle *B. cinerea*-Stämme ein identisches Restriktionsmuster aufweisen und davon ausgegangen werden kann, dass die Sequenzen der *Icc2*-Gene geringe Variabilitäten haben. Lediglich bei *B. cinerea* DSM5144 (Spur 5) konnte mit *HindIII* nur schwache Signale generiert werden. Dennoch stimmte auch hier das Muster mit allen anderen Organismen überein.



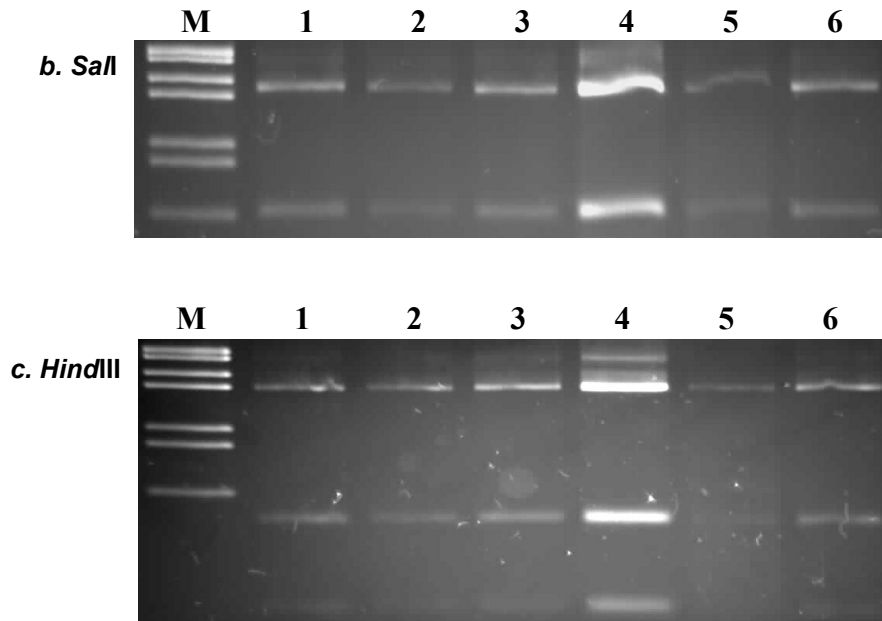


Abb. 14: Restriktionsanalyse der *lcc2*-Gene verschiedener *Botrytis cinerea*-Stämme mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* (a), *SalI* (b) und *HindIII* (c). Spur M: Marker; Spur 1: DSM877; Spur 2: ATCC90769; Spur 3: Stamm1010; Spur 4: DSM4709, Spur 5: DSM5144, Spur 6: DSM5145.

3.6.2 Multiplex-PCR für verschiedene phytopathogene Pilze

Aufgrund der starken Homologie innerhalb der ribosomalen Sequenzen und der größeren Variabilität der Laccase-Gene wurde eine neuartige und bis dato einzigartige Identifikationsmethode für die untersuchten Vertreter der Familie der Sclerotiniaceae etabliert. Dabei diente *lcc2* als Markergen für die verschiedenen Vertreter der Sclerotiniaceae. Ein universeller Reverse-Primer und jeweils ein spezifischer Forward-Primer wurden generiert (vgl. Anhang 6). Der PCR gestützte Nachweis erfolgte in einem Ansatz mit einer Mischung der DNA eines jeden Organismus. Zusätzlich wurden befallene Frucht- und Pflanzenteile aus der Umgebung von Mainz/Wiesbaden, aus Flomborn (Rheinhessen) und aus Stollberg (Sachsen) für die Anwendbarkeit dieser Technik auf Umweltproben mit in die Reaktion einbezogen. Dabei zeigte es sich, dass diese Methode eine zweifelsfreie Identifikation für die verschiedenen Arten liefern konnte und darüber hinaus auch auf Umweltproben anzuwenden war (Abb. 15).

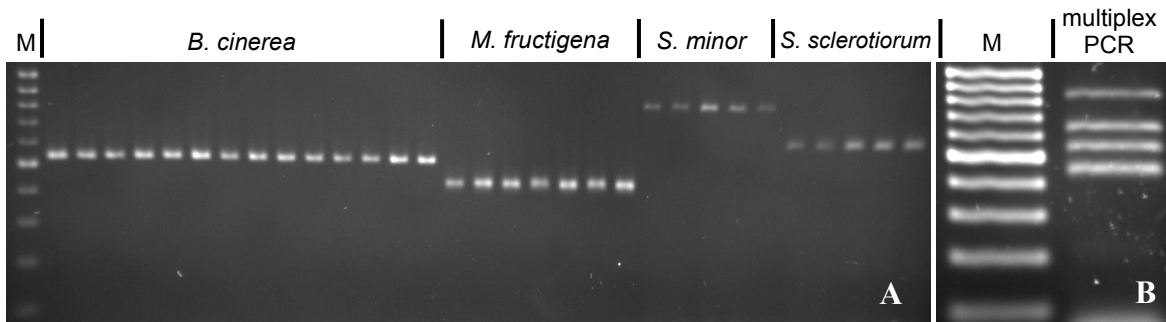


Abb. 15: A. Multiplex-PCR verschiedener Sclerotiniaceae mit *lcc2*-spezifischen Primern. B. Multiplex-PCR einer DNA-Mischung von *B. cinerea* ATCC90769, *M. fructigena* DSM2677, *S. sclerotiorum* DSM1946 und *S. minor* DSM63016.

3.7 Analyse der vorhergesagten Proteinsequenzen

Die Übersetzung der ermittelten Gensequenzen in die zugehörigen Proteinsequenzen erfolgte mit der Übersetzungssoftware auf der Homepage www.expasy.org. Die *Lcc2* von *B. cinerea* weist eine Primärstruktur von 581 aa auf. Demgegenüber wurde für *S. minor* und *S. sclerotiorum* jeweils eine Länge von 580 aa und für *M. fructigena* eine Länge von 584 aa ermittelt (vgl. Anhang 8). Die Analyse zeigte auch die konservierten Kupferbinderegionen innerhalb der Proteinsequenz (Abb. 16), die die ermittelten Gene eindeutig als Multi-Kupferoxidasen identifizierten.

	T2 T3	T3 T3	T1 T2 T3	T3 T1 T3 T1 T1
Mf_Lcc2	125 TSIHwHGIRQ 134	170 WYHSHFSL 177	465 IWHPHLLHGHDY 477	528 LHCHIAWHASEGL 540
SS_Lcc2	122 TAIHFHGIRQ 131	167 WYHSHFSL 174	461 TWHPMHLHGHDFF 473	524 LHCHIAWHASEGL 536
Sm_Lcc2	122 TAIHFHGIRQ 131	167 WYHSHFSL 174	461 TWHPMHLHGHDFF 473	524 LHCHIAWHASEGL 536
AAK77953	122 TSIHwHGIRQ 131	167 WYHSHFSL 174	462 IWHPHLLHGHDY 474	525 LHCHIAWHASEGL 537
AAK77952	116 TSIHwHGIRQ 125	161 WYHSHFIL 168	443 PNHPHLLHGHDW 477	503 MHCHIAWHASEGL 515
CAD10747	131 TAIHwHGLHQ 140	176 WYHSHFSL 183	491 LTHPHLLHGHDW 503	552 VHCHIAWHAGQGL 564
P06811	141 TSIHwHGMHQ 150	187 WYHSHFSA 194	475 LPHPHLLHGHDFL 487	547 MHCHIAWHVSGGL 559
P10574	141 TSIHwHGMHQ 150	187 WYHSHFSA 194	475 LPHPHLLHGHDFL 487	547 MHCHIAWHVSGGL 559
P78722	135 TSIHwHGLHQ 144	181 WYHSHFSA 188	474 IPHPMHLHGHDFL 486	547 FHCHIAWHVSGGL 559

Abb. 16: Sequenzausschnitt der konservierten Kupferbinderegionen (grau hervorgehoben) in der Proteinsequenz verschiedener filamentöser Pilze. Zusätzlich ist der Kupferbindungstyp (T1-T3) dargestellt. Die Nummerierung beschreibt die Position in der jeweiligen Proteinsequenz. *Mf_Lcc2* - *M. fructigena*, *SS_Lcc2* - *S. sclerotiorum*, *Sm_Lcc2* - *S. minor* *Lcc2*, *AAK77953* - *B. cinerea lcc2*, *AAK77952* - *B. cinerea Lcc1*, *CAD10747* - *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *P06811* - *Neurospora crassa*, *P10574* - *Neurospora crassa* Stamm TS, *P78722* - *Podospora anserina* Laccase II.

3.7.1 Voraussagen über mögliche Glykosylierungspositionen

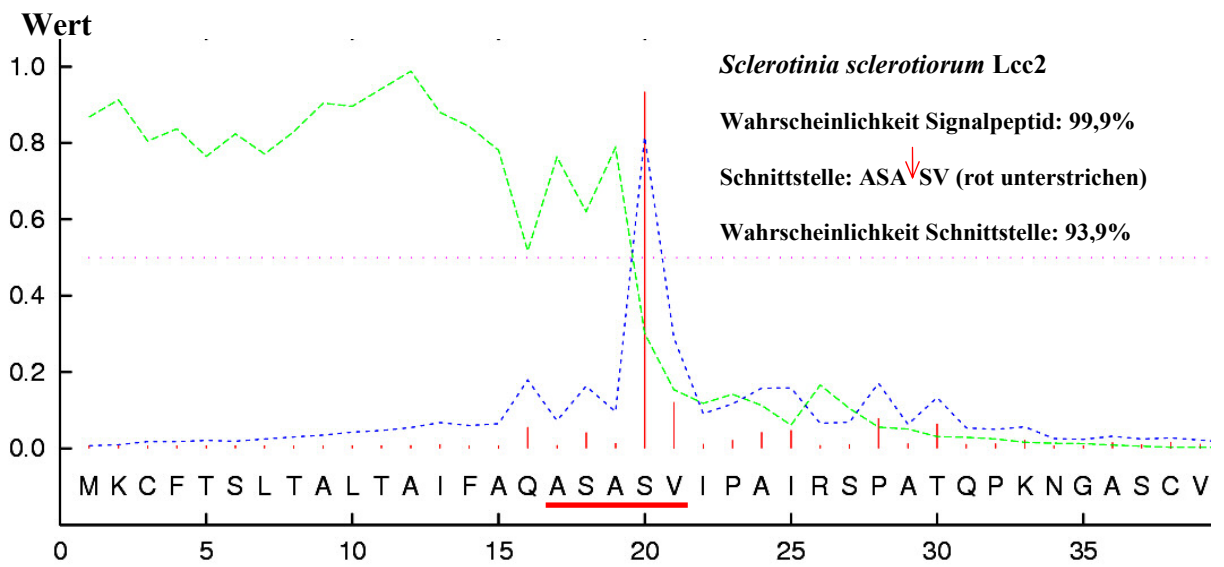
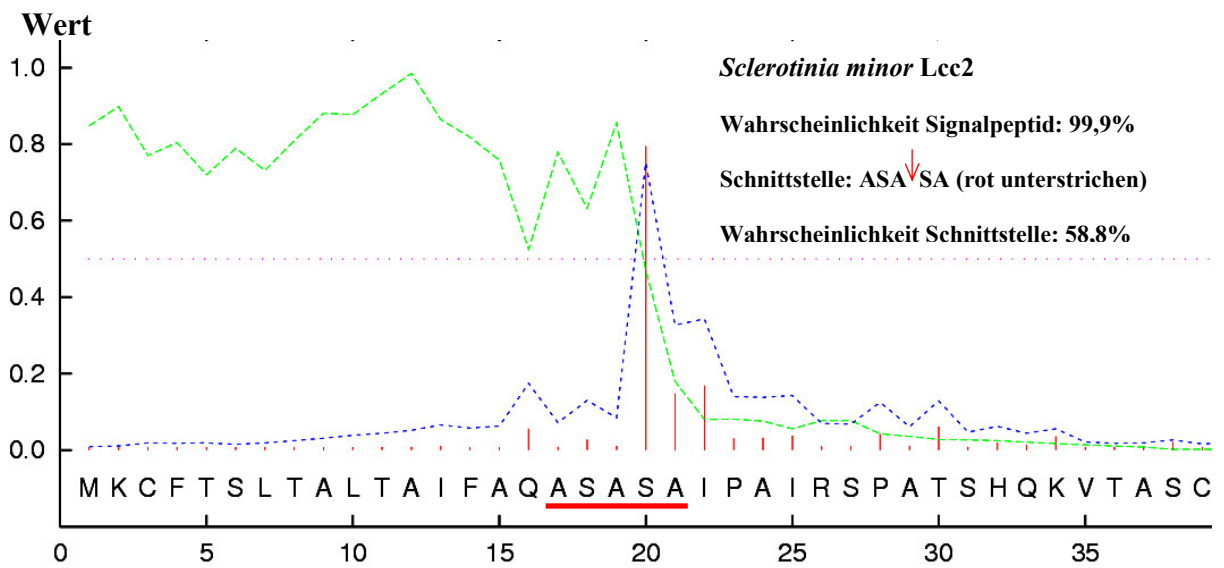
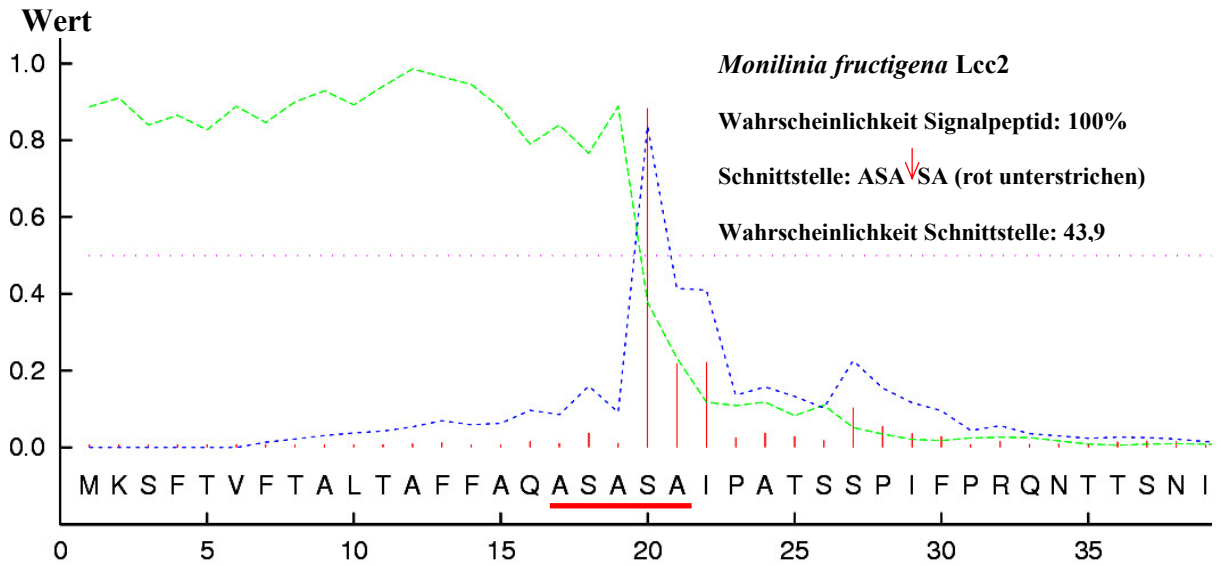
Glykosylierungen sind typische posttranslationale Modifikationen bei vorwiegend eukaryotischen Proteinen. Diese dienen hauptsächlich der Stabilisierung der Enzyme. Als typische N-Glykosylierungsstelle dient die Sequenz Asparagin – jede Aminosäure außer Prolin – Serin/Threonin (Asn–X–Ser/Thr; Nita-Lazar et al. 2005). Alle untersuchten Proteinsequenzen zeigten mehrere dieser potentiellen Glykosylierungspositionen. So existieren 11 Positionen bei *M. fructigena*, neun bei *S. minor* und zehn bei *S. sclerotiorum* (vgl. Anhang 7). So ist es wahrscheinlich, dass bei einer Expression dieser Proteine möglicherweise eine Glykosylierung stattfindet. Dieser Sachverhalt ist von anderen Laccasen zudem bereits bekannt (Baldrian 2006).

3.7.2 Signalsequenzen für den intrazellulären Proteintransfer

In der Abb. 17 auf der nächsten Seite sind die ermittelten Signalsequenzen der einzelnen Laccasen zu erkennen. Hier zeigt sich, dass alle ermittelten Proteinsequenzen für die Lcc2 der einzelnen Sclerotiniaceae mit größter Wahrscheinlichkeit eine Signalsequenz besitzen, die es ermöglicht, das unreife Protein intrazellulär zu translozieren. Auch ist die Erkennungssequenz für die Leaderpeptidase zwischen der 19. und 20. Aminosäure konserviert. Somit kann in allen drei Fällen davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Proteinen um Enzyme handelt, die nach erfolgter Translation und posttranslationaler Modifikation in das endoplasmatische Reticulum transportiert werden und dann in die extrazelluläre Matrix sezerniert werden.

Die grüne Linie in den Darstellungen beschreibt den S-Score, der die Wahrscheinlichkeit für eine Signalsequenz in der jeweiligen Primärstruktur des Proteins angibt. Die rote Linie wiederum gibt die Wahrscheinlichkeit für eine Schnittstelle an dieser Position an (C-Score). Die blaue Markierung wird als Y-Score bezeichnet und ist eine Kombination aus C- und S-Score.

Abb. 17, nächste Seite: Lokalisation der möglichen Signalpeptide der verschiedenen Laccasen inklusive der wahrscheinlichen Schnittstelle in der Primärstruktur. Dargestellt sind lediglich die ersten 40 Aminosäuren eines jedes Polypeptids.



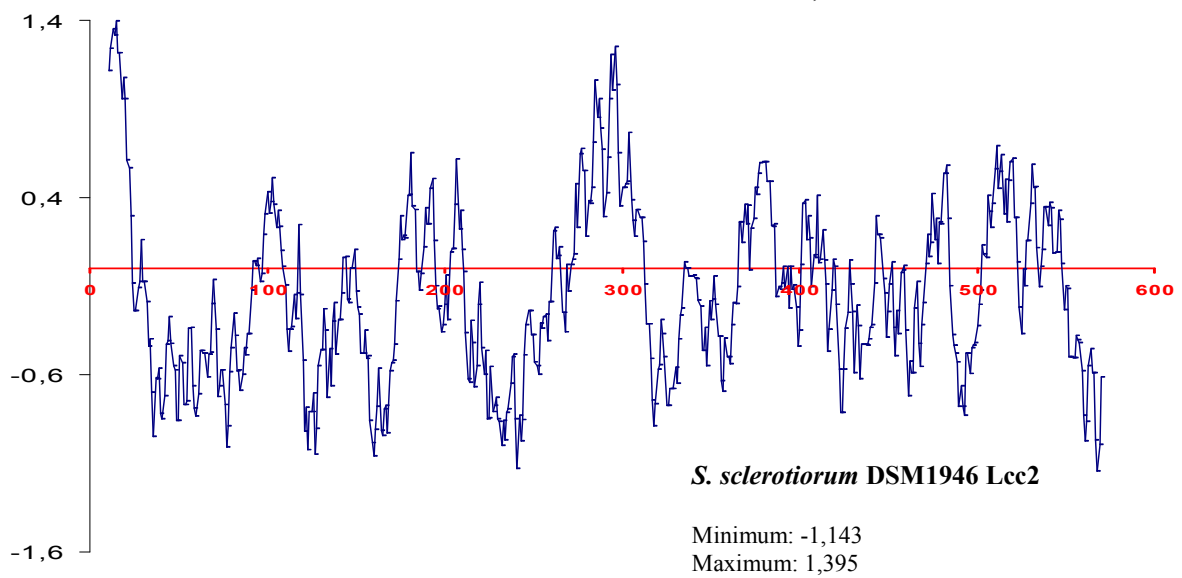
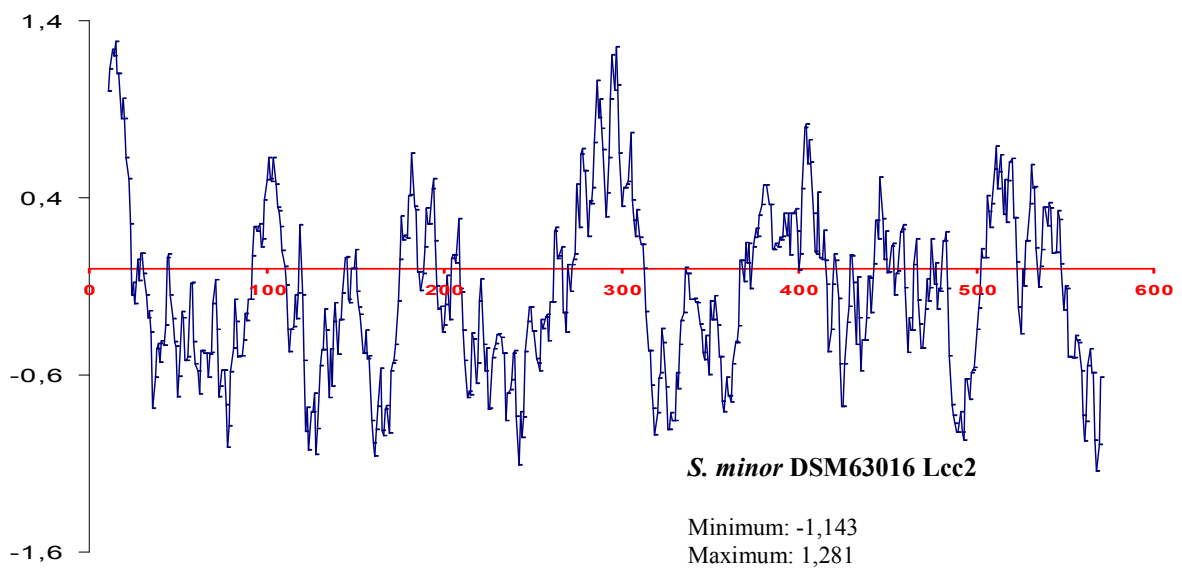
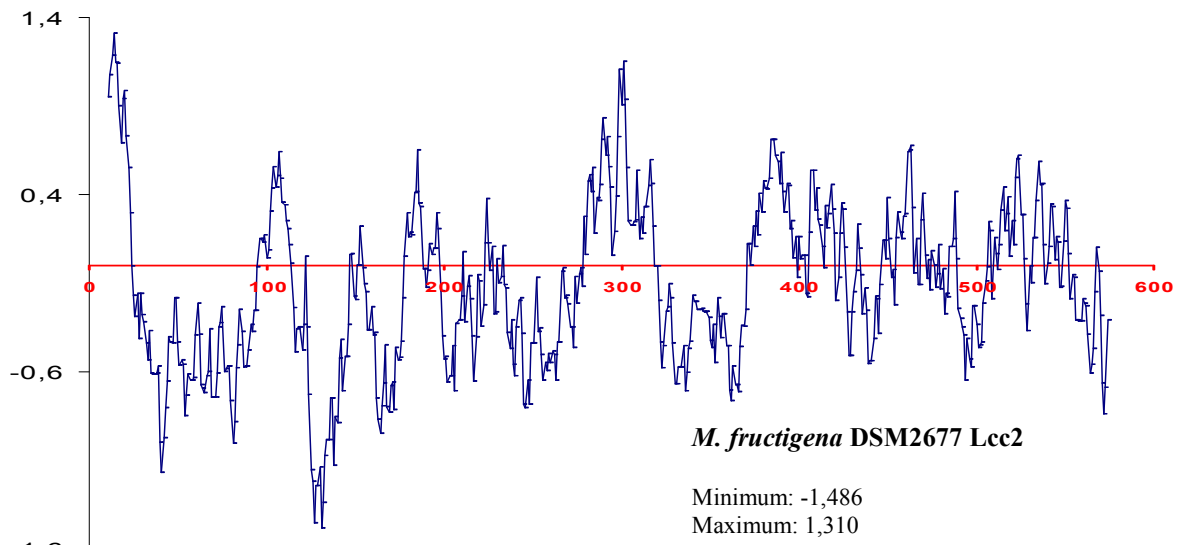
3.7.3 Hydrophobizitätsvorhersagen für die Lokalisation der Proteine

Für die einzelnen ermittelten Proteinsequenzen wurden Hydrophobizitätsplots nach Kite-Doolittle erstellt (Abb. 18). Die Analyse wurde über 21 Aminosäuren gemittelt und gibt über etwaige Membrandomänen im jeweiligen Protein Auskunft. Dafür wird eine Hydrophobizität von +1,6 als maßgebende Größe angenommen (Tetsch 2005).

