

**„Beschreibung von phytotoxischen Dioxolanonen als
konstitutive Virulenzfaktoren
und
Etablierung eines Transformationssystems zur
zielgerichteten Mutagenese in *Guignardia bidwellii*“**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor
der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Iris Buckel
geb. in Dortmund

Mainz, Dezember 2015

Beschreibung von phytotoxischen Dioxolanonen als
konstitutive Virulenzfaktoren und Etablierung eines
Transformationssystems zur zielgerichteten
Mutagenese in *Guignardia bidwellii*

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2015

Beschreibung von phytotoxischen Dioxolanonen als
konstitutive Virulenzfaktoren und Etablierung eines
Transformationssystems zur zielgerichteten
Mutagenese in *Guignardia bidwellii*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2011 bis Oktober 2012 am
Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung e.V. in Kaiserslautern

und

von November 2012 bis August 2015 am Lehrstuhl Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung
im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

angefertigt.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine
anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Mainz, 31.08.2015

Iris Buckel

I. Inhaltsverzeichnis

II.	Abkürzungsverzeichnis	VI
III.	Abbildungsverzeichnis	VIII
IV.	Tabellenverzeichnis	X

1. Einleitung..... **1**

1.1.	Klimawandel und Weinbau.....	1
1.2.	Die Schwarzfäule an Reben.....	2
1.3.	Bekämpfungsstrategien der Schwarzfäule.....	4
1.4.	Virulenzfaktoren.....	4
1.5.	Sekundärmetabolismus von <i>Guignardia bidwellii</i>	6
1.6.	Enzyme des Aminosäurestoffwechsels.....	8
1.6.1.	Aspartat-Transaminase (EC 2.6.1.1).....	8
1.6.2.	Chorismat-Synthase (EC 4.2.3.5).....	9
1.6.3.	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (EC 4.3.1.24).....	10
1.7.	Zielsetzung der Arbeit.....	11

2. Material und Methoden..... **13**

2.1.	Material.....	13
2.1.1.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	13
2.1.2.	Enzyme.....	15
2.1.3.	Reaktionskits.....	16
2.1.4.	Lösungen, Puffer und Kulturmedien.....	16
2.1.4.1.	Lösungen.....	16
2.1.4.2.	Puffer.....	18
2.1.4.3.	Kulturmedien.....	20
2.1.5.	Organismen.....	24

2.1.6. Plasmide.....	26
2.1.7. Oligonukleotide.....	26
2.1.8. Photographische Hilfsmittel.....	27
2.1.9. Software.....	27
2.2. Methoden der Bioinformatik.....	28
2.2.1. Identifizierung unbekannter Gensequenzen in <i>Guignardia bidwellii</i>	28
2.2.2. Generierung einer Gensequenzdatenbank aus <i>Guignardia bidwellii</i>	28
2.3. Methoden der Fermentation und Naturstoffanalyse.....	29
2.3.1. Fermentation in Submerskulturen.....	29
2.3.2. Herstellung von Rohextrakten aus Kulturfiltrat und Mycel.....	29
2.3.3. Fermentationsanalysen.....	30
2.3.3.1. Fermentationsparameter.....	30
2.3.3.2. Analytische HPLC.....	30
2.3.3.3. Quantitative Wirkstoffbestimmung.....	31
2.3.4. Methoden zur Aufreinigung und Charakterisierung von Naturstoffen.....	31
2.3.4.1. Säulenchromatographie.....	31
2.3.4.2. Präparative HPLC.....	32
2.3.4.3. Massenspektroskopie und Kernspinresonanzspektroskopie.....	32
2.3.5. Bioherbizid-Versuch.....	32
2.3.6. Toxinnachweis <i>in planta</i>	33
2.4. Methoden der Molekularbiologie.....	33
2.4.1. Präparation von Nukleinsäuren.....	33
2.4.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	33
2.4.1.2. Isolierung von genomischer DNA aus <i>Guignardia bidwellii</i>	34
2.4.1.3. Isolierung von RNA aus <i>Guignardia bidwellii</i>	34
2.4.1.4. Synthese von cDNA aus RNA.....	34
2.4.1.5. Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren.....	35
2.4.2. Polymerase-Kettenreaktion.....	35
2.4.2.1. PCR mit der Taq DNA-Polymerase.....	35

2.4.2.2.	<i>Step Down</i> PCR-Methode.....	36
2.4.3.	Restriktion von Nukleinsäuren und Gelelektrophorese.....	36
2.4.3.1.	Restriktion von DNA.....	37
2.4.3.2.	Agarosegelelektrophorese.....	37
2.4.3.3.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	38
2.4.4.	Klonierungsmethoden.....	38
2.4.4.1.	Ligation.....	38
2.4.4.2.	Dephosphorylierung von Schnittstellen.....	38
2.4.4.3.	Sequenzierung von DNA.....	39
2.4.5.	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	39
2.4.5.1.	Präparation elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	39
2.4.5.2.	Transformation elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	39
2.4.5.3.	Identifizierung von Transformanten.....	40
2.4.6.	Transformation von <i>Guignardia bidwellii</i>	40
2.4.6.1.	Präparation chemisch-kompenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen.....	40
2.4.6.2.	Transformation chemisch-kompenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen.....	41
2.4.6.3.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelte Transformation von <i>Guignardia bidwellii</i>	41
2.4.6.4.	Protoplasten-vermittelte Transformation von <i>Guignardia bidwellii</i>	43
2.4.6.5.	Lithiumacetat-vermittelte Transformation von <i>Guignardia bidwellii</i>	43
2.4.6.6.	Transformation von <i>Guignardia bidwellii</i> durch Elektroporation.....	44
2.4.7.	Klonierungsstrategien.....	45
3.	Ergebnisse.....	48
3.1.	Toxinnachweis <i>in planta</i>	48

3.2.	Pathogenität toxischer Stämme.....	50
3.2.1.	Naturstoffanalyse in <i>Guignardia aesculi</i>	50
3.2.2.	Naturstoffanalyse in <i>Guignardia musae</i>	51
3.2.3.	Naturstoffanalyse in <i>Guignardia vaccinii</i>	52
3.2.4.	Naturstoffanalyse in <i>Guignardia mangiferae</i>	54
3.3.	Biosyntheseaufklärung.....	56
3.4.	Molekularbiologische Manipulation von <i>Guignardia bidwellii</i>	61
3.4.1.	Identifizierung der kodierenden Sequenzen der zu untersuchenden Enzyme.....	62
3.4.2.	Identifizierung eines geeigneten Transformationssystems für <i>Guignardia bidwellii</i>	64
3.4.3.	Zielgerichtete Mutagenese in <i>Guignardia bidwellii</i> mittels <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> -vermittelter Transformation.....	66
3.4.3.1.	Optimierung der flankierenden homologen Bereiche.....	68
3.4.3.2.	Optimierung der Transformation von <i>Guignardia</i> <i>bidwellii</i> durch Austausch des Selektionsmarkers.....	71
3.4.3.3.	Optimierung der Transformation von <i>Guignardia bidwellii</i> durch Konstruktion eines Selektionsmarkers unter der Kontrolle eines pilzeigenen Promotors.....	74
3.4.3.4.	Optimierung des <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelten Transformationssystems.....	76
3.5.	Phytotoxine aus <i>Guignardia bidwellii</i> als Bioherbizide.....	78
4.	Diskussion	82
4.1.	Der Sekundärmetabolismus von <i>Guignardia bidwellii</i>	82
4.2.	Toxinnachweis <i>in planta</i>	84
4.3.	Virulenzverlust in nicht toxischen Stämmen.....	85
4.3.1.	Phytopathogene <i>Guignardia</i> Arten.....	85
4.3.2.	Avirulente <i>Guignardia</i> Art.....	86

4.3.3.	Naturstoffanalyse der phytopathogenen <i>Guignardia</i> Arten.....	86
4.3.4.	Naturstoffanalyse der avirulenten <i>Guignardia</i> Art.....	87
4.4.	Biosyntheseaufklärung.....	89
4.5.	Molekularbiologische Manipulation von <i>Guignardia bidwellii</i>	91
4.5.1.	Identifizierung kodierender Sequenzen der zu untersuchenden Enzyme....	91
4.5.2.	Identifizierung eines geeigneten Transformationssystems für <i>Guignardia bidwellii</i>	94
4.5.2.1.	Protoplastentransformation.....	96
4.5.2.2.	Lithiumacetat-vermittelte Transformation.....	97
4.5.2.3.	Elektroporation und biolistische Transformation.....	98
4.5.2.4.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelte Transformation	99
4.5.3.	Zielgerichtete Mutagenese in <i>Guignardia bidwellii</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelter Transformation.....	100
4.5.4.	Optimierung der <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelten Transformation.....	103
4.5.5.	RNA Technologien zur zielgerichteten Mutagenese.....	107
4.6.	Bioherbizide.....	109
5.	Ausblick.....	113
6.	Zusammenfassung.....	115
V.	Literaturverzeichnis.....	XII
VI.	Anhang.....	XXV
Anhang I:	Massen- und UV-Spektren der nachgewiesenen Toxine.....	XXV
Anhang II:	Oligonukleotide.....	XXIX
Anhang III:	Klonierungsstrategie.....	XXXII
Anhang IV:	Identifizierte Sequenzen aus <i>Guignardia bidwellii</i>	XXXVII

II. Abkürzungsverzeichnis

AIM	<i>Agrobacterium</i> Induktions Medium
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
BRENDA	Braunschweig Enzyme Database
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EC-Nummern	<i>enzyme commission numbers</i>
<i>for</i>	<i>forward</i>
H ₂ O _{deion.}	deionisiertes Wasser
H ₂ O _{UF}	ultrafiltriertes Wasser
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HPLC-MS	<i>high pressure liquid chromatography–mass spectrometry</i>
HPT	Hygromycin B Phosphotransferase
IBWF	Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung gGmbH
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Kana	Kanamycin
kb	Kilobase
L	Lösung
mAU	<i>milli absorbance units</i>
<i>mcs</i>	<i>multiple cloning site</i>
MeOH	Methanol
NaAc	Natriumacetat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
nt	Nukleotide
OD ₆₀₀	optische Dichte bei λ=600 nm
P	Puffer
p.a.	<i>pro analysis</i> (analysenrein)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
Rif	Rifampicin

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
t _E	Elongationszeit
Tet	Tetracyclin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galatopyranosid
λ	Wellenlänge

(Drei) Buchstabencode der Aminosäuren:

(Ala)	A	Alanin
(Arg)	R	Arginin
(Asn)	N	Asparagin
(Asp)	D	Aspartat
(Cys)	C	Cystein
(Glu)	E	Glutamat
(Gln)	Q	Glutamin
(Gly)	G	Glycin
(His)	H	Histidin
(Ile)	I	Isoleucin
(Leu)	L	Leucin
(Lys)	K	Lysin
(Met)	M	Methionin
(Phe)	F	Phenylalanin
(Pro)	P	Prolin
(Ser)	S	Serin
(Thr)	T	Threonin
(Trp)	W	Thryptophan
(Tyr)	Y	Tyrosin
(Val)	V	Valin

Buchstabencode der Nukleotide:

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanidin
T	Thymidin

Universeller degenerierter

DNA-Code:

M	(A/C)
R	(A/G)
W	(A/T)
S	(G/C)
Y	(C/T)
K	(G/T)
V	(A/G/C)
H	(A/C/T)
D	(A/G/T)
B	(C/G/T)
N	(A/G/C/T)

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.	Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>Guignardia bidwellii</i>	3
Abbildung 1.2.	Strukturformeln der phytotoxisch aktiven Sekundärmetabolite von <i>Guignardia bidwellii</i>	7
Abbildung 1.3.	Transaminierung von L-Aspartat durch die Aspartat-Transaminase.....	9
Abbildung 1.4.	Umwandlung von 5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-phosphoshikimat zu Chorismat durch die Chorismat-Synthase.....	10
Abbildung 1.5.	Umwandlung von L-Phenylalanin zu Zimtsäure durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase.....	10
Abbildung 3.1.	HPLC-Chromatogramme der Extrakte aus <i>Guignardia bidwellii</i> -infiziertem und nicht infiziertem Blattmaterial von <i>Vitis vinifera</i>	49
Abbildung 3.2.	HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltratextraktes aus der Fermentation von <i>Guignardia aesculi</i>	51
Abbildung 3.3.	HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltratextraktes aus der Fermentation von <i>Guignardia musae</i>	52
Abbildung 3.4.	HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltratextraktes aus der Fermentation von <i>Guignardia vaccinii</i>	53
Abbildung 3.5.	HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltratextraktes aus der Fermentation von <i>Guignardia mangiferae</i>	54
Abbildung 3.6.	Hypothetisches Modell des Biosynthesewegs von Phenguignardic acid.....	57
Abbildung 3.7.	Spektrum der ¹³ C NMR-Messung von ¹³ C markierter und unmarkierter Phenguignardic acid mit Strukturformel und ¹³ C NMR-Daten der Verbindung.....	58
Abbildung 3.8.	Spektren der ¹³ C NMR-Messung von ¹³ C markierter und unmarkierter Guignardic acid und Alaguignardic acid mit zugehöriger Strukturformel der beiden Verbindungen.....	60
Abbildung 3.9.	Vereinfachtes Schema des Phenylalaninmetabolismus mit Verdeutlichung der Verknüpfung des primären und sekundären Stoffwechsels durch die katalysierten Reaktionen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase.....	61
Abbildung 3.10.	Agarosegel zur Analyse genomischer DNA einer Transformante von <i>Guignardia bidwellii</i>	65
Abbildung 3.11.	Konstrukt zur Inaktivierung der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase (A), der Chorismat-Synthase (B) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (C) in <i>Guignardia bidwellii</i> mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von 500 Basenpaaren und Inaktivierung der kodierenden Sequenzen durch ein Hygromycinresistenzgen.....	67

Abbildung 3.12.	Konstrukte zur Inaktivierung der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase (A, D), der Chorismat-Synthase (B, E) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (C, F) in <i>Guignardia bidwellii</i> mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von 1000 bzw. 200 Basenpaaren und Inaktivierung der kodierenden Sequenzen durch ein Hygromycin-resistenzgen.....	69
Abbildung 3.13.	Konstrukte zur Inaktivierung der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase (A, D), der Chorismat-Synthase (B, E) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (C, F) in <i>Guignardia bidwellii</i> mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von 500 bzw. 200 Basenpaaren und Inaktivierung der kodierenden Sequenzen durch eine Ammoniumglufosinatresistenz-Kassette.....	72
Abbildung 3.14.	Konstrukt zur Inaktivierung der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase (A), der Chorismat-Synthase (B) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (C) in <i>Guignardia bidwellii</i> mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von 1000 Basenpaaren und Inaktivierung der kodierenden Sequenzen durch ein Hygromycin-resistenzgen, dessen Expression unter der Kontrolle des <i>EFA1</i> -Promotors aus <i>Guignardia bidwellii</i> steht.....	75
Abbildung 3.15.	Herbizide Aktivität von Kulturfiltraten aus Submersfermentation mit <i>Guignardia bidwellii</i> im Freilandversuch.....	80
Abbildung 4.1.	Strukturformel von Allantofuranon aus <i>Allantophomopsis lycopodina</i>	90
Abbildung A1	Massen- und UV-Spektrum der <i>in planta</i> nachgewiesenen Guignardic acid.....	XXV
Abbildung A2	Massen- und UV-Spektrum des Toxins aus Submersfermentationen mit <i>Guignardia aesculi</i>	XXV
Abbildung A3	Massen- und UV-Spektren der Toxine aus Submersfermentationen mit <i>Guignardia musae</i>	XXVI
Abbildung A4	Massen- und UV-Spektren der Toxine aus Submersfermentationen mit <i>Guignardia vaccinii</i>	XXVII
Abbildung A5	Massen- und UV-Spektrum des Toxins aus Submersfermentationen mit <i>Guignardia mangiferae</i>	XXVIII

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.	Optimierte Laufparameter der analytischen HPLC zur Untersuchung der Naturstoffe aus Rohextrakten.....	30
Tabelle 2.2.	Elutionsgradient der Festphasenextraktion an Chromabond-Kartuschen.	31
Tabelle 2.3.	Parameter zur Amplifikation entsprechender Gensequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	45
Tabelle 2.4.	Überblick über die Klonierungsstrategien zur Konstruktion von Inaktivierungsvektoren und Zwischenvektoren zu Klonierungszwecken.....	46
Tabelle 3.1.	Überblick über die fermentierten Organismen und deren identifizierten Sekundärmetabolite.....	55
Tabelle 3.2.	Daten des Genoms und der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus <i>Guignardia bidwellii</i>	63
Tabelle 3.3.	Angaben über die Inaktivierungskonstrukte mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von etwa 500 Basenpaaren und Hygromycin-resistenzkassette.....	68
Tabelle 3.4.	Angaben über die Inaktivierungskonstrukte mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von etwa 1000 bzw. 200 Basenpaaren und Hygromycinresistenzkassette.	70
Tabelle 3.5.	Angaben über die Inaktivierungskonstrukte mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von 500 bzw. 200 Basenpaaren und Ammoniumglufosinatresistenzkassette.	73
Tabelle 3.6.	Angaben über die Inaktivierungskonstrukte mit Hygromycin-resistenzgen, das unter der Kontrolle des <i>EFA1</i> -Promotors aus <i>Guignardia bidwellii</i> steht.....	76
Tabelle 3.7.	Optimierung verschiedener Transformationsparameter zur Durchführung einer <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelten Transformation von <i>Guignardia bidwellii</i>	77
Tabelle 4.1.	Basisinformationen der identifizierten Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase von <i>Guignardia bidwellii</i> im Vergleich mit Sequenzinformationen aus <i>Magnaporthe oryzae</i> und <i>Neurospora crassa</i> und zugehörigen konservierten Domänen.....	93
Tabelle 4.2.	Gebräuchliche Strategien für die Transformation von filamentösen Pilzen im Vergleich.....	95
Tabelle 4.3.	RNA basierte Techniken zum Gensilencing in Eukaryoten im Vergleich.	107

Tabelle A1	Oligonukleotide zur Identifizierung der kodierenden Sequenz der Aspartat-Transaminase in <i>Guignardia bidwellii</i>	XXIX
Tabelle A2	Oligonukleotide zur Identifizierung der kodierenden Sequenz der Chorismat-Synthase in <i>Guignardia bidwellii</i>	XXIX
Tabelle A3	Oligonukleotide zur Identifizierung der kodierenden Sequenz der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase in <i>Guignardia bidwellii</i>	XXIX
Tabelle A4	Oligonukleotide zur Amplifikation des genomischen Bereichs, der die kodierende Sequenz der Zielsequenz aus <i>Guignardia bidwellii</i> mit 200 bp flankiert.	XXX
Tabelle A5	Oligonukleotide zur Amplifikation des genomischen Bereichs, der die kodierende Sequenz der Zielsequenz aus <i>Guignardia bidwellii</i> mit 500 bp flankiert.	XXX
Tabelle A6	Oligonukleotide zur Amplifikation des genomischen Bereichs, der die kodierende Sequenz der Zielsequenz aus <i>Guignardia bidwellii</i> mit 1000 bp flankiert.	XXX
Tabelle A7	Oligonukleotide zur Konstruktion einer Hygromycinresistenz-Kassette mit einem <i>EFA1</i> -Promotor aus <i>Guignardia bidwellii</i>	XXXI
Tabelle A8	Oligonukleotide für allgemeine Anwendungen.	XXXI
Tabelle A9	Identifizierte Sequenz der Aspartat-Transaminase aus <i>Guignardia bidwellii</i>	XXXVII
Tabelle A10	Identifizierte Sequenz der Chorismat-Synthase aus <i>Guignardia bidwellii</i>	XXXVIII
Tabelle A11	Identifizierte Sequenz der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus <i>Guignardia bidwellii</i>	XXXIX
Tabelle A12	Identifizierter Sequenzbereich des <i>EFA1</i> -Promotors aus <i>Guignardia bidwellii</i>	XL

1. Einleitung

Wissenschaftler machen seit Jahrzehnten auf die Folgen des Klimawandels aufmerksam. In den letzten Jahren wird auch zunehmend in der Gesellschaft kontrovers über die Auswirkungen des Klimawandels diskutiert. Laut *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) wird der Begriff „Klimawandel“ als eine Veränderung des Klimas, die für Dekaden oder länger bestehen bleibt, definiert. Dabei kann diese Veränderung durch natürliche Variabilität oder als Ergebnis menschlicher Aktivität zustande kommen. Identifiziert wird der Klimawandel durch eine Veränderung des Mittelwerts oder bestimmter Variablen (Weingärtner und Trentmann, 2011).

1.1. Klimawandel und Weinbau

Der Klimawandel hat einen deutlichen Einfluss auf die Landwirtschaft und insbesondere auf den Weinbau (Goedecke, 2008). Der bis zum Jahr 2050 prognostizierte Klimawandel mit einer möglichen Erhöhung der Jahresmitteltemperatur von 3 – 6 °C in Europa impliziert neben der positiven Entwicklung, dass in Zukunft auch nördlich der etablierten Weinbauregionen lohnende Erträge erzielt werden können (Podbregar *et al.*, 2008), auch Herausforderungen für den Weinbau. Als zentrale Punkte werden ausreichende Wasserverfügbarkeit in der Vegetationsperiode und effiziente Wassernutzung diskutiert (Grocholl und Mersch, 2014).

Ein vielfach unterschätztes Problem sind vor allem auch Rebenkrankheiten, die im Zuge des Klimawandels entweder verstärkt oder neu auftreten. Mit der Erhöhung der Temperatur geht eine Verschiebung der Verbreitungsgrenzen von Erregern einher. Durch eine Erwärmung von 3 – 6 °C würde sich die Verbreitungsgrenze mancher Schaderreger um mehr als 1000 km nach Norden verschieben, so dass Pathogene auftreten können, die bis dahin in diesen Gebieten noch keine Probleme verursacht haben. Aufgrund längerer, milderer und feuchterer Winter können durch Pilze verursachte Krankheiten an Pflanzen vermehrt auftreten, da die Schaderreger bessere Bedingungen zur Etablierung vorfinden (Vollborn und Georgescu, 2012).

Neben der gefürchteten Esca-Krankheit (Deml *et al.*, 2009) ist die Schwarzfäule ein weiteres Beispiel für das durch den Klimawandel bedingte, plötzliche Auftreten einer durch Pilze verursachten Rebenerkrankung in Deutschland. Diese Krankheit wird durch den Ascomyceten *Guignardia bidwellii* verursacht. Der Pilz führt zu erheblichen Schäden an der Rebe und war bis 2002 ausschließlich in mediterranen Gebieten Europas bekannt (Leiritz, 2011).