Wie bereits für die DNA-Sequenzen und für die Signalsequenzen gezeigt, ähneln sich alle drei Hydrophobizitätsprofile der neuen Lcc2-Sequenzen. Die maximalen Hydrophobizitätswerte dieser Proteine werden im Bereich der N-terminalen Signalsequenz erreicht. Hier kann davon ausgegangen werden, dass diese Sequenz für die Translokation des unreifen Proteins innerhalb der Zelle verantwortlich ist. Des Weiteren ist bei allen Sequenzen eine Ansammlung hydrophober Aminosäuren im Bereich um die Position 300 und zwischen 400 und 550 zu erkennen. Da die Lcc2 von *B. cinerea* aktiv ins Medium sezerniert wird und diese Charakteristik wahrscheinlich auch für diese neuen Enzyme zutreffend ist, muss davon ausgegangen werden, dass diese hydrophoben Ansammlungen nach der Faltung im Innern des Proteins lokalisiert sind und nicht mit dem hydrophilen Umgebungsmilieu in Kontakt treten.

Abb. 18, nächste Seite: Hydrophobizitätsprofile der drei ermittelten Proteinsequenzen der verschiedenen Sclerotiniaceae.

A. *M. fructigena* DSM2677 Lcc2; B. *S. minor* DSM63016 Lcc2, C. *S. sclerotiorum* DSM1946 Lcc2. Die Min. und Max.-Werte beziehen sich auf die Hydrophobizitäten der einzelnen Aminosäuren und geben Aufschluss über die Löslichkeit des Proteins in wässriger Umgebung. Je negativer ein Wert ist, desto hydrophiler ist die Sequenz an dieser Position (rote Linie stellt den Wert 0 dar).



3.8 Qualitativer Nachweis der einzelnen Laccasen

Während die Laccase2 von *B. cinerea* charakterisiert werden konnte, wurde bislang keine Laccase aus den phylogenetisch sehr nah verwandten Arten beobachtet, noch weitergehend untersucht. Mit Hilfe von beispielsweise Kaffeesäure kann recht einfach ein qualitativer Nachweis für eventuell produzierte Phenoxidasen durchgeführt werden. Als Resultat entsteht auf einer bewachsenen Kulturoberfläche eine tiefbraune Färbung des Mediums. Von diesen Verbindungen sind zudem induzierende Wirkungen auf die Laccase-Expression beschrieben worden (Gigi et al. 1980, Bollag und Leonowicz, 1984). Auch das spezifische Substrat Syringaldazin kann hier als spezifisches Nachweisreagens herangezogen werden. Dieses färbt das Testmedium rot bis violett.

Die untersuchten Sclerotiniaceae wurden auf einer Lcc-Agaroberfläche, der 500 μ M Kaffeesäure enthielt, kultiviert. Bei den *B. cinerea*-Stämmen und *M. fructigena* zeigte sich nach fünf bis sieben Tagen Kultivierungsdauer die erwartete Färbung (Abb. 19). Demgegenüber zeigten *S. sclerotiorum* und *S. minor* keinen derartigen Nachweis. Aufgrund des genetischen Potentials beider Spezies konnte dies nicht erwartet werden. Auch nach einer Erhöhung der Kaffeesäurekonzentration und erneuter Kultivierung konnte keine Laccaseaktivität detektiert werden.

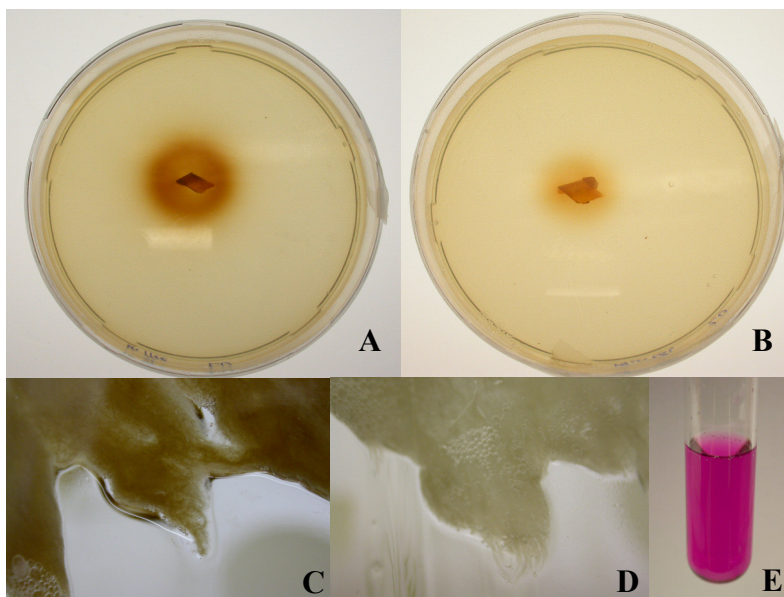


Abb. 19:

Bewachsene Agarblöckchen auf Lcc-Agar, Flüssigkulturen mit und ohne 500 μ M Kaffeesäure und Katalyse von Syringaldazin durch *M. fructigena* DSM2677.

A. *B. cinerea* ATCC90769;

B. *M. fructigena* DSM2677;

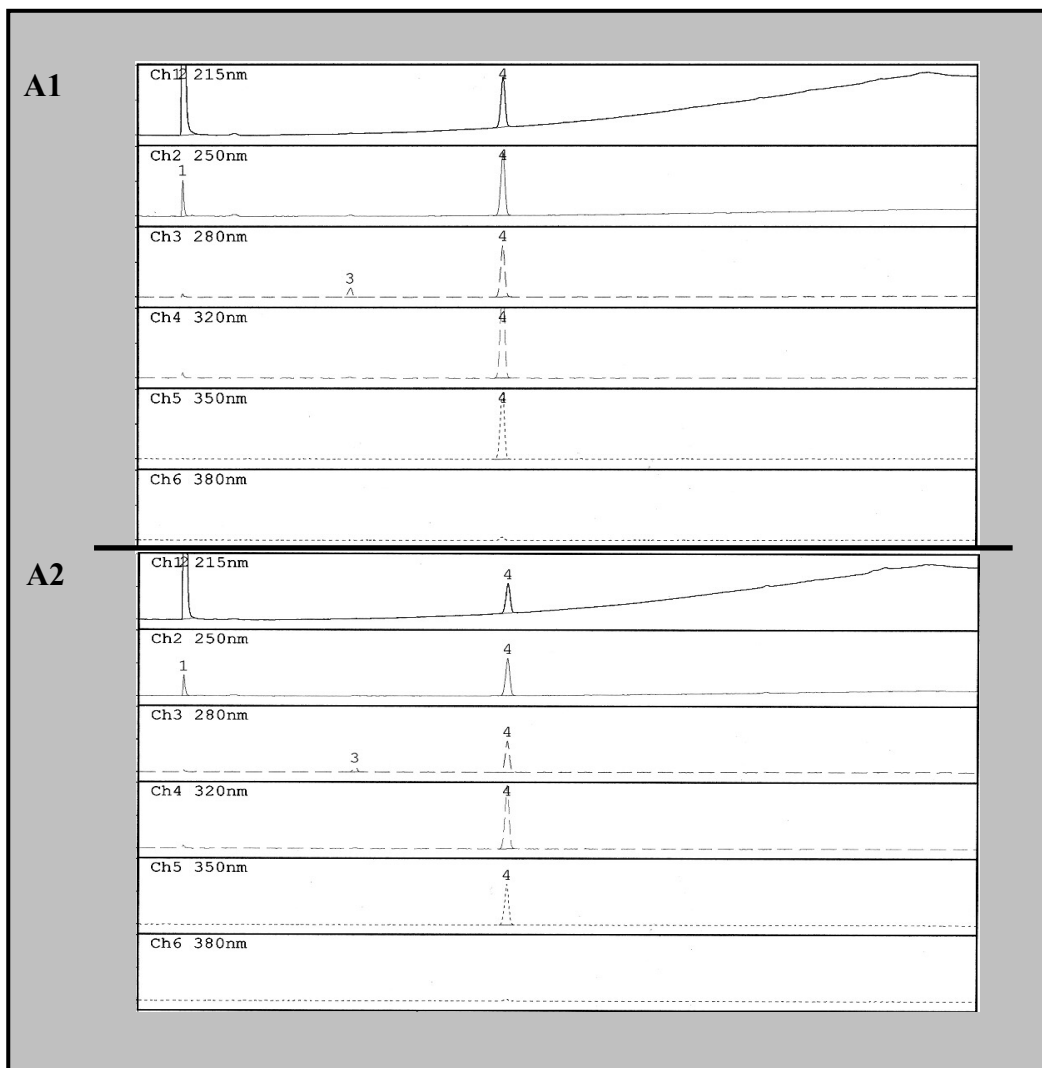
C. Mycel von *M. fructigena* mit 500 μ M Kaffeesäure inkubiert;

D. Mycel von *M. fructigena* ohne Kaffeesäure inkubiert.

E. Spezifischer Laccase-Nachweis im Überstand einer *M. fructigena*-Kultur mit Syringaldazin.

3.8.1 Nachweis des Kaffeesäureabbaus mittels HPLC

Zur Überprüfung, ob die Färbung auf einen möglichen Kaffeesäureumsatz zurückzuführen war, wurden Flüssigkulturen mit 500 µM Kaffeesäure angesetzt und täglich auf eine Reduktion des Aromatengehaltes mittels HPLC untersucht. Bei einer Polymerisation über Reaktionen von Phenoloxidasen sollte eine Abnahme der jeweiligen Konzentration über den Versuchszeitraum von 15 Tagen zu verfolgen sein. Wie erwartet zeigten die Ansätze von *B. cinerea* (nicht dargestellt) und *M. fructigena* DSM2677 einen vollständigen Abbau der Kaffeesäure (Abb. 20). Ein paralleler Abbau durch *S. sclerotiorum* und *S. minor* war indes nicht zu detektieren (nicht dargestellt). Diese Beobachtungen stehen somit im Einklang mit den Daten aus den qualitativen Laccasenachweisen und lassen auf eine aktiv exprimierte Laccase bei *M. fructigena* DSM2677 schließen.



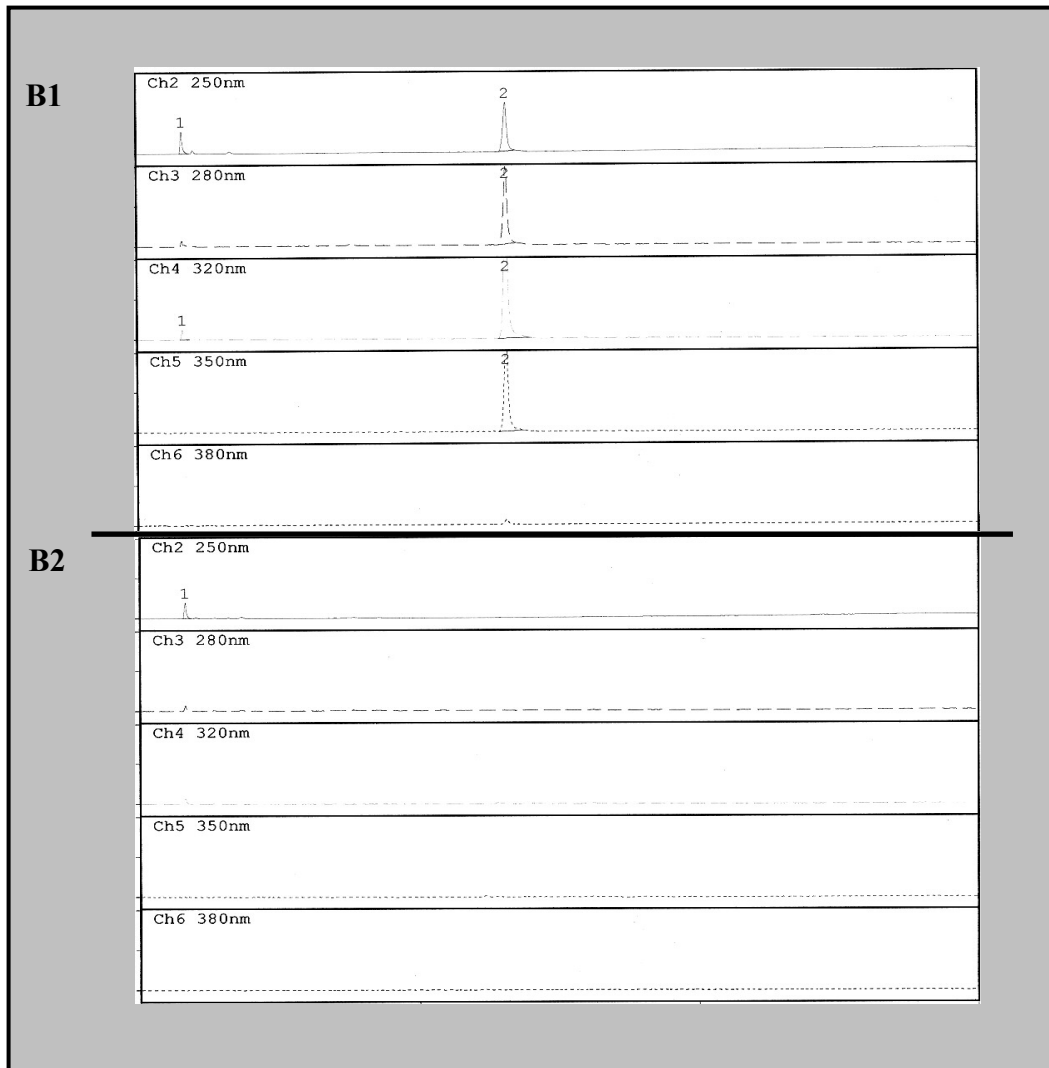


Abb. 20: Kaffeesäureabbau durch *M. fructigena* DSM2677. Im oberen Bild (A1 und A2) ist die Kontrolle ohne Kultur dargestellt, im unteren Bild (B1 und B2) die Probe mit Inokulum. Es sind jeweils die erste und die letzte Messung nach 15 Tagen dargestellt.

3.8.2 Laccase-Expression durch *Monilinia fructigena* DSM2677

Der Nachweis für eine eventuelle Induktion der Laccase von *M. fructigena* wurde mit Hilfe von verschiedenen Induktoren getestet (Abb. 21). Dazu wurden dem Medium Vanillinsäure, Kaffeesäure und 2,5-Xylidin zugegeben und nach verschiedenen zeitlichen Abständen die Kulturüberstände auf Aktivität mittels ABTS gemessen. Die Testreihen wurden in Mikrotiterplatten und die photometrische Auswertung bei 430 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplattenreaders durchgeführt.

In Abb. 21 ist zu erkennen, dass die Expression in der Kultur mit Methanol nach ca. 5 Tagen beginnt und etwa nach drei Wochen eine Plateauphase erreicht ist. Dieses Phänomen wurde schon von Schouten et al. (2002) beobachtet und gilt bei *B. cinerea* als Stressantwort auf das Lösungsmittel. In der Kultur ohne Zusatz zeigt sich erst nach ca. 10 Tagen eine detektierbare Aktivität. Für die drei Ansätze mit den potentiell induzierenden Substanzen kann man erkennen, dass die Expression zwar signifikant gesteigert ist, jedoch lediglich bei der Vanillinsäure und dem 2,5-Xylidin zu einem früheren Zeitpunkt beginnt. Da Laccasen katalytische Aktivitäten gegenüber diesen Substraten aufweisen, kann hier davon ausgegangen werden, dass sie auch die Expression des Proteins stimulieren.

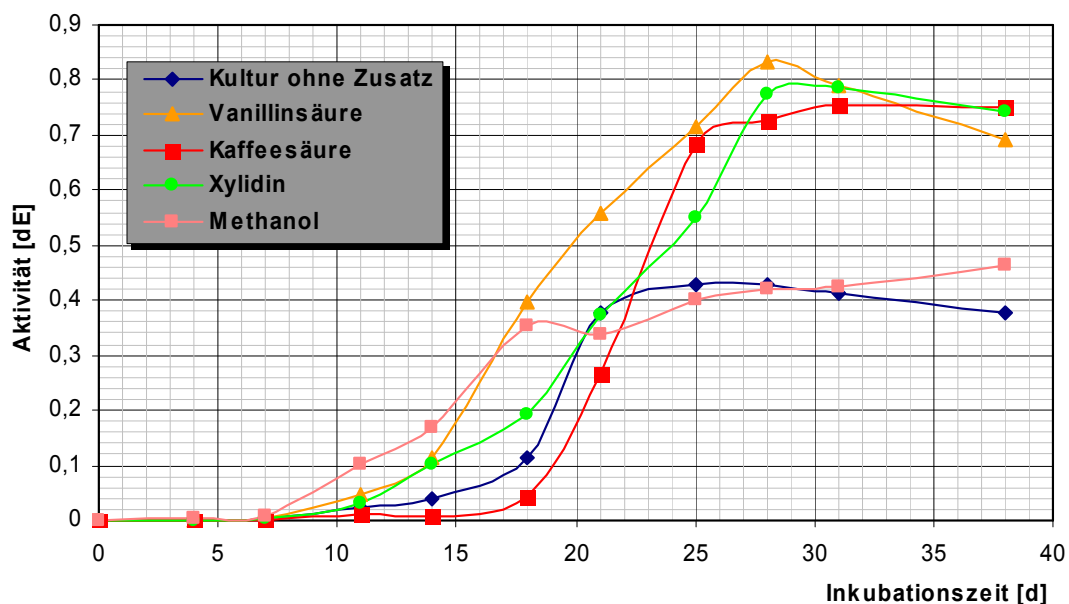


Abb. 21: Laccaseaktivität bei *M. fructigena* unter Einfluss einiger aromatischer Verbindungen.

3.8.3 Isoelektrische Fokussierung der extrazellulären Proteine

Die isoelektrische Fokussierung in einem pH-Gradienten zeigte die Aktivität der von *M. fructigena* sezernierten Phenoloxidase im pH-Bereich von 4,31 bis 4,37. Darüber hinaus waren noch schwache Aktivitäten bis pH 4,19 bzw. pH 5,67 nachweisbar. Diese Messung wurde mit einem angereicherten Kulturüberstand durchgeführt. An dieser Stelle muss jedoch festgehalten werden, dass hier

möglicherweise mehr als eine aktive Laccase erfasst wurde, die in ähnlichen pH-Bereichen ihre Ladungsneutralität zeigen. Des Weiteren war bei höheren pH-Werten keine Aktivitäten nachweisbar. Somit kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass *M. fructigena* Laccasen sezerniert, die im sauren Milieu ihre optimalen Aktivitäten zeigen.

3.8.4 SDS-PAGE und Glykoproteinfärbung des Kulturüberstands

Mit einem, über eine Separationssäule, angereicherten Kulturüberstand wurde eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Nach dem Gellauf erfolgte eine qualitative Aktivitätsmessung mit ABTS. Dazu wurde das Substrat in verflüssigte Agarose eingerührt. Anschließend erfolgte eine Überschichtung des Polyacrylamidgels mit der Suspension. Die Aktivität konnte nach kurzer Inkubation anhand der grünlichen Färbung ermittelt werden. In Abb. 22 ist deutlich zu erkennen, dass die aktive Bande bereits kurz nach Eintritt in das Trenngel ihre endgültige Lage erreicht hat und einen leichten Schmier zeigt. Dies könnte möglicherweise an vielfachen Glykosylierungen des Proteins liegen, die den Lauf des Enzyms im Gel beeinträchtigen. Aus diesem Grund wurde eine Glykosylierungsfärbung mit dem angereicherten Kulturüberstand durchgeführt. In Abb. 22 ist die Glykosylierungsfärbung mit der Aktivitätsmessung in der SDS-PAGE dargestellt. Im Bereich der aktiven Zone zwischen 80 und 124 kD finden sich auch die glykosylierten Proteine des Kulturüberstandes (Abb. 22). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die aktive Laccase tatsächlich in glykosylierter Form von *M. fructigena* DSM2677 ins Medium sezerniert wird.

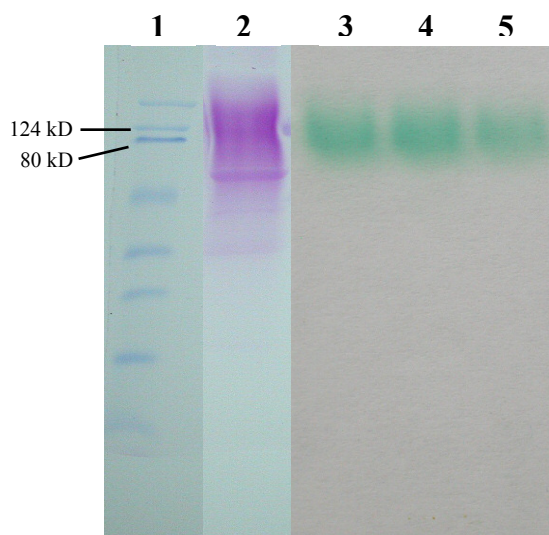


Abb. 22: Kombinierte Gelfotos der SDS-PAGE mit einem angereicherten Kulturüberstand von *M. fructigena*.
Spur 1: Marker;
Spur 2: Glykosylierungsfärbung;
Spur 3 – 5: Aktivitätsfärbung mit ABTS.

3.9 Detektion der Lcc2-codierenden mRNA

Da die Expression der Lcc2 durch *B. cinerea* bereits bekannt ist, wurde auch für *M. fructigena* die Expression dieses Proteins angenommen. Nach 20-tägiger Inkubation in Lcc-Medium mit 500 µM Kaffeesäure wurde eine RNA-Extraktion durchgeführt und mittels Reverser-Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dabei wurde zum einen spezifische *lcc2*-Primer als auch Poly-T-Primer verwendet. In allen Ansätzen war zu keiner Zeit eine mRNA zu detektieren. Dies legt den Schluss nahe, dass *M. fructigena* eine andere Laccase als Lcc2 ins Medium sezerniert.

4. Diskussion

4.1 *B. cinerea* ATCC90769 und die β -Glucansynthese

Die Synthese von extrazellulärem β -Glucan ist ein Charakteristikum der Sclerotiniaceae. Neben *B. cinerea* ATCC90769, *S. sclerotiorum* DSM1946 und *M. fructigena* DSM2677 ist auch *S. minor* DSM63016 in der Lage, dieses Exopolysaccharid zu produzieren und in das umgebene Medium abzugeben. Dabei kommt den Kulturbedingungen eine besondere Wichtigkeit zu. Hier sind überdurchschnittlich gute Sauerstoffversorgung durch Schütteln in Schikanekolben und eine Kohlenstoffquelle in Form von Glucose für die Synthese von nicht adhärentem β -Glucan unabdingbar. In Standkulturen dagegen bilden diese Ascomyceten lediglich einen geringen Anteil des β -Glucans, das als adhärentes Polymer den Hyphen aufliegt und nicht vollständig abzulösen ist.

4.2 Lyse des β -Glucans

Der an Polymerabbau angepasste Ingestinaltrakt der Termiten stellt ein sensibles Gemisch unterschiedlichster Mikroorganismen dar (König et al. 2002), die auf den Abbau von komplexen Polymeren wie Cellulose und Hemicellulosen angepasst sind. Eine Konditionierung auf lediglich ein bestimmtes Substrat und die damit einhergehende Anreicherung einer oder weniger Spezies konnte in dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden. Aus fünf verschiedenen Termiten konnten acht verschiedene filamentöse Pilze isoliert werden, die auf eine mögliche glucanolytische Aktivität hin untersucht wurden. Hier zeigte keiner dieser Organismen die geforderte Eigenschaft. Bei diesen Ascomyceten und Zygomyceten handelt es sich ausnahmslos um weit verbreitete Bodenorganismen. Da aus drei verschiedenen Termiten jeweils nur der filamentöse Ascomycet *Paecilomyces variotii* isoliert wurde gaben diese Ergebnisse anfänglich Grund für eine positive Beurteilung der Experimente. Zu Beginn nahmen wir an, dass sich durch die Fütterung mit dem β -Glucan dieser Organismus gegenüber anderen Darmorganismen durchgesetzt hatte und das β -Glucan verwerten konnte. Bei weitergehender Be-

trachtung führten die Experimente zu keinen erfolgreichen Ergebnissen. Des Weiteren zeigten die Termiten im Laufe der Fütterungsexperimente eine sich verschlechternde Konstitution was hauptsächlich an Körperverfärbungen und Verlangsamungen der Bewegungen zu erkennen war. Der Grund könnte möglicherweise in einer Unverträglichkeit des β -Glucans liegen. Für den Termitendarm stellt das β -1,3-1,6-Glucan wahrscheinlich ein untypisches Substrat dar. Lediglich Hafer und Gerste zeigen derartig vernetzte Glucane in der Zellwand (Yun et al. 2003). Die Seitenketten sind jedoch nicht β -1,6-glykosidisch, sondern β -1,4-glykosidisch verknüpft. Da Termiten sich hauptsächlich von Holz ernähren, könnte ein Grund für die sich verschlechternden Konstitution in der fehlenden Fähigkeit der β -Glucanolyse liegen. Ohne diese ist es den Insekten nicht möglich, ihren Energiebedarf aus dem Polysaccharid zu decken und so ihre intakte Darmflora aufrecht zu erhalten. Diese Veränderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Gemeinschaft konnte auch beobachtet werden. Die mikroskopische Kontrolle zeigte nach der Darmentnahme und Suspension der Mikroorganismen wenige bis keine der sonst reichlich vorhandenen Flagellaten mehr und auch eine Vielzahl der sonst stark beweglichen Spirochaeten war regungslos und möglicherweise abgestorben.

Bislang sind lediglich eine geringe Anzahl von filamentösen Pilzen aus dem Darmtrakt von Termiten isoliert worden (König und Varma 2006). Hier sind an erster Stelle Spezies der Gattung *Trichoderma* aus *Reticulitermes flavipes* zu nennen, die für eine glucanolytische Aktivität bekannt sind (de la Cruz et al. 1995a, b). Dieser Sachverhalt zeigt, dass durchaus filamentöse Pilze existieren, die eine glucanolytische Charakteristik zeigen und im Termitendarm nachgewiesen werden können. Dies bedeutet jedoch nicht zwingend, dass ein Termitendarm auf ein bestimmtes Substrat konditioniert und Organismen angereichert werden können. Als eine weitere Möglichkeit würde sich an dieser Stelle eine Tötung mit direkter Darmentnahme anbieten. Diese Experimente wurden zwar ebenfalls durchgeführt, zeigten jedoch ähnliche negative Ergebnisse und wurden nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassend kann man postulieren, dass sich während der Fütterungen nicht die am besten angepassten Organismen im Termitendarm etablierten, sondern wahrscheinlich solche, die über einen längeren Zeitraum ohne Substratangebot überdauern konnten bzw. eine Darmpassage durchliefen.

4.3 Immunologie des β -Glucans

Dass β -Glucane immunmodulatorische Eigenschaften aufweisen ist schon seit längerer Zeit bekannt. Allerdings unterscheiden sich diese Polymere trotz des gleichen β -1,3-glykosidisch verknüpften Rückgrates durch unterschiedliche Vernetzungsgrade und Molekulargewichte (Brown 2006). Zu Beginn dieses Jahrhunderts konnte Dectin-1 als Rezeptor für diese Polymere auf Macrophagen und dendritischen Zellen identifiziert werden (Brown und Gordon 2001, 2003).

β -Glucane kann man in der Umwelt hauptsächlich in Zellwänden von filamentösen Pilzen und Hefen vorfinden (Leung et al. 2006). Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass dieses Polymer immunmodulatorische Wirkung aufweist. Dabei wird das β -Glucan von so genannten „pattern recognition receptors“ (PRR) gebunden. Dazu gehören die toll-like Rezeptoren 2 und 6 (TLR) sowie der non-TLR Dectin-1. Diese Rezeptoren binden konservierte Muster, die eine Vielzahl von Mikroorganismen auszeichnen und lösen damit die angeborene unspezifische Immunantwort im menschlichen Organismus aus. Auf der Basis dieser Ergebnisse entstand in der Folgezeit ein wachsender Markt von β -Glucan aus Zellwandextrakten von *Saccharomyces cerevisiae*. So weist beispielsweise die Zellwand von *S. cerevisiae* einen β -Glucangehalt von 28 bis 46 % auf. Die übrigen Bestandteile sind hauptsächlich Chitin (1,4 bis 7,9 %) und Mannan (28 bis 46 %) (Aguilar-Uscanga und Francois 2003). Zwar kann man Hefen und filamentöse Pilze in großem Maßstab züchten, die Extraktion der Zellwandbestandteile gestaltet sich dennoch als aufwendig. Aus diesem Grund sind eine Vielzahl von Extraktionstechniken entwickelt worden. Diese reichen von einer sauren bis zur alkalischen Lyse oder dem Herauslösen der Zellwandbestandteile mit heißem Wasser. Allen gemein ist jedoch die Extraktion von unreinem β -Glucan, das aufgrund des heterogenen Aufbaus der jeweiligen Zellwände unumgänglich ist.

In diesem Zusammenhang ist die Ernte des extrazellulären β -Glucans der Sclerotiniaceae wesentlich effizienter, kostengünstiger und einfacher durchzuführen. Da diese Ascomyeten das Polysaccharid in das Medium abgeben, müssen aufwendige Extraktionen nicht durchgeführt werden. Des Weiteren produziert *B. cinerea* ATCC90769 ein nahezu reines β -Glucan (Stahmann et al. 1995), das in diesem Sinne industriell genutzt werden könnte. Allerdings fehlen

bislang Studien, die eine fördernden Wirkung auf die menschliche Gesundheit beweisen könnten.

4.4 Das Glucan als Virulenzfaktor

Die Synthese von β -Glucan durch alle untersuchten Sclerotiniaceae kann mit der bereits beschriebenen Schutzfunktion in Anwesenheit von potentiell antifungal wirkenden Agenzien, wie beispielweise Glucanasen oder Phytoalexinen, erklärt werden (van Etten et al. 1989, Gil-ad et al. 2001). Auch wirkt sich das β -Glucan auch auf die Viskosität des umgebenen Milieus aus. So ist es durchaus wahrscheinlich, dass dieses Exopolymer als eine Art Virulenzfaktor gegenüber Pflanzen betrachtet werden kann. Es fungiert als Trägersubstanz für, von *B. cinerea*, sezernierte Exoenzyme, die phytopathogene Funktionen ausüben (Doss et al. 2003). Dies sind vor allem Superoxiddismutase, β -Glukosidase, Proteinase, Pektin-Methylesterase, Polygalakturonasen und Phenoloxidasen (Staples und Mayer 1995, Rolke et al. 2004). Das u. a. Phenoloxidasen eine gewichtige Rolle im Pathogenitätsmechanismus von *B. cinerea* haben, ist seit Bar-Nun et al. (1988) bereits bekannt.

Da die Sclerotiniaceae eine Familie mit wichtigen und weit verbreiteten phytopathogenen Arten darstellen, ist es weiterhin kaum verwunderlich, dass sie Sequenzen im Genom besitzen, die über ein Arsenal verschiedener Multi-Kupfer-Oxidasen codieren können. Auffälliger ist hingegen die Tatsache, dass bislang niemand solche Laccasen entdeckt noch deren Aktivität nachweisen konnte. Lediglich für *B. cinerea* ist die Lcc2 bereits identifiziert und charakterisiert (Schouten et al. 2002). Da zusätzlich auch die Vertreter der Gattungen *Monilinia* und *Sclerotinia* Pflanzenschädlinge sind, wurde in der vorliegenden Arbeit nach Laccase-Sequenzen bei diesen Organismen gesucht und drei bis heute unbekannte Sequenzen vollständig identifiziert.

4.5 Laccasen innerhalb der Sclerotiniaceae

Da Laccasen zwischen verschiedenen Ascomyceten einen geringen Konservierungsgrad von maximal 76 % aufweisen (Bulter et al. 2003) war die Identifikation dieser Sequenzen äußerst problematisch. Mit Hilfe der konservierten Kupferbindestellen konnten drei zur *lcc2* von *B. cinerea* homologe Laccasesequenzen in *M. fructigena*, *S. sclerotiorum* und *S. minor* nachgewiesen und identifiziert werden. Die Sequenzunterschiede der codierenden Bereiche lagen zwischen 91 % und 79 %. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieses Gen in allen sechs hier untersuchten *B. cinerea*-Stämmen lokalisiert ist.

Da seit kurzer Zeit die Kompletengenome von *B. cinerea* und *S. sclerotiorum* online verfügbar sind (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fgi/>) konnte im Folgenden auch nach anderen möglichen Multi-Kupfer-Oxidasen gesucht werden. Im Genom von *B. cinerea* fanden sich 13 verschiedene Sequenzen, die derartige Enzyme codieren können. Bei *S. sclerotiorum* konnten dagegen acht verschiedene Sequenzen ermittelt werden. Zwar liegen für *M. fructigena* und *S. minor* keine kompletten Genomsequenzen vor, doch ist es wahrscheinlich, dass auch hier mehrere codierende Bereiche vorhanden sind. Dies könnte ein Grund für die verschiedenen Expressionsmuster sein. Die stets fehlende Expression bei den beiden Spezies der Gattung *Sclerotinia* erklärt dieser Sachverhalt jedoch nicht. Möglicherweise wurden entweder nicht die geeigneten Kulturbedingungen geschaffen oder diese Spezies benötigen aufgrund ihres Wirtsspektrums bzw. ihres Infektionsweges an bestimmten Pflanzenteilen keine aktive Phenoloxidase zur Polymerisation pflanzeneigener Aromaten. Da *S. sclerotiorum* ausschließlich alte bzw. tote Pflanzenteile parasitiert, könnte hier ein Grund für die fehlende Expression liegen (Hegedus und Rimmer 2005). Im Gegensatz dazu infizieren *Monilinia* und *Botrytis* gesunde Frucht- und Pflanzenstände, die über eine aktive Immunantwort und eine hohe Konzentration sekundärer Pflanzenstoffe verfügen.

Demnach wären diese codierenden Sequenzen bei *Sclerotinia* spec. lediglich still gelegte Gene, die nur noch im Genom vorhanden sind aber keine Funktion mehr aufweisen. Ähnlich verhält es sich beispielsweise mit der *Lcc1* von *B. cinerea* (Schouten et al. 2002). Auch hier konnte bislang keine Expression nachgewiesen werden. Wahrscheinlich handelt es sich auch in diesem Fall um ein

stummes Gen, dessen Aktivität dem Pilz möglicherweise keinen Nutzen bringt und dementsprechend nicht exprimiert wird.

4.6 Laccase-Sequenzen und deren postulierte Eigenschaften

Mit Hilfe der DNA-Sequenzen für die Lcc2 der verschiedenen Sclerotiniaceae wurden die jeweiligen Proteinsequenzen ermittelt und auf eine Homologie zueinander hin untersucht. Hier konnten in allen Fällen die vier konservierten Kupferbindestellen identifiziert werden und durch den Vergleich mit weiteren Phenoloxidasen aus anderen Ascomyceten den Laccasen zugeordnet werden.

In weiteren Schritten wurden mögliche N-Glykosylierungspositionen nach der konservierten Struktur A-X-S/T (X – alle Aminosäuren außer Prolin) bestimmt. Hier zeigte sich, dass alle Primärstrukturen mehrere dieser Positionen aufwiesen. Diese Tatsache spricht, wie auch bei anderen Laccasen bereits beschrieben, für mögliche Glykosylierungen. Dies zeigte auch die Glykosylierungsfärbung der extrazellulären Proteine von *M. fructigena* DSM2677. Im Bereich der Aktivität des Enzyms konnten glykosylierte Proteine nachgewiesen werden. Die Glykosylierungen dienen im Allgemeinen der Stabilität des Enzyms in der extrazellulären Matrix (Cai et al. 2005). Dennoch müssen diese ermittelten Positionen *in vivo* nicht zwangsläufig Glucanreste tragen (Kiiskinen und Saloheimo 2004). Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen jedoch, dass mehrere dieser Positionen in allen bestimmten Sequenzen vorhanden sind, von denen mit großer Wahrscheinlichkeit einige glykosyliert sind.

Für alle Sequenzen konnte zudem mit der Software SignalIP eine Signalsequenz ermittelt werden, die Aufschluss über die mögliche Lokalisation des reifen Proteins gibt. Zwar existiert keine eindeutige Konsensussequenz für diesen Bereich, doch gilt als sicher, dass die Ansammlung hydrophober Aminosäuren für den Transport des Enzyms ins endoplasmatische Retikulum und darüber hinaus ins Medium verantwortlich ist. Für alle Sequenzen konnte eine mindestens 99,9 %-ige Wahrscheinlichkeit für eine Signalsequenz, die zwischen der 19. und 20. Aminosäure abgespalten wird, gefunden werden. Somit handelt es sich hier mit größten Wahrscheinlichkeiten um Proteine, die ins Medium sezerniert werden können.

Des Weiteren zeigen die Hydrophobizitätsplots nach Kite-Doolittle sehr ähnliche Profile zwischen den einzelnen Primärstrukturen der Proteine. Negative Bereiche zeigen dabei hydrophile, positive Bereiche dagegen hydrophobe Abschnitte innerhalb einer Primärstruktur an. Da ein Wert von etwa +1,6 für membranständige Proteine angenommen wird, muss nach der Analyse diese Lokalisation der Laccasen verneint werden. Einzig die Signalsequenzen direkt nach den Startcodons zeigen derart hydrophobe Eigenschaften. Weitere stark hydrophobe Bereiche sind um die Aminosäureposition 300 lokalisiert. Diese müssen dem jeweiligen Enzym jedoch nicht zwanghaft einen hydrophoben Charakter verleihen. Da die Software lediglich die Primärstruktur des Proteins, nicht jedoch die dreidimensionale Faltung in die Analyse mit einbezieht, kann daraus nicht zwangsläufig auf einen generell hydrophoben Charakter des Enzyms geschlossen werden. Aus diesem Grund scheint es wahrscheinlicher, dass diese Bereiche im Zentrum des Moleküls liegen und gegen die hydrophile Umgebung abgeschirmt werden.

4.7 Laccase-Expression

Während *S. sclerotiorum* und *S. minor* zu keiner Zeit eine Laccaseaktivität zeigten, wurde im Kulturüberstand von *M. fructigena* DSM2677 eine konstitutive Expression mit dem spezifischen Substrat Syringaldazin festgestellt. Da zusätzlich eine mögliche DNA- und Proteinsequenz identifiziert werden konnte, sollte im Weiteren die zugehörige mRNA aus den Hyphen isoliert und mittels Reverser Transkription in eine cDNA übersetzt werden. Trotz mehrfacher Versuche ließ sich kein Anhaltspunkt für die Expression des von *B. cinerea* aktiv exprimierten Homologons der Lcc2 bei *M. fructigena* finden. Damit gilt als sehr wahrscheinlich, dass *M. fructigena* für mehr Laccasen als die Lcc2 codieren kann. Dieser Sachverhalt ist bei *B. cinerea* und *S. sclerotiorum* bereits bestätigt und könnte des Weiteren auch für *S. minor* zutreffen. Dennoch konnten anhand der *lcc2*-Sequenzen Unterschiede zwischen den untersuchten Spezies ausgemacht werden und darüber hinaus einer universell einsetzbaren Identifikationsmethode zugeführt werden.

Die fehlende Expression von Laccasen durch die Arten der Gattung *Sclerotinia* verwundern bei Betrachtung der Funktion von Laccasen. Diese Phenoloxidasen sind im Allgemeinen an der Bildung von Melanin beteiligt. Dieses Pig-

ment konnte auch in extrazellulären Matrix von *B. cinerea* ausgemacht werden (Doss et al. 2003). Im Weiteren kann Melanin auch in den dunkel pigmentierten Sklerotien nachgewiesen werden. In Abb. 2 und 4 kann man auch bei *S. minor* und *S. sclerotiorum* diese typischen schwarzen Dauerstadien erkennen. Da diese Arten jedoch keine Laccaseexpression zeigten, bleibt die Frage wie Melanin durch diese Organismen gebildet wird. Eine mögliche Antwort dieser Frage könne in der Existenz einer Tyrosinase liegen. Während *B. cinerea* kein Gen für ein derartiges Enzym im Genom aufweist, zeigt *S. sclerotiorum* eine 673 aa umfassende und durch sieben Introns unterbrochene Sequenz für ein derartiges Protein. Das komplette Gen ist im Ganzen 2019 bp lang. Somit ist vorstellbar, dass *S. sclerotiorum* und *S. minor* aus 1,8-Dihydroxynaphthalen mittels einer Tyrosinase das pilztypische DHN-Melanin (Butler und Day 1998) synthetisieren und somit die Sklerotien schwarz erscheinen. Dies würde auch die fehlende Aktivität gegenüber den Laccase-spezifischen Substraten ABTS und Syringaldazin erklären. Allerdings konnte in den HPLC-Analysen keine Abnahme der Kaffeesäure detektiert werden, die ein Zwischenprodukt während der Melaninsynthese ist. Es konnte darüber hinaus aber auch keine Sklerotienbildung in diesen Kulturen beobachtet werden. Daraus ist möglicherweise zu schließen, dass die Enzyme, die für die Melaninsynthese in *Sclerotinia* spec. verantwortlich sind, lediglich zu bestimmten Zeiten exprimiert werden und aus diesem Grund nicht nachzuweisen waren.

4.8 Identifikation von filamentösen Pilzen

Gegenwärtig ist die Identifikation von filamentösen Pilzen noch problematisch. Die morphologische Pilzbestimmung setzt eine langjährige Erfahrung und ein detailliertes Hintergrundwissen voraus um die meist mikroskopischen Unterschiede zwischen einzelnen Gattungen und/oder Spezies zu beobachten. Moderne molekularbiologische Identifikationstechniken, die sich im Allgemeinen auf genomische Sequenzbereiche beziehen, sind im Reich der Pilze oftmals von mangelnder Aussagekraft. Als ein derartiges Beispiel kann hier die Fachdiskussion zwischen Bridge et al. (2003, 2004), Holst-Jensen et al. (2004) und Hawksworth (2004a) in der 161. Ausgabe der Fachzeitschrift *New Phytologist* aus dem Jahr 2004 angeführt werden. Diese Diskussion bezieht sich u.a. auf Sequenzen der

Internal Transcribed Spacer Region einiger Vertreter der Sclerotiniaceae, die Bridge et al. in einer Publikation aus dem Jahr 2003, ebenfalls erschienen in der 160. Ausgabe des *New Phytologist*, als fehlerhafte Identifikationen beschrieben. Dabei gingen Bridge et al. (2003) nach einer allgemein üblichen Sequenzabfrage in Datenbanken vor, ohne dabei jedoch die Morphologie der angesprochenen Spezies untersucht zu haben.

Die Fachdiskussion zwischen den einzelnen Parteien endete mit einer Revision der Ergebnisse von Bridge et al. (2003) und einem Artikel von Hawksworth (2004a), der anmerkte, dass nicht ausschließlich die Sequenzierung, sondern auch eine Kultivierung mit morphologischer Bestimmung durchgeführt werden müsse.

Die Kultivierung der oft unzureichend identifizierten Pilze stellt das eigentliche Problem von mangelhaft überprüften und rasch hinterlegten Sequenzen in öffentlichen Datenbanken dar. Hier kann keine eindeutige Reproduktion der Ergebnisse durch unabhängige Wissenschaftler erfolgen und diese Sequenzen stellen leider in der Folgezeit die Basis für weiterführende Arbeiten dar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit kultivierten und für jedermann zugänglichen Organismen gearbeitet, die eine Überprüfung der ermittelten Sequenzen ermöglichen können. Allerdings fanden auch in der hier vorliegenden Arbeit Datenbankvergleiche statt, die aufgrund der Menge an Referenzsequenzen eine Interpretation der tatsächlich vorherrschenden ribosomalen Unterheiten innerhalb der Sclerotiniaceae zuließen.

Betrachtet man nun die in dieser Arbeit angeführten Sequenzen der ITS und der 18S rDNA der verschiedenen Sclerotiniaceae und überprüft bereits bestehende Identifikationstechniken für die Gattungen und Spezies dieser Familie (Freeman et al. 2002, Cote et al. 2004b) so überrascht es nicht, dass fehlerhafte Identifikationen durchaus im Bereich des Wahrscheinlichen liegen und möglicherweise auch mehrfach aufgetreten sein können. Die Homologie innerhalb dieser Sequenzen ist derart hoch, dass zweifelsfreie Aussagen über einen bestimmten Organismus unwahrscheinlich erscheinen. Als ein zusätzliches Beispiel kann die Studie von Freeman et al. aus dem Jahr 2002 angeführt werden. Die Wissenschaftler gaben vor, einen spezifischen Nachweis für *S. sclerotiorum* gefunden zu haben. In einem abgebildeten Sequenzalignment war jedoch eine 100%-ige

Homologie der Forward- und Reverse-Primer zu den Spezies *S. minor* und *S. trifoliorum* dargestellt (Abb. 23).



Abb. 23: Bindepositionen der Forward- und Reverse-Primer (Pfeile in a und b) zur spezifischen Identifikation von *S. sclerotiorum* (blau markierte Sequenzen sind identisch; nach Freeman et al. 2002).

Als Argument für die postulierte Spezifität wird aber lediglich die weniger weite Verbreitung und die Tatsache eines anderen Wirtsspektrums von *S. minor* und *S. trifoliorum* gegenüber *S. sclerotiorum* angeführt. Dieses Argument führen auch Bom und Boland (2000) an, die versuchten *S. sclerotiorum* mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern auf Rapspflanzen zu identifizieren. Hier gelang weder die zweifelsfreie Identifizierung zwischen *Sclerotinia* spec. noch die Abgrenzung gegenüber anderen filamentösen Pilzen, wie *Cladosporium* spec. oder *Alternaria* spec.

Morphologisch unterscheiden sich *S. sclerotiorum*, *S. minor* und *S. trifoliorum* vor allem durch die Art und den Ursprung der Apothecien bzw. der Ascosporen (<http://biologi.uio.no/bot/ascomycetes/>). Mit dem, von Freeman et al. (2002) etablierten System, würden diese Unterschiede jedoch nicht aufgedeckt und möglicherweise in Datenbanken falsch hinterlegt. Somit könnten in der Folgezeit auch keine Aussagen über etwaige Mischpopulationen, Infektionswege, Wirtswechsel oder Einschleppungen in andere Regionen getroffen werden. Des Weiteren können diese sequenzgestützten Methoden nur dann zur Anwendung kommen, wenn ein konkreter Verdacht für eine bestimmte Spezies vorliegt. Phyloge-

netisch nah verwandte Gattungen werden mit diesem Verfahren jedoch nicht erfasst und geben somit auch keine Resultate in der Ergebnisanalyse.

Zusätzlich haben sich auch Gruppe I Introns im ribosomalen Gencluster als nicht Spezies-spezifisch herausgestellt und wurden entweder revidiert (Cote et al. 2004a) oder in der Anwendung bislang nicht verfolgt (Holst-Jensen et al. 1999).

Mit der nSAPD-PCR (Fröhlich und Pfannebecker 2007) können dagegen diese filamentösen Pilze mindestens bis auf das Speziesniveau und auch darüber hinaus klassifiziert werden. Hier zeigen die Ergebnisse eindeutige Unterschiede zwischen den Gattungen *Botrytis*, *Sclerotinia* und *Monilinia* und lassen somit eine zweifelsfreie Identifikation zu. Im Gegensatz zu anderen ‚DNA-Fingerprint-Methoden‘ wie beispielsweise der AFLP-Methodik (amplified fragment-length polymorphism, Vos et al. 1995) können hier ähnlich gute Ergebnisse mit einem geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand generiert werden. Allerdings eignen sich diese Technologien vorwiegend für phylogenetische Analysen und weniger für Routineuntersuchungen im Bereich der Identifikation. Ferner ist bei beiden Methoden eine Reinkultur der zu untersuchenden Organismen eine unabdingbare Voraussetzung. Dies kann während der Isolierung und Kultivierung der zu untersuchenden Organismen unter Umständen zu einem größeren Zeitaufwand führen. Dennoch sind diese sensiblen und exakten Methoden derzeit die Mittel der Wahl zur zweifelsfreien Identifikation, benötigen jedoch Zeit für die Kultivierung der Organismen und zudem einen verhältnismäßig hohen Ressourcenaufwand.

4.9 Ein Vorschlag zur Identifizierung verschiedener Sclerotiniaceae

In der hier vorliegenden Arbeit wurde dem Problem der Identifikation von Spezies der Gattungen *Botrytis*, *Sclerotinia* und *Monilinia* im Besonderen nachgegangen. Dabei wurden zu Beginn die gängigen Methoden der 18S rDNA- und der ITS-Sequenzierung verfolgt. Wie bereits erwähnt war eine zweifelsfreie Identifikation nicht möglich. Datenbankabfragen mit den ribosomalen Sequenzen führten in der Regel zu Verwirrung und nicht zur Lösung des Problems.

Somit wurde nach einer alternativen Möglichkeit zur molekulargenetischen Identifikation dieser Organismen gesucht. Dabei musste die Gensequenz

den unterschiedlichsten Anforderungen genügen. Zum Einen sollte sie in homologer Form in allen untersuchten Organismen vorhanden sein und zum Anderen eine ausreichend hohe Variabilität zur zweifelsfreien Zuordnung eines jeden Organismus aufweisen.