1.2. Die Schwarzfäule an Reben

Die Schwarzfäule (*black rot*) an der Rebe wird durch den Ascomyceten *Guignardia bidwellii* hervorgerufen (Loskill *et al.*, 2009). Ursprünglich war die Schwarzfäule als Rebenkrankheit mit erheblichen wirtschaftlichen Folgen vor allem in Nordamerika, im Mittelmeerraum und in Teilen Südamerikas bekannt (Ramsdell und Milholland, 1988). Seit 2002 konnte sich die Schwarzfäule, begünstigt durch den globalen Klimawandel, auch vermehrt in deutschen Weinanbaugebieten ausbreiten (Mohr, 2005). Anfänglich wurde die Schwarzfäule in Deutschland nur in unbewirtschafteten und verwilderten Weinbergen, sogenannten Drieschen, beobachtet, doch mit der Zeit hat sich der Erreger auch auf bewirtschaftete Weinberge ausgebreitet und kann dort zu Ernteaufschlägen von bis zu 80 % führen (Harms *et al.*, 2005). Dabei befällt *G. bidwellii* alle Kultivare von Weinreben (*Vitis vinifera*). Lediglich die pilzwiderstandsfähigen Sorten Cabernet Carol, Merzling und Solaris sind weniger anfällig (Loskill *et al.*, 2009).

Guignardia bidwellii (Ellis) Viala & Ravaz gehört zur Klasse der Ascomyceten und zur Familie der Botryosphaeriaceae (Kirk *et al.*, 2008). Dabei wird das Teleomorph als *G. bidwellii* bezeichnet, wohingegen das Anamorph als *Phyllosticta ampellicida* (Engelmann) van der Aa bekannt ist (Snowdon, 1990).

Der rebenpathogene Pilz hat einen komplexen Lebenszyklus (Abbildung 1.1) und befällt die Weinrebe durch sexuelle und asexuelle Sporen (Hoffman und Wilcox, 2002).

Eine Infektion über Ascosporen wird als primäre Infektion bezeichnet. Hierbei reifen diese in den vertrockneten Beeren im Winter innerhalb von Perithezien heran. Niederschlag induziert ein Öffnen der Asci und die Ascosporen werden freigesetzt. Sie werden durch Wind verbreitet und können bevorzugt bei jungen, grünen Geweben wie Spross, Blättern und Beeren eine neue Infektion auslösen (Ferrin und Ramsdell, 1978). Auf geeignetem Substrat keimen die Ascosporen aus und bilden ein Appressorium, mit dessen Hilfe der Pilz die Cuticula der Pflanze penetriert. Nach einigen Tagen werden hellbraune nekrotische Läsionen, die von einem schwarzen Rand umgeben sind, auf den befallenen Blättern sichtbar. Die Läsion selbst ist mit vielen kleinen Strukturen durchsetzt, den Pyknidien, welche die asexuellen Konidien enthalten (Verma und Sharma, 1999). Die Infektion über die Konidien wird als sekundäre Infektion bezeichnet (Hoffman und Wilcox, 2002). Infektionen auf Beeren führen dazu, dass diese austrocknen und mumifiziert an den Weinstöcken zurückbleiben. In den Mumien entwickeln sich die Fruchtkörper (Perithezien) und es werden über den Winter neue Ascosporen gebildet (Ferrin und Ramsdell, 1978).

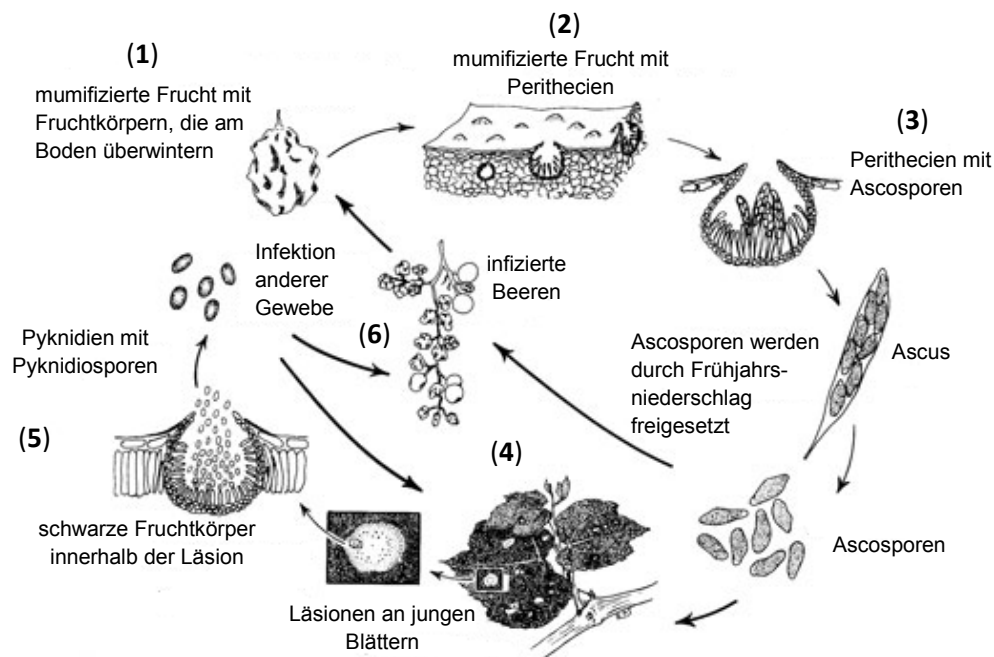


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Guignardia bidwellii*.

Nach Befall der Beeren durch Pyknidiosporen (Konidien) von *G. bidwellii* trocknen die Beeren aus und bleiben als Fruchtmumien in den Weinstöcken zurück (1). Innerhalb dieser Fruchtmumien entwickeln sich Perithezien (2), in denen die Ascosporen heranreifen (3). Diese werden im Frühjahr bei Regenfall freigesetzt und verursachen die primäre Infektion der Rebe. Die Ascosporen verursachen vor allem an jungen Blättern Läsionen (4), in denen sich anschließend Pyknidien bilden (5), die asexuelle Konidien enthalten. Diese lösen die sekundäre Infektion aus, durch die Blätter und Beeren über das Jahr hinweg infiziert werden können (6). Letztere trocknen wieder ein und können somit zur Quelle für eine neue Fruchtkörperbildung werden (1) (nach Ellis, 2008).

Der Infektionsprozess verläuft in zwei Phasen, einer symptomlosen Initialphase, gefolgt von einer nekrotischen Absterbephase (Kuo und Hoch, 1996). Die Konidie keimt auf der Blattoberfläche der Pflanze innerhalb einer Stunde und bildet innerhalb von sechs Stunden ein Oberflächen-Appressorium (Kuo und Hoch, 1996). Mithilfe dieses Appressoriums durchdringt die Penetrationshyph die Cuticula der Pflanze (Luttrell, 1974) und wächst dann ausschließlich subcuticulär entlang der antiklinalen Wände der Epidermiszellen. In dieser Phase bleibt die Epidermiszelle unbeschadet. Nach etwa 10 - 14 Tagen biotropher Lebensweise findet ein Wechsel zur nekrotrophen Lebensform statt, wobei die Epidermiszelle kollabiert und die Läsionen sichtbar werden. Aufgrund dieses Wechsels spricht man bei *G. bidwellii* auch von einem hemibiotrophen Pathogen (Kuo und Hoch, 1996). Der Grund oder mögliche Auslöser für diesen Wechsel der Lebensformen ist noch nicht bekannt.

1.3. Bekämpfungsstrategien der Schwarzfäule

Die Schwarzfäule an Reben lässt sich mit einer Kombination von indirekten Maßnahmen und direkten Maßnahmen bekämpfen (Molitor, 2009). Indirekte Maßnahmen sind beispielsweise Reduzierung des Inokulumpotentials durch manuelle Entfernung der Fruchtmumien aus den Weinstöcken, gezielter Rebschnitt zur optimalen Oberflächenabtrocknung, Beseitigung von Drieschen und Verwendung von pilzwiderstandsfähigen Sorten von *V. vinifera* (Molitor und Beyer, 2014). Direkte Maßnahmen sind unter anderem die Verwendung von chemischen Pflanzenschutzmitteln. Die Schwarzfäule lässt sich im integrierten Weinbau gut mit Fungiziden aus den Gruppen der Demethylase-Inhibitoren (DMI-Fungizide), der Dithiocarbamate und der Chinon-Oxidations-Inhibitoren (QoI-Fungizide) bekämpfen (Molitor, 2009). Allerdings wurden bereits erste Resistenzen des Erregers gegen DMI- und QoI-Fungizide gemeldet, so dass die Entwicklung von alternativen Bekämpfungsstrategien notwendig ist (Molitor und Beyer, 2014).

Die Entwicklung alternativer Bekämpfungsstrategien ist besonders auch in Hinblick auf den ökologischen Weinbau essentiell. Hier ist die Anwendung von synthetischen Fungiziden nicht zulässig und es stehen ausschließlich indirekte Maßnahmen zur Bekämpfung der Schwarzfäule zur Verfügung. Für die kurative Behandlung der Schwarzfäule gibt es erste Präparate, z.B. einen Extrakt aus der Palmilie (*Yucca* sp.), der Saponine enthält, der sich in Gewächshausversuchen als wirksam erwiesen hat (Molitor und Beyer, 2014). Im Feld ist diese Methode allerdings nicht geeignet, wenn die Wetterverhältnisse schlecht sind, da die Wirksamkeit der Präparate durch Abwaschung bei Regen schnell abnimmt (Loskill *et al.*, 2009).

Somit steht dem ökologischen Anbau fast ausschließlich die Verwendung von Kupfer-Schwefel-Kombinationen zur Verfügung. Dabei ist der Einsatz von Kupfer aber limitiert, da sich die Präparate im Boden anreichern und somit ökotoxisch sind (Molitor, 2009).

Um wirksame biologische Strategien zur Bekämpfung der Schwarzfäule zu entwickeln, muss in erster Linie die Biologie des Erregers und vor allem die Pathogen-Wirt-Interaktion besser verstanden werden. Ein Fokus sollte dabei auf Virulenzfaktoren liegen, die am Infektionsprozess von *G. bidwellii* beteiligt sind.

1.4. Virulenzfaktoren

Der Befall von Pflanzen durch phytopathogene Organismen kann indirekt durch schon vorhandene Öffnungen (z.B. Stomata oder Verletzungen) oder mittels Penetration der Cuticula (z.B. Oberflächen-Appressorium) erfolgen (Wenzel, 2014). In der Regel erkennt die

Pflanze nach Eindringen der Pathogene die mikrobiellen Strukturen (*microbe-associated molecular patterns*, MAMP) und leitet eine Abwehrreaktion ein (Jones und Dangl, 2006). Diese äußert sich z.B. durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxidative species*, ROS; Lamb und Dixon, 1997) oder durch eine hypersensitive Reaktion (Agrios, 1997). Pathogene können durch Sekretion geeigneter Virulenzfaktoren Einfluss auf diese pflanzlichen Abwehrmechanismen nehmen. Diese Faktoren befähigen die Erreger dazu, in einen Wirtsorganismus einzudringen und sich dort trotz vorhandener Abwehrmechanismen zu vermehren und zu etablieren (Stein, 2006). Im Gegensatz zur Pathogenität, die durch die Fähigkeit einer Spezies definiert ist, in einem Makroorganismus eine Krankheit zu erzeugen, beschreibt die Virulenz den Ausprägungsgrad der krankheitserzeugenden Eigenschaften bei einem gegebenen Stamm einer pathogenen Spezies. Die Virulenz beruht auf dem Besitz von Virulenzfaktoren, wodurch Virulenz eine Stammeseigenschaft ist. Die Pathogenität hingegen ist eine Spezieseseigenschaft. Da es virulente Stämme nur bei einer pathogenen Spezies geben kann, ist der Virulenzbegriff dem Pathogenitätsbegriff untergeordnet (Bhakdi *et al.*, 2009). Zu den Virulenzfaktoren gehören hydrolytische Enzyme (*cell wall degrading enzymes*, CWDE), Effektorproteine und niedermolekulare Substanzen (Wenzel, 2014). Hydrolytische Enzyme, die häufig in Zusammenhang mit einer Infektion sekretiert werden, sind vor allem Pektinasen, Lipasen, Cellulasen, Xylanasen, Proteasen und Cutinasen (Bezerra *et al.*, 2012; Kothe, 2007). Niedermolekulare Substanzen wie Phytotoxine, die von phytopathogenen Pilzen produziert und sekretiert werden, können ebenfalls als Virulenzdeterminanten an der Infektion beteiligt sein (Möbius und Hertweck, 2009). Es ist jedoch zu beachten, dass Pilze oft eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten produzieren, die zwar toxisch für Pflanzen sind, aber nicht alle als konstitutive Virulenzfaktoren beschrieben werden können. Aus diesem Grund wurden von Bender *et al.* (1999) vier Kriterien aufgestellt, die eine Klassifizierung als Virulenzfaktor zulassen:

- 1.) Reproduktion der Krankheitssymptome durch Applikation der Reinsubstanz
- 2.) Korrelation zwischen Toxinmenge und Pathogenität
- 3.) Produktion des Toxins während des aktiven Wachstums des Pathogens in der Pflanze
- 4.) Fehlende Virulenz in Stämmen, die das Toxin nicht bilden können

Dabei können die Phytotoxine in wirtsspezifische und nicht-wirtsspezifische Toxine unterteilt werden (Panaccione *et al.*, 2002). Wirtsspezifische Toxine werden von ungefähr 20 Arten pathogener Pilze produziert und man geht davon aus, dass sie der bestimmende Faktor für die Wirtsbreite und die Pathogenität sind (Atkinson *et al.*, 2003). Phytotoxine, die keine

ausgeprägte Spezifität aufweisen, zählen zu den nicht-wirtsspezifischen Toxinen und können auch an Pflanzen Symptome verursachen, die durch den produzierenden Organismus nicht infiziert werden können (Möbius und Hertweck, 2009).

1.5. Sekundärmetabolismus von *Guignardia bidwellii*

Pilze produzieren eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten, die strukturell sehr divers sind (Demain, 1986). Diese niedermolekularen Stoffe sind im Gegensatz zu den Produkten aus dem Primärstoffwechsel nicht essentiell für das Wachstum und die Reproduktion des Organismus, haben aber wichtige Funktionen bei verschiedenen Strategien des Überlebens in der Natur (Sutton, 1996). Sie werden meist nicht in der Trophophase (Wachstumsphase) des Organismus, sondern in der Idiophase (stationäre Phase) gebildet (Tkacz und Lange, 2004).

Bereits durch Rodrigues-Heerklotz *et al.* (2001) wurden erste Untersuchungen zum Sekundärmetabolismus an *Phyllosticta telopeae* durchgeführt. Hierbei wurde Guignardic acid entdeckt (Abbildung 1.2). Diese Verbindung enthält einen Dioxolanonring und wurde von Rodrigues-Heerklotz *et al.* (2001) als erste Verbindung einer neuen Klasse an Naturstoffen beschrieben. Der Dioxolanonring entsteht vermutlich aus der Fusion von Phenylbrenztraubensäure und Dimethylbrenztraubensäure, den desaminierten Aminosäuren Phenylalanin und Valin (Rodrigues-Heerklotz *et al.*, 2001). Untersuchungen an *G. bidwellii* durch Molitor *et al.* (2012) führten zur Identifikation eines Naturstoffes, der ebenfalls einen Dioxolanonring enthält. Dieser entsteht vermutlich durch die Fusion von zwei Phenylbrenztraubensäureverbindungen und wurde daher Phenguignardic acid genannt (Abbildung 1.2). Beide Verbindungen sind in Pflanzenversuchen an Reben, Weizen und Reis stark phytotoxisch und nicht wirtsspezifisch. Auffällig ist, dass die Rebenblätter sensitiver als die anderen Pflanzenblätter auf diese Verbindungen reagieren (Molitor *et al.*, 2012).

Während einer Fermentationsoptimierung mit *G. bidwellii* konnten sieben weitere Naturstoffe aus dieser Stoffklasse identifiziert werden, die Alaguignardic acid und die Guignardianone A – F. Drei dieser Verbindungen (Alaguignardic acid und Guignardianone E und F) sind ebenfalls phytotoxisch (Abbildung 1.2, Buckel *et al.*, 2013).

Auch diese Verbindungen wurden vermutlich aus desaminierten Aminosäurevorstufen gebildet. Bei der Alaguignardic acid ist die Beteiligung der desaminierten Vorstufe von Alanin und bei Guignardianone E und F die desaminierte Vorstufe von Tyrosin an der Biosynthese des Dioxolanonringes zu vermuten (Buckel *et al.*, 2013).

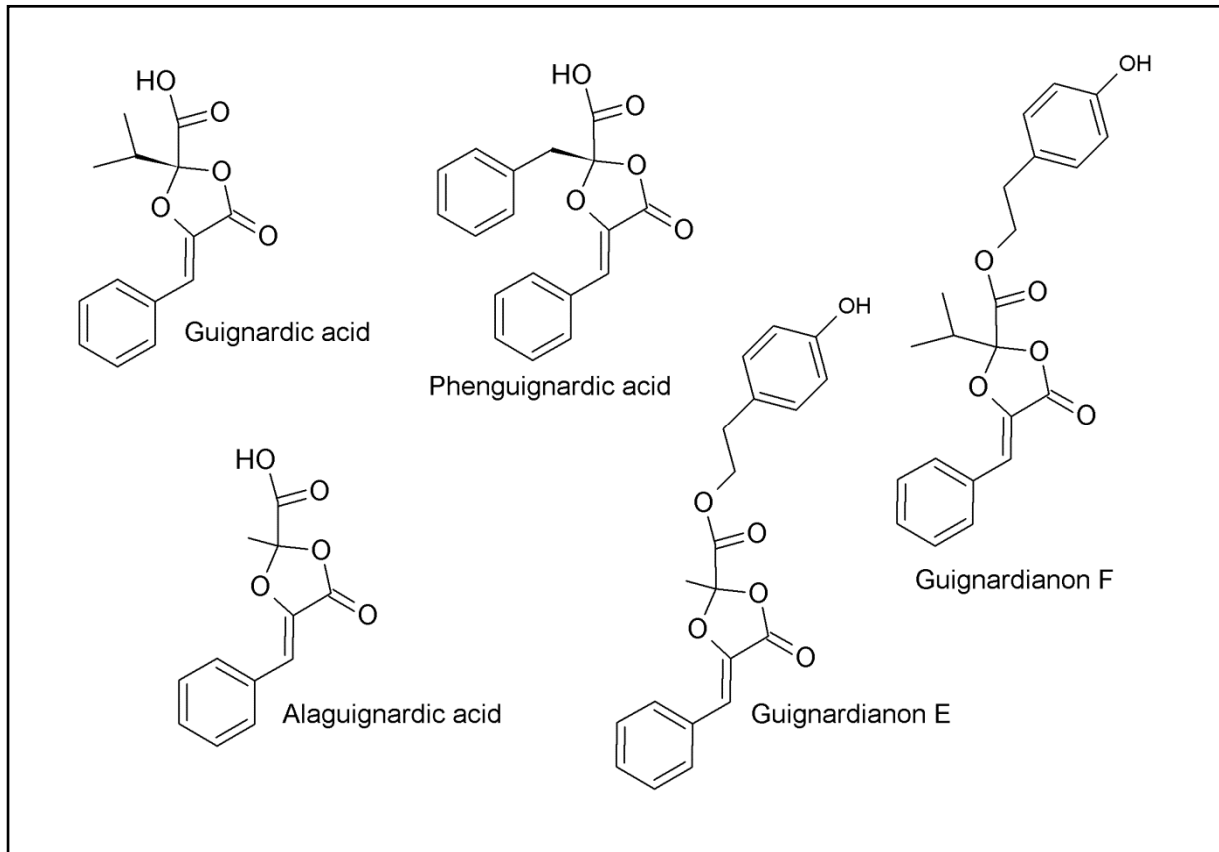


Abbildung 1.2.: Strukturformeln der phytotoxisch aktiven Sekundärmetabolite von *Guignardia bidwellii*.

Die Verbindungen gehören einer neuen Naturstoffklasse an, die ein Dioxolanon als Grundgerüst enthalten, das vermutlich aus der Fusion von desaminierten Aminosäurevorstufen entsteht (Buckel *et al.*, 2013).

Der Mechanismus zur Bildung des Dioxolanonrings ist noch nicht bekannt. Daher wäre es besonders interessant, die Biosyntheseschritte für die Fusion der desaminierten Aminosäuren zu untersuchen. Die Annahme, dass Vorstufen von Aminosäuren an der Synthese der Verbindungen beteiligt sind, wird weiter gefestigt durch Supplementationsversuche mit der Aminosäure Phenylalanin. Hierbei konnte die Produktionsrate von Phenguignardic acid deutlich nach Zugabe von Phenylalanin gesteigert werden. Auch die Zugabe von Pyridoxalphosphat, einem Coenzym im Aminosäurestoffwechsel, wirkte sich hinsichtlich der Produktionsrate von Phenguignardic acid in der Submersfermentation positiv aus (Buckel *et al.*, 2013). Aus diesen Gründen ist es interessant, einzelne Enzyme des Aminosäurestoffwechsels in Bezug auf die Biosynthese der Verbindungen näher zu betrachten.

1.6. Enzyme des Aminosäurestoffwechsels

Die phytotoxischen Sekundärmetabolite aus *G. bidwellii* werden vermutlich durch die Fusion von desaminierten Aminosäurevorstufen gebildet. Ein Schlüsselenzym bei Desaminierungen von Aminosäuren ist die Aspartat-Transaminase (EC 2.6.1.1). Da die phytotoxischen Substanzen grundsätzlich mindestens aus einem Phenylbrenztraubensäuremolekül aufgebaut werden, ist eine Beteiligung weiterer Enzyme wie z.B. der Chorismat-Synthase (EC 4.2.3.5) oder der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (EC 4.3.1.24) möglich. Beide Enzyme sind an Syntheseprozessen mit Phenylalanin beteiligt, indem sie entweder für die Synthese oder den Abbau bzw. die Modifikation der Aminosäure verantwortlich sind (Bilger *et al.*, 2008; Scharnhop, 2008).

1.6.1. Aspartat-Transaminase (EC 2.6.1.1)

Die Aspartat-Transaminase katalysiert die reversible Umwandlung von α -Ketosäuren zu α -Aminosäuren. Diese Reaktion ist eine der häufigsten Reaktionen des Intermediärstoffwechsels sämtlicher Organismen (Follmann, 2001). Dabei sind Transaminasen sowohl für den Abbau als auch für die Biosynthese von Aminosäuren verantwortlich (Löffler, 2008). In Pilzen sind Transaminasen besonders für den Nitratmetabolismus wichtig. Daneben sind sie auch an der Synthese von sekundären Aminosäuren aus primären Aminosäuren beteiligt (Eze und Echetebe, 1980).

Transaminasen sind streng spezifisch für L-Aminosäuren und benötigen als Coenzym Pyridoxalphosphat (PLP), welches aus dem Vitamin B₆ (Pyridoxin) entsteht (Follmann, 2001). Die Reaktion der Transaminase verläuft über eine Schiff'sche Base, indem sich zunächst zwischen der Aminogruppe einer Aminosäure und der Carbonylgruppe des PLP ein Aldimin bildet. Anschließend findet eine Umlagerung zum Ketimin statt, welches dann zur α -Ketosäure hydrolysiert wird. Dabei entsteht Pyridoxaminphosphat (PMP). Die abgespaltene Aminogruppe ist nun an das PMP gebunden und steht bereit, in der Rückreaktion an eine entsprechende α -Ketosäure ebenfalls über eine Schiff'sche Base angelagert zu werden. Durch erneute Tautomerisierung und hydrolytische Spaltung entsteht eine neue Aminosäure und das Coenzym befindet sich wieder in seiner Ausgangsposition (Löffler, 2008).