Aus diesem Grund wurde im Genom von *M. fructigena*, *S. sclerotiorum* und *S. minor* ein homologes Gen zum bereits bekannten Lcc2-Gen von *B. cinerea* (Schouten et al. 2002) gesucht. Für die untersuchten Arten konnte auch ein Homologon gefunden werden, dessen Variabilität einen spezies-spezifischen Nachweis zuließ. Besonders auffällig war hier die unterschiedliche Anzahl an nicht-codierenden Sequenzen innerhalb der jeweiligen Lcc2-Gene. Während *B. cinerea* und *M. fructigena* drei Introns an konservierten Positionen aufwiesen, zeigten die *Sclerotinia*-Arten nur die ersten beiden. Das dritte fehlte dagegen vollständig. Auf Basis dieser unterschiedlichen Anzahl von Introns und der Sequenzunterschiede konnte eine Multiplex PCR zum spezifischen Nachweis der untersuchten Organismen etabliert werden. Bei Anwendung dieses Tests an Frucht- und Pflanzenproben aus Mainz/Wiesbaden, Rheinhessen und Stollberg (Sachsen) konnte im Folgenden jede Art spezifisch nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Multiplex PCR gaben jedoch keinen Anhaltspunkt für eventuelle Mischpopulationen auf den jeweiligen Wirten. Demnach eignet sich dieses System zwar zur Identifikation, den Nachweis einer Mischkultur auf befallenen Pflanzen konnte bislang jedoch nicht erbracht werden. Dennoch ist mit diesem System zum ersten Mal eine Methode entwickelt worden, die verschiedene Gattungen der Sclerotiniaceae in einer Reaktion zweifelsfrei nachweisen und unterscheiden kann.

4.9.1 Problematik dieser Identifikationsmethode

Eine These besagt, dass Laccasen in allen Pilzen gefunden werden können bei denen danach gesucht werde. Somit würden sich diese Gene als universelle Identifikationssequenzen anbieten. Problematisch wird an dieser Stelle jedoch die Tatsache, dass die meisten Spezies über mehrere Gene und somit auch Isoenzyme verfügen, die ähnlich den Polygalakturonasen von *B. cinerea* einer unterschiedlichen Expression unterliegen (ten Have et al. 2001). Somit ist die Identifikation der einen Sequenz in einem Organismus nicht stichhaltig, wenn

Identifikationen dieses Organismus mit einer anderen Sequenz durchgeführt werden würden. Demnach muss eine einheitliche Identifikationsvorgabe vorhanden sein, da sonst mehrere Sequenzen einen Organismus darstellen könnten.

Derzeit ist vermutlich nur ein Bruchteil der global vorkommenden Pilzarten beschrieben und ein weit geringerer Teil dieser Arten molekulargenetisch untersucht (Hawksworth 2004b). Demzufolge besteht auch weiterhin die Möglichkeit, dass weitere, noch unbekannte Arten, ähnliche oder möglicherweise auch identische Sequenzen tragen. Diese könnten in der Multiplex PCR falsch-positive Ergebnisse liefern und den Nachweis *ad absurdum* führen. Bislang gibt es aber keinen Anhaltspunkt für eine derartige Situation. Dafür spricht auch die Arbeit von Bulter et al. (2003), die zwischen Laccasen aus Ascomyceten eine Ähnlichkeit von maximal 76 % finden konnten.

Im Weiteren ist die beschriebene Multiplex-PCR lediglich für die hier untersuchten Spezies angewendet worden. Andere Gattungen aus der Familie der Sclerotiniaceae standen dieser Studie nicht zur Verfügung und sollten deshalb in weiteren Analysen ebenfalls auf homologe *lcc2* Sequenzen hin untersucht werden. Auch hier könnten Kreuzreaktionen mit den hier identifizierten Sequenzen falsch-positive Nachweise liefern.

Als letztes ist eine mögliche allelische Variabilität innerhalb einzelner Arten nicht auszuschließen. Das fehlende dritte Intron in den *Lcc2*-Sequenzen der *Sclerotinia*-Arten scheint zwar ein spezifisches Charakteristikum für diese Organismen zu sein, eine mögliche allelische Vielfalt schließt dies trotzdem nicht aus. Auch gibt es Variationen zwischen unterschiedlichen *B. cinerea*-Stämmen hinsichtlich ihres Ploidiegrades (Büttner et al. 1994). Diese Heterokaryose könnte sich darin äußern, dass aufgrund der unterschiedlichen DNA-Menge in einem Organismus keine *lcc2* oder mehrere verschiedene homologe *lcc2*-Sequenzen vorhanden sind. Hier gab es aber zu keinem Zeitpunkt Schwierigkeiten während der Sequenzierung dieser Loci, sodass wir hier von einer Homogenität dieses Gens in einem Organismus ausgehen können. Dennoch fehlen in diesem Bereich bislang ausreichende Referenzsequenzen für eine derartige Untersuchung. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Sclerotiniaceae auf diesem Weg bislang differenziert werden können und gegenüber der üblichen ITS-Bestimmung klare Vorteile besitzen.

4.10 Mögliche Anwendungen

Die Anwendung dieser neuartigen Identifikationsmethoden bietet neben den in 4.7 beschriebenen ökologischen Vorteilen eine möglicherweise effizientere Nutzung von Pflanzenschutzmittel bzw. Fungiziden.

Gegen *S. sclerotiorum* sind in Deutschland mehrere Fungizide mit unterschiedlichem Wirkmechanismus zugelassen (<http://www.landwirtschaft-bw.info/>). Hier ist vor allem der Mycoparasit *Coniothyrium minitans* zu nennen. Dieser Schlauchpilz parasitiert vornehmlich die Sklerotien von *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum* Erikss. und *Sclerotium cepivorum* Berk. (Whipps und Gerlagh 1992, Gerlagh et al. 1996). Dagegen werden weder die Sklerotien von *B. cinerea* (Turner und Tribe 1976, Gerlagh et al. 1996) noch die Wirtspflanze selber geschädigt. *C. minitans* wird unter dem Namen Contans WG angeboten und ist seit dem 21.06.2004 gegen *S. sclerotiorum*, *S. minor* und *S. trifoliorum* in Deutschland zugelassen. Bei möglichen Kreuzinfektionen mit anderen Sclerotiniaceae kann dieses Mittel nicht wirksam eingesetzt werden und Mischinfektionen würden nicht effektiv bekämpft. Des Weiteren kann mit Hilfe einer erweiterten Multiplex-PCR-gestützten Identifizierung nach möglichen verborgenen Phytopathogenen gefahndet werden. Besonders spektakulär wäre aller Wahrscheinlichkeit nach die Entdeckung von *M. fructicola*. Diese Spezies ist in der EU als Quaratäneorganismus eingestuft, da er schneller und aggressiver als sein europäischer Verwandter *M. fructigena* Kern- und Steinobstarten zerstört.

Im Bezug auf die aktiv exprimierte Laccase von *M. fructigena* sind auch mehrere industrielle Anwendungen möglich. Diese Enzyme haben bereits in der Vergangenheit wichtige Funktionen im Bereich des Bleichens von Farbstoffen gefunden (Claus et al. 2002, Glenn und Gold 1983, Zille et al. 2005). Des Weiteren werden auch industrielle Abwässer von Brauereien oder Mühlen, aber auch aufzubereitendes Trinkwasser unter Verwendung dieser Enzyme gereinigt (Minussi et al. 2002). Hier kommt es zur Polymerisation von aromatischen Verbindungen, die aufgrund ihrer Größe ausfallen und im Anschluss dem Wasser entnommen werden können (Uchida et al. 2001, Torres et al. 2003). Auch im Hinblick auf das Enzym aus *M. fructigena* wären diese möglichen Anwendungen vorstellbar.

5. Ausblick

Da Laccasen eine breite Anwendung bei der Detoxifizierung von Umweltgiften bzw. dem Bleichen von Farbstoffen gefunden haben, könnten auch die hier vorgestellten Proteinsequenzen die Basis für anwendungsbezogene Untersuchungen darstellen. Da *M. fructigena* DSM2677 mindestens eine aktive Laccase ins Medium sezerniert, könnten nachfolgende Studien die Identifikation dieser Phenoloxidase zum Ziel haben. Da es sich bei diesem Protein mit großer Wahrscheinlichkeit um ein glykosyliertes Protein handelt, sollten Expressionsanalysen mit einem handelsüblichen Expressions-Kit für eukaryotische Gene durchgeführt werden. Diese Systeme bestehen aus zellfreien Extrakten aller zur Translation und nachfolgender Modifikation nötigen Strukturen, so dass hier die Expression der aktiven Form möglich wäre. Für diese Anwendung ist allerdings eine codierende mRNA nötig, die keine Introns mehr aufweist. Und hier liegt wahrscheinlich das größte Problem zukünftiger Arbeiten. Durch eine möglicherweise hohe Anzahl an verschiedenen codierenden Sequenzen kann nicht zweifelsfrei eine bestimmte Laccase als die exprimierte Form definiert werden. Dafür wurden bereits Vorarbeiten geleistet, die keine Aufnahme in die hier vorliegende Arbeit gefunden haben. Für *M. fructigena* gibt es nach unserem derzeitigen Kenntnisstand noch mindestens eine weitere Laccase, die auch schon teilweise sequenziert werden konnte und mit dem Begriff LccX bezeichnet wurde. Ob es sich in diesem Fall aber um die exprimierte Form handelt, konnte bislang nicht geklärt werden. Wird jedoch eine aktive und funktionelle mRNA gefunden, dann kann relativ rasch die Expression, proteinchemische Charakterisierung und die mögliche industrielle Anwendung geprüft werden. Da Laccasen bereits zur Bleichung von Papier oder Entfärben von Farbstoffen eingesetzt werden, könnte dies mit diesen Proteinen ebenfalls möglich sein. Eine weitere Anwendung ist z.B. die Detoxifizierung von Umweltgiften oder der Abbau von Polymeren durch die Polymerisationsaktivität dieser Enzyme.

Auch die Expression dieser hier neu identifizierten Lcc2-Gene könnte in weiteren Studien im Mittelpunkt stehen. Die Frage nach dem Zeitpunkt der Expression von *lcc2* bzw. dem Grund der fehlenden Transkription sind Eckpunkte zukünftiger Studien.

6. Zusammenfassung

Botrytis cinerea ist einer der wichtigsten Phytopathogene, der im Bereich der Weinbereitung als Erreger des Edel- bzw. des Grauschimmels von Trauben eine zentrale Stellung einnimmt. Taxonomisch gehört dieser Organismus zur Familie der Sclerotiniaceae, die ausnahmslos Phytopathogene sind und weltweit große Schäden bei verschiedenen Pflanzen verursachen. Die molekularbiologische Identifikation von Vertretern dieser wichtigen Gruppe von Pflanzenpathogenen ist jedoch bis heute ein Problem. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit als Themenschwerpunkt die zweifelsfreie Identifikation einiger Vertreter der Sclerotiniaceae bearbeitet. Hier konnte von neun verschiedenen Organismen die ‚Internal Transcribed Spacer Region‘ identifiziert und zusätzlich zur 18S rDNA für eine sichere Identifikation ausgeschlossen werden. Die Unterscheidung der einzelnen Gattungen und verschiedener *B. cinerea*-Stämme wurde mit Hilfe der neuartigen nSAPD-PCR Technologie erfolgreich überprüft. Hier konnten die drei Gattungen *Botrytis*, *Monilinia* sowie *Sclerotinia* zweifelsfrei differenziert werden.

Ferner konnten von *Monilinia fructigena*, *Sclerotinia minor* und *Sclerotinia sclerotiorum* neue Laccase-Gene identifiziert und komplett sequenziert werden, die homolog zur Laccase2 (*lcc2*) von *B. cinerea* sind. Auf Basis dieser Sequenzen bzw. Sequenzunterschiede konnte eine Multiplex-PCR zur zweifelsfreien Identifikation dieser Spezies etabliert werden. Im Folgenden konnte dieses System auch an Umweltproben aus der Umgebung von Mainz und Wiesbaden, aus Flomborn (Rheinhessen) sowie aus Stollberg (Sachsen) überprüft werden. Anhand dieser Proben konnte gleichzeitig ein konstantes Vorkommen dieses Gens in allen überprüften Organismen gezeigt werden. Somit ist es zum ersten Mal möglich, verschiedene Spezies der Sclerotiniaceae in einer Probe simultan nachzuweisen und zu differenzieren.

Anschließend wurde die Laccase-Expression der jeweiligen Sclerotiniaceae überprüft. Für *M. fructigena* konnte mindestens eine konstitutiv exprimierte Laccase im Kulturüberstand detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten weder *S. minor* noch *S. sclerotiorum* eine derartige Aktivität. Da *B. cinerea lcc2* exprimiert, wurde dies auch für *M. fructigena* angenommen. Die reverse Transkription der codierenden mRNA konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die

Analyse des Genoms von *B. cinerea* und *S. sclerotiorum* zeigte zudem 13 bzw. 8 mögliche Laccase-Gene. Somit ist es wahrscheinlich, dass *M. fructigena* mehr als einen codierenden Bereich für ein derartiges Enzym besitzt und somit eine oder mehrere andere Laccasen exprimiert.

Auf Basis der codierenden DNA-Sequenzen konnten EDV-gestützte Proteincharakterisierungen mit allen neu entdeckten Laccase-Sequenzen durchgeführt werden. Die hier ermittelten Eigenschaften legen den Schluss nahe, dass es sich ausnahmslos um Proteine handelt, die extrazellulär lokalisiert sind. So besitzen alle drei eine identisch lange Signalsequenz, die für die Translokation in die extrazelluläre Matrix nötig ist. Des Weiteren zeigen alle Laccasen eine schwache Hydrophobizität, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Enzyme keine membranständigen Proteine sind. Auch konnten zahlreiche Glykosylierungspositionen ermittelt werden und bei *M. fructigena* die Glykosylierung der aktiven Laccase nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten alle konservierten Kupferbindepositionen ermittelt werden. Der Vergleich zur mRNA der Lcc2 von *B. cinerea* offenbarte die *lcc2* von *M. fructigena* drei nicht-codierende Intronsequenzen, für *S. minor* und *S. sclerotiorum* jedoch lediglich die ersten beiden. Somit bleibt für alle neu identifizierten Sequenzen die Frage nach der Expression offen. Es wurden weder Deletionen von Nukleotiden noch frame-shift Mutationen in den einzelnen Genen gefunden. Auch geben die Signalsequenzen bzw. die enthaltenen Kupferbindepositionen keine Aufschluss über das Ausbleiben der Expression dieser Gene.

Da das von *B. cinerea* synthetisierte β -1,3-1,6-Glucan in der Kellerwirtschaft große Filtrationsprobleme verursacht, wurde als ein zusätzlicher Themenschwerpunkt die Lyse dieses Polymers mit symbiontischen Mikroorganismen aus Termitendärmen untersucht. Da Termiten auf den Abbau von Polymeren, wie Cellulose und Hemicellulosen spezialisiert sind, lag die Vermutung nahe, dass auch das β -Glucan von symbiontischen Mikroorganismen hydrolysiert werden kann.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte zwar das β -Glucan erfolgreich hergestellt und in pulverisierter Form 5 verschiedenen Termitenspezies als Futter angeboten werden, die anschließende Isolierung der Darmflora und die Untersuchung der isolierten Mikroorganismen auf eine mögliche glucanolytische Aktivität erbrachte jedoch nicht den erhofften Erfolg. Hier wurden acht verschiedene fila-

mentöse Ascomyceten bzw. Zygomyceten isoliert, eine lytische Aktivität konnte jedoch bei keiner dieser Spezies gezeigt werden.

7. Literaturverzeichnis

- **Aguilar-Uscanga, B., Francois, J.M.** (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 268-274.
- **Albert, G., Krauthausen, H.-J., Zollfrank, U., Pfeilstetter, E.** (2004). No evidence of the quarantine organism *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey in Germany. *Nachr.bl. Dtsch. Pflanzenschutzd.* 56, 202-205.
- **Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- **Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften** (2000). RICHTLINIE 2000/29/EG DES RATES vom 8. Mai 2000 über Maßnahmen zum Schutz der Gemeinschaft gegen die Einschleppung und Ausbreitung von Schadorganismen der Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse. http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ph_ps/harm/legal/dir00_29_de.pdf.
- **Arlorio, M., Coisson, J.D., Martelli, A.** (1999). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA. *Europ. Food Res. Technol.* 209, 185-191.
- **Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M.** (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79, 137-158.
- **Baldrian, P.** (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215-242.

- **Bar-Nun, N., Tal Lev, A., Harel, E., Mayer, A.** (1988). Repression of laccase formation in *Botrytis cinerea* and its possible relation to phytopathogenicity. *Phytochemistry* 27, 2505-2509.
- **Bara, M.T.F., Lima, A.L., Ulhoa, C.J.** (2003). Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 81-85.
- **Bartels, G.** (1955). Über einige Fragen der Pathgenität, des Krankheitsverlaufes und der chemotherapeutischen Bekämpfungsmöglichkeiten von *Sclerotinia fructigena* Schroet. und *Sclerotinia laxa* Aderh. und Ruhl. *Wiss. Zeitschrift der Universität Rostock*, 4 (3), 357-380.
- **Bavendamm, W.** (1928). Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen. *Z. Pflanzenkrankh.* 38, 257-276.
- **Bertrand, G.** (1896). Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 123, 463-465.
- **Blasco, L., Ferrer, S., Pardo, I.** (2003). Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 115-123.
- **Bollag, J.-M., Leonowicz, A.** (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 849-854.
- **Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J., Nelson, B.D.** (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 7, 1-16.
- **Bom, M., Boland, G.J.** (2000). Evaluation of polyclonal-antibody-based immunoassays for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola petals, and prediction of stem rot. *Can. J. Microbiol.* 46, 723-729.

- **Bridge, P.D., Roberts, P.J., Spooner, B.M., Panchal, G.** (2003). On the reliability of published DNA sequences. *New Phytologist* 160, 43-48.
- **Bridge, P.D., Spooner, B.M., Roberts, P.J.** (2004). Reliability and use of published sequence data. *New Phytologist* 161, 15-17.
- **Brown, D.G.** (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Immunol. Rev.* 6, 33-43.
- **Brown, D.G., Gordon, S.** (2001). Immune recognition: A new receptor for β -glucans. *Nature* 413, 36-37.
- **Brown, D.G., Gordon, S.** (2003). Fungal β -Glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19, 311-315.
- **Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., Arnold, F.H.** (2003). Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 987-995.
- **Butler, M.J., Day, A.W.** (1998). Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.* 44, 1115-1136.
- **Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Bruckner, B., Tudzynski, P.** (1994). Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: Implications for genetic and molecular analyses. *Curr. Genetics* 25, 445-450.
- **Cai, G., Salonikidis, P.S., Fei, J., Schwarz, W., Schulein, R., Reutter, W., Fan, H.** (2005). The role of N-glycosylation in the stability, trafficking and GABA-uptake of GABA-transporter 1. Terminal N-glycans facilitate efficient GABA-uptake activity of the GABA transporter. *FEBS J.* 272, 1625-38.

- **Cantrell, A., Casillas-Martinez, L., Molina, M.** (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycol. Res.* 110, 962-970.
- **Chiang, V.L.** (2006). Monolignol biosynthesis and genetic engineering of lignin in trees, a review. *Environ. Chem. Lett.* 4, 143-146.
- **Claus, H., Faber, G., König, H.** (2002). Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 672-678.
- **Claus, H.** (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 179, 145-150.
- **Claus, H.** (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35, 93-96.
- **Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K., Jarvis, W.R.** (1980). The biology of *Botrytis*. *Academic Press Inc.*, London.
- **Collado, M.C., Moreno, Y., Cobo, J.M., Hernandez, M.** (2006). Microbiological evaluation and molecular characterization of bifidobacteria strains in commercial fermented milks. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 112-117.
- **Cote, M.-J., Prud'homme, M., Tardif, M.-C., Meldrum, A.J.** (2004a). Variations in sequence and occurrence of SSU rDNA group I introns in *Monilinia fructicola* isolates. *Mycologia* 96, 240-248.
- **Cote, M.-J., Tardif, M.-C., Meldrum, A.J.** (2004b). Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease* 88, 1219-1225.
- **Czop, J.K., Austen, K.F.** (1985). Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte β -glucan receptor. *J. Immunol.* 135, 3388-3393.

- **da Silva, S.G., Gillan, D.C., Dubilier, N., de Ridder, C.** (2006). Characterization by 16S rRNA gene analysis and in situ hybridization of bacteria living in the hindgut of a deposit-feeding echinoid (Echinodermata). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 86, 1209-1213.
- **Davin, L.B., Lewis, N.G.** (2005). Lignin primary structures and dirigent sites. *Curr. Op. Biotechnol.* 16, 407-415.
- **de la Cruz, J., Pintor-Toro, J.A., Benitez, T., Llobell, A.** (1995a). Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J. Bacteriol.* 177, 1864-1871.
- **de la Cruz, J., Pintor-Toro, J.A., Benitez, T., Llobell, A., Romero, L.C.** (1995b). A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 177, 6937-6945.
- **Deshpande, M.S., Rale, V.B., Lynch, J.M.** (1992). *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology, A status report. *Enzyme Microb. Tech.* 14, 514-527.
- **Doss, R.P., Deisenhofer, J., von Nidda, H.-A.K., Soeldner, A.H., McGuire, R.P.** (2003). Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63, 687-691.
- **Dubourdieu, D., Ribereau-Gayon, P.** (1981). Structure of the extracellular β -D-glucan from *Botrytis cinerea*. *Carbohydr. Res.* 93, 294-299.
- **Dugan, F.M., Lupien, S.L., Grove, G.G.** (2002). Incidence, aggressiveness and *in planta* interactions of *Botrytis cinerea* and other filamentous fungi quiescent in grape berries and dormant buds in Central Washington State. *J. Phytopathol.* 150, 375-381.
- **Freeman, J., Ward, E., Calderon, C., and McCartney A.** (2002). A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Europ. J. Plant Pathol.* 108, 877-886.

- **Fröhlich, J., Pfannebecker, J.** (2006). Spezies-unabhängiges Nachweisverfahren für biologisches Material. Patentanmeldung DE 102 06 022 569.4.
- **Fröhlich, J., Pfannebecker, J.** (2007). The nested specific amplified polymorphic DNA-PCR (nSAPD-PCR): a new PCR-method for identification and discrimination of strains and other closely related organisms. *Nucleic Acids Res.*, submitted.
- **Fuchs, B.M., Glöckner, F.O., Wulf, J., Amann, R.** (2000). Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 8, 3603-3607.
- **Fulton, C.E., Brown, A.E.** (1997). Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 307-312.
- **Gawronski, M., Donkai, N., Fukuda, T., Miyamoto, T.** (1997). Triple Helix of the polysaccharide cinerean in aqueous solution. *Macromolecules* 30, 6994-6996.
- **Gerlagh, M., Whipps, J.M., Budge, S.P. Goossen-van de Geijn** (1996). Efficiency of isolates of *Coniothyrium minitans* as mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* and *Botrytis cinerea* on tomato stem pieces. *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 787-793.
- **Gigi, O., Marbach, I., Mayer, A.** (1980). Induction of Laccase formation in *Botrytis*. *Phytochemistry* 19, 2273-2275.
- **Gil-ad, N.L., Bar-Num, N., Mayer, A.M.** (2001). The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 109-113.

- **Glenn , J.K., Gold, M.H.** (1983). Decolorization of polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1741-1747.
- **Griffith, F.** (1928) The significance of pneumococcal types, *J. Hyg.* 27, 113-159.
- **Hakulinen, N., Kiiskinen, L.-L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., Rouvinen J.** (2002). Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Struct. Biol.* 9, 601-605.
- **Harada, Y., Nakao, S., Sasaki, M., Sasaki, Y., Ichihashi, Y., Sano, T.** (2004). *Monilia mumecola*, a new brown rot fungus on *Prunus mume* in Japan. *J.Gen. Plant Pathol.* 70, 297-307.
- **Harkin, J.M., Obst, J.R.** (1973). Syringaldazine, an effective reagent for detecting Laccase and Peroxidase in Fungi. *Experimentia* 29, 381-387.
- **Hawksworth, D.L.** (2004a). 'Misidentifications' in fungal DNA sequences databanks. *New Phytologist* 161, 13-15.
- **Hawksworth, D.L.** (2004b). Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Stud. Mycol.* 50, 9-18.
- **Hegedus, D.D., Rimmer, S.R.** (2005). *Sclerotinia sclerotiorum*: When „to be or not to be“ a pathogen? *FEMS Microbiol. Lett.* 251, 177-184.
- **Higuchi, T.** (2004). Microbial degradation of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proc. Jpn. Acad.* 80, 204-214.
- **Higuchi, T.** (2006). Look back over the studies of lignin biochemistry. *J. Wood Sci.* 52, 2-8.

- **Hirschhäuser, S., Fröhlich, J., Gneipel, A., Schönig, I., König, H.** (2005). Fast protocols for the 5S rDNA and ITS-2 based identification of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 165-171.
- **Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R., Kües, U.** (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* 273, 2308-2326.
- **Hofrichter, M., Fritsche, W.** (1997). Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. III. In vitro depolymerization of coal humic acids by a crude preparation of manganese peroxidase from the white-rot fungus *Nematoloma frowardii* b19. *App. Microbiol. Biotechnol.* 47, 566-571.
- **Hogart, M., Trebesius, K.-H., Geiger, A.M., Hornef, M., Rosenecker, J., Heesemann, J.** (2000). Specific and rapid detection by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin. Microbiol.* 38, 818-825.
- **Holst-Jensen, A., Vaage, M., Schumacher, T.** (1998). An approximation to the phylogeny of *Sclerotinia* and related genera. *Nordic J. Bot.* 18, 705-719.
- **Holst-Jensen, A., Vaage, M., Schumacher, T., Johansen, S.** (1999). Structural characteristics and possible horizontal transfer of group I introns between closely related plant pathogenic fungi. *Mol. Biol. Evol.* 16, 114-126.
- **Holst-Jensen, A., Vralstad, T., Schumacher, T.** (2004). On reliability. *New Phytologist* 161, 11-13.
- **Hughes, K.J.D., Fulton, C.E., McReynolds, D., Lane, C.R.** (2000). Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species. *EPPO Bull.* 30, 507-511.

- **Inacio, J.J., Behrens, S., Fuchs, B.M., Fonseca, A., Spencer-Martins, I., Amann, R.** (2003). In situ accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2899-2905.
- **Ioos, R., Frey, P.** (2000). Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *Europ. J. Plant Pathol.* 106, 373-378.
- **Jönsson, L.J., Saloheimo, M., Penttilä, M.** (1997). Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Curr Genet.* 32, 425-430.
- **Juge, N.** (2006). Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *TRENDS Plant Sci.* 11, 359-367.
- **Kiiskinen, L.-L., Saloheimo, M.** (2004). Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl Environ Microbiol* 70, 137-144.
- **König, H., Fröhlich, J., Berchthold, M., Wenzel, M.** (2002). Diversity and microhabitats of the hindgut flora of termites. *Recent Res. Devel. Microbiol.* 6, 125-156.
- **König, H., Varma, A.** (Eds.) (2006). Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. Springer-Verlag, Berlin & Heidelberg.
- **Kulminskaya, A.A., Thomsen, K.K., Shabalin, K.A., Sidorenko, I.A., Eneyskaya, E.V., Savel'ev, A.N., Neustroev, K.N.** (2001). Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3-β-glucanase from *Trichoderma viridae*. *Eur. J. Biochem.* 268, 6123-6131.

- **Larrondo, L.F., Salas, L., Melo, F., Vicina, R., Cullen, D.** (2003). A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6257-6263.
- **Leung, M.Y.K., Liu, C., Koon, J.C.M., Fung, K.P.** (2006). Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol. Lett.* 105, 101-114.
- **Li, L., Fröhlich, J., Pfeiffer, P., König, H.** (2003). Termite gut symbiotic archezoa are becoming living metabolic fossils. *Eukar. Cell* 2, 1091-1098.
- **Marmur, J.** (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208.
- **McIntosh, M., Stone, B.A., Stanisich, V.A.** (2005). Curdlan and other bacterial (1→3)- β -D-glucans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 163-173.
- **Melzer, M.S., Smith, E.A., Boland, G.J.** (1997). Index of Plant Hosts of *Sclerotinia minor*. *Can. J. Plant Pathol.* 19, 272-280.
- **Minussi, R.C., Pastore, C.M., Durán, N.** (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *TRENDS Food Sci. Technol.* 13, 205-216.
- **Montant, P.C., Thomas, L.** (1977). Structure d'un glucane exo-cellulaire produit par le *Botrytis cinerea* (Pers.). *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 12, 185-192.
- **Montant, P.C., Thomas, L.** (1978). Propriétés physicochimiques du β (1,3) β (1,6) glucane exocellulaire par le *Botrytis cinerea* (Pers.). *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 12, 39-43.
- **Moyano, C., Melgarejo, P.** (2002). Survival of *Botrytis cinerea* in soil in south-eastern Spain. *J. Phytopathol.* 150, 536-540.

- **Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr.** (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. (<http://www.psc.edu/biomed>)
- **Nita-Lazar, M., Wacker, M., Schegg, B., Amber, S., Aebi, M.** (2005). The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation. *Glycobiology* 15, 361-367.
- **Noronha, E.F., Ulhoa, C.J.** (2000). Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 119-123.
- **Ohno, N., Suzuki, I., Yadomae, T.** (1986). Structure and antitumor activity of a β -1,3-glucan isolated from the culture filtrate of *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 1362-1365.
- **Paul, B.** (2000). *Pythium contiguanum* nomen novum (syn. *Pythium dreschleri* Paul) its antagonism to *Botrytis cinerea*, ITS1 region of its nuclear ribosomal DNA, and its comparison with related species. *FEMS Microbiol Lett.* 183, 105-110.
- **Phalip, V., Hatch, D., Laugel, B., Jeltsch, J.-M.** (2006). An overview of fungal community diversity in diseased hop plantations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 321-329.
- **Pielken, P., Stahmann, P., Sahm H.** (1990). Increase in glucan formation by *Botrytis cinerea* and analysis of the adherent glucan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 1-6.
- **Poppert, S., Essig, A., Stoehr, B., Steingruber, A., Wirths, B. Juretschko, S., Reischl, U., Wellinghausen, N.** (2005). Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3390-3397.

- **Putnam, M.L.** (2004). First report of stem rot of rosemary caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in the United States. *Plant Pathol.* 53, 252.
- **Quentin, U.** (2004). *Sclerotinia sclerotiorum* – Auftreten und Bekämpfung. *Kartoffelbau* 8, 318-319.
- **Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H., Viret, O.** (2002). Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry *Fragaria x ananassa* Duch. using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 169-174.
- **Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K.-M., Siewers, V., Tenberge, K.B., Tudzynski, B., Tudzynski, P.** (2004). Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: The major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol. Plant Pathol.* 5, 17-27.
- **Röder, C., König, H., Fröhlich, J.** (2007). Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labelled rDNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Res.*, submitted.
- **Sanger, F., Niclen, S., Coulen, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
- **Santamaria, F., Reyes, F., Lahoz, R.** (1978). Extracellular glucan containing (1,3)-β and (1,6)-β linkages isolated from *Monilinia fructigena*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2847-2858.
- **Scherer, M., Fischer, R.** (2001). Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 207-213.

- **Schouten, A., Wagemakers, L., Stefonato, F.L., van der Kaaij, R.M., van Kan, J.A.L.** (2002). Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Mol. Microbiol.* 43, 883-894.
- **Scupham, A.J., Presley, L.L., Wei, B., Bent, E., Griffith, N., McPherson, M., Zhu, F., Oluwadara, O., Rao, N., Braun, J., Borneman, J.** (2006). Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* 177, 793-801.
- **Shimizu, J., Wada, M., Takita, T., Innami, S.** (1999). Curdlan and gellan gum, bacterial gel-forming polysaccharides, exhibit different effects on lipid metabolism, cecal fermentation and fecal bile acid excretion in rats. *J. Nutr. Science Vit.* 45, 251-262.
- **Staats, M., van Baarlen, P., van Kan, J.A.L.** (2004). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. Evol.* 22, 333-46.
- **Stahmann, K.-P., Pielken, P., Schimz, K.-L., Sahm, H.** (1992). Degradation of extracellular β -(1,3)-(1,6)-D-Glucan by *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3347-3354.
- **Stahmann, K.-P., Monschau, N., Sahm, H., Koschel, A., Gawronski, M., Conrad, H., Springer, T., Kopp, F.** (1995). Structural properties of native and sonicated cinerean, a β -(1,3)(1,6)-D-glucan produced by *Botrytis cinerea*. *Carbohydr. Res.* 266, 115-128.
- **Staples, R.C., Mayer, A.** (1995). Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.*, 134, 1-7.
- **Suarez, M.B., Walsh, K., Boonham, N., O'Neill, T., Pearson, S., Barker, I.** (2005). Development of real-time PCR (TaqMan) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 890-899.

- **Sutherland, I.W.** (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Tibtech* 16, 41-46.
- **ten Have, A., Breuil, W.O., Wubben, J.P., Visser, J., van Kan, A.L.** (2001). *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet. Biol.* 33, 97-105.
- **Tetsch, L.** (2005). Laccasen und Laccasegene des acidophilen Ascomyceten *Hortaea acidophila*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- **Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G.** (1997). The ClustalX windows interface, flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 24, 4876-4882.
- **Thurston, C.F.** (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.
- **Torres, E., Bustos-Jaimes, I., Le Borgne, S.** (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl Catal. B: Environ.* 46, 1-15.
- **Turner, G.J., Tribe, H.T.** (1976). On *Coniothyrium minitans* and its parasitism of *Sclerotinia* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66, 97-105.
- **Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M., Uwajima, T.** (2001) Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 287, 355-358.
- **van Etten, H.D., Matthews, D.E., Matthews, P.S.** (1989). Phytoalexin detoxification importance for pathogenicity and practical implications. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 143-164.

- **Varma, A., Kolli, B.K., Paul, J., Saxena, S., König, H.** (1994). Lignocellulose degradation by microorganisms from termite hills and termite guts: a survey on the present state of art. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 9-28.
- **Vernhet, A., Pellerin, P., Belleville, M.-P., Planque, J., Moutounet, M.** (1999). Relative impact of major wine polysaccharides on the performances of an organic microfiltration membrane. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 51-56.
- **Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M.** (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414.
- **Warrand, J.** (2006). Healthy polysaccharides. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 355-370.
- **Watanabe, H., Takase, A., Tokuda, G., Yamada, A., Lo, N.** (2006). Symbiotic "archaezoa" of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis* still play a role in cellulase production. *Eukar. Cell* 5, 1571-1576.
- **Welsh, J., McClelland, M.** (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.
- **Whipps, J.M., Gerlagh, M.** (1992). Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential use in disease biocontrol. *Mycol. Res.* 96, 897-907.
- **White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press Inc.*, 315-322.
- **Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.

- **Wucherpfennig, K., Dietrich, H., Fauth, R.** (1984). Über den Einfluß von Polysacchariden auf die Klärung und Filtrierbarkeit von Weinen unter besonderer Berücksichtigung des Botrytisglucans. *Deutsche Lebensmittelrundschau* 80, 38-44.
- **Yoshida, H.** (1883). Chemistry of laquer (Urushi). Part 1. *J. Chem. Soc.* 43, 472-486.
- **Yun, C.-H., Estrada, A., van Kessel, A., Park, B.-C., Laarveld, B.** (2003). β -glucan, extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 67-75.
- **Zille, A., Gornacka, B., Rehorek, A., Cavaco-Paulo, A.** (2005). Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6711-6718.

8. Anhang

Anhang 1: Internal Transcribed Spacer Region (ITS)

Botrytis cinerea DSM877 (447 bp)

```
ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTACTTTGTTGCTTTG
GCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACCTTTTT
TATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTA
TTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTG
GTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGC
TGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGC
CAAACCCCAAATTTTTCTATGGTTGA
```

Botrytis cinerea DSM4709 (447 bp)

```
ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTACTTTGTTGCTTTG
GCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACCTTTTT
TATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTA
TTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTG
GTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGC
TGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGC
CAAACCCCAAATTTTTCTATGGTTGA
```

Botrytis cinerea DSM5144 (447 bp)

```
ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTACTTTGTTGCTTTG
GCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACCTTTTT
TATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTA
TTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTG
GTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGC
TGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGC
CAAACCCCAAATTTTTCTATGGTTGA
```

Botrytis cinerea DSM5145 (447 bp)

ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTG
GCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACTCTTTT
TATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGTA
TTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTG
GTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGC
TGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGC
CAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGA

Botrytis cinerea ATCC90769 (447 bp)

ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTG
GCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACTCTTTT
TATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGTA
TTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTG
GTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGC
TGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGC
CAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGA

Botrytis cinerea Stamm 1010 (447 bp)

ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTG
GCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACTCTTTT
TATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGTA
TTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTG
GTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGC
TGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGC
CAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGA

Sclerotinia minor DSM63016 (447 bp)

ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTG
GCGAGCTGCTCTTCGGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATATCAAACTCTT
TTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATC
TCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTG
TATTCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCT
TGGTATTGAGTCCATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCC
GCTGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCT
GCAAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTG

Sclerotinia sclerotiorum DSM1946 (448 bp)

ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTACTTTGTTGCTTTG
GCGAGCTGCTCTTCGGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATATCAAACTCTT
TTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATAAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATC
TCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGG
TATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCT
TGGTATTGAGTCCATGTCAGCAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCC
GCTGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCT
GCCAAAACCCAAATTTTCTATGGTTGA

Monilinia fructigena DSM2677 (446 bp)

ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATCATTACTTTGTTGCTTTG
GCGAGCTGCCTTCGGGGCCTTGCACGCTCGCCAGAGAATAACCAAACCTTTTT
TATCAATGTCGTCTGAGTACTATAACAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTA
TTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTG
GTATTGAGTCTATGCCAGTAGTGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGC
TGGGTCCTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCAGTGTGCTTCTGG
CAAACACCAATTTTCTATGGTTGA

ITS-Sequenzen der aus Termiten isolierten Pilze

Zootermopsis angusticollis (*Paecilomyces variotii* ZA01, 571 bp)

GAGGGTCCCTCGAGGCCCAACCTCCATCCGTGTTGTTAAACACCTGTTGCTT
CGGCGGGCCCGCCGTGGTTCACGCCGTGGCCGCCGGGGGGGCATCTCGCCC
CCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCTCGAACGCTGCCTTGAAGGTTGCC
GTCTGAGTATGAAATTCAATCGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCC
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGG
GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTAACCCCTCCAGCCCGGCTGGTGTGT
TGGGTCGACGTCCCCCCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCGC
CGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACGCGCTCTGGTAGGGTC
GGCCGGCTGGCCAGCCAGCGACCTCACGGTCACCTATTATTTTTCTCTTAGG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC
GGAGGA

Incisitermes tabogae (*Paecilomyces variotii* IT01, 569 bp)

GGTCCCTCGAGGCCCAACCTCCCATCCGTGTTGTTAAACACCTGTTGCTTCG
GCGGGCCCGCCGTGGTTCACGCCGTGGCCGCCGGGGGGGCATCTCGCCCCC
GGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCTCGAACGCTGCCTTGAAGGTTGCCGT
TGAGTATGAAATTCAATCGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
CGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGG
GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTAACCCCTCCAGCCCGGCTGGTGTGTTG
GGTCGACGTCCCCCCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCGCCG
CGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACGCGCTCTGGTAGGGTCGG
CCGGCTGGCCAGCCAGCGACCTCACGGTCACCTATTATTTTTCTCTTAGGTT
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG
AGGA

Incisitermes marginipennis (*Paecilomyces variotii* IM01, 539 bp)

GTAAACACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTGGCTTCACGCCGTGGCCG
CCGGGGGGGCATCATCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCTCGAA
CGCTGCCTTGAAGGTTGCCGTCTGAGTATGAAATTCAATCGTTAAAACCTTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG
CGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTAACCC
TCCAGCCCGGCTGGTGTGTTGGGTTCGACGTCCCCCCCCGGGGGACGGGCC
GAAAGGCAGCGGCGGCGCCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTC
ACgCGCTCTGGTAGGGTCGGCCGGCTGGCCAGCCAGCGACCTCACGGTCAC
CTATTATTTTTCTCTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Incisitermes marginipennis (*Chaetomium* spec. IM02, 704 bp)

ATCcGAGGTCAACCTTtGGGTACCCCTTGGGGGGTGGGTTTCACGGCCGGAA
CCCGCCGCACGCCCTGAGCGAGACAGAGAAGCTACTACGCTCGGTGTGGTC
AGCGAGCCC GCCACTGGTTTT CAGGGCCTGCGGGCGCGCCGCAGGTCCCC
AACACAAGCCGGGGGCTTGATGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCC
GCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATCACTGA
ATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAG
AACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTTATTCAGTACAGAAGACTCAG
AGAGGCCACGAAAATTCAAGAGTTTGTGGGTCTCCGGCGGGCCCCCGGA
GGGGGCTGAGGGCGCGGGCGCGCCGCCCGCCGAAGCAACGATATTGGTAG
CGTTCACGATGGTTTGGGAGTTTTGCAACTCTGTAATGATCCCTCCGCTGGTT
CACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCGAGTTTGG
ATAGCTTTCGGCCCTGAGTGGTTCGTTGCCGACCTCTCTGGGCCAGTCCGG
AAGCCTCACTGAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAG
GGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGAC

Coptotermes havilandii (*Absidia* spec. COP47, 700 bp)

GCTGGGCTCCTCTTTTTGGGAGTCTCAACTTTTTATTCTGTGCACCGTTTAATTT
GGGGGTCGAATTCATTTTCGGCCGCCGCCCTGGGTTGGTTCGCTTTTTTCCTT
TGGGAGATTGTTTCGGCCGCCAGATCAATTATTATACTATTATGACTGAACC
ATAACAGAAATTGTTAACATATAAACAACCTTTCAGCAATGGATCTCTCGGCTTT
CGTATCGATGAAGAACGCAGCAAATCGCGATATGTAGTGTGATCTGCCTATA
GTGAATCATCAAATCTTTGAACGCATCTTGCACCTCTGGGTATTCTGGAGGT
ACGCCTGTTTCAGTATCATTATAACTTCTTCCCATACTATTTGGGTGGAAAAAT
TACTACTGGCCCTTGAGGAAAGGGAGGATTTCGTTCTTCTGCCTTCACGGCTT
AAATATGATCTGGTTTCTTTTTAACCGGCTAGTTACCTTTTGGTAGATTCATCT
TTCAAAAAAACCTAGTCAGCTAGAAAAGCCTCCCCTTCATTCAAAAACTTG
ATCTGAAATCAGGCGGGATTACCTGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA
GGAAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATG
CATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCC
GTCGTTTTACAAC

Mastotermes darwiniensis (*Absidia* spec. MD27, 700 bp)

TGACCTTTAAAAGGTTCGGTTTTACTCTTCTTGTGTGCAACGCTCTGGTCGACA
ATTGAGTTGACCATTGGAGTTTTTAAGTTTTCTAGTATTGAAAGATACTTGGAA
GCGGGCGACTCTATGGCCTTTCGGCTGGTATAGGATGAAAGTCCTAGCTAGTT
TCACGTTTTACTTGAAACAGCCAGCCAAAGGTTACTTTAACTTGTATGAATTGA
TGTAAGATTTATTTATAAAAGTTGTTAAAACAACCTTGGCAATGGATCTCTTG
GTTCTCGCATCGATGAAGAGCGTAGCAAAGTTCGATAATTATTGCGACTTGC
ATTCATAGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCATCTTGCACCTAGTGGTTTATC
CACTAGGTACGGTTGTTTCAGTATCTGCAACTACCAAACAAAACCTTGGGTT
TTGGAACCTGGGCTCTAGTTTAGTCGATtCagTttGACTAATGGCCTTAAATTCAA
GTtAAtCCTAGATGTTTCTGTAATGGAAAGATCGGATGGAGACTCTATAGAGTT
GAGAAAGCAGGCTTTGGGTTTGTGAATTTTACCTAGAACCGCTTAAAGTCTTTT
TCAAATCTTGTCTCTAGTCAAACGGATTAAGTAAAAACACAAAAAACTTCACA

ATTAGATCTGAAATCAACTGAGGTTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG
CGGAGG

Mastotermes darwiniensis (*Absidia corybifera* MD01, 699 bp)

AtcTAGATGTgAGTTTGTGTTGAAGAGAAGACCCAAGATTAGATCCTCTCGCTAGT
CCGTAAAGATTAAGACCTAGTTCAAGAGAAGACTGATTGACTTGGGAATTATGA
ACTCACTAACCAAGTCGTTGCTCCTCAGGCACTCTAGAGTCTACATCCGGCA
AAATGACTAAAGCCAATTGCCTAGGACTAAATGTATTTAAGGCCATGACAGCA
ACTGAATGCCATCAACACAAGCCCATTTCCAGTTCGCTTAGATTCAAAGAACC
AAGTTGAACTGATTGGTAGTTGCAGATACTGAAACAACCTGTGCCTAGTAGATT
GACTACTAGGCGCAAGATGCGTTCGAGAACTCGATGATTTCGCTATGAATGCA
AGTCGCAATAATTATCGCACTTTGCTACGCTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAG
AGATCCATTGCCAAGAGTTGTTTTTAAGTTAACAACCTAACTTTTTTCGTACATCA
TGGTTTACACGAGAAGAATAAACACCCTTGGGGATAGTTAGTACTAGAGCCC
CAAAGGCTTGCCTTGCCTTGCCTTTGACTCGAGACATAGGTCTCCTGAAAGAAG
GGTCCATACGTCTCGTTTCAAGCAGCCTAGATCTTAAGTAGTGGCACAAGTCT
CCTAAAAGGAGGGTCTCTATGCCAACAACCAGAGATCCAAGGCACAAGGCAG
AGCCAACCAAGT

Mastotermes darwiniensis (*Absidia corymbifera* MD02, 705 bp)

TTTCagATCTaGAtGtGAGTTTGTGTTGAAGAGAAGACCCAAGATTAGATCCTCTCG
CTAGTCCGTAAAGATTAAGACCTAGTTCAAGAGAAGACTGATTGACTTGGAAAT
TATGAACTCACTAACCAAGTCGTTGCTCCTCAGGCACTCTAGAGTCTACATCC
GGCAAATGACTAAAGCCAATTGCCTAGGACTAAATGTATTTAAGGCCATGAC
AGCAACTGAATGCCATCAACACAAGCCCATTTCCAGTTCGCTTAGATTCAAAG
AACCAAGTTGAACTGATTGGTAGTTGCAGATACTGAAACAACCTGTGCCTAGTA
GATTGACTACTAGGCGCAAGATGCGTTCGAGAACTCGATGATTTCGCTATGAA
TGCAAGTCGCAATAATTATCGCACTTTGCTACGCTCTTCATCGATGCGGAGAAC
CAAGAGATCCATTGCCAAGAGTTGTTTTTAAGTTAACAACCTAACTTTTTTCGTAC
ATCATGGTTTACACGAGAAGAATAAACACCCTTGGGGATAGTTAGTACTAGAG
CCCCAAAGGCTTGCCTTGCCTTGCCTTTGACTCGAGACATAGGTCTCCTGAAA
GAAGGGTCCATACGTCTCGTTTCAAGCAGCCTAGATCTTAAGTAGTGGCACA
AGTCTCCTAAAAGGAGGGTCTCTATGCCAACAACCAGAGATCCAAGGCACAA
GGCAGAGCCAACCAAGT

Anhang 2: Partielle 18S rDNA Sequenzen

Botrytis cinerea DSM877 (1630 bp)

GGCTCATTAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTACTACATGGATAACC
GTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAACCTCGACTTCGGAAGGGGTG
TATTTATTAGATAAAAAACCAATGCCCTTCGGGGCTCCCTGGTGATTATAAT
AACTTAACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGC
CCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAAC
GGGAATTAGGGTTCTATTCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACAT
CCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTA
GTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGAGTCTTGTAATTGGAATGAGT
ACAATTTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAA
AGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGTTGGCCGGTCCGCCTCACCGCGTGC
ACTGGTCCGACCGGGTCTTTCCTTCTGGGGAGCCGCATGCCCTTCACTGGGT
GTGTCGGGGAACCAAGACTTTTACTTTGAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAG
GCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTTCTA
TTTTGTTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGGCAT
CAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTG
CGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTTATTAAATCAGTGAACGAAAGTTAGGGGA
TCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG
GGATCGGGCGATGTTATCTTTTTGACTCGCTCGGCACCTCACGAGAAATCAA
AGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGAAAT
TGACGGAAAGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAAC
ACGGGGAAACTCACCAAGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCT
CTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG
ATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCCC
GGCTAGCTTTGGCTGGTCGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGGCTCAAGCCG
ATGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCC
GCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAACGAGTTTTTCTCCTTGACCGAAAGG
TCTGGGTAATCTTGTTAACTCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTAT
TGCTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATT
ACGTCCCTGCCTTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCT
AAGTGAGGCTTTCGGACTGCCTTAGGGAGGGTGGCAACACCCACCCAGAGG
CGGAAAG