Die Hauptreaktion der Aspartat-Transaminase ist die Umwandlung von L-Aspartat in Oxalacetat mit gleichzeitiger Umwandlung von α -Ketoglutarat in L-Glutamat (Abbildung 1.3, Bugg, 2004).

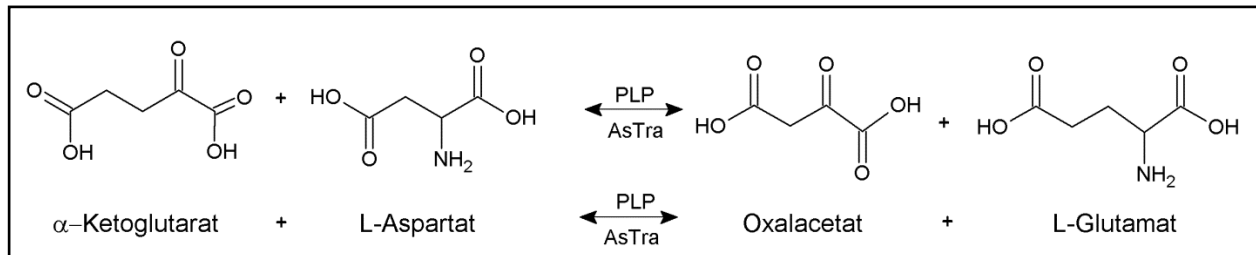


Abbildung 1.3.: Transaminierung von L-Aspartat durch die Aspartat-Transaminase.

L-Aspartat wird durch die Aspartat-Transaminase (AsTra) zu Oxalacetat transaminiert, während gleichzeitig die Umwandlung von α -Ketoglutarat zu L-Glutamat stattfindet. Für die Reaktion ist die Anwesenheit von Pyridoxalphosphat (PLP) notwendig (<http://www.brenda-enzymes.org>, Stand 12.2014).

Daneben katalysiert die Aspartat-Transaminase auch Reaktionen im Phenylalanin- und Tyrosinabbau. Die Aspartat-Transaminase nutzt auch hier als Akzeptor der Aminogruppe das α -Ketoglutarat. Als korrespondierende α -Ketosäure entsteht bei der Transaminierung von L-Phenylalanin die Phenylbrenztraubensäure und bei L-Tyrosin die 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (<http://www.brenda-enzymes.org>, Stand 12.2014).

1.6.2. Chorismat-Synthase (EC 4.2.3.5)

Die Chorismat-Synthase ist ein Schlüsselenzym im Shikimatstoffwechselweg. Dieser liefert die drei essentiellen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Diese drei aromatischen Aminosäuren sind bekannte Ausgangsstoffe für die Synthese zahlreicher phenolischer Sekundärverbindungen. Aus Phenylalanin entstehen unter anderem Zimtsäure und weitere Derivate, aus denen sich beispielsweise die Flavonoide ableiten (Bilger *et al.*, 2008). Die Chorismat-Synthase ist daher ein wichtiges Verbindungsenzym zwischen primärem und sekundärem Stoffwechsel.

Aus Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat entsteht Shikimat, welches dann über das Zwischenprodukt Chorismat in die Synthese der drei Aminosäuren eingeht. Dieser Stoffwechselweg existiert in Pflanzen, Pilzen und Bakterien. Tiere können diese Aminosäuren nicht selbstständig synthetisieren und sind somit auf die Aufnahme dieser essentiellen Aminosäuren durch die Nahrung angewiesen. Die Chorismat-Synthase katalysiert im Shikimatstoffwechselweg den Schritt, bei dem aus 5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-phosphoshikimat (EPSP) unter Abspaltung von Phosphat Chorismat entsteht. Hierzu wird reduziertes Flavinadenindinukleotid (FADH_2) benötigt (Abbildung 1.4, Bilger *et al.*, 2008).

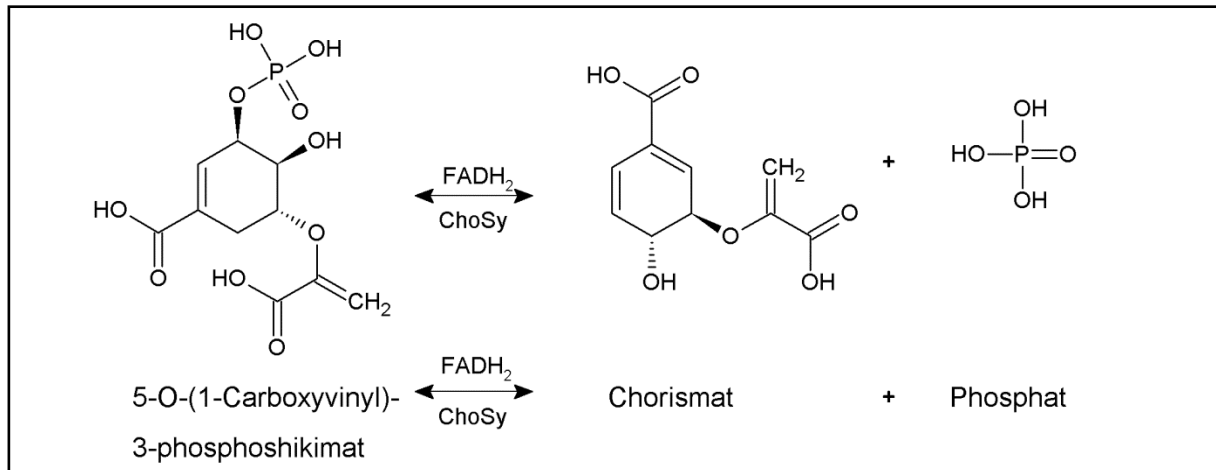


Abbildung 1.4.: Umwandlung von 5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-phosphoshikimat zu Chorismat durch die Chorismat-Synthase.

Die Chorismat-Synthase (ChoSy) katalysiert die Umwandlung von 5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-phosphoshikimat unter Abspaltung von Phosphat in Anwesenheit von FADH_2 zu Chorismat, welches das Ausgangsprodukt zur Bildung der drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan ist (<http://www.brenda-enzymes.org>, Stand 12.2014).

1.6.3. Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (EC 4.3.1.24)

Beim Übergang vom primären Stoffwechsel zum Sekundärstoffwechsel in Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen ist vor allem das Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) essentiell, welches aus L-Phenylalanin Zimtsäure und Ammoniak freisetzt (Abbildung 1.5; Scharnhop, 2008). Dieses Enzym katalysiert den ersten Schritt im Phenylpropanoidstoffwechselweg (Vermerris und Nicholson, 2007).

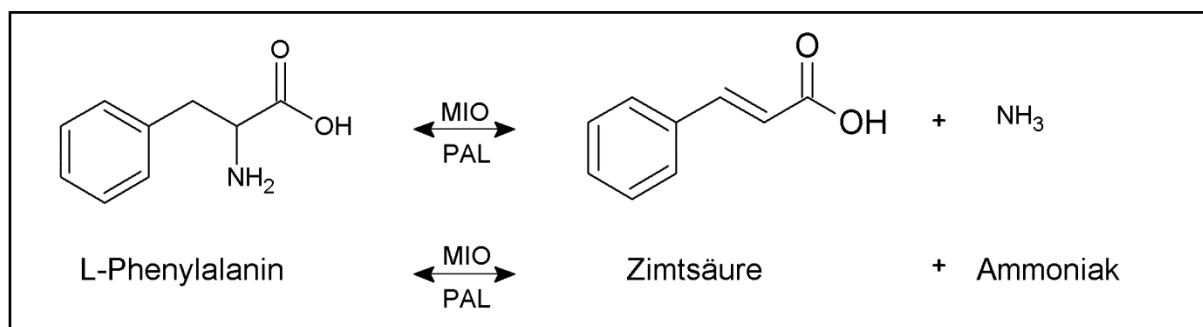


Abbildung 1.5.: Umwandlung von L-Phenylalanin zu Zimtsäure durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase.

In Anwesenheit von 3,5-Dihydro-5-methyliden-4H-imidazol-4-on (MIO) wird durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) unter Abspaltung von Ammoniak das L-Phenylalanin zur Zimtsäure umgewandelt (<http://www.brenda-enzymes.org>, Stand 12.2014).

Durch oxidative Einführung von Hydroxylgruppen durch verschiedene Monooxygenasen entstehen aus der Zimtsäure Hydroxyzimtsäuren, wie z.B. die para-Cumarsäure oder die Kaffeesäure. Aus diesen Verbindungen leiten sich die Coumarine ab, die weiter biosynthetisch zu Flavonoiden und Stilbenen modifiziert werden können (Ebermann und Elmadfa, 2011).

Ebenso wie die Chorismat-Synthase existiert die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase in Pflanzen, Pilzen und einigen Bakterien, nicht allerdings in Tieren. Im Gegensatz zu Pflanzen ist dieses Enzym in Mikroorganismen nicht nur am Aufbau von Sekundärmetaboliten beteiligt, sondern auch am Katabolismus, da mithilfe der PAL bei Bedarf L-Phenylalanin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verwendet werden kann (MacDonald und D' Cunha, 2007). Als Cofaktor dient bei der Reaktion das 3,5-Dihydro-5-methyliden-4H-imidazol-4-on (MIO; <http://www.brenda-enzymes.org>, Stand 12.2014).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, tiefere Erkenntnisse über die Pathogen-Wirt-Interaktion zwischen *Guignardia bidwellii* und *Vitis vinifera* zu erlangen. Hierbei soll der Fokus der Untersuchungen auf der Bedeutung von Sekundärmetaboliten aus *G. bidwellii* als konstitutive Virulenzfaktoren liegen.

Im ersten Teil der Arbeit soll die Beteiligung von Sekundärmetaboliten aus *G. bidwellii* am Infektionsprozess mit *V. vinifera* bestätigt und die Beschreibung dieser Sekundärmetabolite als konstitutive Virulenzfaktoren ermöglicht werden. Zur Klärung, ob es sich bei den Stoffen um konstitutive Virulenzfaktoren handelt, sollen Versuche zur Erfüllung der Kriterien nach Bender *et al.* (1999) durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen soll die Biosynthese der Naturstoffe aus *G. bidwellii* untersucht werden. Die Verbindungen gehören einer neuen Naturstoffklasse an, deren Biosynthese bislang noch nicht beschrieben wurde. Ein besseres Verständnis über die Biosynthese der Verbindungen kann zu neuen Strategien zur Bekämpfung der Schwarzfäule führen, die auch im ökologischen Weinbau Anwendung finden können.

Zur Klärung des vierten Kriteriums nach Bender *et al.* (1999), ob toxische Stämme apathogen sind, soll eine toxische Mutante generiert werden. Da bislang keine Kenntnisse über eine zielgerichtete molekularbiologische Manipulation von *G. bidwellii* vorliegen, soll im zweiten Teil dieser Arbeit ein Transformationssystem zur zielgerichteten Mutagenese in *G. bidwellii* etabliert werden. Dadurch soll eine gezielte Inaktivierung von ausgewählten

Genen ermöglicht werden, deren Produkte vermutlich an der Biosynthese der Sekundärmetabolite beteiligt sind. Da die niedermolekularen Substanzen vermutlich aus desaminierten Aminosäuren synthetisiert werden, soll die genetische Manipulation der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase im Fokus stehen. Diese drei Enzyme sind Schlüsselenzyme im Aminosäurestoffwechsel. Letztere sind am Auf- bzw. Abbau von Phenylalanin, einer vermuteten Hauptkomponente der Toxine, beteiligt.

Bestätigt sich, dass die Naturstoffe konstitutive Virulenzfaktoren sind, können mithilfe des etablierten Transformationsverfahrens auch spezifische Angriffsorte für Fungizide in *G. bidwellii* zur Bekämpfung der Schwarzfäule im Weinbau identifiziert werden.

Die in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse sollen einen Beitrag dazu leisten, die Entwicklung von *biologicals* zu fördern, die auch im ökologischen Weinbau Anwendung finden können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Lösungsmittel

Acetonitril, <i>HPLC grade</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, <i>absolute</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	VWR International S.A.S., Frankreich
Methanol, <i>HPLC grade</i>	Fisher Scientific, UK

Säuren und Laugen

Ameisensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	VWR International S.A.S., Frankreich
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ortho H ₃ PO ₄ (85 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Salzsäure <i>p.a.</i> (37 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cefotaxim-Natrium	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Glufosinatummonium (Basta [®])	Bayer CropScience Deutschland GmbH, Monheim
Hygromycin B (HygroGold [™])	Invivogen, San Diego, USA
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rifampicin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Streptomycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tetracyclinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Die Antibiotika wurden, sofern nicht anders angegeben, in H₂O_{UF} gelöst, sterilfiltriert und die Stammlösung bei -20 °C gelagert.

Medienbestandteile für Flüssig- und Festmedien

Acetosyringon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bacto [™] Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Bacto™ Casamino Acids	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Difco™ Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Difco™ Oatmeal Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Difco™ Potatoe Dextrose Broth	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Gerstenmalzextrakt	Lindenmeyer GmbH & Co. KG, Heilbronn
Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
IPTG	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Thiamindichlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Weitere Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

¹³ C-Phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumnitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Antibiotika-Testblättchen	Macherey-Nagel GmbH & Co. Kg, Düren
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Calciumnitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cellulose Nitrat Filter, 0,45 µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
CTAB	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Eisen(II)sulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eisen(III)chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Elektroporationsküvetten, 1mm	VWR International, Belgien
Elektroporationsküvetten, 2mm	VWR International, Belgien
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
FilterTips Gilson Style	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe
Glucose Diabur-Test® 5000	Roche Diagnostics International AG, Mannheim
Glycerin	VWR International S.A.S., Belgien
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ladepuffer (6x Orange Loading Dye)	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mangan(II)-chlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Mangan(II)-sulfat	Merck KgaA, Darmstadt

2. Material und Methoden

MES Hydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Miracloth	Merck KgaA, Darmstadt
Na ₂ EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumnitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Parafilm [®] M	Bemis Flexible Packaging, Neenah USA
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol [25:24:1]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sterilfilter, Typ FP 30/00, 45 CA-S	Whatman GmbH, Dassel
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
X-Gal	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe

Wasser:

Für die experimentellen Arbeiten wurde Wasser in drei unterschiedlichen Reinheitsstufen verwendet.

Dabei wurde Leitungswasser in normaler Trinkwasserqualität als H₂O, entionisiertes Wasser (Mischbett-Wasservollentsalzer DI 1500, Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe) als H₂O_{deion.} und ultrafiltriertes Reinstwasser (PURELAB[®] flex, Elga[®] LabWaters; VWS Deutschland GmbH, Celle) als H₂O_{UF} bezeichnet.

H₂O wurde für Medien benutzt, in denen Gerstenmalzextrakt verwendet wurde. H₂O_{deion.} kam in den anderen Medien und allen Lösungen und Puffern zum Einsatz. H₂O_{UF} wurde für molekularbiologische Arbeiten, die Aufnahmen von Nukleinsäure sowie bei der Benutzung der HPLC-Anlagen verwendet.

2.1.2. Enzyme

Dream Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe
Long-PCR-Enzyme-Mix	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe
Lysing Enzymes from <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phusion [™] Hot Start DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe
RNase A	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe
SAP	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe

2.1.3. Reaktionskits

Folgende Reaktionskits wurden für die molekularbiologischen Arbeiten verwendet, wobei stets nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Ausgeschlossen davon war die Elution von Nukleinsäuren, bei der H_2O_{UF} anstelle des Elutionspuffers verwendet wurde.

GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe
NucleoSpin [®] Extract II	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren
pGEM [®] -T Easy Vector System I	Promega, Mannheim
RevertAid [™] First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe
RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies, Böblingen
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4. Lösungen, Puffer und Kulturmedien

Alle Angaben der Lösungen, Puffer und Kulturmedien beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf ein Endvolumen von 1 l $H_2O_{deion.}$. Medien, die Gerstenmalzextrakt als Bestandteil enthalten, wurden mit H_2O angesetzt. Der jeweilige pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH eingestellt, sofern nicht anders vermerkt.

Alle Lösungen, Puffer und Kulturmedien wurden vor Gebrauch für 45 min bei 121 °C und 1,8 bar autoklaviert. Hitzelabile Bestandteile wurden sterilfiltriert und nach Abkühlen des Mediums (< 50 °C) steril zugegeben. Bei Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 2 % granulierter Difco[™] Agar zugesetzt, ausgenommen Oatmeal-Agar (M8).

2.1.4.1. Lösungen

L1: Alkalische Lyse-Lösung I

EDTA (pH 8,0)	10,0 mM
Glucose-Lösung	50,0 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	25,0 mM

L2: Alkalische Lyse-Lösung II

NaOH-Lösung	0,2 M
SDS-Lösung	1,0 % (m/v)

L3: Alkalische Lyse-Lösung III

Essigsäure	2,0 M
Kalium-Acetat	3,0 M

L4: Lösung B für CCM-Medium(100x); pH 5,3

KH_2PO_4	150,0 mM
MgSO_4	100,0 mM
NaCl	250,0 mM

L5: Magnesium-Stammlösung

MgCl_2	1,0 M
MgSO_4	1,0 M

L6: Nitratsalz-Lösung (20x)

KCl	140,0 mM
KH_2PO_4	220,0 mM
MgSO_4	40,0 mM
NaNO_3	1,4 M

L7: Spurenelement-Lösung I (1000x); pH 6,5 (mit KOH)

CoCl ₂	7,0 mM
CuSO ₄	6,0 mM
FeSO ₄	18,0 mM
H ₃ BO ₃	180,0 mM
MnCl ₂	25,0 mM
Na ₂ EDTA (pH 8,0)	135,0 mM
Na ₂ MoO ₄	6,0 mM
ZnSO ₄	80,0 mM

L8: Spurenelement-Lösung II (1000x)

CuSO ₄	0,40 mM
FeSO ₄	0,36 mM
H ₃ BO ₃	1,60 M
MnSO ₄	0,60 mM
ZnSO ₄	0,35 mM

2.1.4.2. Puffer

P1: CTAB-Puffer

CTAB	2,0 % (w/v)
EDTA	10,0 mM
NaCl	0,7 M
Tris-HCl (pH 8,0)	0,1 M

2. Material und Methoden

P2:	<u>K-Puffer</u>		
	K ₂ HPO ₄	1,15	M
	KH ₂ PO ₄	1,15	M
P3:	<u>MN-Puffer</u>		
	MgSO ₄	120,0	mM
	NaCl	255,0	mM
P4:	<u>Protoplastierungspuffer I</u>		
	CaCl ₂	260,0	mM
	KCl	700,0	mM
P5:	<u>Protoplastierungspuffer II</u>		
	CaCl ₂	70,0	mM
	Sorbitol	1,2	M
	Tris-HCl (pH 7,5)	10,0	mM
P6:	<u>TAE-Puffer; pH 8,0 (mit Essigsäure)</u>		
	Na ₂ EDTA	2,1	mM
	Tris	40,0	mM
P7:	<u>TE-Puffer; pH 8,0</u>		
	Na ₂ EDTA	1,0	mM
	Tris	10,0	mM

2.1.4.3. KulturmedienM1: AIM (*Agrobacterium tumefaciens*-Induktions-Medium)

Acetosyringon-Lösung (in DMSO)	400,0	µM
CaCl ₂ (1 % (w/v))	1,0	ml
FeSO ₄ (0,01 % (w/v))	10,0	ml
Glucose-Lösung (20 % (w/v))	5,0	ml
Glycerin-Lösung (50 % (w/v))	5,0	ml
K-Puffer (P2)	0,8	ml
MES-Lösung (1 M)	40,0	ml
MN-Puffer (P3)	20,0	ml
NH ₄ NO ₃ -Lösung (20 % (w/v))	2,5	ml
Spurenelementlösung II (L8)	5,0	ml

M2: CCM (*Cochliobolus*-Komplettmedium)

Bacto™ Casamino Acids	0,1	% (w/v)
Bacto™ Yeast Extract	0,1	% (w/v)
Ca(NO ₃) ₂ (10 % (w/v))	10,0	ml
Glucose	0,1	% (w/v)
Lösung B für CCM-Medium (L4)	10,0	ml
Spurenelementlösung I (L7)	1,0	ml

2. Material und Methoden

M3: CM (Komplettmedium); pH 6,5

Bacto™ Casamino Acids	0,1 % (w/v)
Bacto™ Pepton	0,2 % (w/v)
Bacto™ Yeast Extract	0,1 % (w/v)
Glucose	1,0 % (w/v)
Nitratsalzlösung (L6)	50,0 ml
Spurenelementlösung I (L7)	1,0 ml

M3a: CM-Selektionsmedium

Cefotaxim-Natrium	300,0 mg/l
Hygromycin B	50,0 mg/l
Streptomycin	200,0 mg/l

M4: DM-Medium (Doppelmalz)

Gerstenmalzextrakt	4,0 % (w/v)
--------------------	-------------

M5: LB-Medium (*lysogeny broth*), pH 7,4

Bacto™ Yeast Extract	0,5 % (w/v)
Bacto™ Trypton	1,0 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

M5a: LB-AIX

Ampicillin	100,0 mg/l
IPTG	0,5 mM
X-Gal (in DMSO)	80,0 mg/l

M5b: LB Ampicillin

Ampicillin	100,0 mg/l
------------	------------

M5c:	<u>LB Kanamycin</u>	
	Kanamycin-Monosulfat	60,0 mg/l
M5d:	<u>LB Rifampicin</u>	
	Rifampicin (in MeOH)	60,0 mg/l
M5e:	<u>LB Rifampicin + Kanamycin</u>	
	Kanamycin-Monosulfat	60,0 mg/l
	Rifampicin (in MeOH)	60,0 mg/l
M5f:	<u>LB Tetracyclin</u>	
	Tetracyclinhydrochlorid (in EtOH)	50,0 mg/l
M6:	<u>MEM (Malzextraktmedium)</u>	
	Bacto™ Pepton	0,1 % (w/v)
	Gerstenmalzextrakt	2,0 % (w/v)
	Glucose	2,0 % (w/v)
M7:	<u>MM (Minimalmedium); pH 6,5</u>	
	Biotin-Lösung (0,01 % (w/v))	250,0 µl
	Glucose	1,0 % (w/v)
	Nitratsalz-Lösung (L6)	50,0 ml
	Spurenelement-Lösung I (L7)	1,0 ml
	Thiamindichlorid-Lösung (1 % (w/v))	1,0 ml
M7a:	<u>MM-Selektionsmedium</u>	
	Cefotaxim-Natrium	300,0 mg/l
	Glufosinatummonium (Basta®)	100,0 mg/l
	Streptomycin	200,0 mg/l

M8: OMA (Oatmeal-Agar)

Difco™ Oatmeal Broth	7,45 % (w/v)
----------------------	--------------

Das Medium wird vor dem Autoklavieren aufgekocht, bis sich das gesamte Pulver vollständig löst.