Botrytis cinerea Stamm 1010 (656 bp)

AAAGTTGAACCTTGGGCCTGGTTGGCCGGTCCGCCTCACCGCGTGC_wCTGG
TCCGACCGGGTCTTTCCTTCTGGGGAGCCGCATGCCCTTCACTGGGTGTGTC
GGGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCA_gGCCTAT
GCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTTCTATTTTGT
TGG_yTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGT_mGGGGGCATCAGTA
TTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAA
GCATTTGCCAAGGATGTTTTTATTAAATCAGTGAACGAAAGTTAGGGGATCGAA
NACGATCAGATACC_rTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCG
GGCGATGTTATCTTTTTGACTCGCTCGGCACCTCACGAGAAATCAAAGTCTTT
GGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGAAATTGACGG

AAAGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGG
AAACTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGmGAGCTCTTTCTT
GATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCG

Sclerotinia minor DSM63016 (1630 bp)

GGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTTATTTGATAGTACCTTACTACATGGATAACC
GTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAACCTCGACTTCGGAAGGGGTG
TATTTATTAGATAAAAAACCAATGCCCTTCGGGGCTCCCTGGTGATTATAAT
AACTTAACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGC
CCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAAC
GGGAATTAGGGTTCTATTCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACAT
CCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTA
GTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTTGAGTCTTGTAATTGGAATGAGT
ACAATTTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAA
AGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGTTGGCCGGTCCGCCTCACCGCGTGC
ACTGGTCCGACCGGGTCTTTCCTTCTGGGGAGCCGCATGCCCTTCACTGGGT
GTGTCGGGGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAG
GCCTATGCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTTCTA
TTTTGTTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGGCAT
CAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAGACTAACTACTG
CGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTATTAAATCAGTGAACGAAAGTTAGGGGA
TCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG
GGATCGGGCGATGTTATCTTTTTGACTCGCTCGGCACCTCACGAGAAATCAA
AGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGAAAT
TGACGGAAAGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAAC
ACGGGGAAACTCACAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCT
CTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG
ATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCCC
GGCTAGCTTTGGCTGGTCGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGGCTCAAGCCG
ATGGAAGTTTGAGGCAACAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCC
GCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAACGAGTTTTTCTCCTTGACCGAAAGG
TCTGGGTAATCTTGTTAAACTCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTAT
TGCTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATT
ACGTCCCTGCCTTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCT
AAGTGAGGCTTTCGACTGCCTTAGGGAGGGTGGCAACACCCACCCAGAGG
CGGAAAG

Partielle 18S rDNA Sequenzen der aus Termiten isolierten Organismen

Coptotermes havilandii (*Absidia* spec., 1187 bp)

TAAGTTGTTGCAGTTAAACGTCCGTAGTCGAATTTCCACCTTTTGCCTGGCC
GCCGGTTCTTCATTGAGCTGGATTGGTTCCAGTGCTGGGTGATAAAGTCTGG
CTGATAGGGTGGTTGGCTTCGGTTGGCTGCCTTTCCTCGCCAGGCGTATTAC
CATGAGCAAATCAGAATGCTCAAAGTAGGCCTTCGCGCCTGAATGTGTTAGC
ATGGAATAATAAAATAGGACTCGAGTCTTGTTTTGTTGGTTACTTGACATTGA
GAAATGATGAATAGGAACGGTTGGGGGCATTTGTATTTGGCCGCTAGAGGTG
AAATTCTTGGATTGGCCGAAGACAACTACTGCGAAAGCATTGACCCAGGA
CGTTTTTATTGATCAGGGACTAAAGTTGAGGGATCGAAGACGATTAGATACC
GTCGTAGTCTTAACCACTATGCCGACTAGCGATTGGGCTTGACCTTTG
GTCAGGTTTCAGCAGCTTAGCGAAAGTAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTA
TGGGACGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGA
GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAG
ACATAAGAAGGATTGACAGATTGAAAGCTCTTTCTAGATTTTATGGGTGGTGG
TGCATGGCCGTTCTTAGTTCGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACG
AACGAGACCTTAATCTGCTAACTAGCTAGGCCAACTTTTTAGTTGGTAGCATG
ACTCCTTCGGGGATCCTAGCTTCTTAGAGAGACTACTGAATTCATTCAGTGG
AAGTTTTAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCAC
GCGCGCTACACTGACAAAAGCAACGAGTTTTTTTCTTGGCCGGAAGGCCTG
GGTAACTTTTGAATTTTGTCTGCTGGGGATAGAACATTGCAATTATTGTTT
TTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTC
CCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTGCTACTACCGATTGAATGGTCATAGT
GAGCATATGGGATCACCCGTAGCCAGGATGGCAACATCCAGGTGTGGGGGA
GAACTATGGCAAACCTAGATTATTAGAGGAAGTAA

Mastotermes darwiniensis (*Absidia* spec., 1155 bp)

AGTCGAAGTTTTGCCTTTTAGtTTGGGCCTCCTATCATTCAATTTGTTAGGGTTG
GTTCTGAACAGGGCACCAGTCCaGATGGCTCTGTGGGTTCACTCtCATArAGT
CTATTAACCTGGGCGTATTACCATGAGCAAATCAGAGTGTTTAAAGCAGGCTA
TCAAGCTTGAATGTGTTAGCATGGAATAATGAAATATGACCCAGGGTCTATTT
CGTTGGTTTTGAGACCCAAAGTAATGATGAATAGGAGTGGTCGGGGGCATTT
GTATTTTCGGCGCTAGAGGTGAAATTCCTGGATTGCCGGAAGACAACTACTG
CGAAAGCATTGACCCAGGACATGTCCATTGATCAAGGGCTAAAGTTGAGGG
ATCGAAGACGATTAGATACCGTCTGATGCTTAACCACTAAACGATGCCGACTA
GAGATCGGGCTTGGCTATAAAGGCTTGGCTCGGGATCTTAGCGAAAGCAAAGT
TTTTGGGTTCTGGGGGGAGTACGGCTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTG
ACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACAC
GGGGAACTCACCAGGTCCAGACATACGAAGGATTGACAGATTGAAAGCTCT
TTCTAGATTGTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTCTGTGGAGTGATT
TGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACCTTAATCTGCTAAATAGTCAGAC
CCATTTTTTAATGGGGTTTCTTGGGCTTCGGTTCAAGCTGACTTCTTAGAGA
GACTATCGACTTCAAGTCGAAGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATG
CCCTTAGATGTTkTGGGCCGCACGCGCTACACTGATACAGGCAGCGAGTT
TTTTATTCTTGGCTGACAAGTCTGGGTAACTTTTGAACCTGTATCGTGCTG
GGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTTAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCA

AGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTC
GCTACTACCGATTGAATGGTGCAGCAAGCATTAGAGACGGTCTCTCTCTAG
TTGGCAACGACTAGGGATCTTGAGTCGCGGCAGTGCCACTGTCCACCGGAA
CG

Mastotermes darwiniensis (Absidia corymbifera, 703 bp)

tGTtGCaGTTAaaACGTCCGTAGTCGAAGTTTTGCCTTTTAGTTTTGGGCCTCCTA
TCATTCATTTGtTAGGGTTGGTTCTGAACAGGGCACCAAGTCCAGATGGCTCT
GTGGGTTCACTCTCATAGAGTCTATTAAGTGGGCGTATTACCATGAGCAAAT
CAGAGTGTTTAAAGCAGGCTATCAAGCTTGAATGTGTTAGCATGGAATAATGA
AATATGACCCAGGGTCTATTTTCGTTGGTTTTGAGACCCAAAGTAATGATGAAT
AGGAGTGGTCGGGGGCATTTGTATTTTCGGCGCTAGAGGTGAAATTCTTGAT
TGCCGGAAGACAACTACTGCGAAAGCATTTCACCCAGGACATGTCCATTGA
TCAAGGGCTAAAGTTGAGGGATCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTTA
ACCACAAACGATGCCGACTAGAGATCGGGCTTGGCTATAAAGGCTTGCTCGG
GATCTTAGCGAAAGCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGGAGTACGGCTCGCAAG
GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGC
GGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACATACGAAGG
ATTGACAGATTGAAAGCTCTTTCTAGATTGTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGT
TCTTAGTTCGTGGAGTGATT

Mastotermes darwiniensis (Absidia corymbifera, 703 bp)

TGTtGCaGTTaAAACGTCCGTAGTCGAACGTTTTGCCTGTTGTCCAGGCCTCTC
ATCATTAGTTGTTGAGTTTTGGTCTTGGACTGGGCACAAAGTCTAGATGGCTT
GAGTCTCTCGGGGCTTGAGTCTATTCAGTGGCGTATTACCATGAGCAAATCA
GAGTGTTTAAAGCAGGCTTTTTAAGCTTGAACGTGTTAGCATGGAATAATGAA
ATATGACCCAGGGTCTATTTTCGTTGGTTTTGAGACCCAAAGTAATGATGAATA
GGAGTGGTCGGGGGCATTTGTATTTTCGGCGCTAGAGGTGAAATTCTTGAT
GCCGGAAGACAACTACTGCGAAAGCATTTCACCCAGGACATCTCCATTGAT
CAAGGGCTAAAGTTGAGGGATCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTTAA
CCACAAACGATGCCGACTAGAGATCGGGCTTGGCTATTAAGGCTTGCTCGGG
ATCTTAGCGAAAGCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGGAGTACGGCTCGCAAGG
CTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG
GCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACATACGGAGGA
TTGACAGATTGAAAGCTCTTTCTAGATTGTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGT
CTTAGTTCGTGGAGTGATTTGT

Anhang 3: Laccase codierende Sequenzen inklusive der Intronsequenzen

(nicht-codierende Sequenzen sind rot, Intronsequenzen blau markiert)

Kernsequenz der Laccase 2 (*lcc2*) von *Monilinia fructigena* DSM2677

GGACTTTTTGGTCCCTTGATCATTAAATGGCCCTGCAACTGCGGACTATGATGA
 GGATCTGGGACCAATCTTCTCCAAGACTGGGCACATCAATCCGCTTTTGAA
 ATCTGGGATACCGCTAGACTTGGCGCTCCTCCAGCTCTTCCAAACACTTTGAT
 CAATGGAACAACTTTTCGATTGCTCGAGTTCTGAAGATGCCAACTGCGTTG
 GTGGCGGTAAGAAATTTCGAGTTGACTTTTCGTCAAGGGTAAAAAATATAGATTG
 AGATTACTCAACGTTGGAATTGATAGTCATTTTGAATTCGCCATTGATGGTCA
 CAATCTTACTGTCATCGCTACCGATCTAGTTCCCATCACCCCGTACACCACCG
 ATACCCTCCTCATAGGTATCGGTCAAAGATACGATGTCATTGTCGAGGCCAAC
 GCCACAGCCGGTGACTACTGGATCCGCGGCAACTGGGGAACATCCTGCTCA
 ACCAATCTCAACGCCGCAATGCCACTGGCATTCTCCGCTACGACTCTTCCA
 GCACCGCAGACCCAACCTCAGTCGGCACCACAGCCCGCGGTACCTGCGGC
 GATGAACCAATAGCAAGTCTCGTTCCTCACCTAGCACTAGACGTAGGAAGCT
 ATTCTCTCGTTGATGAACAATTGAGTTTCTCAGCCGCAAACACTTTCACCTGG
 ACCATCAATTCTAGTTCTCTCGTCCCTCGACTGGGCCAGCCCAACGACTCTCAA
 AATTTTCAAAAACGAATCCATCTTTCTACAGACTATAACGTCGTAGCTCTAGA
 CAAATCAAGCGCAAATGACGATTGGGTCGTCTACGTTATCGAAGATCTAACTG
 GTTTTGGCATCTGGCATCCCATCCATCTCCACGGCCACGATTTCTATATCGTG
 GGCCAGGAAGCCACTGTATTCAACCCGGCCACATCTCCAAGTAGCTTTAACC
 TCGTCAATCCTCCCCGTAGAGACGTTGCTGCAC

5'-Genabschnitt mit dem Primer TSP3R sequenziert:

TCACAGAAGTATGCCAGCGAGGGGGGGGGTACATTCTTTCTTCTTTTCTT
 GGTGTTTAATTCATAATCATGAAGTCCTTTACAGTCTTTACTGCTCTCACTGCA
 TTCTTTGCACAAGCATCTGCATCTGCTATTCCAGCTACTAGCTCACCGATCTT
 TCCGCGTCAGAACACCACTTCCAACATCACTCCGACTTGTGCACACTCGTCTA
 CTTCCAGATCTTGCTGGGGAGCTTACTCAATCGATACCAACTGGTACGATGTT
 ACTCCTACAGGAGTCACTAGAGGTAAGTGATATGACATCCTTTTGTACCAGTC
 TAGCGCTAACTTTATCTAAAGAATATTGGCTTTCAGTTGAGAACCACCACATC
 ACCCCTGATGGCTATACTCGCTCAGCCATGACCTTCAATGGAACAGTCCCTG
 GCCAGCAATTATTGCTGATTGGGGTGACAATCTTATAATCCGTATGTCTTCA
 GTTCCATCATCTCGGAAGATCATCTTTTTTGTGTTGATTCCACTTACTAACCTC
 TACTACAGATGTAACAAACAATCTTGAATACAATGGAACATCCATTGATGGC
 ACGGGATTCGTCAGCGAAGAAGTTTAGAATATGACGGTGTTCAGGTGTCAC
 TCAAGTAAGTTAATCCAAAATTACGCCACCTTTACTTCAACCTAACATCCCAT
 CAAGTGCCCTATAGCTCCTGGAGACACCTTGACCTACAAGTTCCAAGTTACTC
 AATACGGAACCACTTGGTATCACTCTCACTTCTCGCTTCAATATGCTGAT

3'-Genabschnitt mit dem Primer TSP3F sequenziert:

TTCTTGAAATGGCTACTTGGCCATTGCGTTTAAAGCTTGACAATCCTGGTTCC
 TGGCTTCTTCATTGCCACATTGCGTGGCAGCCTTCCGAAGGGTTGGCCATGC

AATTTGTCGAGAGCCAGAGCTCGATTGCAGTGCGCATGAAAGATACAGCCAT
 CTTTGAGGATACCTGCTCGAACTGGAATGCGTATGTTCCCTGGGGAATTGTTTG
 CGGAAGACGATTCTGGTATCTAGGCGGGATATCCCGCGCGGACTGTTTCGAT
 GGGACTCTTTTAAGCTTCTGTACGCCATTTTCGATCTTTGAGTCGTCGATTGT
 TATTCGAGTTTACGAGAATTCTTTGGGGCACTTTTTGGACCCCCCCCCCTCGC
 TtGGcATACTTCTGTGAA

Kernsequenz der Laccase 2 (*lcc2*) von ***Sclerotinia minor* DSM63016**

TGCCACTGCAGACTACGATGAGGATCTTGGAGTAATGTTTTTGGGTGATTGG
 GCACACGAAACCGTCTTCGATCTTTGGGATCGCGCTAGATCCGGCCCTCCTA
 TCTCTCTTCCAAACACTTTGATGAACGGAACCAACAGTTGCGAGTGCGATACT
 TCTGATCCTCAGTGC GTTGGTGGTAAGAAATTTCGAGGCAGTTTTTCGTCTG
 AGGGCCAAAAGTACAGAATCAGATTGATCAATGTTGGTATTGACAGTCATTTT
 GAATTCGCCATTGATGGCCACACTCTTACCGTCATTGCTAATGATCTTGTTCC
 TATCGTCCCATATAACCACTGAGACTCTCCTCATTGGTATTGGTCAAAGATACG
 ATGTCATCGTCGAAGCTAATGCTAAGCCTAATAACTACTGGATCCGCGCCAA
 CTGGGGAACTGCTTGCTCATCCAACCTGCGAGCTGCCAACGCCACGGGAAT
 CTTGCGATACAACAGCTCCAGCACCGCAGAACCTACCTCTGTCCGGCGCCACC
 CCACGCGGTACTTGTGGGGATGAACCACTTGCCAGCTTGGTTCCGCATTTAG
 CAATGGATGTCGGTGACTATGCTCTCATGGACGAGAAATTAAGTGGATCCTC
 GGCAACGTCATAACCTGGACCATCAACAGCAGCTCTCTCGTCCCTCGACTGGA
 CCAACCCAACCACGCTCCAAGTATTCCGCAACGAATCAATCTTCCCAACAGA
 CTACAACGTCGTTCCCTATCAGCAAGGAAATCACAAACTCAGACTGGGTCTGTC
 TATGTCATCGA

5'-Genabschnitt mit dem Primer TSP3R sequenziert:

GGATCACAGTCCTTCCTGTCTTTGGGTGTCTATTCCGCAATCATGAAGTGTT
 TTACATCACTCACTGCCCTCACTGCAATCTTTGCACAGGCATCTGCTTCAGCT
 ATTCCAGCTATTCGCTCGCCGGCCACTTCACACCAAAAAGTGAAGTGCCTCCT
 GTGCACACTCGGCTACTTCCCGATCCTGCTGGGGAGCTTACTCCATCGATAC
 CGACTGGTATGATGTTATACCACACACTGGAGTTACCAGAGGTATGCGATATC
 ACATTCTCATTCACTACCTAGTCTAGTACTAATTTATGCATAGAATACTGGCTT
 TCGGTTGAGAACTCCACTATAACCCCTGATGGTTATACCCGCTCAGCCATGA
 CCATCAATGGAACCGTCCCTGGCCCTGCAATTATCGCGGACTGGGGCGACA
 ATCTTGTAATCCGTAAGTCTCCGATAGCGCACCGAATCTCAAAGTCTCTCGAT
 AGCATGGGATATCCTCAATCATCCTTTTGCATGTTTCTTCTTCACTAACTACGAG
 TCACAGATGTCACCAACAATCTTCAACACAATGGAACAGCCATTCACTTCCAC
 GGTATTCGTCAGAAGGGAAGCTTAGAGTACGATGGTGTGCCCGGTGTTACTC
 AATGTCCTATCGCTCCTGGAGATACCTTGACCTACAAGTTCCAAGCTACTCAA
 TATGGAACACTTGGTATCACTCTCACTTCTCTTCAATACGCTGATGGGCT
 CTTCCGGCCCTCTCATCATTAACGGTCC

3'-Genabschnitt mit dem Primer TSP3F sequenziert:

AGATCTCACCACCGCCGGTACCTGGCACCCCTATGCATCTCCACGGCCACGAT
TTCTTCATCGTCGGTCAGGAACAAGCCGTCTTCGACCCCGTCAACACCCCTT
CCACTTTCAACCTTAAGAATCCTCCTCGTCGTGACGTGGCTGCTCTTCCCGC
CGGCGGCTACCTCGCTATCGCTTTCAAGCTCGATAACCCTGGTTCGTGGCTT
CTTCACTGCCATATCGCGTGGCACGCATCCGAGGGTTTGGCTATGCAGTTTG
TTGAGTCTGAGAGCTCGATTGCCATTGGTATGAAGGATACCCAGATCTTTGAT
AATACGTGCAAGAATTGGAATGCATATGTTCCAACCTGAGGTATTCCTCAAGA
CGATTCTGGTATCTAGGTCGACA

Kernsequenz der Laccase 2 (*lcc2*) von *Sclerotinia sclerotiorum* DSM1946

CAGACTACGATGAGGATCTTGGAGTAATGTTTTTGGGTGATTGGGCGCwCGA
AACCGTCTTCGATATTTGGGATGCCsCTAGAGCTGGCTGTCGtCCATCTCTTTA
AACACCTTGATGAACGGAACCAATAGTTGCGAGTGCGATACTTCTGACCCTA
AGTGCGTTGGTGGTGGTAAAAAATTCGAGGCAGTTTTTCGTGAGGGCCAAAA
GTACAGAGTCAGATTGATCAATGTTGGAATTGACAGTCATTTCAATTGCGTA
TCGATGGACACAATCTTACCGTCATTGCTAATGATCTTGTTCCCTATCGTCCCA
TATAACACTGACACCCTTCTCATTGGTATTGGTCAAAGATACGATGTCATTGT
CGAAGCTAATGCTACTCCTGACAACACTGGATCCGCGCCAATTGGGGAACT
GCTTGCGCACCGAACTTGCAAGCTGCCAACGCCACGGGAATTTTGCGATAACA
ACAGATCCAGCACCGCAGAACCTACCTCTGTCGGCGTCACACCACGCAGTAC
TTGTGCGGATGAACCACTTGCCAGCTTGGTTCCACATTTAGCATTGGATGTTG
GTAGCTATGCTCTCATGGACGAGAAATTAGACTGGGTAAGGCAACATGTT
GACCTGGACCATCAACAGCAGCTCTCTCGTCCTCGACTGGACCAACCCAACC
ACACTCCAAGTATTCGAAACGAATCCCTCTTCCCAACCGACTACAACGTCGT
TCCTATCAACAAGGAAATCGCCAACCTCAGACTGGATCGTCTACGTCATCGAA
GATCTCACCCACTCCGGTACCTGGCACCCCTATGCATCTC

5'-Genabschnitt mit dem Primer TSP3R sequenziert:

TCTGTCTTTTGGTGTATTCCGCAATCATGAAGTGTTTTACATCACTCACTGC
CCTCACTGCAATCTTTGCACAGGCATCTGCTTCAGTTATTCCAGCTATTCGAT
CGCCAGCCACTCAACCCAAAAATGGTGCCTCCTGTGTACTCGGCTACTTC
TAGATCCTGCTGGGGAGATTACTCTATCGATACTGACTGGTATGATGTTATTC
CTCACACTGGAGTCACTAGAGGTATGCGATATCACATTCTCAATTTACTAGTC
TAATACTAATTTTTGCATAGAATACTGGCTTTTCGGTTGAGAACTCCACTATAAC
CCCTGACGGGTATACCCGCTCAGCCATGACCTTTAATGGAACCGCCCCTGGC
CCTGCAATTATCGCCGACTGGGGCGACAATCTTGTCATCCGTAAGTCTTCGA
TAGCGCGCCGAATCTCAATGTCCTCCATAAGATCAGAAATTTTCATATCATCC
TTTTGCATGATTCTTCTTACTAACCACGGGTCATAGATGTCACCAATAATCTTC
AACATAATGGAACAGCCATTCATTTCCACGGTATTCGTGAGAAGGGAAGCTTA
GAGTACGATGGAGTGCCCGGTGTTACTCAGTGTCCCTATCGCTCCTGGAGATA
CCTTGACCTACAAGTTCCAAGCTACTCAATATGGAACACTTGGTATCACTCT
CACTTCTCTTTCAATACGCTGATGGACTCTTTGGCCCTCTTATCATCAATGG
TCCTGCCACTG

3'-Genabschnitt mit dem Primer TSP3F sequenziert:

```
CACGGACACGATTTCTTCATCGTCGGTCAAGAAGCTGCTGTCTTCGACCCTG
TCAACACTCCCGCTACCTTCAACCTCAATAATCCTCCCCGTCGTGACGTGGCT
GCGCTTCCGGCTGGCGGATATCTCGCCATCGCGTTCAAGCTTGATAATCCTG
GTTTCGTGGCTTCTTCACTGCCATATCGCATGGCACGCATCCGAGGGACTGGC
AATGCAATTTGTAGAGTCGGAGAGCTCGATTGCGATCGGTATGAAAGATACT
GAGATCTTTGATAATACTTGCAAGAATTGGAATGCATATGTTCCAACCTGAGGT
ATTCCTCAGGATGATTCTGGAATCTAAGGAGCTTTGTTCTAGATTTGTTGGAT
ATC
```


Anhang 4: Sequenzvergleich der ITS-Region verschiedener Vertreter der Familie der Sclerotiniaceae

(- = fehlende Base, . = identische Base)

Bezeichnungen im folgenden Sequenzvergleich:

<i>B. cinerea</i>	DSM877, 4709, 5144, 5145, ATCC90769, AY550976, AY686867
<i>B. elliptica</i>	AY684918
<i>S. sclerotiorum</i>	DSM1946, DQ059577
<i>S. minor</i>	DSM63016, Z99673
<i>S. trifoliorum</i>	AY547267, Z99676
<i>M. laxa</i>	AF150676
<i>M. fructicola</i>	Z73778
<i>M. fructigena</i>	DSM2677, AF150680

DSM877	ATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGC-CT	64
ATCC90769-..	64
DSM4709-..	64
DSM5144-..	64
DSM5145-..	64
AY550976-..	64
AY686867G.....-..	64
AY684918-..	64
DSM1946T..	65
DQ059577T..	65
DSM63016T..	65
Z99673T..	65
AY547267T..	65
Z99676T..	65
AF150676-..	64
Z73778-..	64
DSM2677C.....-..	64
AF150680C.....-..	64

DSM877	TC-GGGCCTTGATGCTCGCCAGAGAATACCAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTAT	128
ATCC90769	128
DSM4709	128
DSM5144	128
DSM5145	128
AY550976	128
AY686867	128
AY684918	128
DSM1946	..G.....T.....	130
DQ059577	..G.....T.....	130
DSM63016	..G.....T.....	130
Z99673	..G.....T.....	130
AY547267	..G.....G.....T.....	130
Z99676	..G.....G.....T.....	130
AF150676ATC.....	128
Z73778G.....ATT.....	128
DSM2677C.C.....A.C.....C.....	128
AF150680C.C.....A.C.....C.....	128

DSM877	ATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT	193
ATCC90769	193
DSM4709	193
DSM5144	193
DSM5145	193
AY550976	193
AY686867	193
AY684918	193
DSM1946	195
DQ059577	195
DSM63016	195
Z99673	195
AY547267	195
Z99676	195
AF150676	193
Z73778	193
DSM2677	.C.....	193
AF150680	.C.....	193

DSM877	GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC	258
ATCC90769	258
DSM4709	258
DSM5144	258
DSM5145	258
AY550976	258
AY686867	258
AY684918	258
DSM1946	260
DQ059577	260
DSM63016	260
Z99673	260
AY547267	260
Z99676	260
AF150676	258
Z73778	258
DSM2677	258
AF150680	258

C

DSM877	TTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGA	323
ATCC90769	323
DSM4709	323
DSM5144	323
DSM5145	323
AY550976	323
AY686867	323
AY684918	323
DSM1946C.....	325
DQ059577C.....	325
DSM63016C.....	325
Z99673C.....	325
AY547267C.....	325
Z99676C.....	325
AF150676AC.....	323
Z73778AC.....	323
DSM2677AC.....	323
AF150680AC.....	323

DSM877	GTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAAT	388
ATCC90769	388
DSM4709	388
DSM5144	388
DSM5145	388
AY550976	388
AY686867	388
AY684918	388
DSM1946	..C.....C.....	390
DQ059577	..C.....	390
DSM63016	..C.....	390
Z99673	..C.....	390
AY547267	..C.....C.....	390
Z99676	..C.....C.....	390
AF150676C.....	388
Z73778	388
DSM2677C.....G.....	388
AF150680C.....G.....	388

DSM877	ATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTCTATGGTTGA--	447
ATCC90769--	447
DSM4709--	447
DSM5144--	447
DSM5145--	447
AY550976--	447
AY686867--	447
AY684918--	447
DSM1946-	448
DQ059577-	448
DSM63016A...A..C...-	448
Z99673A...A..C...-	448
AY547267-	448
Z99676-	448
AF150676-	446
Z73778C.....A.....-	446
DSM2677A.....G.....A..C...-	446
AF150680A.....G.....A..C...-	446

Anhang 5: Vergleich der von 18S rDNA Sequenzen verschiedener Sclerotiniaceae

Bezeichnungen im folgenden Sequenzvergleich:

<i>B. cinerea</i>	DSM877, AY544695
<i>S. minor</i>	DSM63016, Z99673
<i>S. sclerotiorum</i>	AY187065, AY187078, L37541
<i>S. trifoliorum</i>	AY187076
<i>M. laxa</i>	Y14210
<i>M. fructicola</i>	Y14211

DSM877	GGCTC-ATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTACTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAG	69
AY544695-.....	69
DSM63016-.....	69
AY187065C.....	70
AY187078-.....	69
L37541	T.....-.....	69
AY187076-.....	69
Y14210-.....	69
Y14211-.....	69

DSM877	CTAATACATGCTAAAAACCTCGACTTCGGAAGGGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAATGCCCTTCGGG	139
AY544695	139
DSM63016	139
AY187065	140
AY187078	139
L37541-.....	138
AY187076	139
Y14210A.....	139
Y14211A.....	139

DSM877	GCTCCCTGGTGATTCATAATAACTTAACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTC	209
AY544695	209
DSM63016	209
AY187065	210
AY187078	209
L37541G.....	208
AY187076	209
Y14210	209
Y14211	209

DSM877	TGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTT	279
AY544695	279
DSM63016	279
AY187065	280
AY187078	279
L37541	278
AY187076	279
Y14210	279
Y14211	279

DSM877	CTATCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCA	349
AY544695	349
DSM63016	349
AY187065	350
AY187078	349
L37541	348
AY187076	349
Y14210	349
Y14211	349
DSM877	ATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAACTGATACAGGCTCTTTTGAGTCTTGTAATTGGAATGA	419
AY544695	419
DSM63016	419
AY187065	420
AY187078	419
L37541	418
AY187076	419
Y14210	419
Y14211	419
DSM877	GTACAATTTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCA	489
AY544695	489
DSM63016	489
AY187065	489
AY187078	489
L37541	488
AY187076	489
Y14210	489
Y14211	489
DSM877	GCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGTTGGCCG	559
AY544695	559
DSM63016	558
AY187065	559
AY187078	559
L37541	558
AY187076	559
Y14210	559
Y14211	559
DSM877	GTCCGCCTCACCGCGTGCCTGGTCCGACCGGGTCTTTCCTTCTGGGGAGCCGCATGCCCTTCACTGGGT	629
AY544695	629
DSM63016	628
AY187065	629
AY187078	629
L37541	628
AY187076G.....	629
Y14210	629
Y14211	629
DSM877	GTGTCGGGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTATGCTCGAATACAT	699
AY544695	699
DSM63016	698
AY187065	699
AY187078	699
L37541	698
AY187076	699
Y14210	699
Y14211	699

DSM877	TAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAAT	769
AY544695	769
DSM63016	768
AY187065	769
AY187078	769
L37541	768
AY187076	769
Y14210	769
Y14211	769

DSM877	AGGGATAGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAGACTAACTAC	839
AY544695	839
DSM63016	838
AY187065	839
AY187078	839
L37541	838
AY187076	839
Y14210	839
Y14211	839

DSM877	TGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAGTGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGA	909
AY544695	909
DSM63016	908
AY187065-.....A.....	908
AY187078-.....	908
L37541	908
AY187076-.....	908
Y14210	909
Y14211	909

DSM877	TACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGCGATGTTATCTTTTTGACTCGCTCG	979
AY544695	979
DSM63016	978
AY187065	978
AY187078	978
L37541	978
AY187076	978
Y14210	979
Y14211	979

DSM877	GCACCTCACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAA	1049
AY544695	1049
DSM63016	1048
AY187065	1048
AY187078	1048
L37541	1048
AY187076	1048
Y14210	1049
Y14211	1049

DSM877	TTGACGGAAGGCACCACCAGGCGTGG-AGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAG	1118
AY544695G.....	1119
DSM63016-	1117
AY187065-	1117
AY187078-	1117
L37541--	1115
AY187076-	1117
Y14210-	1118
Y14211-	1118

DSM877	GTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGT	1188
AY544695	1189
DSM63016	1187
AY187065	1187
AY187078	1187
L37541	1185
AY187076	1187
Y14210	1188
Y14211	1188

DSM877	TCTTAGTTGGTGGAGTGATTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCCC	1258
AY544695	1259
DSM63016	1257
AY187065T.....	1257
AY187078	1257
L37541	1255
AY187076	1257
Y14210	1258
Y14211	1258

DSM877	GGCTAGCTTTGGCTGGCTCGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGGCTCAAGCCGATGGAAGTTTGAGGCAAT	1328
AY544695	1329
DSM63016C	1327
AY187065	1327
AY187078	1327
L37541	1325
AY187076	1327
Y14210	1328
Y14211	1328

DSM877	AACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCTACACTGACAGAGCCAACGAGTTTTT	1398
AY544695	1399
DSM63016	1397
AY187065	1397
AY187078	1397
L37541	1395
AY187076	1397
Y14210	1398
Y14211-	1397

DSM877	CTCCTTGACCGAAAGGTCTGGGTAATCTTGTTAAACTCTGTCGTGCTGGGATAGAGCATTGCAATTATT	1468
AY544695	1469
DSM63016	1467
AY187065	1467
AY187078	1467
L37541	1465
AY187076TC.....	1467
Y14210	T.....	1468
Y14211	T.....	1467

DSM877	GCTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATTACGTCCTGCCTTTTGTA	1538
AY544695	1539
DSM63016	1537
AY187065	1537
AY187078	1537
L37541	1535
AY187076	1537
Y14210	1538
Y14211	1537

DSM877	CACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTAAGTGAGGCTTTCGGACTGCCTTAGGGAGGGTGGCA	1608
AY544695	1609
DSM63016	1607
AY187065	1607
AY187078	1607
L37541	1605
AY187076	1607
Y14210T...T.....	1608
Y14211A...C.....	1607

DSM877	ACACCCACCCAGAGGCGGAAAG	1630
AY544695	1631
DSM63016	1629
AY187065	1629
AY187078	1629
L37541	1627
AY187076	1629
Y14210A...A.....	1630
Y14211	1629

Anhang 6: Vergleich der Lcc2 codierenden Sequenzen mit den zugehörigen Intronsequenzen

(Bindungssequenzen und zugehörige Primerbezeichnungen für die Multiplex-PCR sind rot gekennzeichnet)

AF243855 : ATGAAGTATTCTACAGTCTTTACTGCCCCTCACTGCATTATTTGCACAGGCATCTGCAACAGCTATTCCAG : 70
 AF243855G: ATGAAGTATTCTACAGTCTTTACTGCCCTCACTGCATTATTTGCACAGGCATCTGCAACAGCTATTCCAG : 70
 DSM63016 : ATGAAGTGTTTTACATCACTCACTGCCCTCACTGCAATCTTTGCACAGGCATCTGCTTCAGTTATTCCAG : 70
 DSM1946 : ATGAAGTGTTTTACATCACTCACTGCCCTCACTGCAATCTTTGCACAGGCATCTGCTTCAGTTATTCCAG : 70
 DSM2677G : ATGAAGTCCTTTACAGTCTTTACTGCTCTCACTGCATTCTTTGCACAAGCATCTGCATCTGCTATTCCAG : 70
 DSM2677 : ATGAAGTCCTTTACAGTCTTTACTGCTCTCACTGCATTCTTTGCACAAGCATCTGCATCTGCTATTCCAG : 70

MP_SmF

AF243855 : CTGTTCTTCACCCTCGCTCCTCGTCAAAGCACCCTGCCT-----CTGTGCAAACTCGGC : 128
 AF243855G: CTGTTCTTCACCCTCGCTCCTCGTCAAAGCACCCTGCCT-----CTGTGCAAACTCGGC : 128
 DSM63016 : CTATTCTGCTCGCCGGCCACTTCAACCAAAAAGTGCCT-----CCTGTGCACACTCGGC : 128
 DSM1946 : CTATTCTGCTCGCCAGCCACTCAA--CCCAAAAATGG-TGCCT-----CCTGTGTACACTCGGC : 125
 DSM2677G : CTACTAGCTCACCCTGCTTCCGCGTCAAGAACCACTTCCAACATCACTCCGACTTGTGCACACTCGTC : 140
 DSM2677 : CTACTAGCTCACCCTGCTTCCGCGTCAAGAACCACTTCCAACATCACTCCGACTTGTGCACACTCGTC : 140

AF243855 : TACTTCCAGATCTTGTCTGGGGAGAGTATTCCATTGATACCAACTGGTATGATGTTACTCCTAATACTGGA : 198
 AF243855G: TACTTCCAGATCTTGTCTGGGGAGAGTATTCCATTGATACCAACTGGTATGATGTTACTCCTAATACTGGA : 198
 DSM63016 : TACTTCCGATCCTGCTGGGGAGCTTACTCCATCGATACCGACTGGTATGATGTTTATACCACACACTGGA : 198
 DSM1946 : TACTTCTAGATCCTGCTGGGGAGATTACTCTATCGATACACTGACTGGTATGATGTTATTCCCTCACACTGGA : 195
 DSM2677G : TACTTCCAGATCTTGTCTGGGGAGCTTACTCAATCGATACCAACTGGTACGATGTTACTCC---TACAGGA : 207
 DSM2677 : TACTTCCAGATCTTGTCTGGGGAGCTTACTCAATCGATACCAACTGGTACGATGTTACTCC---TACAGGA : 207

AF243855 : GTCACCAGAG-----AATA : 212
 AF243855G: GTCACCAGAGGATGTGATATCGAATTCCTA-G---TCTCTAGTCTATCACTAACTCGATATACAGAATA : 264
 DSM63016 : GTTACCAGAGGATGTGATATCACATTTCTCACTACCTAGTCTAGTACTAA-TTTATGATAGAAATA : 267
 DSM1946 : GTCACTAGAGGATGTGATATCACATTTCTCA---ATTTACTAGTCTAATACTAA-TTTTTGCATAGAATA : 261
 DSM2677G : GTCACTAGAGGTAAGTGTATGATGACATCCTTT-T---GTACCAGTCTAGCGCTAACTTTATCTAAAGAAATA : 273
 DSM2677 : GTCACTAGAG-----AATA : 221

MP_SsF

AF243855 : CTGGCTTTTCAGTTGAGAACTCCACCATCACACCTGATGGTTATACTCGCTCAGCCATGACCTTCAATGGA : 282
 AF243855G: CTGGCTTTTCAGTTGAGAACTCCACCATCACACCTGATGGTTATACTCGCTCAGCCATGACCTTCAATGGA : 334
 DSM63016 : CTGGCTTTTCGTTGAGAACTCCACTATAAACCCTGATGGTTATAACCCGCTCAGCCATGACCATCAATGGA : 337
 DSM1946 : CTGGCTTTTCGTTGAGAACTCCACTATAAACCCTGACGGGTATAACCCGCTCAGCCATGACCTTTAATGGA : 331
 DSM2677G : TTGGCTTTTCAGTTGAGAACACCACCATCACCCCTGATGGCTATACTCGCTCAGCCATGACCTTCAATGGA : 343
 DSM2677 : TTGGCTTTTCAGTTGAGAACACCACCATCACCCCTGATGGCTATACTCGCTCAGCCATGACCTTCAATGGA : 291

AF243855 : ACTGTTCCAGGACCTGCAATTACAGCAGACTGGGGTGACAATCTTATAATCC----- : 334
 AF243855G: ACTGTTCCAGGACCTGCAATTACAGCAGACTGGGGTGACAATCTTATAATCCGTAGGCTCTCCAGTCACTC : 404
 DSM63016 : ACCGTCCTTGCCCTGCAATTATCGCGGACTGGGGGACAATCTTGTAAATCCGTAAGTCTCCGATAGCGC : 407
 DSM1946 : ACCGCCCTTGCCCTGCAATTATCGCGGACTGGGGGACAATCTTGTAAATCCGTAAGTCTTCGATAGCGC : 401
 DSM2677G : ACAGTCCCTGGCCGCAATTTATTGCTGATTGGGGTGACAATCTTATAATCCGTATGCTTCTCAGT----- : 408
 DSM2677 : ACAGTCCCTGGCCGCAATTTATTGCTGATTGGGGTGACAATCTTATAATCC----- : 343

AF243855 : ----- : -
 AF243855G: AGAGAGCCTCTTT--GTCCTCACAACTTGAGGCCCTCAAATATCACTGTTTAAAGCTTTGATTGCTCCTT : 472
 DSM63016 : ACCGAATCTCAAAAGTCCTCGATAGCATGGGATATCCTCA-ATCATCCTTTTG---CATGTTCTCTCTC : 472
 DSM1946 : GCCGAATCTCAAT-GTCCTCCATAAGATCAGAAATTTTCATATCATCCTTTTG---CATGATTCTTCTT : 466
 DSM2677G : -----TC-----CATCAT--CTCG-G---AA-GATCATCTTTTT--GCTT-GATTCCACTT : 450
 DSM2677 : ----- : -

MP_BcF

AF243855 : -----ACGTTACCAACAATCTCCAACACAATGGTACATCTATT**CATTGGCATGGAA** : 385
 AF243855G: **GCTAACTACCTGATTACAG**ACGTTACCAACAATCTCCAACACAATGGTACATCTATT**CATTGGCATGGAA** : 542
 DSM63016 : **ACTAACTA-CGAGTCACAG**ATGTCACCAACAATCTTCAACACAATGGAAACGCCATTCACTTCCACGGTA : 541
 DSM1946 : **ACTAACCA-CGGGTCATAG**ATGTCACCAATAATCTTCAACATAAATGGAAACGCCATTCATTTCCACGGTA : 535
 DSM2677G : **ACTAACCTCT-ACTACAG**ATGTAACAAACAATCTTGAATACAATGGAAACATCCATT**CATTGGCACGGGA** : 519
 DSM2677 : -----ATGTAACAAACAATCTTGAATACAATGGAAACATCCATT**CATTGGCACGGGA** : 394

MP_MfF

* 600 *

AF243855 : TTCGTC**CAACTAGG**AAGTCTCGAATACGACGGCGTACCCG----- : 426
 AF243855G: TTCGTC**CAACTAGG**AAGTCTCGAATACGACGGCGTACCCG**GTATGCTTTAAAAGATTGTGACCATGCGAT** : 612
 DSM63016 : TTCGTCAGAAAGGGAAGCTTAGAGTACGATGGTGTGCCCG----- : 589
 DSM1946 : TTCGTCAGAAAGGGAAGCTTAGAGTACGATGGAGTGCCCG----- : 583
 DSM2677G : TTCGTC**CAGCGAAG**AAGTTTAGAATATGACGGTGTCCAG**GTGTCACTCAAGTAAGTT**---A--AT----- : 579
 DSM2677 : TTCGTC**CAGCGAAG**AAGTTTAGAATATGACGGTGTCCAG**GTGTCACTCAA**----- : 444

640 * 680 *

AF243855 : ----- : -
 AF243855G: **CACAAGAATATTTCCCCTTTTCCCTCCCTTTTCGCTCATAATTTCCCTCCCTACATCCATAACTCTTG** : 682
 DSM63016 : ----- : -
 DSM1946 : ----- : -
 DSM2677G : **C-CAAATATACGCCACCTTT**-----**ACTTC**-----**AAC**----- : 606
 DSM2677 : ----- : -

720 * 760

AF243855 : -----GTGTA**ACTCAAT**GTCTTATCGCTCCTGGAGAT : 456
 AF243855G: **CCAGTCTTCTACTGAAAAATTACTAACATAAATTACAGG**TGTA**ACTCAAT**GTCTTATCGCTCCTGGAGAT : 752
 DSM63016 : -----GTGTT**ACTCAAT**GTCTTATCGCTCCTGGAGAT : 612
 DSM1946 : -----GTGTT**ACTCAGT**GTCTTATCGCTCCTGGAGAT : 606
 DSM2677G : -----**CTAACAT**-----**CCCCATCAAG**TGCCCTATAGCTCCTGGAGAC : 644
 DSM2677 : -----TGCCCTATAGCTCCTGGAGAC : 465

* 800 * 840

AF243855 : ACCTTGACCTACAAAT**TCCAAGCTACTCAAT**ATGGAAC**CACTGGTATCACTCTCACTTCTCTCTCAAT** : 526
 AF243855G: ACCTTGACCTACAAAT**TCCAAGCTACTCAAT**ATGGAAC**CACTGGTATCACTCTCACTTCTCTCTCAAT** : 822
 DSM63016 : ACCTTGACCTACAA**GTCCAAGCTACTCAAT**ATGGA**ACTACTTGGTATCACTCTCACTTCTCTCTCAAT** : 682
 DSM1946 : ACCTTGACCTACAA**GTCCAAGCTACTCAAT**ATGGA**ACTACTTGGTATCACTCTCACTTCTCTCTCAAT** : 676
 DSM2677G : ACCTTGACCTACAA**GTCCAAGTTACTCAAT**ACGGA**CACTTGGTATCACTCTCACTTCTCGCTTCAAT** : 714
 DSM2677 : ACCTTGACCTACAA**GTCCAAGTTACTCAAT**ACGGA**CACTTGGTATCACTCTCACTTCTCGCTTCAAT** : 535

* 880 *

AF243855 : ACGTGATGGACTCTTTGGACCCTTGATC**ATTAATGGTCCCGCTACTGCGGACTATGATGAAGATGTTGG** : 596
 AF243855G: ACGTGATGGACTCTTTGGACCCTTGATC**ATTAATGGTCCCGCTACTGCGGACTATGATGAAGATGTTGG** : 892
 DSM63016 : ACGTGATGGGCTCTTCGGCCCTCTC**ATCATTAAAGGTCCTGCCACTGCAGACTACGATGAGGATCTTGG** : 752
 DSM1946 : ACGTGATGGACTCTTTGGCCCTCTT**ATCATTAAAGGTCCTGCCACTGCAGACTACGATGAGGATCTTGG** : 746
 DSM2677G : ATGCTGATGGACTTTTGGTCCCTTGATC**ATTAATGGCCCTGCAACTGCGGACTATGATGAGGATCTGGG** : 784
 DSM2677 : ATGCTGATGGACTTTTGGTCCCTTGATC**ATTAATGGCCCTGCAACTGCGGACTATGATGAGGATCTGGG** : 605

920 * 960 *

AF243855 : TGCAATTTTCTCCAAGATTGGGCACATA**AAATCCGTTTTCGAAATTTGGGACTCCGCTAGACAAGTGCT** : 666
 AF243855G: TGCAATTTTCTCCAAGATTGGGCACATA**AAATCCGTTTTCGAAATTTGGGACTCCGCTAGACAAGTGCT** : 962
 DSM63016 : AGTAATGTTTTGGGTGATTGGGCACAC**GAACCGTCTTCGATCTTTGGGATCGCGCTAGATCCGGCCCT** : 822
 DSM1946 : AGTCATGTTCTGGGAGATTGGGCACAC**CAACCGTCTTCGATATTTGGGATGCCGCTAGAGCGGGCACT** : 816
 DSM2677G : ACCAATCTTCTCCAAGACTGGGCACAT**CAATCCGTTTTGAAATCTGGGATACCCTAGACTTGGCGCT** : 854
 DSM2677 : ACCAATCTTCTCCAAGACTGGGCACAT**CAATCCGTTTTGAAATCTGGGATACCCTAGACTTGGCGCT** : 675

1000 * 1040

AF243855 : CCTCCAGCACTTGA**AAACACTTTGATGAATGGAACCAACATCTACGATTGCTCAGTCTCTACTGATGCTA** : 736
 AF243855G: CCTCCAGCACTTGA**AAACACTTTGATGAATGGAACCAACATCTACGATTGCTCAGTCTCTACTGATGCTA** : 1032
 DSM63016 : CCTATCTCTCTTCCA**AAACACTTTGATGAACGGAACCAACAGTTGCGAGTGCATACTTCT**---GATCC**TC** : 889
 DSM1946 : CGTCCATCTCTTCCA**AAACACTTTGATGAACGGAACCAATAGTTGCGAGTGCATACTTCT**---GATCC**CA** : 883
 DSM2677G : CCTCCAGCTCTTCCA**AAACACTTTGATCAATGGAACCAACACTTTGATGCTCAGTCTCTGAAGATGCCA** : 924
 DSM2677 : CCTCCAGCTCTTCCA**AAACACTTTGATCAATGGAACCAACACTTTGATGCTCAGTCTCTGAAGATGCCA** : 745

* 1080 * 1120

AF243855 : ACT**CGGTTGGTGGTGGTAAGAAATTCGAG**TTA**ACTTTTCGTCGAAGGCACAAAATACAGATTGAGATTGAT** : 806
 AF243855G: ACT**CGGTTGGTGGTGGTGGTAAGAAATTCGAG**TTA**ACTTTTCGTCGAAGGCACAAAATACAGATTGAGATTGAT** : 1102
 DSM63016 : AGT**CGGTTGGTGGTGGTAAGAAATTCGAG**GCAGT**TTTCGTCGAGGGCCAAAAGTACAGAATCAGATTGAT** : 959
 DSM1946 : AGT**CGGTTGGTGGTGGTAAGAAATTCGAG**GCAGT**TTTCGTCGAGGGCCAAAAGTACAGAATCAGATTGAT** : 953
 DSM2677G : ACT**CGGTTGGTGGCGGTAAGAAATTCGAG**TTGAC**TTTCGTCGAAGGTAATAATATAGATTGAGATTACT** : 994
 DSM2677 : ACT**CGGTTGGTGGCGGTAAGAAATTCGAG**TTGAC**TTTCGTCGAAGGTAATAATATAGATTGAGATTACT** : 815