M9: PDA (*Potatoe Dextrose Broth*)

Difco™ Potatoe Dextrose Broth	2,4 % (w/v)
-------------------------------	-------------

M9a: PDA-Selektionsmedium

Cefotaxim-Natrium	300,0 mg/l
-------------------	------------

Hygromycin B	50,0 mg/l
--------------	-----------

Streptomycin	200,0 mg/l
--------------	------------

M9b: ½ PDA + Sucrose

Difco™ Potatoe Dextrose Broth	1,2 % (w/v)
-------------------------------	-------------

Sucrose	1,0 M
---------	-------

M10: SOB-Medium

Bacto™ Yeast Extract	0,50 % (w/v)
----------------------	--------------

Magnesium-Stammlösung (L5)	10,00 ml
----------------------------	----------

NaCl	0,05 % (w/v)
------	--------------

Trypton	2,00 % (w/v)
---------	--------------

M11: SOC-Medium

Glucose	20,0 mM
---------	---------

SOB-Medium (M10)	ad 1,0 l
------------------	----------

2.1.5. Organismen

Folgende Organismen wurden für die fermentativen und molekularbiologischen Analysen in dieser Arbeit verwendet.

Agrobacterium tumefaciens

Stamm: AGL1 (BAA-101) (ATCC, Manassas, USA)

Genotyp: AGL0 *recA::bla p TiBo542deltaT Mop+ CbR* (Lazo *et al.*, 1991)

Der *Agrobacterium tumefaciens* AGL1-Stamm enthält ein hypervirulent geschwächtes Tumor-induzierendes Plasmid (*pTiBo542*), von dem DNA-Sequenzen der T-Region deletiert wurden. Dies erlaubt eine gute DNA-Transformation. Der Stamm hat zusätzlich einen Defekt in seiner Rekombination (*recA*), wodurch rekombinante Plasmide stabilisiert werden. Zur Selektion wird die vorhandene Resistenz gegen Rifampicin genutzt.

Escherichia coli

Stamm: *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, USA; Bullock *et al.*, 1987)

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10(Tet^r)]*

Der *Escherichia coli* XL1-Blue-Stamm besitzt keine Endonuklease (*endA*) und hat einen Defekt in der Rekombination (*recA*). Dadurch wird die Qualität isolierter Plasmid-DNA erheblich verbessert und die Stabilität von *Inserts* in Plasmiden stark erhöht. Die Mutation *hsdR17* verhindert die Spaltung einklonierter DNA durch das *EcoK*-Endonuklease-System. Die Blau/Weiß-Selektion wird durch das *lacI^q ZΔM15*-Gen ermöglicht. Der *E. coli* XL1-Blue-Stamm weist eine Tetracyclin-Resistenz (*Tet^r*) auf.

Guignardia aesculi

Stamm: CBS 756.70

Anamorph: *Phyllosticta sphaeropsoides* (Pastirčáková *et al.*, 2009)

Guignardia aesculi ist ein filamentöser Pilz, der die Blattbräune an Rosskastanien (*Aesculus hippocastanum*) verursacht (Pastirčáková *et al.*, 2009). Das verwendete Isolat wurde 1970 von H. A. van der Aa in der Fränkischen Schweiz isoliert (<http://www.cbs.knaw.nl>, Stand: 12.2014).

Guignardia bidwellii

Stamm: CBS 111645

Anamorph: *Phyllosticta ampelicida* (Hoffman *et al.*, 2002)

Guignardia bidwellii ist ein filamentöser Pilz, der die Schwarzfäule an Weinreben (*Vitis vinifera*) verursacht (Molitor, 2009). Das verwendete Isolat wurde 1999 aus *Parthenocissus quinquefolia* (selbstkletternde Jungfernrebe) durch G. Carroll isoliert (<http://www.cbs.knaw.nl>, Stand: 12.2014).

Guignardia mangiferae

Stamm: CBS 123405

Anamorph: *Phyllosticta capitalensis* (Romão *et al.*, 2011)

Guignardia mangiferae ist ein Endophyt, der nicht wirtsspezifisch ist. Besiedelte Pflanzen haben keine Anzeichen von Krankheiten, da die Pflanze durch den Pilz nicht geschädigt wird (Wickert *et al.*, 2012). Das verwendete Isolat wurde 2007 aus der Banane (*Musa acuminata*) von N.F. Wulandari isoliert (<http://www.cbs.knaw.nl>, Stand: 12.2014).

Guignardia musae

Stamm: IMI 147360

Anamorph: *Phyllosticta musarum* (Jones und Alcorn, 1982)

Guignardia musae verursacht die Fleckenkrankheit auf Bananen (*freckle disease*) und ist vor allem in Südostasien, auf den Pazifischen Inseln und in Ostafrika verbreitet (Punithalingham und Holliday, 1975). Das verwendete Isolat wurde 1970 in Asien aus der Banane (*Musa sapientum*) isoliert (<http://www.herbimi.info>, Stand: 12.2014).

Guignardia vaccinii

Stamm: CBS 126.22

Anamorph: *Phyllosticta elongate* (Weidemann *et al.*, 1982)

Guignardia vaccinii ist für die Pflanzenkrankheit CFR (*cranberry fruit rot*) an der Moosbeere (*Vaccinium oxycoccos*) verantwortlich und kommt hauptsächlich in Nordamerika vor

(Polashock *et al.*, 2009). Das verwendete Isolat wurde 1922 von C.L. Shear aus der großfrüchtigen Moosbeere (*Oxycoccus macrocarpos*) isoliert (<http://www.cbs.knaw.nl>, Stand: 12.2014).

Vitis vinifera cv. Riesling

Mit *G. bidwellii* infiziertes und nicht infiziertes Blattmaterial von jungen *Vitis vinifera* cv. Riesling Kultivaren wurde durch Frau Prof. Dr. Beate Berkelmann-Löhnertz und Frau Nicole Seibert (Institut für Phytomedizin, Hochschule Geisenheim University, Geisenheim) zur Verfügung gestellt.

2.1.6. Plasmide

Folgende Plasmide wurden für die molekularbiologischen Arbeiten verwendet.

pCAMBIA0380	CAMBIA, Canberra, Australien
pCAMBIA-BAR (<i>Sall</i>)	Kramer <i>et al.</i> , 2009
pCAMBIA-HPT (<i>Sall</i>)	Kramer <i>et al.</i> , 2009
pCAMBIA-HPT (<i>HpaI</i>)	Kramer <i>et al.</i> , 2009
pCAMBIA-HPT-EFA-GFP	Fischer, 2014
pGEM [®] -T Easy	Promega, Mannheim
pPZPbargfp	Figueiredo <i>et al.</i> , 2010
pCAMBIA-pzp-BAR-gfp	Konstruktion aus pCAMBIA0380 und pPZPbargfp. Die Resistenzkassette BAR und die Expressionskassette von GFP wurden aus dem pPZPbargfp-Vektor in den pCAMBIA 0380 überführt.

2.1.7. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operons (Ebersberg) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in H₂O_{UF} gelöst (100 pmol/μl) und bei -20 °C

aufbewahrt. Für die Gebrauchslösung wurden die Oligonukleotide auf eine Konzentration von 5 μ M verdünnt.

Die Schmelztemperatur T_m wurde von den Herstellerangaben übernommen.

Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in Anhang II dargestellt.

2.1.8. Photographische Hilfsmittel

Zur Dokumentation der Gelelektrophorese-Gele wurde der Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+ (Bio-Rad, München) verwendet.

2.1.9. Software

Das Programm pDRAW32 (Kjeld Olesen, AcaClone Software) wurde zur Auswahl geeigneter Restriktionsnukleasen für die Klonierungsversuche und zur Planung der Klonierungsstrategien verwendet.

Das Programm ApE A plasmid editor (1.13 für Windows von M. Wayne Davis) wurde zur Bearbeitung von DNA-Sequenzen, zur Erstellung von Oligonukleotiden und zur Umwandlung von Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen verwendet.

Das Programm BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) wurde für bioinformatische Untersuchungen und Vergleiche von Nukleotidsequenzen genutzt. Dabei wurde das integrierte Programm ClustalW (Chenna *et al.*, 2003) für *multiple sequence alignments* genutzt.

Die Graphen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm SigmaPlot[®] 10 (Systat Software Inc.) erstellt.

2.2. Methoden der Bioinformatik

Die Genomsequenz von *Guignardia bidwellii* ist noch nicht erforscht, so dass keine Gensequenzdatenbank, wie zum Beispiel bei *Saccharomyces cerevisiae* oder *Magnaporthe oryzae*, existiert. Somit konnte für die molekularbiologische Manipulation von *G. bidwellii* nicht auf bestehende Systeme zurückgegriffen werden, sondern die Sequenzen der benötigten Gene mussten zunächst über verschiedene Methoden identifiziert werden.

2.2.1. Identifizierung unbekannter Gensequenzen in *Guignardia bidwellii*

Die Proteinsequenzen der entsprechenden Proteine wurden zunächst aus der Hefedatenbank (<http://www.yeastgenome.org>) ermittelt. Diese Sequenzen wurden genutzt, um homologe Sequenzen aus verwandten Pilzen von *G. bidwellii* zu erhalten. Dies wurde durch die Verwendung des BLASTp-Algorithmus des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermöglicht. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem integrierten Programm *ClustalW* (Chenna *et al.*, 2003) aus dem BioEdit Sequence Alignment Editor abgeglichen. Aus Sequenzabschnitten besonders hoher Homologie wurden degenerierte Oligonukleotide generiert (Anhang II). Diese dienten zur Amplifikation eines bestimmten Genfragments. Als Template für die Vervielfältigung wurde cDNA aus *G. bidwellii* verwendet. Das Amplifikat wurde anschließend sequenziert (2.4.4.3.), woraufhin spezifische Oligonukleotide generiert werden konnten (Anhang II). Diese wurden zur Amplifikation genutzt, wobei hier gDNA als Matrize diente. Das erhaltene Fragment wurde erneut sequenziert. Mithilfe der *step down* PCR-Methode (2.4.2.2.) wurden die Bereiche um das erhaltene Fragment verlängert.

2.2.2. Generierung einer Gensequenzdatenbank aus *Guignardia bidwellii*

Im Laufe der Arbeit wurde eine Gensequenzdatenbank generiert. Dafür wurde sowohl RNA als auch gDNA aus *G. bidwellii* isoliert. Hierfür wurden 500 ml Erlenmeyerkolben mit 250 ml MEM (M6) oder MM (M7) mit *G. bidwellii* inokuliert und bei RT und 120 rpm kultiviert. Anschließend wurde RNA zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert (2.4.1.), einmal zum Zeitpunkt als keine Produktion von Sekundärmetaboliten mittels HPLC nachweisbar war (im MM-Medium) und zum Zeitpunkt als eine deutliche Produktion von Sekundärmetaboliten mittels HPLC nachweisbar war (im MEM-Medium). Die Überprüfung mittels HPLC erfolgte wie unter 2.3.3.2. beschrieben. Die Qualität der RNA wurde mittels BioAnalyzer (Agilent Technologies, Böblingen) überprüft. Anschließend konnten die Nukleinsäuren durch das Institut für Molekulargenetik, gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung an der

Johannes Gutenberg-Universität Mainz bei Prof. Dr. Schmidt sequenziert werden. Dr. Karsten Andresen (IBWF, Kaiserslautern) generierte aus den erhaltenen Rohdaten eine Datenbank für *G. bidwellii*.

Mithilfe dieser Datenbank konnten die bisher über Homologievergleiche gefundenen Sequenzen verglichen und angepasst werden.

Nach Aufarbeitung der Rohdaten wurde gegen Ende dieser Arbeit ein Vergleich zwischen den Zuständen der Produktion und der Nicht-Produktion auf Grundlage des Transkriptoms durch Dr. Karsten Andresen (IBWF, Kaiserslautern) durchgeführt.

2.3. Methoden der Fermentation und Naturstoffanalyse

2.3.1. Fermentation in Submerskulturen

Alle Fermentationen wurden, falls nicht anders erwähnt, in 1 l MEM-Medium (M6) in 2 l Erlenmeyerkolben ohne Schikane durchgeführt. Als Inoculum für 1 l Medium wurden 5 Rondelle (Ø 10 mm) von gut bewachsenen Pilzkulturen verwendet. Die Fermentation fand bei RT und 120 rpm auf einer Rundschüttelmaschine (Infors AG, Bottmingen) statt. Für Fermentationsanalysen wurde stets in Dublikaten gearbeitet.

2.3.2. Herstellung von Rohextrakten aus Kulturfiltrat und Mycel

Für Untersuchungen der Wirkstoffproduktion wurde alle 2 – 3 Tage eine 30 ml Probe aus der Submerskultur steril entnommen. Anschließend wurden der pH-Wert und der Glucosegehalt gemessen. Bei jeder Probe wurde das Mycel über einen Filter (Macherey-Nagel, Düren) mittels Büchnertrichter von der Kulturbrühe separiert. Das erhaltene Kulturfiltrat wurde in einen Scheidetrichter überführt und das abgetrennte Mycel wurde verworfen.

Niedermolekulare Verbindungen wurden mit Ethylacetat (1:1 (v/v)) aus dem Kulturfiltrat extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und im Rotationsverdampfer (Rotavapor[®] R-124, Büchi Labortechnik GmbH) unter Vakuum bei 45 °C eingengt. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte mit Acetonitril 1:100 (v/v). Der erhaltene Rohextrakt wurde zur Aufbewahrung bei -20 °C in Probegläschen überführt.

Die Fermentation wurde beendet, sobald im Medium keine freie Glucose mehr nachweisbar war.

Für eine HPLC-Analyse wurde der Extrakt in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Schwebstoffe zu entfernen. Der Überstand wurde in ein HPLC-Gläschen (Vials N11 flach SF, 1,5 ml Macherey-Nagel GmbH & Co.KG) überführt.

2.3.3. Fermentationsanalysen

2.3.3.1. Fermentationsparameter

Der pH-Wert der Kulturbrühe wurde mithilfe eines pH-Meters (pH 209, HANNA® Instruments Deutschland GmbH) bestimmt.

Der Glucosegehalt in der Kulturbrühe wurde mithilfe von Glucose-Teststreifen (Glucose-Teststreifen „Diabur-Test® 5000“, Roche Diagnostics, Mannheim) gemessen.

2.3.3.2. Analytische HPLC

Zur Untersuchung von Sekundärmetaboliten in den Rohextrakten wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt. Dabei wurde die HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn), die mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) ausgestattet ist, verwendet. Die Injektion der Probe wurde durch einen LC Autosampler (HTC PAL, CTC Analytics GmbH, Zwingen, CH) durchgeführt. Als Trennsäule wurde eine Zorbax Eclipse XDB Phenyl-Säule (3 x 150 mm; 3,5 µm) von Agilent genutzt. Für die Detektion der Naturstoffe wurde eine Methode mit optimierten Laufparametern verwendet (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1.: Optimierte Laufparameter der analytischen HPLC zur Untersuchung der Naturstoffe aus Rohextrakten.

Eluent A: $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 , Eluent B: Acetonitril. Die Laufparameter wurden für alle Messungen mittels analytischer HPLC verwendet.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	99	1
3	60	40
13	60	40
17	0	100
19	0	100
20	99	1

Als Elutionsmittel wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ + 0,1 % (v/v) H_3PO_4 (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) eingesetzt. Die Analysen wurden bei einer Säulenofentemperatur von 40 °C durchgeführt.

Dabei wurde eine Flussrate von 0,7 ml/min verwendet. Die Auswertung erfolgte stets bei einer Wellenlänge von 300 nm.

2.3.3.3. Quantitative Wirkstoffbestimmung

Für die quantitative Wirkstoffbestimmung der Verbindungen Alaguignardic acid, Guignardic acid und Phenguignardic acid wurde mithilfe eines externen Standards je Substanz in verschiedenen Konzentrationen eine Kalibrierungsgerade bei einem Injektionsvolumen von 10 µl erstellt. Mittels dieser Geraden konnte der Gehalt [mg/l] der jeweiligen niedermolekularen Substanzen in den verschiedenen Kulturfiltraten bestimmt werden.

2.3.4. Methoden zur Aufreinigung und Charakterisierung von Naturstoffen

2.3.4.1. Säulenchromatographie

Für die Supplementationsversuche mit ¹³C-Phenylalanin wurde der erhaltene Rohextrakt durch Festphasenextraktion an Chromabond-Kartuschen (C18 ec-Säulenkartuschen, Macherey-Nagel, Düren) aufgetrennt. Dafür wurde der Extrakt in Acetonitril gelöst und auf eine mit Ameisensäure equilibrierte Säule gegeben. Das Elutionsvolumen betrug 10 ml und die Substanzen wurden mit einem Gradienten (Tabelle 2.2.) eluiert.

Tabelle 2.2.: Elutionsgradient der Festphasenextraktion an Chromabond-Kartuschen.

Der Elutionsgradient wurde zur Auftrennung des erhaltenen Rohextraktes aus den ¹³C-Phenylalanin-Supplementationen mit *G. bidwellii* verwendet.

Ameisensäure [%]	Acetonitril [%]
100	0
75	25
50	50
40	60
25	75
0	100

Die erhaltenen Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer eingedampft und mit Acetonitril wieder gelöst. Nach Trocknung der Fraktionen in einem Vakuumkonzentrator (RVC 2-18 CDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) wurden die Fraktionen an der Feinwaage gewogen und mittels analytischer HPLC gemessen.

2.3.4.2. Präparative HPLC

Zur Reindarstellung der Verbindungen wurden entsprechende Fraktionen aus der Festphasenextraktion (2.3.4.1.) mittels präparativer HPLC aufgetrennt. Dabei wurde eine Zorbax Eclipse XDB Phenyl-Säule (250 x 9,4 mm) von Agilent mit einer Flussrate von 7 ml/min verwendet. Die Verbindungen wurden isokratisch mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ + 0,1 % (v/v) Ameisensäure und Acetonitril (60:40) aufgetrennt. Die erhaltenen Reinsubstanzen wurden eingedampft und definiert in Acetonitril aufgenommen.

Die erhaltenen Reinsubstanzen wurden für die Messung zur ^{13}C -NMR-Spektroskopie genutzt (2.3.4.3.).

2.3.4.3. Massenspektroskopie und Kernspinresonanzspektroskopie

Zur Bestimmung der Reinsubstanzen wurden die HPLC-ESI-MS-Analysen in einer HPLC-Anlage (Series 1200, Agilent, Waldbronn) mit UV-Dioden-Array-Detektor und einem angekoppelten LC/MSD Trap XCT-ESI-Massenspektrometer vermessen.

Zur Trennung wurde eine Ascentis[®] Express C_{18} Säule (Länge: 3 cm, Durchmesser: 2,1 mm, Porengröße: 2,7 μm , Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet, die auf 40 °C temperiert wurde. Es wurden Gemische aus H_2O + 0,1 % (v/v) Ameisensäure und Acetonitril als Laufmittel verwendet. Die Flussrate betrug 1,0 ml/min.

Die Spektren der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) wurden auf einem Avanca.III 600 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen, das mit einem 5 mm cryo-TCI Probenkopf ausgestattet ist (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA). Die Messung erfolgte mit Standardpulssequenzen bei 23 °C. Die NMR-Signale wurden auf die Lösungsmittelsignale des CDCl_3 referenziert (^1H : 7,26 ppm; ^{13}C : 77,16 ppm; Fulmer *et al.*, 2010).

2.3.5. Bioherbizid-Versuch

Für den Bioherbizid-Versuch wurden fünf 2 l Erlenmeyer Kolben ohne Schikane mit 1 l MEM-Medium (M6) mit 5 Rondellen (\varnothing 10 mm) von gut bewachsenen Oatmeal-Agarplatten (M8) mit *G. bidwellii* angeimpft. Alle zwei Tage wurde eine Probe entnommen (2.3.2.) und die Produktionsrate der phytotoxischen Dioxolanone mittels analytischer HPLC analysiert (2.3.3.2.). Nachdem die höchste Produktionsrate der Naturstoffe erreicht war, wurde die Fermentation beendet und das Mycel von der Kulturbrühe separiert (2.3.2.). Es konnten 8,7 l Kulturfiltrat gewonnen werden. Das erhaltene Kulturfiltrat wurde 1:1 geteilt. Aus dem einen Teil wurden die niedermolekularen Substanzen extrahiert (2.3.2.). Der andere Teil des

Kulturfiltrats wurde mittels Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Die Ausbeute des lyophilisierten Kulturfiltrats betrug 68,47 g, die des extrahierten Kulturfiltrats 375 mg. Beide Proben wurden im Anschluss durch Dr. Daniel Molitor (Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann, Belvaux, Luxemburg) in einem Freilandversuch auf ihre herbizide Wirkung getestet.

2.3.6. Toxinnachweis *in planta*

Für den Nachweis der phytotoxischen Dioxolanone von *G. bidwellii* wurde frisches, mit *G. bidwellii* infiziertes und nicht infiziertes Blattmaterial von *Vitis vinifera* cv. Riesling durch Frau Prof. Dr. Berkelmann-Löhnertz und Frau Nicole Siebert (Institut für Phytomedizin, Hochschule Geisenheim University, Geisenheim) zur Verfügung gestellt.

Zur Identifikation der Toxine von *G. bidwellii in planta* wurden 43 g infiziertes Blattmaterial und 50 g nicht-infiziertes Blattmaterial mit 500 ml Ethylacetat versetzt und mit einem Stabmixer (ESGE Zauberstab®, Unold AG, Hockenheim) zerkleinert. Anschließend wurden weitere 500 ml Ethylacetat zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf einem Schüttler bei RT und 120 rpm inkubiert. Die Suspension wurde über einen Filter und Na₂SO₄ abfiltriert, das Filtrat in einen Rundkolben überführt und im Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Acetonitril aufgenommen und zur Aufbewahrung bei -20 °C in Probegläschen überführt. Phytotoxische Dioxolanone in den Extrakten wurden mittels analytischer HPLC (2.3.3.2.) und HPLC-MS (2.3.4.3.) identifiziert.

2.4. Methoden der Molekularbiologie

2.4.1. Präparation von Nukleinsäuren

2.4.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* wurde eine Schüttelkultur in 5 ml LB-Selektionsmedium (je nach enthaltener Resistenz) in 14 ml Röhrchen über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken wurde aus 1,5 ml der Kultur durch alkalische Lyse mittels L1, L2 und L3 nach Sambrook *et al.* (2001) isoliert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA für präparative Zwecke wurde das GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit verwendet (Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe).

2.4.1.2. Isolierung von genomischer DNA aus *Guignardia bidwellii*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *G. bidwellii* wurde die Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (PCI)-Extraktion [25:24:1] in Anlehnung an Subramanyam *et al.* (2009) angewendet. Eine Submerskultur von *G. bidwellii* in 50 ml DM-Medium (M4) wurde für vier Wochen bei 26 °C und 120 rpm in einem 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert. Anschließend wurde das Mycel von der Kulturbrühe separiert, lyophilisiert und in Flüssigstickstoff zu feinem Pulver gemörsert.