MP_UniR

* 1160 *

AF243855 : CAATGTTGGAATTGACAGTCACTTCGAATTCGCCATTGATAATCACACACTCACTGTTATTGCCAACGAT : 876
 AF243855G : CAATGTTGGAATTGACAGTCACTTCGAATTCGCCATTGATAATCACACACTCACTGTTATTGCCAACGAT : 1172
 DSM63016 : CAATGTTGGTATTGACAGTCACTTCGAATTCGCCATTGATGGCCACACTCTTACCGTCATTGCTAATGAT : 1029
 DSM1946 : CAATGTTGGTATTGACAGTCACTTCGAATTCGCCTATTGATGGTCACTCTTACCGTCATTGCTAATGAT : 1023
 DSM2677G : CAACGTTGGAATTGATAGTCATTTGAATTCGCCATTGATGGTCAACAATCTTACTGTCAATCGCTACCGAT : 1064
 DSM2677 : CAACGTTGGAATTGATAGTCATTTGAATTCGCCATTGATGGTCAACAATCTTACTGTCAATCGCTACCGAT : 885

1200 * 1240 *

AF243855 : CTTGTTCCAATTGTGCCCTACACTACCGATACTCTTCTCATTTGGTATTGGACAAAAGATACGATGTTATCG : 946
 AF243855G : CTTGTTCCAATTGTGCCCTACACTACCGATACTCTTCTCATTTGGTATTGGACAAAAGATACGATGTTATCG : 1242
 DSM63016 : CTTGTTCCATATCGTCCCATATACACTGAGACTCTCCTCATTTGGTATTGGTCAAAGATACGATGTCATCG : 1099
 DSM1946 : CTTGTTCCATATCGTCCCATATACACTACTGACACCCCTCCTCATTTGGTATTGGTCAAAGATACGATGTCATCG : 1093
 DSM2677G : CTAGTTCCTATCAGCCCGTACACCACCGATACCCCTCCTCATAGGTATCGGTCAAAGATACGATGTCATCG : 1134
 DSM2677 : CTAGTTCCTATCAGCCCGTACACCACCGATACCCCTCCTCATAGGTATCGGTCAAAGATACGATGTCATCG : 955

1280 * 1320

AF243855 : TTGAGGCCAAATGCGGCAGCAGACAACACTACTGGATTAGAGGAAACTGGGGAACCCCTGCTCATCCAACCT : 1016
 AF243855G : TTGAGGCCAAATGCGGCAGCAGACAACACTACTGGATTAGAGGAAACTGGGGAACCCCTGCTCATCCAACCT : 1312
 DSM63016 : TCGAAGCTAATGCTAAGCCTAATAACTACTGGATCCGCGCAACTGGGGAACTGCTTGCTCATCCAACCT : 1169
 DSM1946 : TCGAAGCTAATGCTAAGCCTAATAACTACTGGATCCGCGCAACTGGGGAACTGCTTGCTCATCCAACCT : 1163
 DSM2677G : TCGAGGCCAACGCCACAGCCGGTACTACTGGATCCGCGCAACTGGGGAACTGCTTGCTCAACCAATCT : 1204
 DSM2677 : TCGAGGCCAACGCCACAGCCGGTACTACTGGATCCGCGCAACTGGGGAACTGCTTGCTCAACCAATCT : 1025

* 1360 * 1400

AF243855 : GGAAGCAGCAAATGCCACAGGTATCCTCCGATACGATAGTTCAGCACCCTAGATCCTACCTCTGTCCGGT : 1086
 AF243855G : GGAAGCAGCAAATGCCACAGGTATCCTCCGATACGATAGTTCAGCACCCTAGATCCTACCTCTGTCCGGT : 1382
 DSM63016 : GCGAGCTGCCAACGCCACGGGAATCTTGGATACAAACAGTCCAGCACCAGCAGAACCTACCTCTGTCCGGC : 1239
 DSM1946 : GCAAGCAGCAAACGCCACTGGAATCTTGGATACAAACAGTTCAGCACCAGCAGAACCTACCTCCGTCCGGC : 1233
 DSM2677G : CAACGCCGCAATGCCACTGGCATTCTCCGCTACGACTCTTCCAGCACCAGCAGCCAACCTCAGTCCGGC : 1274
 DSM2677 : CAACGCCGCAATGCCACTGGCATTCTCCGCTACGACTCTTCCAGCACCAGCAGCCAACCTCAGTCCGGC : 1095

* 1440 *

AF243855 : GTCACTCCCCTGGTACTTGCGCGGATGAGCCGGTTGCCAGTCTTGTTCACACTTGGCATTGGACGTTG : 1156
 AF243855G : GTCACTCCCCTGGTACTTGCGCGGATGAGCCGGTTGCCAGTCTTGTTCACACTTGGCATTGGACGTTG : 1452
 DSM63016 : GCCACCCACGCGGTACTTGTGGGGATGAACCACTTGCAGCTTGGTTCGGCATTTAGCAATGGATGTCG : 1309
 DSM1946 : GTCACCCACGTTGGTACTTGTGCTGATGAGCCACTTGCAGCTTAGTTCACACTTAGCCATGGATGTCG : 1303
 DSM2677G : ACCACAGCCCGGTACTTGCGCGGATGAACCAATAGCAAGTCTCGTTCCTCACCTAGCACTAGACGTTAG : 1344
 DSM2677 : ACCACAGCCCGGTACTTGCGCGGATGAACCAATAGCAAGTCTCGTTCCTCACCTAGCACTAGACGTTAG : 1165

1480 * 1520 *

AF243855 : GTGGATACTCTCTCGTCGACGAAACAGGTGCTTTTCGCCTTACCAACTACTTTCACATGGACCATCAACT : 1226
 AF243855G : GTGGATACTCTCTCGTCGACGAAACAGGTGCTTTTCGCCTTACCAACTACTTTCACATGGACCATCAACT : 1522
 DSM63016 : GTGACTATGCTCTCATGGACGAGAAATTAACACTGGATCCCGGCAACGTCATAACCTGGACCATCAACAG : 1379
 DSM1946 : GAAGCTATGCACTCATGGACGAGAAATTAACACTGGATCCCGGCAACGTCATAACCTGGACCATCAACAG : 1373
 DSM2677G : GAAGCTATGCTCTCTCGTTGATGAACAATGAGTTTCTCAGCCGCAAACTACTTTCACCTGGACCATCAACT : 1414
 DSM2677 : GAAGCTATGCTCTCTCGTTGATGAACAATGAGTTTCTCAGCCGCAAACTACTTTCACCTGGACCATCAACT : 1235

1560 * 1600

AF243855 : AAGTAGTTTACTCCTTGACTGGAGCTCCCAACAACCTCTCAAGATTTTCAACAACGAGACAATCTTCCCA : 1296
 AF243855G : AAGTAGTTTACTCCTTGACTGGAGCTCCCAACAACCTCTCAAGATTTTCAACAACGAGACAATCTTCCCA : 1592
 DSM63016 : CAGTCTCTCGTCTCGACTGGACCAACCAACAGCTCCAAGTATTCGGCAACGAATCAATCTTCCCA : 1449
 DSM1946 : TAGTCTCTCGTCTCGACTGGACCAACCAACCACTCAAGTATTCGAAACGAATCCCTCTTCCCA : 1443
 DSM2677G : TAGTCTCTCGTCTCGACTGGGCGGACCCCAACGACTCTCAAAATTTTCAAAAACGAATCCATCTTTCT : 1484
 DSM2677 : TAGTCTCTCGTCTCGACTGGGCGGACCCCAACGACTCTCAAAATTTTCAAAAACGAATCCATCTTTCT : 1305

* 1640 * 1680

AF243855 : ACTGATTACAACGTTGTCGCTCTCAATCAAACACTGACGCCAATGAAGAG---TGGGTCGTCTATGTCATCG : 1363
 AF243855G : ACTGATTACAACGTTGTCGCTCTCAATCAAACACTGACGCCAATGAAGAG---TGGGTCGTCTATGTCATCG : 1659
 DSM63016 : ACAGACTACAACGTCGTTCTTATCAGCAAGGAAATCACAACACTCAGAC---TGGGTCGTCTATGTCATCG : 1516
 DSM1946 : ACAGACTACAACGTCGTTCTTATCACAAGGAAATCGCAAATGGAGACGACTGGATCGTCTACGTCATCG : 1513
 DSM2677G : ACAGACTATAACGTCGTAGCTCTAGACAAATCAAGCGCAAATGACGAT---TGGGTCGTCTACGTTATCG : 1551
 DSM2677 : ACAGACTATAACGTCGTAGCTCTAGACAAATCAAGCGCAAATGACGAT---TGGGTCGTCTACGTTATCG : 1372

* 1720 *

AF243855 : AAGATCTCACCCGGCTTCGGCATTGGCATCTCCATCTCCACGGTCACGATTTTACGTCGTAGCTCA :1433
AF243855G : AAGATCTCACCCGGCTTCGGCATTGGCATCTCCATCTCCACGGTCACGATTTTACGTCGTAGCTCA :1729
DSM63016 : AAGATCTCACCCGGGTACCTGGCACCCTATGCATCTCCACGGCCACGATTTCTTCATCGTCGGTCA :1586
DSM1946 : AAGATCTCACCCACTCTGGCACCTGGCACCCTATGCATCTCCACGGACACGATTTCTTCATCGTCGGTCA :1583
DSM2677G : AAGATCTAACTGGTTTTGGCATCTGGCATCCCATCCATCTCCACGGCCACGATTTCTATATCGTGGGCCA :1621
DSM2677 : AAGATCTAACTGGTTTTGGCATCTGGCATCCCATCCATCTCCACGGCCACGATTTCTATATCGTGGGCCA :1442

1760 * 1800 *

AF243855 : AGAAACTGATGTGTTTCAGTGCTACCAAGTCGCCAGCCAACCTTCAACCTCGTCAATCCTCCCCGTCGTGAC :1503
AF243855G : AGAAACTGATGTGTTTCAGTGCTACCAAGTCGCCAGCCAACCTTCAACCTCGTCAATCCTCCCCGTCGTGAC :1799
DSM63016 : GGAACAAGCCGTCTTCGACCCCGTCAACACCCCTTCCACTTCAACCTTAAGAATCCTCCTCGTCGTGAC :1656
DSM1946 : AGAAGCTGTGTCTTCGACCCTGTCAACACTCCCCTACCTTCAACCTCAATAATCCTCCCCGTCGTGAC :1653
DSM2677G : GGAAGCCACTGTATTCAACCCGGCCACATCTCCAAGTAGCTTTAACCTCGTCAATCCTCCCCGTAGAGAC :1691
DSM2677 : GGAAGCCACTGTATTCAACCCGGCCACATCTCCAAGTAGCTTTAACCTCGTCAATCCTCCCCGTAGAGAC :1512

1840 * 1880

AF243855 : GTTGCCGCACTCCCCGAAACGGTTATCTTGCCATTGCATTCAAGCTTGACAACCCCTGGTTCCTGGCTTC :1573
AF243855G : GTTGCCGCACTCCCCGAAACGGTTATCTTGCCATTGCATTCAAGCTTGACAACCCCTGGTTCCTGGCTTC :1869
DSM63016 : GTGGCTGTCTTCCCGCCGGCGGTACCTCGCTATCGCTTTCAAGCTCGATAACCCCTGGTTCGTGGCTTC :1726
DSM1946 : GTGGCTGTCTTCCGGCTGGCAGGATATCTCGCCATCGCGTTCAAGCTTGATAATCCTGGTTCGTGGCTTC :1723
DSM2677G : GTTGCTGCACTTCCCTGAAATGGCTACTTGCCATTGCGTTTAAAGCTTGACAATCCTGGTTCCTGGCTTC :1761
DSM2677 : GTTGCTGCACTTCCCTGAAATGGCTACTTGCCATTGCGTTTAAAGCTTGACAATCCTGGTTCCTGGCTTC :1582

* 1920 *

AF243855 : TTCATTGCCATATCGCATGGCAGCATCTGAGGGATTAGCAATGCAATTTGTGGAGTCTCAAAGCTCGAT :1643
AF243855G : TTCATTGCCATATCGCATGGCAGCATCTGAGGGATTAGCAATGCAATTTGTGGAGTCTCAAAGCTCGAT :1939
DSM63016 : TTCACTGCCATATCGCGTGGCAGCATCCGAGGGTTGGCTATGCAGTTTGTGGAGTCTGAGAGCTCGAT :1796
DSM1946 : TTCACTGCCATATCGCATGGCAGCATCCGAGGGACTGGCAATGCAATTTGTAGAGTCCGAGAGCTCGAT :1793
DSM2677G : TTCATTGCCACATTGCGTGGCAGCTTCCGAAGGGTTGGCCATGCAATTTGTGCGAGAGCCAGAGCTCGAT :1831
DSM2677 : TTCATTGCCACATTGCGTGGCAGCTTCCGAAGGGTTGGCCATGCAATTTGTGCGAGAGCCAGAGCTCGAT :1652

* 2000 *

AF243855 : TGCGATCGGTATGAGCGATACTGATATTTTCGAGGATACTTGCGCAAACCTGGAATGCCTATACTCCTACT :1713
AF243855G : TGCGATCGGTATGAGCGATACTGATATTTTCGAGGATACTTGCGCAAACCTGGAATGCCTATACTCCTACT :2009
DSM63016 : TGCCATTGGTATGAAGGATACCCAGATCTTTGATAATACTGCAAGAATTGGAATGCATATGTTCCAACT :1866
DSM1946 : TGCGATCGGTATGAAGATACTGAGATCTTTGATAATACTGCAAGAATTGGAATGCATATGTTCCAACT :1863
DSM2677G : TGCAAGTGGCATGAAAGATACAGCCATCTTTGAGGATACTGCTCGAACTGGAATGCGTATGTTCTCTGGG :1901
DSM2677 : TGCAAGTGGCATGAAAGATACAGCCATCTTTGAGGATACTGCTCGAACTGGAATGCGTATGTTCTCTGGG :1722

2040 *

AF243855 : GAGTTGTTTCGCGGAGGACGATTCTGGAATCTAA :1746
AF243855G : GAGTTGTTTCGCGGAGGACGATTCTGGAATCTAA :2042
DSM63016 : GAGGTATTTCTCAAGACGATTCTGGTATCTAG :1899
DSM1946 : GAGGTATTTCTCAGGATGATTCTGGAATCTAA :1896
DSM2677G : GAATTGTTTCGCGGAGGACGATTCTGGTATCTAG :1934
DSM2677 : GAATTGTTTCGCGGAGGACGATTCTGGTATCTAG :1755

Anhang 7: Von den Genen abgeleitete Proteinsequenzen

(mögliche Glykosylierungspositionen sind blau markiert)

***Monilinia fructigena* DSM2677 (584 aa, 11 mögliche Glykosylierungspositionen)**

MKSFTVFTALTAFFAQASASAI PATSSPI FPRQ**NTT****S****NIT**PTCAHSSTSRSCWGAYSIDT
 NWYDVTPTGVTREYWLSV**ENTT**ITPDGYTRSAMTF**NGT**VPGPAIIADWGDNLIIHVTNNL
 EY**NGT**SIHWHGIRQRRSLEYDGVPGVTQCP IAPGDTLTYKFQVTQYGT TWYHSHFSLQYA
 DGLFGPLI INGPATADYDEDLGP IFLQDWAHQSAFEIWD TARLGAPPALPNTLI**NGT**NTF
 DCSSSEDANCVGGGKKFELTFVKGKKYRLRLLNVGIDSHFEFAIDGH**NLT**VIATDLVPIT
 PYTTDTLLIGIGQRYDVIVE**ANAT**AGDYWIRGNWGTSCSTNLNA**ANAT**GILRYDSSSTAD
 PTVSGTTARGTCGDEPIASLVPHLALDVGSYSLVDEQLSFSAANYFTWTI**NSS**SLVLDWA
 SPTTLKIFK**NES**IFPTDYNVVALDKSSANDDWVVYVIEDLTGFGIWHPIHLHGHDYFIVG
 QEATVFN PATSPSSFNLVNPPRRDVAALPGNGYLAI AFKLDNPGSWLLHCHIAWHASEGL
 AMQFVESQSSIAVRMKDTAIFEDTCSNWNAYVP GELFAEDDSGI

***Sclerotinia minor* DSM63016 (580 aa, 8 mögliche Glykosylierungspositionen)**

MKCFTSLTALTALTAIFAQASASAI PAIRSPATSHQKVTASCAHSATSRSRSCWGAYSIDTDWYD
 VIPHTGVTREYWLSV**ENST**ITPDGYTRSAMTI**NGT**VPGPAIIADWGDNLVIHVTNNLQH**N**
GTAIHFHGIRQKGSLEYDGVPGVTQCP IAPGDTLTYKFQATQYGT TWYHSHFSLQYADGL
 FGPLI INGPATADYDEDLGVMFLGDWAHETVFDLWDRARSGPPI SLPNTLM**NGT**NSCECD
 TSDPQCVGGGKKFEAVFVEGQKYRIRLINVGIDSHFEFAIDGH TLTVIANDLVPIVYPYTT
 ETL LIGIGQRYDVIVEANAKPNNYWIRANWGTACSSNLRA**ANAT**GILRY**NSS**STAEPTSV
 GATPRGTCGDEPLASLVPHLAMVDVGYALMDEKLNWILGNVITWTI**NSS**SLVLDWTNPTT
 LQVFR**NES**IFPTDYNVPI SKEITNSDWVVYVIEDLT TAGTWHPMHLHGHDFFIVGQEQA
 VFDPVNT PSTFNLKNPPRRDVAALPAGGYLAI AFKLDNPGSWLLHCHIAWHASEGLAMQF
 VESESSIAIGMKDTQIFDNTCKNWNAYVPTEVFPQDDSGI

***Sclerotinia sclerotiorum* DSM1946 (580 aa, 9 mögliche Glykosylierungspositionen)**

MKCFTSLTALTALTAIFAQASASVI PAIRSPATQPKNGASCVHSATSRSRSCWGDYSIDTDWYDVI
 PHTGVTREYWLSV**ENST**ITPDGYTRSAMTF**NGT**APGPAIIADWGDNLVIHVTNNLQH**NGT**A
 IHFHGIRQKGSLEYDGVPGVTQCP IAPGDTLTYKFQATQYGT TWYHSHFSLQYADGLFGPL
 I INGPATADYDEDLGVMFLGDWAHQTVFDI WDAARAGTRPSLQNTLM**NGT**NSCECDTSDPK
 CVGGGKKFEAVFVEGQKYRIRLINVGIDSHFEFAIDGH TLTVIANDLVPIVYPYTTDTLLIG
 IGQRYDVIVE**ANAT**PDNYWIRGNWGTACAPNLQ**ANAT**GILRY**NSS**STAEPTSVGVTPRGT
 CADEPLASLVPHLAMVDVGYALMDEKLDWVRGNILTWTI**NSS**SLVLDWTNPTTLQVFR**NES**
 LFPTDYNVVPINKEIANGDDWIVYVIEDLTHSGTWHPMHLHGHDFFIVGQEAAVFDPVNTP
 ATFNLNPPRRDVAALPAGGYLAI AFKLDNPGSWLLHCHIAWHASEGLAMQFVESESSIAI
 GMKDTEIFDNTCKNWNAYVPTEVFPQDDSGI

Anhang 8: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der einzelnen Laccasen

AAK77953: MKYSTVFTALTALFAQASATAIPAVRSPLAPRQSTTA----SCANSATSRSCWGEYSIDTNWYDVTPTNTGVVRE : 70
 DSM63016: ..CF.SL.....I.....S....I...ATSH.KV.----.H.....A.....D....I.H..... : 70
 DSM1946 : ..CF.SL.....I.....SV...I...AT-QPKNG.----.VH.....D.....D....I.H..... : 69
 DSM2677 : ..SF.....F.....S....TS..IF...N...SNITPT..H.S.....A.....-..... : 73

80 * 120 *
 AAK77953: YWLSVENSTITPDGYTRSAMTFNGTVPGPAITADWGDNLIIHVTTNNLQHNGTSHHWHGIRQLGSLEYDGVPGVT :144
 DSM63016:I.....I.....V.....A..F....K.....:144
 DSM1946 :A.....I.....V.....A..F....K.....:143
 DSM2677 :T.....I.....EY.....RR.....:147

160 * 200 *
 AAK77953: QCPIAPGDTLTYKFQATQYGTWYHSHFSLQYADGLFGPLIINGPATADYDEDVGAIFLQDWAHKSVEFIWDSA :218
 DSM63016:L.VM..G....ET..DL..R.:218
 DSM1946 :L.VM..G....QT..D..A.:217
 DSM2677 :V.....L.P.....Q.A.....T.:221

240 * 280
 AAK77953: RQGAPPALENTLMNGTNIYDCSASTDANCVGGGKFFELTFVEGTYRRLINVGIDSHFEFAIDNHTLTVIAND :292
 DSM63016: .S.P..IS.P.....SCE.DT.-.PQ.....AV...Q...I.....G.....:291
 DSM1946 : .A.TR.S.Q.....SCE.DT.-.PK.....AV...Q...I.....G.....:290
 DSM2677 : .L.....P...I...TF...S.E.....K.K.....L.....G.N.....T.:295

* 320 * 360
 AAK77953: LVPPIVPTTDTLLIGIGQRYDVIVEANAAADNYWIRGNWGTTCSSNSEAANATGILRYDSSSTVDPTSVGVTPR :366
 DSM63016:E.....KPN....A...A...LR.....N...AE....A...:365
 DSM1946 :TP.....A.AP.LQ.....N...AE.....:364
 DSM2677 :T.....T.GD.....S..T.LN.....A.....T.A.:369

* 400 * 440
 AAK77953: GTCADPEVASLVPHLALDVGYSLVDEQVSFAFTNYFTWTINSSSLLLDWSSPTTLKIFNNETIFPTDYNVVAL :440
 DSM63016: ...G...L.....M...D.A.M...KLNWILG.VI.....V...TN...QV.R..S.....PI :439
 DSM1946 : ...L.....M...S.A.M...KLDWVRG.II.....V...TN...QV.R..SL.....PI :438
 DSM2677 : ...G...I.....S.....L.SAA.....V...A.....K..S.....:443

* 480 * 512 * 5
 AAK77953: NQTDAN-EEWVVYVIEDLTGFGIWHPIHLHGHDYFVVAQETDVFSATKSPANFNLVNPPRRDVAALPGNGYLAI :513
 DSM63016: SKEIT.-SD.....TA.T...M.....FI.G..QA..DPVNT.ST...K.....AG.....:512
 DSM1946 : .KEI..GDD.I.....HS.T...M.....FI.G..AA..DPVNT..T...N.....AG.....:512
 DSM2677 : DKSS...DD.....I.G..AT..NPAT..SS.....:516

20 * 560 *
 AAK77953: AFKLDNPGSWLLHCHIAWHASEGLAMQFVESQSSIAIGMSDTDIFEDTCANWNAYTPELFAEDDSGI :581
 DSM63016:E.....K..Q..DN..K....V...V.PQ.....:580
 DSM1946 :E.....K..E..DN..K....V...V.PQ.....:580
 DSM2677 :VR.K..A.....S.....V.G.....:584

Anhang 9: In Datenbanken hinterlegte Sequenzen**Internal transcribed spacer region (ITS)**

S. sclerotiorum DSM1946 EF110889

18S rDNA

S. minor DSM63016 EF110888

B. cinerea DSM877 EF110887

Sequenzen der identifizierten Laccasen

M. fructigena DSM2677 EF050081

S. sclerotiorum DSM1946 EF050080

S. minor DSM63016 EF050079

Anhang 10: Verwendete Web-Adressen

Kulturensammlungen

<http://www.dsmz.de/>

<http://www.lgcpromochem-atcc.com/>

<http://www.cbs.knaw.nl/index.htm>

Informationen zu Sclerotiniaceae

<http://www.ndsu.nodak.edu/plantpath/sclero.htm>

<http://www.mycology.net/>

<http://www.indexfungorum.org/>

<http://nt.ars-grin.gov/fungal-databases/index.cfm>

<http://biologi.uio.no/bot/ascomycetes/Sclero.key.html>

<http://www.landwirtschaft-bw.info/>

<http://www.scopus.com/scopus/home.url>

<http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3025.html>

Datenbanken zur Primer- und Sequenzanalyse

<http://www.broad.mit.edu/annotation/fgi/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ebi.ac.uk/Databases/>

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<http://www.expasy.org/>

<http://www.operon.com/>

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die dem Sinn und Wortlaut anderen Quellen entnommen wurden, sind durch Angabe kenntlich gemacht.

Steffen Hirschhäuser