Das so verarbeitete Mycel dieser Kultur wurde mit 4 ml CTAB-Puffer (65 °C, P1) und 40 µl β-Mercaptoethanol versetzt und invertiert. Die Lösung wurde für 30 min bei 65 °C mit gelegentlichem Invertieren inkubiert und dann mit einem Volumen (PCI) [25:24:1] versetzt. Nach Inkubation für 20 min auf einem Wippschüttler (STS, CAT Scientific Inc., Kalifornien, USA) bei RT wurde der Ansatz für 5 min bei 4 °C mit 5000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde entnommen und in ein neues Gefäß überführt. Erneut wurde ein Volumen PCI zugegeben und der Vorgang wiederholt. Für eine weitere Extraktion wurde ein Volumen Chloroform verwendet. Im Anschluss an den Zentrifugationsschritt wurde die wässrige Phase mit einem Volumen Isopropanol vermischt und für 10 min 4 °C mit 10000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 300 µl TE-Puffer (P7) (+40 µg/ml RNase-A) resuspendiert. Darauf folgte eine klassische Ethanol-fällung, bei der die Lösung mit 1/10 Volumen NaAc (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen EtOH (100%; -20 °C) versetzt und mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert wurde. Nach Inkubation wurde die Lösung für 20 min bei 4 °C mit 13000 rpm zentrifugiert und nach der Trocknung in H₂O_{UF} aufgenommen.

2.4.1.3. Isolierung von RNA aus *Guignardia bidwellii*

Zur Isolierung von RNA aus *G. bidwellii* wurde, wie bei der Isolierung von genomischer DNA (2.4.1.2.), Mycel aus einer 4 Wochen alten Submerskultur verwendet, lyophilisiert und gemörsert. Zur Isolierung der RNA wurde das RNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) und das RNase-free DNase Set (Qiagen, Hilden) verwendet. Die isolierte RNA wurde mit H₂O_{UF} aufgenommen und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.1.4. Synthese von cDNA aus RNA

Für die Synthese von cDNA aus RNA wurde das RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, Karlsruhe) verwendet. Bei jeder cDNA-Synthese wurde sowohl ein Ansatz mit *Oligo(dT)*₁₈ Primern als auch ein Ansatz mit *Random hexamer* Primern durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.1.5. Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Qualität der isolierten Nukleinsäuren wurde das NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe) genutzt. Die Messung erfolgte durch UV/VIS Spektroskopie nach Angaben des Herstellers.

Die Qualität und Reinheit der RNA-Proben wurde zusätzlich unter Verwendung des RNA 6000 Pico Assays (Agilent Technologies, Böblingen) im BioAnalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) bestimmt.

2.4.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR diente zur Amplifikation von Fragmenten mit gDNA, cDNA und Plasmid-DNA als Template für analytische und präparative Zwecke. Dabei wurde das GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) verwendet. Es wurde bei der Präparation der PCR-Ansätze stets auf Eis und mit Filter Tips gearbeitet.

2.4.2.1. PCR mit der *Taq* DNA-Polymerase

Für Standardansätze wurde für die Amplifikation die Dream Taq™ DNA-Polymerase, bei Fragmenten mit einer hohen Nukleotid-Anzahl (> 4500 bp) der Long-PCR-Enzyme-Mix verwendet.

Standard PCR-Reaktionsansatz

Template DNA	~ 100,0	ng
PCR Puffer mit MgCl ₂ (25 mM, 10x)	5,0	µl
dNTPs (10 mM)	1,0 2,5	µl
Primer <i>forward</i> (5 µM)	2,5	µl
Primer <i>reverse</i> (5 µM)	1,0	µl
Dream Taq™ DNA-Polymerase	ad 50,0	µl
H ₂ O _{UF}		

Zu Beginn wurde die DNA einmalig für 5 min bei 94 °C denaturiert. Danach folgten 35 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94 °C, 20 s *Annealing* bei T_A und die Elongation für t_E bei 72 °C. Die *Annealing*-Temperatur T_A wurde jeweils etwa 3 °C unter der Schmelztemperatur T_m der Oligonukleotide gewählt. Die Schmelztemperatur T_m wurde vom Hersteller (Eurofins MWG Operons, Ebersberg) übernommen. Nach Abschluss der Zyklen folgte eine terminale Elongationsphase bei 72 °C für 10 min.

2.4.2.2. Step Down PCR-Methode

Diese Methode wurde – mit einigen Änderungen – nach Zhang und Gurr (2000) durchgeführt, um Fragmente, die mithilfe degenerierter Oligonukleotide erhalten wurden, zu verlängern.

Dafür wurden jeweils zwei Oligonukleotidpaare generiert, wobei das eine Paar an den äußeren Enden der bereits identifizierten Sequenz und das andere Paar weiter innen in der bekannten Sequenz binden sollte.

Die genomische DNA von *G. bidwellii* wurde mittels PCI-Extraktion (2.4.1.2.) gewonnen und jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *BcuI*, *NheI*, *XbaI*, *XmaI*, *NgoMIV* und *BspEI* im entsprechenden Puffer für 12 h bei 37 °C inkubiert, sofern diese Schnittstellen nicht in der bereits bekannten Sequenz vorhanden waren.

Restriktionsansatz

gDNA	2,0 µg
Restriktionsenzym	4,0 µl
10x Puffer	10,0 µl
H ₂ O _{UF}	ad 100,0 µl

Nach erfolgter Restriktion musste die gDNA zunächst von möglichen Salzen gereinigt werden, so dass die Proben, wie durch Zhang und Gurr (2000) beschrieben, aufgearbeitet wurden. Nach der Entsalzung wurden die entsprechenden Adapter ligiert. Auch hier wurde entsprechend der Veröffentlichung gearbeitet, ebenso wie bei der anschließenden PCR. Die Ansätze wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen (2.4.3.2.) und die entsprechenden DNA-Fragmente extrahiert. Darauf wurden die Fragmente in den pGEM[®]-T Easy ligiert (2.4.4.1.) und sequenziert (2.4.4.3.).

2.4.3. Restriktion von Nukleinsäuren und Gelelektrophorese

Die folgenden Methoden der Restriktion von Nukleinsäuren und der Gelelektrophorese wurden nach den allgemeinen Vorschriften von Sambrook *et al.* (2001) durchgeführt.

2.4.3.1. Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde für analytische und präparative Zwecke durchgeführt. Die Restriktion zu analytischen Zwecken wurde mit 200 ng DNA durchgeführt und für 1 h bei entsprechender Temperatur inkubiert.

Restriktionsansatz zu analytischen Zwecken

DNA	200,0 ng
Enzypuffer (10x)	2,0 µl
Restriktionsenzym	1,0 µl
H ₂ O _{UF}	ad 20,0 µl

Bei Restriktionen zu Klonierungszwecken wurden 1 µg DNA eingesetzt und der Ansatz für 2 h bei entsprechender Temperatur inkubiert.

Restriktionsansatz für Klonierungszwecke

DNA	1,0 µg
Enzypuffer (10x)	5,0 µl
Restriktionsenzym	2,0 µl
H ₂ O _{UF}	ad 50,0 µl

2.4.3.2. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Hierbei wurde ein Agarosegel (1 % Agarose in 1 x TAE-Puffer (P6)) in Standard-Gelkammern (Bio-Rad, München) verwendet und eine Spannung von 100 V angelegt. Als Größenstandard wurde der Größenmarker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder verwendet, um die Fragmentgröße zu bestimmen. Nach der Auftrennung wurden die Agarosegele für 5 s in einer Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) gefärbt und anschließend für etwa 30 min in H₂O_{deion.} wieder entfärbt. Abschließend wurde die DNA unter Verwendung des Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad, München) bei UV-Licht (λ = 365 nm) mit der Software Image Lab™ 4.1 (Bio-Rad, München) sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.4.3.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus Restriktions- oder PCR-Ansätzen wurden mithilfe des Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel entnommen. Die DNA wurde anschließend mit dem Reaktionskit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) extrahiert und in H₂O_{UF} gelöst.

2.4.4. Klonierungsmethoden**2.4.4.1. Ligation**

Die Ligation erfolgte mit einer T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte). In den Ligationsansätzen wurde meist ein molares Verhältnis von 3:1, selten 5:1, von DNA-Insert zu Vektor in einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt. Hierbei wurden vom Vektor 50 ng eingesetzt. Das molare Verhältnis wurde mit folgender Formel berechnet (Mülhardt, 2007):

$$\frac{\text{Vektor [ng]} * \text{Insert [bp]}}{\text{Vektor [bp]}} \times \text{molares Verhältnis Insert : Vektor} = \text{Insert [ng]}$$

Standard-Ligationsansatz

Vektor	50,0	ng
DNA-Insert	x	ng
Puffer (10x)	2,0	µl
T4-Ligase	1,0	µl
H ₂ O _{UF}	ad 20,0	µl

Die Ligation erfolgte für 1 h bei 22 °C im Thermoblock (Thermomixer comfort, Eppendorf AG Hamburg) mit anschließender Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10 min.

2.4.4.2. Dephosphorylierung von Schnittstellen

Bei Ligationsreaktionen mit Vektorfragmenten, die nur mit einer Endonuklease restringiert werden, kann es zu unerwünschten Religationen kommen (Hewitt und McDonnell, 2004). Deswegen wurden in diesen Fällen die freien 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert. Dabei wurden 2 µl des Enzyms *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) verwendet, die nach erfolgter Restriktion in den Ansatz des restringierten Vektors gegeben wurden. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde die SAP für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

2.4.4.3. Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden Proben der Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 50 – 100 ng/µl in 20 µl eingestellt. Die Proben wurden mit den Sequenzierungsoligonukleotiden M13 (Anhang II) durch die Firma Eurofin MWG Operon, Ebersberg, sequenziert.

Die Sequenzierung der gDNA und RNA zur Genomanalyse bzw. Transkriptomanalyse wurde mit 1 – 5 µg der jeweiligen Nukleinsäure vom Institut für Molekulargenetik, gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bei Prof. Dr. Schmidt durchgeführt.

2.4.5. Transformation von *Escherichia coli*

2.4.5.1. Präparation elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen

Von einer Glycerinkultur des Stammes *E. coli* XL1-Blue wurde ein Verdünnungsausstrich auf LB Tet-Agarplatten (M5f) angefertigt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von der bewachsenen Platte wurde jeweils eine Kolonie in ein 14 ml Röhrchen mit 5 ml LB-Tet-Flüssigmedium überführt und für 16 – 18 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

Die gewachsene Schüttelkultur wurde vollständig als Inokulum für 500 ml LB-Medium (M5) mit 20 mM Glucose in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane genutzt. Der Kolben wurde bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer maximalen OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert. Die photometrische Überprüfung der OD₆₀₀ wurde im Photometer (SmartSpec™ 3000, Bio-Rad, München) durchgeführt.

Nach erreichter Zelldichte wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000 rpm bei 4 °C für 15 min zentrifugiert (Zentrifuge 5810R mit Ausschwingrotor A-4-81, Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem H₂O_{UF} gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Glycerinlösung (10 % (v/v)) gewaschen und abschließend in 10 ml Glycerinlösung (10 % (v/v)) resuspendiert. Von diesem Zellkonzentrat wurden 80 µl Aliquots hergestellt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Aufbewahrung der kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte bei – 80 °C.

2.4.5.2. Transformation elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die Transformation von elektrokompenten *E. coli*-Zellen (Dower *et al.*, 1988) wurde ein Aliquot mit Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit 3 µl des Ligationsansatzes (2.4.4.1.) versetzt. Dieser Ansatz wurde dann in eine vorgekühlte 1 mm-Elektroporations-

küvette gegeben und im GenePulser Xcell™ (Bio-Rad, München) durch einen elektrischen Impuls mit den Einstellungen 25 μ F, 1,3 kV und 200 Ω elektroporiert. Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen sofort mit 300 μ l SOC-Medium (M11) versetzt und in ein 14 ml Röhrchen überführt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Kultur wurde je nach eingebrachter Resistenz auf Selektionsplatten mit Antibiotikum überführt und für 16 – 18 h bei 37 °C inkubiert.

2.4.5.3. Identifizierung von Transformanten

Die Identifizierung von Transformanten erfolgte abhängig vom verwendeten Selektionsmarker beziehungsweise von der vorhandenen Antibiotikum-Resistenz der entsprechenden Plasmide.

Bei der Nutzung des Klonierungsvektors pGEM®-T Easy wurde das Blau/Weiß-Selektionssystem genutzt. Der Vektor enthält das *LacZ*-Gen, welches für die β -Galaktosidase kodiert, wobei diese Gen-Sequenz durch eine *mcs* unterbrochen ist. Wird ein PCR-Produkt erfolgreich in die *mcs* integriert, ist eine Expression von β -Galaktosidase nach Induktion durch IPTG nicht mehr möglich und die Kolonien erscheinen auf LB-AXI (M5a) weiß (Mülhardt, 2007). Zusätzlich oder bei weiteren Klonierungsschritten mit diesem Vektor wurde über Ampicillin auf LB-Ampicillin (M5b) selektiert.

Bei Verwendung von pCAMBIA-Plasmiden diente Kanamycin als Selektionsmarker und die Kulturen wurden auf LB-Kanamycin (M5c) inkubiert.

Zur weiteren Analyse wurden einzelne Kolonien in 14 ml Röhrchen mit 5 ml LB-Flüssigmedium gegeben, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt. Die Ansätze wurden für 16 – 18 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Nach erfolgtem Wachstum wurde die Plasmid-DNA aus den Kulturen isoliert (2.4.1.1.) und durch eine Restriktionsanalyse überprüft (2.4.3.1.).

2.4.6. Transformation von *Guignardia bidwellii*

2.4.6.1. Präparation chemisch-kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Von einer Glycerinkultur des Stammes *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 wurde ein Verdünnungsausstrich auf LB-Rif-Agarplatten (M5d) aufgetragen und für 2 – 4 Tage bei 28 °C in Dunkelheit inkubiert. Von der bewachsenen Platte wurden mehrere Kolonien in ein 14 ml Röhrchen mit 5 ml LB-Rif-Flüssigmedium überführt und für 16 – 18 h bei 28 °C und 220 rpm inkubiert.

Diese Kultur wurde als Inoculum für 500 ml LB-Medium (M5) in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane verwendet. Der Kolben wurde bei 28 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 inkubiert. Nach erreichter Zelldichte wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert (Zentrifuge 5810R mit Ausschwingrotor A-4-81, Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde einmal mit 100 ml 20 mM CaCl₂-Lösung gewaschen. Abschließend wurden die pelletierten Zellen in 1 ml 20 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Von diesem Zellkonzentrat wurden 100 µl Aliquots angefertigt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Aufbewahrung der kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen erfolgte bei – 80 °C.

2.4.6.2. Transformation chemisch-kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Für die Transformation von chemisch-kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen (Bowyer, 2001) wurde ein Aliquot mit Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und 500 ng bzw. 2 µg Plasmid-DNA zugegeben. Es folgte für 5 min eine Inkubation in einem Wasserbad bei 37 °C und eine erneute Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 400 µl LB-Flüssigmedium (M5) wurde der Ansatz in ein 14 ml Röhrchen überführt und für 4 – 6 h bei 28 °C und 220 rpm auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Abschließend wurden 100 µl und 300 µl der Zellsuspension auf vorgewärmte LB-Rif-Kana-Selektionsplatten (M5e) überführt und in Dunkelheit 3 Tage bei 28 °C inkubiert.

2.4.6.3. *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Guignardia bidwellii*

Die Transformation von *G. bidwellii* wurde in Anlehnung an Figueiredo *et al.* (2010) und Shaw *et al.* (2001) durchgeführt und wurde im Laufe der Untersuchungen weiter modifiziert. Nach der Transformation von *A. tumefaciens* wurden mehrere Kolonien in ein 14 ml Röhrchen mit 5 ml LB-Rif-Kana-Flüssigmedium (M5e) überführt und für 16 – 18 h bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 1,5 ml bei 6000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet steril in 750 µl AIM (M1) resuspendiert. Dieser Ansatz wurde in einem sterilen 14 ml Röhrchen mit weiteren 4 ml AIM verdünnt und bei 28 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert.

Um Mycel von *G. bidwellii* zur Transformation zu erhalten, wurden in Anlehnung an Shaw *et al.* (2001) 50 ml *Cochliobolus*-Komplettmedium (M2, Leach *et al.*, 1982) in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 10 Rondellen (Ø 10 mm) von gut bewachsenen *G. bidwellii*-Kulturen

inokuliert und 7 Tage als Standkultur bei RT kultiviert. Nach erfolgter Kultivierung wurde der gesamte Ansatz in ein 50 ml Falcon (Cellstar® Tubes, PP Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen) überführt und bei RT für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 30 ml NaCl-Lösung (0,9 % (v/v)) resuspendiert. Der Ansatz wurde in einen sterilen Becher überführt und mithilfe eines Stabmixers (ESGE Zauberstab®, Unold AG, Hockenheim) zerkleinert. Der Ansatz wurde für 5 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde erneut für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Mycel wurde mit der Bakteriensuspension der transformierten *A. tumefaciens*-Zellen in einem Verhältnis von 2 mg zu 4 ml gemischt. Von dieser Suspension wurden 700 µl auf den Rand eines Cellulose-Nitrat-Filters (Porengröße 0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) auf AIM-Platten (M1) aufgetragen und schließlich für 48 h bei 28 °C in Dunkelheit inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation folgte der Transfer der Filter auf Selektionsmedium (MM-Selektionsmedium (M7a), PDA-Selektionsmedium (M9a) oder CM-Selektionsmedium (M3a)) und eine erneute Inkubation für 14 – 30 Tage bei 28 °C. Sobald Einzelkolonien am Rand der Filter sichtbar waren, wurden diese Kolonien auf neues entsprechendes Selektionsmedium überführt. Wuchs die Kolonie hier gut an, wurden anschließend 50 ml DM-Flüssigmedium (M4) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben ohne Schikane mit 3 Mycelrondellen (Ø 10 mm) der Kolonie inokuliert und für 3 Wochen bei 28 °C und 120 rpm inkubiert. Abschließend wurde aus den Ansätzen genomische DNA isoliert (2.4.1.2.).

Modifizierungen:

Um ein effektives Transformationssystem für *G. bidwellii* zu etablieren wurden, mit Unterstützung von Frau Isabell Büttel (Projektarbeit) verschiedene Parameter des Standardverfahrens modifiziert.

- Acetosyringon-Konzentration
- Zelldichte *A. tumefaciens* (OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 1,0)
- Mischungsverhältnis Mycel : Bakteriensuspension
- Zugabe von Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (5 mg/ml)
- Kultivierungsdauer der Pilzkultur
- Co-Kultivierungsdauer
- Mycelbehandlung mit Trizyclazol (400 µM in Dichlormethan)

Bei einigen Untersuchungen wurden Sporen zur Transformation verwendet. Dafür wurden Sporen von 11 Tage alten, auf Oatmeal-Agar (M8) gewachsenen *G. bidwellii*-Kulturen steril mit NaCl-Lösung (0,9 % (v/v)) gewonnen und über einlagiges Miracloth filtriert. Die Sporen wurden für 10 min bei RT mit 4000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 1 ml NaCl-Lösung

(0,9 % (v/v)) resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert und 1:1 mit der Bakteriensuspension versetzt. Von dieser Suspension wurden 400 µl auf den Rand eines Cellulose-Nitrat-Filters auf AIM-Platten (M1) aufgetragen und für 48 h bei 28 °C in Dunkelheit inkubiert.

2.4.6.4. Protoplasten-vermittelte Transformation von *Guignardia bidwellii*

Die Protoplastierung des Mycel von *G. bidwellii* wurde in Anlehnung an Shaw *et al.* (2001) durchgeführt. Für die Gewinnung des Mycel wurden 50 ml CCM-Medium (M2) in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 10 Rondellen (Ø 10 mm) von gut bewachsenen *G. bidwellii*-Kulturen inokuliert und 7 Tage als Standkultur bei RT kultiviert. Nach der Kultivierung wurde das Mycel bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge 5810R mit Ausschwingrotor A-4-81, Eppendorf AG, Hamburg) und der Überstand verworfen. Die Lyse der Zellwände wurde mit einer *Trichoderma harzianum* Lysing Enzyme-Lösung (5 mg/ml) in 15 ml Protoplastierungspuffer I (P4) für 30 min auf einem Wippschüttler bei RT durchgeführt. Daraufhin folgte eine mikroskopische Überprüfung des Ansatzes und nach erfolgter Protoplastierung wurde die resultierende Protoplastensuspension durch steriles dreilagiges Miracloth filtriert. Nach erneuter Zentrifugation folgte die Aufnahme des Pellets in Protoplastierungspuffer I (P4). Die Protoplastensuspension wurde auf 100 µl Aliquots verteilt und je 10 µg Plasmid-DNA zugegeben. Die Lösungen wurden 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurden jedem Ansatz zunächst 200 µl PEG-4000 (60 % (v/v)) zugegeben, invertiert und weitere 200 µl PEG-4000 (60 % (v/v)) zugegeben. Nach erneutem Invertieren wurden abschließend 800 µl PEG-4000 (60 % (v/v)) zugegeben und die Ansätze wurden für 20 min auf Eis inkubiert. Darauf wurde jeweils 1 ml Protoplastierungspuffer II (P5) zugefügt. Je 200 µl der resultierenden Lösung wurden auf noch flüssige ½ PDA + Sucrose Agarplatten (M9b) überführt. Nach 16 Stunden Inkubation bei 28 °C wurden die Platten mit je 5 ml Wasseragar (1 % (v/v)), versetzt mit Hygromycin, überschichtet. Die Konzentration an Hygromycin betrug 50 µg/ml. Die Inkubation fand bei 28 °C statt.

Zur Kontrolle wurde protoplastiertes Mycel von *G. bidwellii* auf ½ PDA + Sucrose Agarplatten ausplattiert und mit Wasseragar (1 % (v/v)) ohne Zusatz überschichtet.

2.4.6.5. Lithiumacetat-vermittelte Transformation von *Guignardia bidwellii*

Die Lithiumacetat-vermittelte Transformation wurde in Anlehnung an Dhawale *et al.* (1984) durchgeführt. Dafür wurden die Konidien von 30 Tage alten, bei 28 °C auf Oatmeal-Agarplatten (M8) gewachsenen *G. bidwellii* Kulturen gewonnen, indem sie mit NaCl-Lösung (0,9 % (v/v)) mithilfe eines Drigalski-Spatels dispergiert und über zweilagiges Miracloth

filtriert wurden. Anschließend wurden die Sporen bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge 5810R mit Ausschwingrotor A-4-81, Eppendorf AG, Hamburg) und in 30 ml 10 mM Tris und 1 mM EDTA (pH 7,5) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Sporen in 1 ml 0,1 M Lithiumacetat-Lösung zu einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml resuspendiert und für 30 min bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation und das Pellet wurde dann in 400 μ l 0,1 M Lithiumacetat-Lösung resuspendiert und 20 μ g Plasmid-DNA zugegeben. Dieses Gemisch wurde für weitere 30 min bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden 4 ml PEG-4000 (40 % (v/v)) zugegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und nach Zentrifugation wurden die Konidien in sterilem H_2O_{UF} gewaschen und aufgenommen. Daraufhin wurden sie auf PDA-Selektionsmedium (M9a) überführt und bei 28 °C inkubiert.

Als Kontrolle und zur Überprüfung des Keimungs- und Wachstumsverhaltens der Konidien wurde der Versuch auch mit niedriger konzentrierten Lithiumacetat-Lösungen (100 mM; 200 mM; 500 mM) ohne die Zugabe von DNA durchgeführt. Die resultierenden Konidien suspensionen wurden auf PDA (M9) ausplattiert und bei 28 °C inkubiert.

2.4.6.6. Transformation von *Guignardia bidwellii* durch Elektroporation

Die Elektroporation von *G. bidwellii* wurde in Anlehnung an Margolin *et al.* (1997) durchgeführt. Dafür wurden die Konidien von 30 Tage alten, bei 28 °C auf Oatmeal-Agarplatten (M8) gewachsenen *G. bidwellii* Kulturen gewonnen, indem sie mit sterilem H_2O_{UF} mithilfe eines Drigalski-Spatels dispergiert und über zweilagiges Miracloth filtriert wurden. Anschließend wurden die Konidien für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5810R mit Ausschwingrotor A-4-81, Eppendorf AG, Hamburg). Die Konidien wurden dreimal in 50 ml Sorbitol (1 M) gewaschen und in 1 ml Sorbitol (1 M) aufgenommen. Ein Elektroporationsansatz beinhaltete je 40 μ l oder 60 μ l der Konidien suspension, der je 300 μ g, 150 μ g oder 10 μ g Plasmid-DNA (zirkuläre oder linearisierte) zugesetzt wurde. Hierbei wurde eine 2 mm Küvette verwendet. Die Versuche wurden zum Teil bei verschiedenen Spannungen (1500 V; 1800 V und 800 V) und Widerständen (600 Ω und 200 Ω) durchgeführt.

Nach der Elektroporation wurde je 1 ml Sorbitol (1 M) zu den Ansätzen in der Küvette gegeben und resuspendiert. Von jeder Probe wurden je 100 μ l, 200 μ l und 700 μ l auf PDA-Selektionsmedium (M9a) überführt und bei 28 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden Konidien unter den gleichen Bedingungen behandelt und ohne Zusatz von Plasmid-DNA auf PDA-Medium (M9) ausplattiert.

Die Transformationen zur zufälligen Mutagenese in *G. bidwellii* mit den erwähnten Methoden wurden mit Unterstützung von Frau Linda Muskat (Bachelorarbeit) durchgeführt.

2.4.7. Klonierungsstrategien

Für die Konstruktion der Inaktivierungsvektoren musste zunächst die bisher unbekannt Sequenz des entsprechenden Gens identifiziert (2.2.1.) und durch die *step-down* PCR-Methode (2.4.2.2.) verlängert werden. Im Verlauf der Arbeit wurden die erhaltenen Sequenzen mithilfe der entstandenen Datenbank (2.2.2.) abgeglichen und gegebenenfalls korrigiert. Tabelle 2.3. gibt einen Überblick über die Parameter der Amplifikation entsprechender Gensequenzen mittels PCR. Alle daraus resultierenden Genfragmente wurden zur weiteren Bearbeitung in den pGEM[®]-T Easy-Vektor ligiert.

Tabelle 2.3.: Parameter zur Amplifikation entsprechender Gensequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion.

T_A : *Annealing*-Temperatur; t_E : Elongationszeit; bp: Basenpaare

Gen	Oligonukleotid	Nukleinsäure	T_A [°C]	t_E [min]	Größe des Fragments [bp]	Größe der flankierenden Bereiche [bp]
Aspartat-Transaminase	AsTra-200-for / AsTra-200-rev	gDNA	59,0	1:50	1830	247 / 242
Chorismat-Synthase	ChoSy-200-for / ChoSy-200-rev	gDNA	57,0	2:00	1903	301 / 266
Phenylalanin-Ammoniak-Lyase	PAL-200-for / PAL-200-rev	gDNA	57,0	2:50	2740	277 / 229
Aspartat-Transaminase	AsTra-500-for / AsTra-500-rev	gDNA	56,0	2:30	2640	800 / 497
Chorismat-Synthase	ChoSy-500-for / ChoSy-500-rev	gDNA	56,0	2:30	2418	512 / 571
Phenylalanin-Ammoniak-Lyase	PAL-500-for / PAL-500-rev	gDNA	57,0	3:00	3205	459 / 521
Aspartat-Transaminase	AsTra-1000-for / AsTra-1000-rev	gDNA	61,5	3:20	3395	1339 / 716
Chorismat-Synthase	ChoSy-1000-for / ChoSy-1000-rev	gDNA	61,5	3:20	3392	977 / 1080
Phenylalanin-Ammoniak-Lyase	PAL-1000-for / PAL-1000-rev	gDNA	57,0	4:00	4025	1115 / 677
Hygromycin	HPT-o-Prom_for / HPT-o-Prom_rev	pCAMBIA-HPH (<i>SaI</i>)	57,0	1:05	1094	---
EFA1-Promotor	EFA1-Promo_for / EFA1-Promo_rev	gDNA	58,0	1:20	1337	---

Tabelle 2.4. gibt einen Überblick über die Klonierungsstrategie der in dieser Arbeit konstruierten Inaktivierungsvektoren. Eine genaue Beschreibung ist in Anhang III gegeben. Die Konstruktion von AsTra-EFA1-HPT_K.O., ChoSy-EFA1-HPT_K.O. und PAL-EFA1-HPT_K.O. wird aufgrund der komplexen Konstruktion hier nicht tabellarisch aufgeführt, ist jedoch in Anhang III nachzulesen.

Tabelle 2.4.: Überblick über die Klonierungsstrategien zur Konstruktion von Inaktivierungsvektoren und Zwischenvektoren zu Klonierungszwecken.

Eine detaillierte Beschreibung der Klonierungsstrategien ist in Anhang III gegeben.

Ausgangsvektor	Deletion eines Genfragmentes (bp)	Insertion der Resistenzkassette (bp)	Quelle der Resistenzkassette	Ligation in pCAMBIA 0380		Erzeugter Insertionsvektor (bp)
				Restriktion Zwischenkonstrukt (bp)	Restriktion pCAMBIA 0380	
pGEM-T AsTra_200	<i>BssHI</i> / <i>NheI</i> (389)	<i>AscI</i> / <i>NheI</i> (1538)	pCAMBIA- HPH (<i>Sall</i>)	<i>AvrII</i> / <i>NotI</i> / <i>AseI</i> (2714)	<i>PspOMI</i> / <i>AvrII</i>	AsTra-200- HPT-K.O. (9510)
pGEM-T ChoSy_200	<i>HindIII</i> / <i>MfeI</i> (259)	<i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> (1486)	pCAMBIA- HPH (<i>Sall</i>)	<i>NotI</i> / <i>AseI</i> (3164)	<i>PspOMI</i>	ChoSy-200- HPT-K.O. (9976)
pGEM-T PAL_200	<i>HindIII</i> / <i>MfeI</i> (1333)	<i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> (1486)	pCAMBIA- HPH (<i>Sall</i>)	<i>SpeI</i> / <i>Apal</i> (1975)	<i>SpeI</i> / <i>Apal</i>	PAL-200- HPT-K.O. (8714)
pGEM-T AsTra_200	<i>BssHI</i> / <i>NheI</i> (389)	<i>AscI</i> / <i>NheI</i> (1017)	pCAMBIA- BAR (<i>Sall</i>)	<i>NdeI</i> / <i>Apal</i> (2260)	<i>Apal</i> / <i>AseI</i>	AsTra-200- BAR-K.O. (9052)
pGEM-T ChoSy_200	<i>HindIII</i> / <i>MfeI</i> (259)	<i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> (965)	pCAMBIA- BAR (<i>Sall</i>)	<i>NdeI</i> / <i>Apal</i> / <i>AseI</i> (2692)	<i>Apal</i> / <i>AseI</i>	ChoSy-200- BAR-K.O. (9484)
pGEM-T PAL_200	<i>HindIII</i> / <i>MfeI</i> (1333)	<i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> (965)	pCAMBIA- BAR (<i>Sall</i>)	<i>SpeI</i> / <i>Apal</i> (1454)	<i>SpeI</i> / <i>Apal</i>	PAL-200- BAR-K.O. (8193)
pGEM-T AsTra_500	<i>AvrII</i> / <i>XhoI</i> (1358)	<i>Sall</i> / <i>NheI</i> (1503)	pCAMBIA- HPH (<i>HpaI</i>)	<i>NotI</i> / <i>BspHI</i> (2816)	<i>PspOMI</i>	AsTra-500- HPT-K.O. (9635)
pGEM-T AsTra_500	<i>AvrII</i> / <i>BssHII</i> (1242)	<i>BssHII</i> / <i>SpeI</i> (5694)	pCAMBIA- pzp-BAR-gfp	<i>SpeI</i> / <i>PvuI</i> (7292)	<i>SpeI</i> / <i>PvuI</i>	AsTra-500- BAR_gfp- K.O. (14038)
pGEM-T ChoSy_500	<i>HindIII</i> / <i>MfeI</i> (259)	<i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> (1486)	pCAMBIA- HPH (<i>Sall</i>)	<i>Apal</i> / <i>SbfI</i> (3719)	<i>Apal</i> / <i>PstI</i>	ChoSy-500- HPT-K.O. (10495)

Fortsetzung Tabelle 2.4.: Überblick über die Klonierungsstrategien zur Konstruktion von Inaktivierungs-vektoren und Zwischenvektoren zu Klonierungszwecken.

Ausgangs-vektor	Deletion eines Genfragmentes (bp)	Insertion der Resistenz-kassette (bp)	Quelle der Resistenz-kassette	Ligation in pCAMBIA 0380		Erzeugter Insertions-vektor (bp)
pGEM-T ChoSy_500	<i>HindIII</i> / <i>MfeI</i> (259)	<i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> (5654)	pCAMBIA- pzp-BAR-gfp	<i>NotI</i> (7847)	<i>PspOMI</i>	ChoSy-500- BAR_gfp- K.O. (14659)
pGEM-T PAL_500	<i>MfeI</i> / <i>BglII</i> (286)	<i>EcoRI</i> / <i>BglII</i> (1512)	pCAMBIA- HPH (<i>SaII</i>)	<i>ApaI</i> / <i>SpeI</i> (4481)	<i>ApaI</i> / <i>SpeI</i>	PAL-500- HPT-K.O. (11220)
pGEM-T PAL_500	<i>MfeI</i> / <i>BssHII</i> (1892)	<i>EcoRI</i> / <i>BssHII</i> (5957)	pCAMBIA- pzp-BAR-gfp	<i>EcoRI</i> (7288)	<i>EcoRI</i>	PAL-500- BAR_gfp- K.O. (14100)
pGEM-T AsTra_1000	<i>NheI</i> / <i>AvrII</i> (1631)	<i>NheI</i> / <i>AvrII</i> (1561)	pCAMBIA- HPH (<i>SaII</i>)	<i>NotI</i> (3359)	<i>PspOMI</i>	AsTra-1000- HPT-K.O. (10171)
pGEM-T ChoSy_1000	<i>NheI</i> / <i>MfeI</i> (435)	<i>NheI</i> / <i>EcoRI</i> (1531)	pCAMBIA- HPH (<i>SaII</i>)	<i>NotI</i> (4522)	<i>PspOMI</i>	ChoSy- 1000-HPT- K.O. (11334)
pGEM-T PAL_1000	<i>MfeI</i> / <i>HindIII</i> (2337)	<i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> (1486)	pCAMBIA- HPH (<i>SaII</i>)	<i>EcoRI</i> (3228)	<i>EcoRI</i>	PAL-1000- HPT-K.O. (10040)
pGEM-T HPT o Prom	<i>PspOMI</i> / <i>PstI</i> (1101)	---	---	---	<i>PspOMI</i> / <i>PstI</i>	pCAMBIA_ HPT-o-Prom (7873)
pGEM-T EFA1	<i>PspOMI</i> / <i>PstI</i> (1415)	---	---	---	<i>PspOMI</i> / <i>PstI</i>	pCAMBIA_ EFA1_Gb (8187)
pCAMBIA_ EFA1_Gb	<i>AseI</i> / <i>SpeI</i> (1413)	<i>AseI</i> / <i>AvrII</i> (7867)	pCAMBIA_ HPT-o-Prom	---	---	pCAMBIA_ EFA1_HPT

3. Ergebnisse

Der Infektionsprozess von *Guignardia bidwellii* ist durch eine lange symptomlose Phase gekennzeichnet, auf die eine destruktive Absterbephase folgt (Kuo und Hoch, 1996). Wie es zum Wechsel von biotropher zu nekrotropher Lebensweise in *G. bidwellii* kommt, ist bisher nicht geklärt. In früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass *G. bidwellii* phytotoxische Substanzen sekretiert, die am Infektionsprozess beteiligt sein könnten (Buckel *et al.*, 2013). Um zu klären, ob diese Verbindungen als konstitutive Virulenzfaktoren beschrieben werden können, wurde *G. bidwellii* in Bezug auf die vier Kriterien für Virulenzfaktoren von Bender *et al.* (1999) genauer untersucht. Die ersten beiden Kriterien, die besagen, dass die Applikation der Reinsubstanz zur Reproduktion der Krankheitssymptome führt und dass Toxinmenge und Pathogenität korrelieren, wurden bereits durch frühere Arbeiten von Buckel *et al.* (2013) bestätigt.

3.1. Toxinnachweis *in planta*

Das dritte Kriterium von Bender *et al.* (1999) besagt, dass die Produktion des Toxins während des aktiven Wachstums des Pathogens in der Pflanze nachweisbar sein muss.

Um dies zu untersuchen, wurde von Prof. Dr. Beate Berkelmann-Löhnertz (Institut für Phytomedizin, Hochschule Geisenheim University, Geisenheim) mit *G. bidwellii* infiziertes und nicht infiziertes Blattmaterial von *Vitis vinifera* cv. Riesling zur Verfügung gestellt. Nach der Extraktion des Blattmaterials wurden die Extrakte mittels analytischer HPLC untersucht. Um detektierbare Signale zu erhalten, wurden 10 µl der Extrakte mit einer Konzentration von 100 mg/ml injiziert.

Die HPLC-Chromatogramme der Proben mit *G. bidwellii* infiziertem und nicht infiziertem Blattmaterial wurden miteinander verglichen (Abbildung 3.1.). Hierbei wurde auf Signale im Chromatogramm geachtet, die charakteristisch für Sekundärmetabolite aus *G. bidwellii* sind. Auffällig war hierbei ein Metabolit, dessen Signal bei einer Retentionszeit von 8,7 min detektiert wurde. Dieses Signal konnte im Chromatogramm der infizierten Probe (Abbildung 3.1., rot) beobachtet werden, jedoch nicht im Chromatogramm der nicht infizierten Probe (Abbildung 3.1., blau).

Die dem Signal im Chromatogramm zugrunde liegende Verbindung hat ein charakteristisches UV-Spektrum für ein Dioxolanon (Rodrigues Heerklotz *et al.*, 2001) und wurde im Blattextrakt mit einer Konzentration von 45 µg/g Blattmaterial (nass) gemessen. Die Substanz wurde aus dem Extrakt isoliert und mittels HPLC-MS bestimmt. Die

Untersuchung ergab eine spezifische Masse, die für die phytotoxische Verbindung Guignardic acid bekannt ist (Anhang I).

Die Ergebnisse bestätigen das dritte Kriterium nach Bender *et al.* (1999). Das Toxin Guignardic acid konnte in *G. bidwellii*-infiziertem Blattmaterial von *V. vinifera* nachgewiesen werden, nicht aber in gesunden Kontrollpflanzen. Dadurch ist das Toxin während des aktiven Wachstums des Pathogens in der Pflanze nachgewiesen.

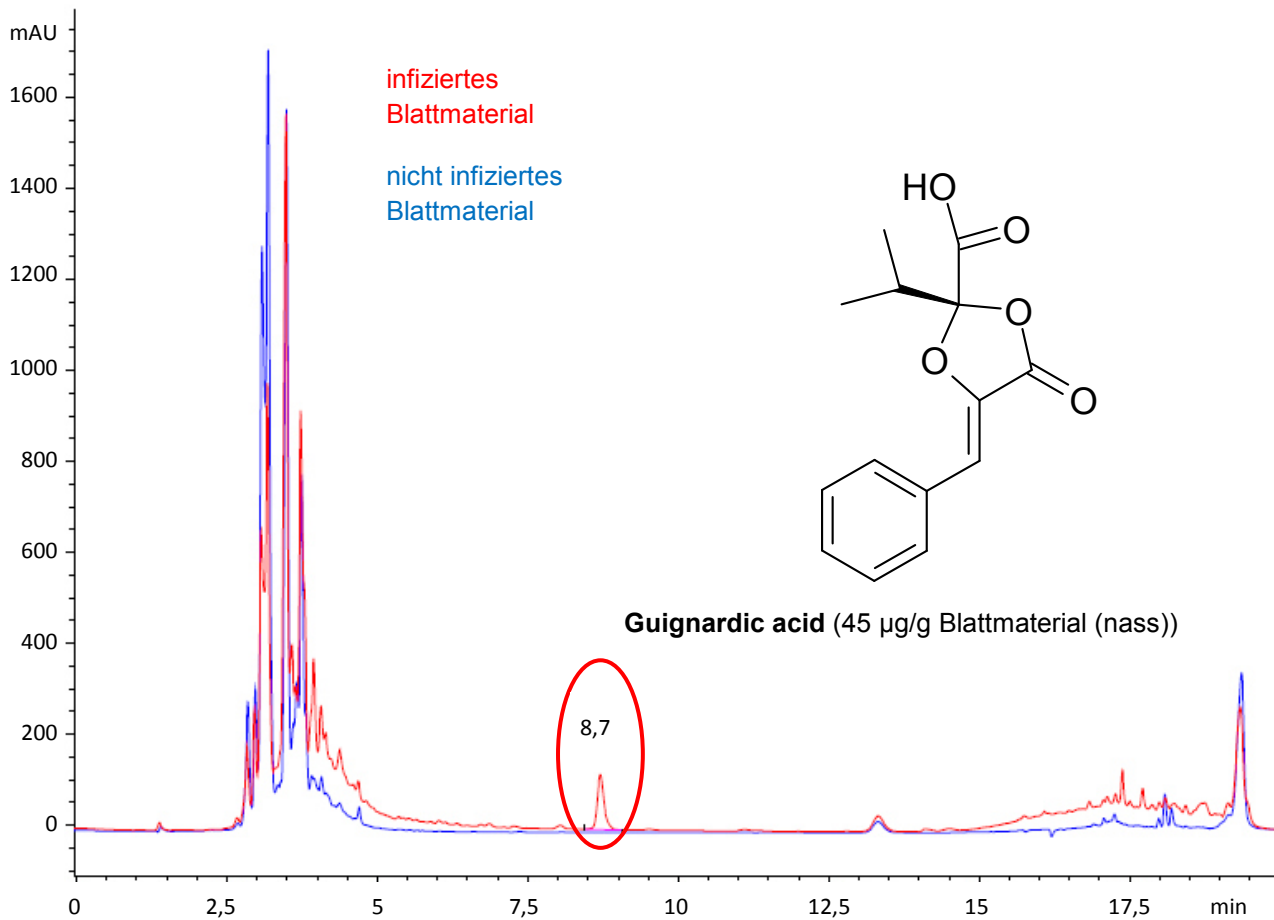


Abbildung 3.1.: HPLC-Chromatogramme der Extrakte aus *Guignardia bidwellii*-infiziertem und nicht infiziertem Blattmaterial von *Vitis vinifera*.

Die Chromatogramme der Proben aus *G. bidwellii*-infiziertem Blattmaterial (rot) und aus nicht infiziertem Blattmaterial von *V. vinifera* (blau) wurden verglichen. Es ist ein Signal bei einer Retentionszeit von 8,7 min im Chromatogramm der Probe des infizierten Blattmaterials zu sehen, das in der Probe des nicht infizierten Blattmaterials nicht detektiert werden konnte. Mittels HPLC-MS-Analyse konnte die zugehörige Verbindung anhand von Retentionszeit und Masse als Guignardic acid identifiziert werden. Guignardic acid konnte mit einer Konzentration von 45 µg/g Blattmaterial (nass) nachgewiesen werden.

3.2. Pathogenität toxischer Stämme

Das vierte Kriterium nach Bender *et al.* (1999) verlangt, dass Stämme, die das Toxin nicht produzieren, apathogen sein müssen. Um dieses Kriterium für die phytotoxischen Dioxolanone zu bestätigen, wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, dass apathogene Arten der Gattung *Guignardia* toxischfrei sind. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden pathogene und apathogene *Guignardia*-Arten unter Laborbedingungen bezüglich ihrer Toxinproduktion untersucht. Für die pathogenen Arten wurden *Guignardia aesculi*, *Guignardia musae* und *Guignardia vaccinii* zur näheren Betrachtung ausgewählt. *G. aesculi* ist der Erreger der Blattbräune an der Roskastanie (*Aesculus hippocastanum*, Pastirčáková *et al.*, 2009), *G. musae* der Erreger der *freckle disease* an Bananen (*Musca* spp., Punithalingham und Holliday, 1975) und *G. vaccinii* ist der Erreger der *cranberry fruit rot* an der Moosbeere (*Vaccinium macrocarpon*, Polashock *et al.*, 2009). Als apathogene Art wurde *Guignardia mangiferae* untersucht. Dieser Pilz ist ein biotropher Endophyt und besiedelt bevorzugt Citruspflanzen (Wickert *et al.*, 2012).

Die vier *Guignardia* Arten wurden fermentiert, um deren Sekundärmetabolismus zu untersuchen. Wie beim Toxinnachweis *in planta* wurde besonderes auf Metabolite geachtet, die charakteristisch für Sekundärmetabolite aus *G. bidwellii* sind.

3.2.1. Naturstoffanalyse in *Guignardia aesculi*

Nach einer Fermentationsdauer von 31 Tagen war die freie Glucose im Medium verbraucht und die Fermentation von *G. aesculi* wurde beendet. Nach der Separation des Mycels von der Kulturbrühe wurde von dem erhaltenen Rohextrakt des Kulturfiltrats mit einer Konzentration von 1 mg/ml eine chromatographische Analyse mittels analytischer HPLC durchgeführt (Abbildung 3.2.).

Die Untersuchung der Probe nach Beendigung der Fermentation von *G. aesculi* führte zu dem Ergebnis, dass *G. aesculi* unter anderem eine Substanz mit einer Konzentration von 41,2 mg/l in die Kulturbrühe sekretierte, deren Signal bei einer Retentionszeit von 13,2 min detektiert werden konnte. Das zugehörige UV-Spektrum ist charakterisiert durch zwei deutliche Maxima bei einer Wellenlänge von 200 nm und 300 nm und ist identisch mit einem UV-Spektrum von Dioxolanonen (Rodrigues Heerklotz *et al.*, 2001). Mithilfe von HPLC-MS-Analysen konnte die Verbindung als Phenguignardic acid identifiziert werden (Anhang I), die bereits aus *G. bidwellii* bekannt ist (Molitor *et al.*, 2012).

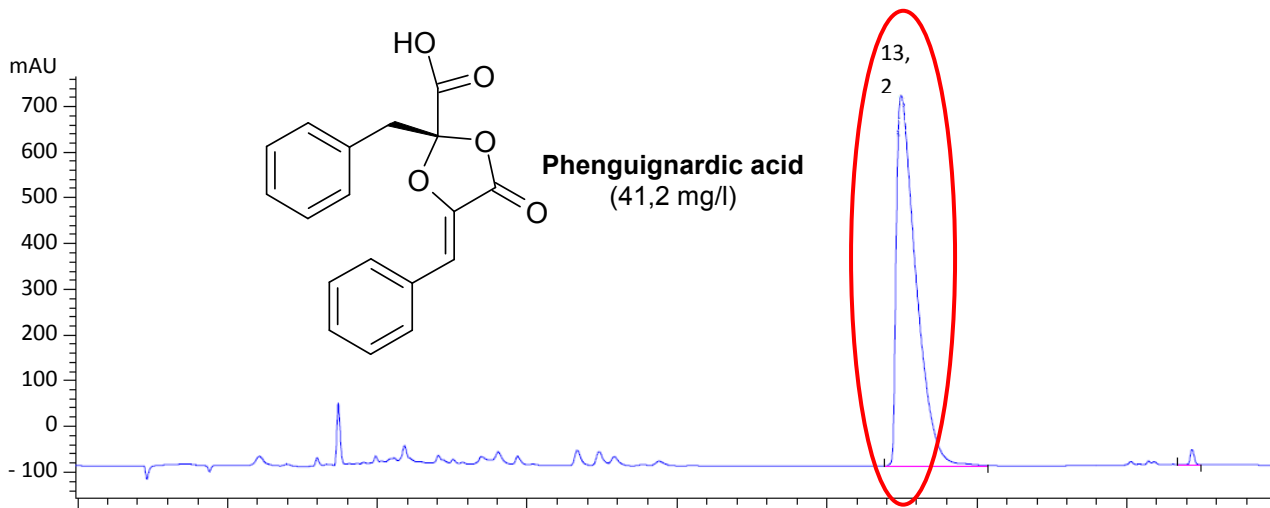


Abbildung 3.2.: HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltratextraktes aus der Fermentation von *Guignardia aesculi*.

Während der Submersfermentation mit *G. aesculi* konnte eine Substanz mittels analytischer HPLC bei einer Retentionszeit von 13,2 min mit einer Konzentration von 41,2 mg/l detektiert werden. Mithilfe von HPLC-MS-Analysen wurde die Verbindung als Phenguignardic acid identifiziert.

3.2.2. Naturstoffanalyse in *Guignardia musae*

Die Fermentation von *G. musae* wurde nach 16 Tagen beendet. Von dem erhaltenen Rohextrakt des Kulturfiltrats wurde mit einer Konzentration von 1 mg/ml eine chromatographische Analyse mittels analytischer HPLC durchgeführt (Abbildung 3.3.).

Im Rohextrakt konnten nach Beendigung der Fermentation von *G. musae* zwei Metabolite mit einer Retentionszeit von 8,8 min und 11,2 min identifiziert werden. Die Verbindungen wurden aus dem Extrakt isoliert und mittels HPLC-MS untersucht. Das Signal bei einer Retentionszeit von 8,8 min konnte Guignardic acid zugeordnet werden (Anhang I). Die Analyse des Signals bei einer Retentionszeit von 11,2 min ergab eine spezifische Masse für die bereits bekannte Phenguignardic acid (Anhang I). Die Unterschiede in der Retentionszeit der Phenguignardic acid aus Fermentationen von *G. aesculi* sind auf unterschiedliche Messapparaturen und -bedingungen zurückzuführen. Quantitativ wurde die Guignardic acid mit einer Konzentration von 7,9 mg/l und die Phenguignardic acid mit einer Konzentration von 2,1 mg/l von *G. musae* in Submerskultur produziert.

Während der Naturstoffanalyse konnte neben diesen beiden bekannten phytotoxischen Dioxolanonen noch ein weiteres Signal detektiert werden, das ein charakteristisches UV-Spektrum für Dioxolanone, aber, in Abgleich mit den Datenbanken des IBWF, eine

unbekannte Masse in der HPLC-MS-Analyse hat (Abbildung 3.3., grün hinterlegt). Aufgrund der Fraktionierung der Masse und des UV-Spektrums könnte vermutet werden, dass es sich um ein Dioxolanon-Derivat handelt, das neben der Brenztraubensäure die desaminierte Aminosäure Isoleucin enthält. Eine Isolierung und Charakterisierung der Verbindung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden und ist daher Bestandteil weiterführender Arbeiten.

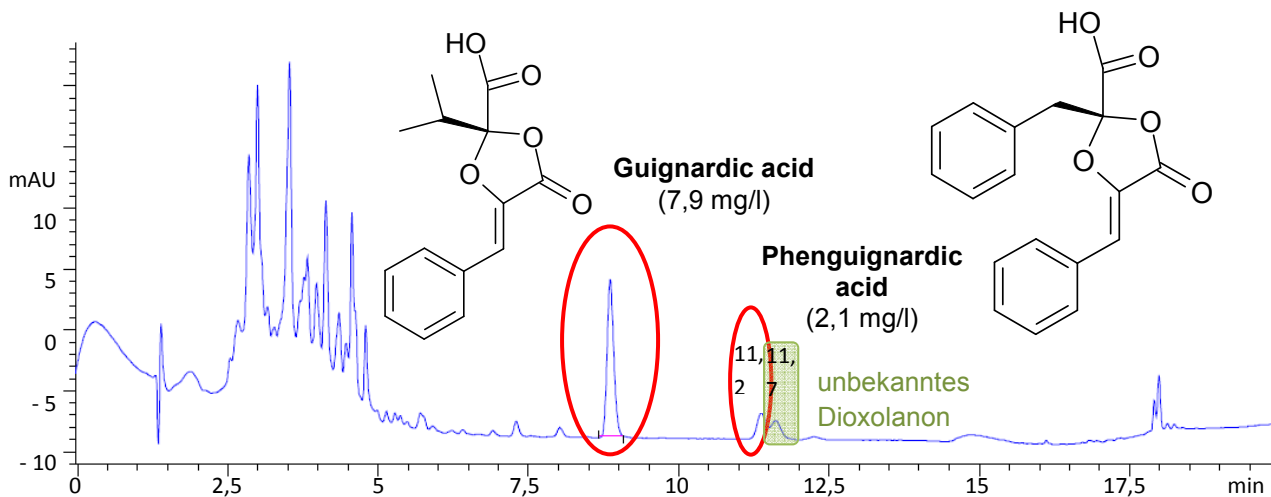


Abbildung 3.3.: HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltratextraktes aus der Fermentation von *Guignardia musae*.

Im Kulturfiltrat der Submersfermentation mit *G. musae* konnten zwei Signale bei einer Retentionszeit von 8,8 min und 11,2 min detektiert werden. Mittels HPLC-MS konnten für die entsprechenden Signale spezifische Massen für Guignardic acid und Phenguignardic acid nachgewiesen werden. *G. musae* produziert die Verbindungen in Submersfermentation in nur geringen Konzentrationen von 7,9 mg/l Guignardic acid und 2,1 mg/l Phenguignardic acid. Zusätzlich zu den zwei bekannten Dioxolanonen konnte ein Signal mit einer Retentionszeit von 11,7 min detektiert werden, das ein charakteristisches UV-Spektrum für Dioxolanone hat (grün hinterlegt).

3.2.3. Naturstoffanalyse in *Guignardia vaccinii*

Die Fermentation von *G. vaccinii* wurde nach einer Fermentationsdauer von 12 Tagen beendet. Nach Aufarbeitung der Kulturbrühe wurde von dem erhaltenen Rohextrakt des Kulturfiltrats mit einer Konzentration von 1 mg/ml eine chromatographische Analyse mittels analytischer HPLC durchgeführt (Abbildung 3.4.).

Der phytopathogene Pilz *G. vaccinii* sekretierte während der Fermentation zwei Substanzen in die Kulturbrühe, deren Signale in der chromatographischen Analyse bei einer Retentionszeit von 8,8 min und 11,2 min detektiert werden konnten. Analog zur Analyse bei *G. musae* konnten die Signale durch die Massenspektrometrie den beiden Verbindungen Guignardic acid und Phenguignardic acid zugeordnet werden (Anhang I). Im Gegensatz zu *G. musae* produziert *G. vaccinii* die Verbindungen in größeren Mengen. Die Quantifizierung in der Probe ergab eine Konzentration für Guignardic acid von 208,7 mg/l und für Phenguignardic acid von 19,9 mg/l. Damit ist *G. vaccinii* ein ähnlich guter Produzent für die beiden Verbindungen wie *G. bidwellii* (Guignardic acid: 300 mg/l und Phenguignardic acid: 45 mg/l (Buckel, 2011)). Hinzu kommt, dass *G. vaccinii* mit 12 Tagen, im Vergleich mit *G. bidwellii* (25 Tage, Buckel *et al.*, 2013), nur die Hälfte der Fermentationsdauer benötigt.

Zusätzlich zu den beiden bekannten Verbindungen produzierte *G. vaccinii* ebenfalls ein Dioxolanon, dessen Signal bisher nicht in den Datenbanken des IBWF zu finden war (Abbildung 3.4.), das bei einer Retentionszeit von 11,7 min detektiert werden konnte (grün hinterlegt). Anhand der massenspektrometrischen Daten wird vermutet, dass diese Verbindung aus den desaminierten Vorstufen von Phenylalanin und Isoleucin aufgebaut ist.

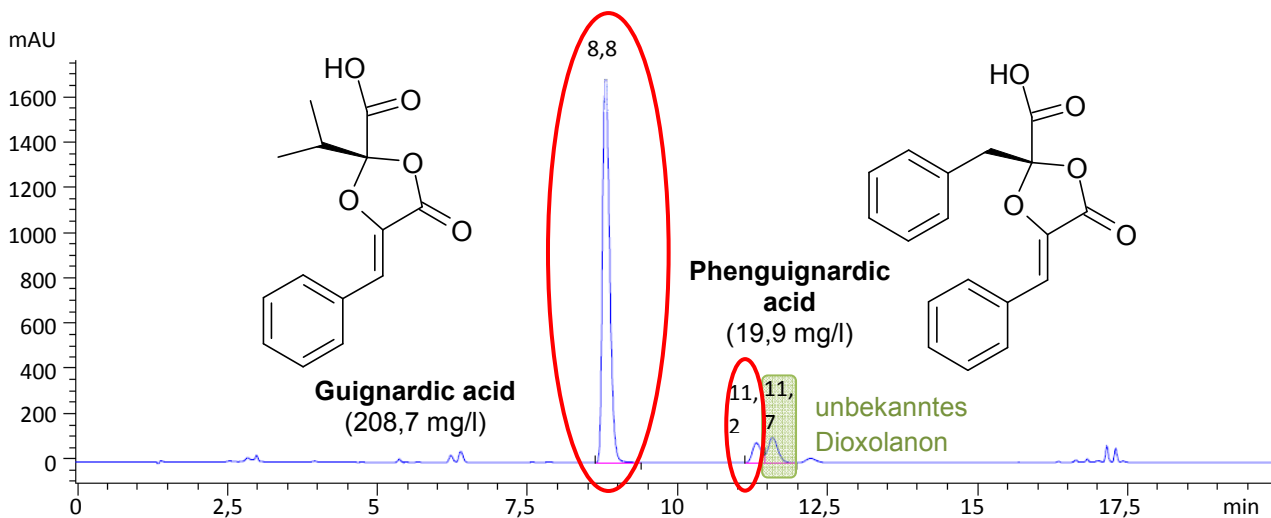


Abbildung 3.4.: HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltratextraktes aus der Fermentation von *Guignardia vaccinii*.

Im Rohextrakt aus der Submersfermentation mit *G. vaccinii* konnten die Guignardic acid und die Phenguignardic acid in Konzentrationen von 208,7 mg/l und 19,9 mg/l mittels analytischer HPLC und HPLC-MS nachgewiesen werden. Daneben wurde ein bisher unbekanntes Dioxolanon-Derivat bei einer Retentionszeit von 11,7 min detektiert (grün hinterlegt).

In allen untersuchten phytopathogenen *Guignardia* Arten konnten Phenguignardic acid und Guignardic acid nachgewiesen werden. Damit konnte aufgezeigt werden, dass neben *G. bidwellii* weitere phytopathogene Arten der Gattung *Guignardia* Sekundärmetabolite der neuen Naturstoffklasse mit einem Dioxolanonring produzieren.

3.2.4. Naturstoffanalyse in *Guignardia mangiferae*

Zur Bestätigung der Hypothese, dass aphythogene Arten der Gattung *Guignardia* toxisch sind, sollte die aphythogene Art *G. mangiferae* untersucht werden.

Die Fermentation von *G. mangiferae* dauerte 14 Tage. Nach Extraktion der Kulturbrühe und chromatographischer Analyse mit einer Konzentration von 1 mg/ml konnte festgestellt werden, dass auch in der aphythogenen Art in Submersfermentationen ein Dioxolanon in die Kulturbrühe sekretiert wurde (Abbildung 3.5.). Die Verbindung bei einer Retentionszeit von 8,8 min hat ein charakteristisches UV-Spektrum für Dioxolanone. Mittels Massenspektrometrie wurde die Verbindung als Guignardic acid (Anhang I) identifiziert. Der biotrophe Endophyt produziert die phytotoxische Verbindung mit einer Konzentration von 7,3 mg/l in die Kulturbrühe.

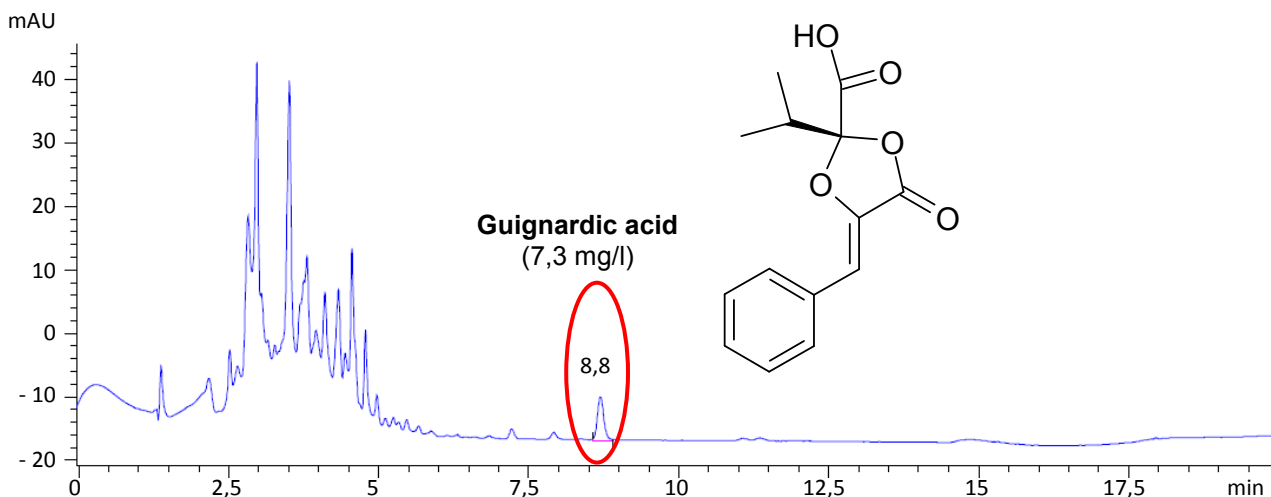


Abbildung 3.5.: HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltratextraktes aus der Fermentation von *Guignardia mangiferae*.

Der biotrophe Endophyt *G. mangiferae* produziert mit einer Konzentration von 7,3 mg/l die phytotoxische Verbindung Guignardic acid. Somit ist auch die aphythogene *Guignardia* Art zur Sekretion von phytotoxischen Dioxolanonen befähigt.

Die Untersuchungen von virulenten und nicht virulenten Arten der Gattung *Guignardia* ergaben, dass neben *G. bidwellii* auch weitere phytopathogene *Guignardia*-Arten in der Lage

sind, phytotoxische Dioxolanone zu produzieren. Auch bei der apathogenen Art *G. mangiferae* konnte ein phytotoxisches Dioxolanon nachgewiesen werden.

Einen Überblick über die identifizierten Substanzen aus den untersuchten *Guignardia* Stämmen ist in Tabelle 3.1. gegeben.

Tabelle 3.1.: Überblick über die fermentierten Organismen und deren identifizierten Sekundärmetabolite.

Die Organismen *G. aesculi*, *G. musae*, *G. vaccinii* und *G. mangiferae* wurden submers fermentiert und auf die Sekretion von Sekundärmetaboliten ins Kulturmedium hin untersucht. Bei allen untersuchten *Guignardia*-Arten konnten phytotoxische Dioxolanone identifiziert werden. Zum Vergleich wurden die entsprechenden Angaben von *G. bidwellii* auch aufgeführt (rot hinterlegt, Buckel, 2011).

Organismus	Pathogenität	produzierte Sekundärmetabolite	Konzentration [mg/l]
<i>Guignardia aesculi</i>	phytopathogen	Phenguignardic acid	41,2
<i>Guignardia musae</i>	phytopathogen	Guignardic acid	7,9
		Phenguignardic acid	2,1
<i>Guignardia vaccinii</i>	phytopathogen	Guignardic acid	208,7
		Phenguignardic acid	19,9
<i>Guignardia mangiferae</i>	apathogen	Guignardic acid	7,26
<i>Guignardia bidwellii</i>	phytopathogen	Guignardic acid	300,0
		Phenguignardic acid	45,0

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hypothese, dass apathogene Arten der Gattung *Guignardia* toxisch sind, nicht bestätigt werden konnte. Allerdings kann die Möglichkeit, dass ein Pilz unter anderen Bedingungen als in der Pflanze pathogen wird, obwohl er als apathogener Endophyt isoliert wurde, nicht ausgeschlossen werden (Kuldau und Yates, 2000). Aus diesem Grund kann eine Ablehnung des vierten Kriteriums von Bender *et al.* (1999) nicht zweifelsfrei angenommen werden.

Um das vierte Kriterium, vor allem in Bezug auf *G. bidwellii*, eindeutig beurteilen zu können, soll *G. bidwellii* im weiteren Verlauf der Arbeit molekularbiologisch manipuliert werden, mit dem Ziel, eine toxische Mutante zu generieren.

Um eine solche Untersuchung durchzuführen und geeignete Gene für die gezielte genetische Manipulation auszuwählen, mussten zunächst Erkenntnisse über die Biosynthese der Verbindungen gewonnen werden.

3.3. Biosyntheseaufklärung

Die phytotoxischen Dioxolanone aus *G. bidwellii* gehören einer neuen Naturstoffklasse an, deren Biosynthese noch nicht verstanden ist (Buckel *et al.*, 2013). Frühere Arbeiten führten zur Hypothese, dass die Verbindungen aus desaminierten Aminosäurevorstufen gebildet werden. Dabei scheinen bei der Synthese von Guignardic acid die desaminierten Vorstufen von Phenylalanin und Valin, bei der Phenguignardic acid zwei desaminierte Vorstufen von Phenylalanin, bei Alaguignardic acid die desaminierten Vorstufen von Phenylalanin und Alanin und bei den Guignardianonen E und F die desaminierten Vorstufen von Phenylalanin und Tyrosin verwendet zu werden (Buckel *et al.*, 2013; Molitor *et al.*, 2012).

Supplementationsversuche mit Phenylalanin verstärkten diese Hypothese, da eine Steigerung der Produktionsrate von Phenguignardic acid in Submerskulturen von *G. bidwellii* durch die Zugabe von Phenylalanin beobachtet werden konnte (Buckel *et al.*, 2013). Interessant war auch, dass alle Verbindungen eine desaminierte Vorstufe von Phenylalanin als Grundbaustein enthalten. Nur die zweite vermutete desaminierte Aminosäurevorstufe variiert in den verschiedenen Verbindungen.

Um die grundlegende Frage zu klären, ob die Biosynthese der Substanzen mit Aminosäuren als Ausgangsverbindungen stattfindet, wurde während der Fermentation von *G. bidwellii* eine Supplementation mit ^{13}C markiertem Phenylalanin durchgeführt. Bei den danach isolierten Reinsubstanzen Phenguignardic acid, Guignardic acid und Alaguignardic acid wurde der Einbau von ^{13}C markiertem Phenylalanin mittels ^{13}C NMR-Spektroskopie überprüft.

Der hypothetische Syntheseweg für Phenguignardic acid ist in Abbildung 3.6. veranschaulicht. Zwei Moleküle Phenylalanin werden als Bausteine bei der Synthese von Phenguignardic acid verwendet. Im ersten Schritt der Synthese kommt es zu einer Desaminierungsreaktion, bei der die Aminogruppe abgespalten wird und durch eine Carbonylgruppe ersetzt wird. Weitere noch unklare Reaktionen führen zu einer Fusion der beiden desaminierten Verbindungen und es wird ein Dioxolanonring gebildet.

Wenn sich die Hypothese bestätigt, dass Aminosäuren die Ausgangsstoffe zur Synthese der Dioxolanonverbindungen sind, würde ein Einbau des supplementierten ^{13}C markierten Phenylalanin dazu führen, dass durch die ^{13}C NMR Spektroskopie bei diesen Proben im

Vergleich zu Proben ohne ^{13}C -Zugabe ein stärkeres Signal am Kohlenstoff 5 (bzw. Kohlenstoff 5 und 6 bei Phenguignardic acid, Abbildung 3.6.) detektierbar wäre.

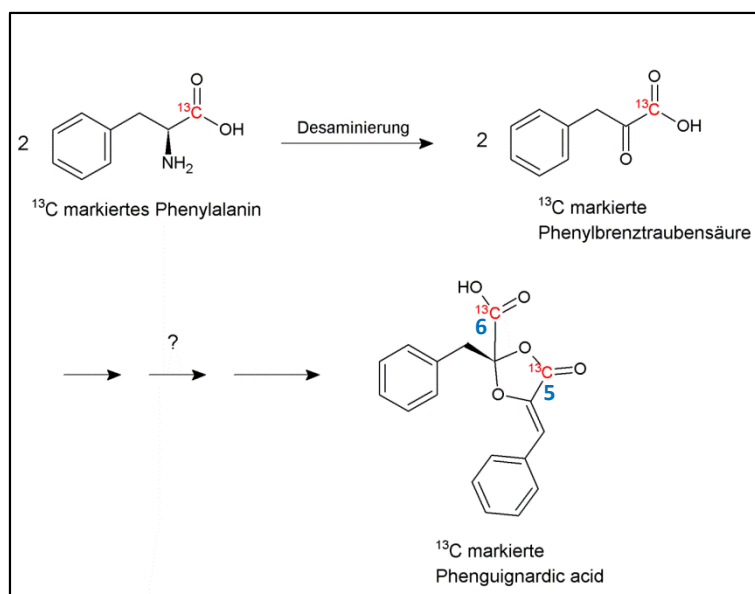


Abbildung 3.6.: Hypothetisches Modell des Biosynthesewegs von Phenguignardic acid.

Ausgehend von zwei Molekülen ^{13}C markiertem Phenylalanin kommt es vermutlich zur Abspaltung der Aminogruppe und zwei Moleküle Phenylbrenztraubensäure entstehen. Diese desaminierten Aminosäuren fusionieren auf bisher ungeklärte Weise und bilden einen Dioxolanonring, wodurch Phenguignardic acid entsteht. An Position 5 und 6 sollten die von ^{13}C markiertem Phenylalanin detektierbaren Kohlenstoffatome in Phenguignardic acid zu messen sein.

Zur Durchführung der Untersuchung wurden Submerskulturen von *G. bidwellii* mit Phenylalanin und ^{13}C markiertem Phenylalanin in einer Endkonzentration von je 2,5 mM angereichert. Die Supplementation wurde durchgeführt, nachdem die Anwesenheit der Naturstoffe im Kulturfiltrat mittels analytischer HPLC nachweisbar war, da die Zugabe von Phenylalanin zu diesem Zeitpunkt der Fermentation die Produktionsrate von Phenguignardic acid positiv beeinträchtigt (Buckel *et al.*, 2013). Die Fermentation wurde beendet, sobald in der chromatographischen Analyse eine maximale Produktionsrate nachweisbar war.

Die Reinsubstanzen Alaguignardic acid, Phenguignardic acid und Guignardic acid konnten mittels präparativer HPLC isoliert werden. In Zusammenarbeit mit Dipl. Chem. Lars Andernach (Institut für Organische Chemie, AK Prof. Dr. Opatz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) wurden die ^{13}C NMR Spektren der drei Verbindungen aufgenommen (Abbildungen 3.7. und 3.8.).

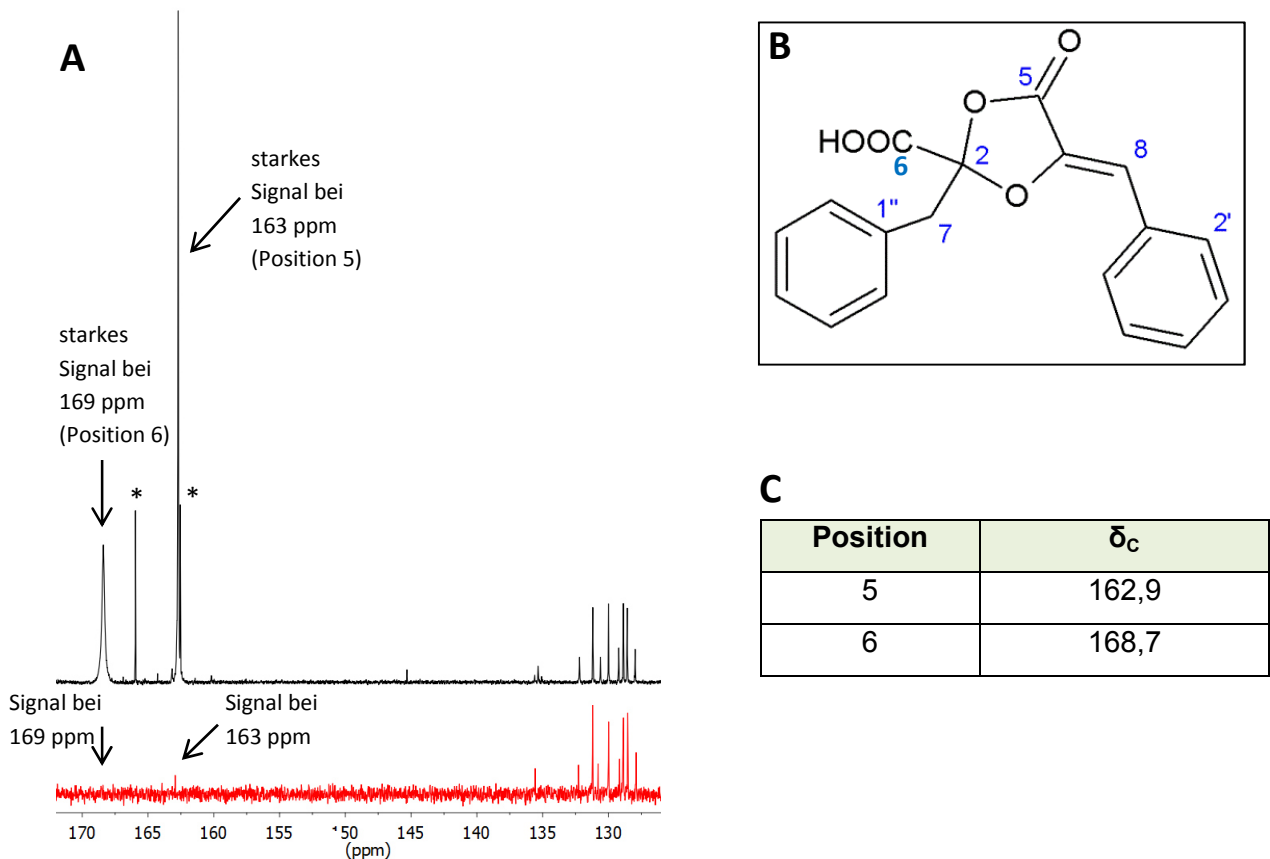


Abbildung 3.7.: Spektrum der ^{13}C NMR-Messung von ^{13}C markierter und unmarkierter Phenguignardic acid mit Strukturformel und ^{13}C NMR-Daten der Verbindung.

(A) Im NMR-Spektrum von Phenguignardic acid wurden starke Signale bei einer chemischen Verschiebung von 163 ppm und 169 ppm detektiert (schwarz), die im NMR-Spektrum von Phenguignardic acid aus einer Fermentation ohne künstliche ^{13}C -Zugabe mit einer deutlich geringeren Intensität zu beobachten waren (rot). Dies weist auf eine Anreicherung von ^{13}C an Position 5 und 6 in Phenguignardic acid hin.

(*) = Verunreinigung durch Doppelbindungs-Isomer.

(B) Strukturformel von Phenguignardic acid mit Atomnummerierung nach IUPAC. 2' und 1'' bezeichnen die Nummerierungen in den aromatischen Ringen (Molitor *et al.*, 2012).

(C) Ausschnitt der ^{13}C NMR Daten aus der Messung von Phenguignardic acid in Chloroform-d nach Molitor *et al.* (2012).

δ_c : chemische Verschiebung des Kohlenstoff-Atoms.

Bei der Untersuchung der ^{13}C markierten Probe von Phenguignardic acid mittels NMR-Spektroskopie konnte ein starkes Signal jeweils bei einer chemischen Verschiebung von 163 ppm und 169 ppm beobachtet werden (Abbildung 3.7., A, schwarz). Im Vergleich wurden in der Probe von Phenguignardic acid ohne ^{13}C -Zugabe an diesen Positionen deutlich geringere Signalintensitäten detektiert (Abbildung 3.7., A, rot), obwohl die Signale

zwischen 125 ppm und 135 ppm beider Proben gleich intensiv sind. Die Integrale beider Signale der markierten Probe sind nahezu identisch, woraus geschlossen werden kann, dass in beiden Positionen gleich viel ^{13}C angereichert wurde. Die natürliche Häufigkeit des ^{13}C Isotops liegt normalerweise bei 1,1 % (Liebl, 2013). In der markierten Probe kommt das Isotop 38 mal häufiger vor als im natürlichen Fall (Daten nicht gezeigt).

Vergleicht man diese Werte mit den NMR-Daten (Abbildung 3.7., C) aus der Messung von Phenguignardic acid aus der Publikation von Molitor *et al.* (2012) und der Strukturformel (Abbildung 3.7., B) von Phenguignardic acid, wird deutlich, dass sich die markierten Kohlenstoffatome an Position 5 und 6 befinden. Dadurch wird das hypothetische Modell zum Syntheseweg von Phenguignardic acid bestätigt (Abbildung 3.6.).

Die Untersuchung der ^{13}C markierten Probe von Guignardic acid (Abbildung 3.8., A, schwarz) und Alaguignardic acid (Abbildung 3.8., C, schwarz) mittels NMR-Spektroskopie ergab jeweils ein starkes Signal bei einer chemischen Verschiebung von 163 ppm.

Im Vergleich zu den markierten Proben konnten in den Proben von Guignardic acid (Abbildung 3.8., A, rot) und Alaguignardic acid (Abbildung 3.8., C, rot) ohne künstliche ^{13}C -Zugabe an der jeweiligen Position deutlich geringere Signalintensitäten detektiert werden, obwohl die Signale jeweils von markierter und unmarkierter Probe zwischen 125 ppm und 135 ppm gleich intensiv sind. Sowohl bei Guignardic acid als auch bei Alaguignardic acid kommt in der markierten Probe das Isotop bei einer chemischen Verschiebung von 163 ppm 33 mal häufiger vor als im natürlichen Fall (Daten nicht gezeigt). Für Guignardic acid schreiben Rodrigues-Heerklotz *et al.* (2001) das Signal bei 163 ppm einer Carbonylgruppe zu, die dem Kohlenstoffatom an Position 5 in der Strukturformel von Guignardic acid (Abbildung 3.8., B) zugeordnet werden kann. Die zusätzlichen Signale bei 135 ppm im NMR-Chromatogramm der Probe ohne ^{13}C -Phenylalanin Supplementation sind auf einen Kopplungseffekt zurückzuführen.

Gemäß Buckel *et al.* (2013) entspricht ein Signal von 163 ppm dem Kohlenstoffatom an Position 5 in der Strukturformel von Alaguignardic acid (Abbildung 3.8., D).

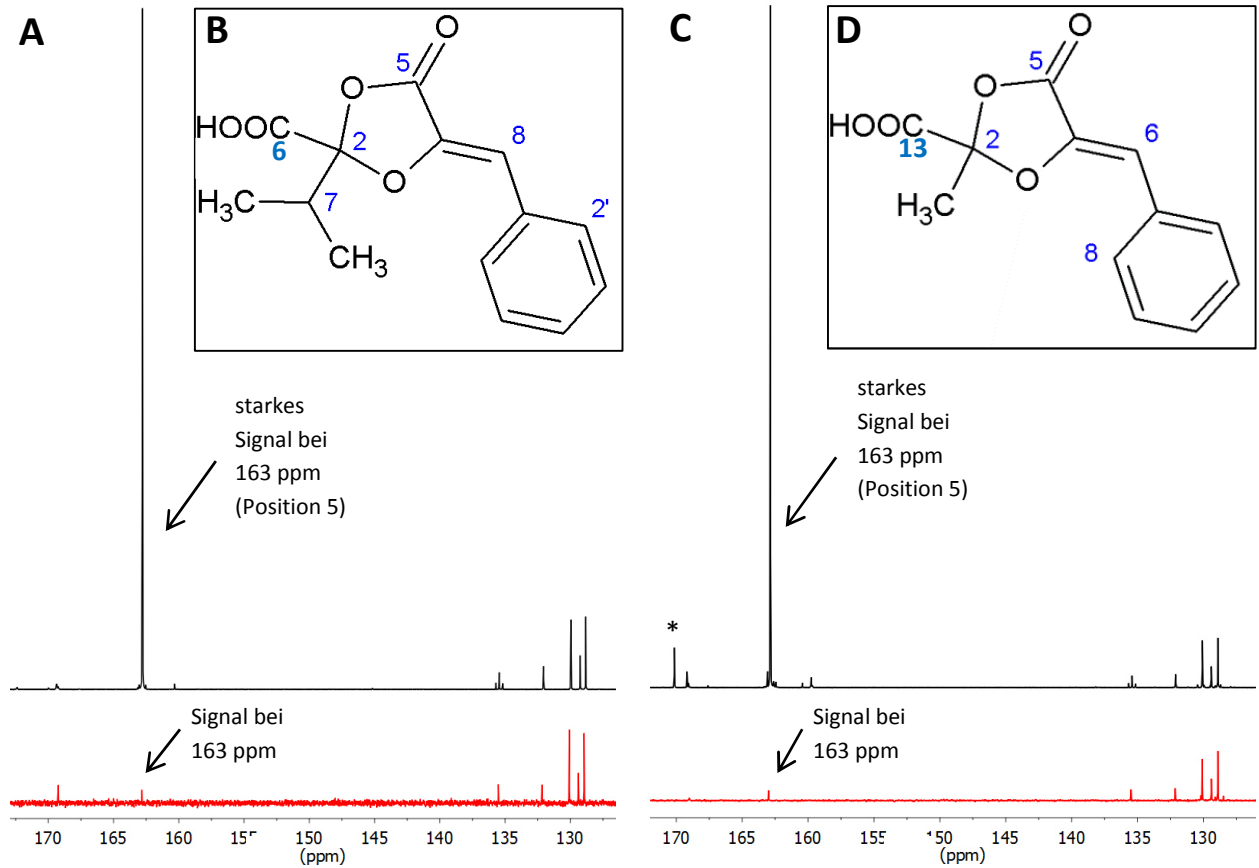


Abbildung 3.8.: Spektren der ^{13}C NMR-Messung von ^{13}C markierter und unmarkierter Guignardic acid und Alaguignardic acid mit zugehöriger Strukturformel der beiden Verbindungen.

(A) Im NMR-Spektrum von Guignardic acid aus dem Supplementationsversuch konnte ein starkes Signal bei einer chemischen Verschiebung von 163 ppm detektiert werden (schwarz), das im NMR-Spektrum von Guignardic acid aus einer Fermentation ohne ^{13}C -Zugabe mit einer deutlich geringeren Intensität detektiert werden konnte (rot).

(B) Strukturformel von Guignardic acid mit Atomnummerierung nach IUPAC.

(C) Im NMR-Spektrum von Alaguignardic acid aus dem Supplementationsversuch konnte ein starkes Signal bei einer chemischen Verschiebung von 163 ppm detektiert werden (schwarz), das im NMR-Spektrum von Alaguignardic acid ohne künstliche ^{13}C -Markierung mit einer deutlich geringeren Intensität detektiert werden konnte (rot). Asterisk (*) = Verunreinigung durch Doppelbindungs-Isomer.

(D) Strukturformel von Alaguignardic acid mit Atomnummerierung nach IUPAC.

Durch diese Ergebnisse wird eindeutig belegt, dass zwei Moleküle Phenylalanin als Ausgangsprodukte für die Synthese von Phenguignardic acid verwendet werden. Darüber hinaus wird eine Beteiligung von Phenylalanin als Biosynthesestufe an allen drei untersuchten Naturstoffen aus *G. bidwellii* bewiesen.

3.4. Molekularbiologische Manipulation von *Guignardia bidwellii*

Nachdem bekannt war, dass Aminosäuren als Bausteine für die Synthese der Naturstoffe genutzt werden, konnten Gene für die gezielte genetische Manipulation ausgewählt werden. Zur Generierung einer toxischen Mutante von *G. bidwellii* wurden drei Schlüsselenzyme des Aminosäurestoffwechsels für die zielgerichtete Mutagenese ausgewählt, um deren kodierende Sequenzen zu inaktivieren: Die Aspartat-Transaminase (EC 2.6.1.1), die Chorismat-Synthase (EC 4.2.3.5) und die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (EC 4.3.1.24). Alle drei Enzyme sind wichtig im Aminosäuremetabolismus. Die letzten beiden katalysieren Reaktionen, die den primären mit dem sekundären Stoffwechsel verbinden (Abbildung 3.9.).

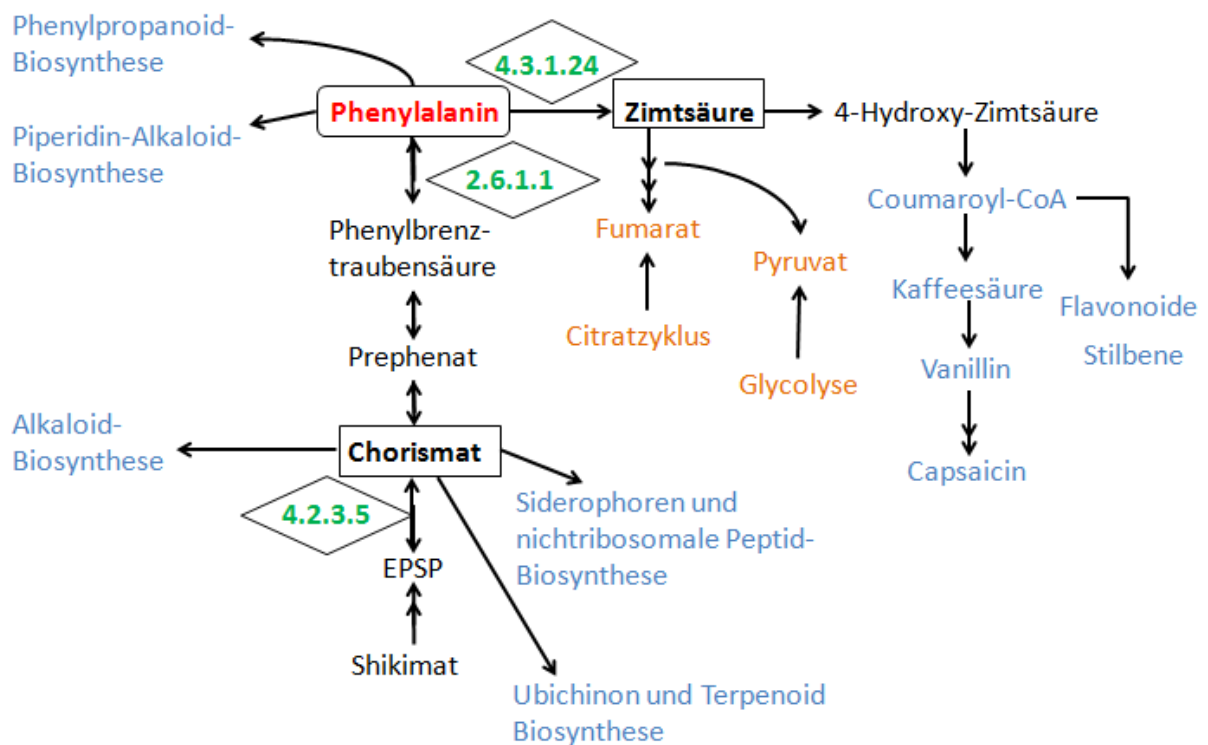


Abbildung 3.9.: Vereinfachtes Schema des Phenylalaninmetabolismus mit Verdeutlichung der Verknüpfung des primären und sekundären Stoffwechsels durch die katalysierten Reaktionen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase.

Die Aspartat-Transaminase (2.6.1.1), die Chorismat-Synthase (4.2.3.5) und die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (4.3.1.24) sind wichtige Enzyme im Aminosäuremetabolismus und die letzten beiden katalysieren Reaktionen, die den primären Stoffwechsel mit dem sekundären Stoffwechsel verknüpfen.

EPSP: 5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-phosphoshikimat, blau: überwiegend Sekundärmetabolismus, orange: Primärmetabolismus, schwarz: Phenylalaninmetabolismus.

(Vereinfacht abgeändert nach <http://www.genome.jp/kegg>, Stand August 2015).

3.4.1. Identifizierung der kodierenden Sequenzen der zu untersuchenden Enzyme

Der erste Schritt zur Generierung einer toxischen Mutante von *G. bidwellii* war die Identifizierung der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase. Da zu Beginn dieser Arbeit keine Genomsequenzen von *G. bidwellii* verfügbar waren, wurden bioinformatische Methoden angewandt, um die kodierenden Sequenzen der entsprechenden Enzyme zu identifizieren. Zunächst wurden mithilfe der Enzym-Datenbank BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org>) die EC-Nummern der entsprechenden Enzyme ermittelt und anschließend die jeweiligen Proteinsequenzen aus Hefe mittels der *Saccharomyces* Genome Datenbank (<http://www.yeastgenome.org>) bestimmt. Aus diesen Sequenzen wurden Homologe aus verwandten Pilzen von *G. bidwellii* identifiziert. Es wurden Sequenzen aus den Pilzen *Magnaporthe oryzae*, *Podospira anserina*, *Neurospora crassa*, *Pyrenophora tritici-repentis* und *Giberella zeae* verwendet (Daten nicht gezeigt).

Parallel zur Identifizierung der kodierenden Sequenzen der zu untersuchenden Enzyme wurde sowohl eine Genomsequenzierung als auch eine Transkriptomanalyse von *G. bidwellii* durchgeführt. Für die Transkriptomanalyse wurde RNA verwendet, die aus entsprechenden Pilzkulturen, zum einen im Zustand der Toxinproduktion und zum anderen im Zustand, in dem keine Toxinproduktion nachweisbar war, isoliert wurde.

Die DNA wurde vom Institut für Molekulargenetik, gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) bei Prof. Dr. Schmidt mittels *next generation sequencing* sequenziert. Die Rohdaten konnten zur molekularbiologischen Untersuchung von *G. bidwellii* genutzt werden. Die Bearbeitung dieser Rohdaten durch Dr. Karsten Andresen (IBWF, Kaiserslautern) führte zu dem Ergebnis, dass das Genom eine Gesamtgröße von 27,13 Mbp hat, der GC-Gehalt 53,02 % beträgt und 7918 ORFs enthält (orientiert an *Magnaporthe oryzae*). Mithilfe dieser Daten konnten die kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase mit den bisher ermittelten Daten abgeglichen werden (Anhang IV). Daten des Genoms und der identifizierten Sequenzen samt konservierten Domänen der entsprechenden Enzyme sind in Tabelle 3.2. zusammengefasst.

Tabelle 3.2.: Daten des Genoms und der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *Guignardia bidwellii*.

Eine Genomsequenzierung mittels *next generation sequencing* ergab erste Daten über das Genom von *G. bidwellii*. Daraus wurden die kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *G. bidwellii* identifiziert. Die N50 Statistik bezieht sich auf 50 % der totalen Sequenzlänge, die in den 400 Sequenzen enthalten ist. Die ORFs sind anhand eines *M. oryzae*-Modells berechnet. Die konservierten Domänen wurden mittels CD-Datenbank von NCBI ermittelt.

Mbp: Megabasenpaare; kDa: Kilodalton; bp: Basenpaare; ORFs: *open reading frames*

Genom	Größe [Mbp]	GC [%]	N50 Statistik [bp]	ORFs
<i>Guignardia bidwellii</i>	27,13	53,02	20013	7918
Enzym	Aminosäuren	Molekulargewicht [kDa]	genomische Sequenz [bp]	Intronlänge [bp] (Position innerhalb der Sequenz)
Aspartat-Transaminase EC 2.6.1.1	395	43,98	1340	73 (107) 79 (313)
konservierte Domänen				
Chorismat-Synthase EC 4.2.3.5	406	43,67	1335	63 (35) 53 (461)
konservierte Domänen				
Phenylalanin-Ammoniak-Lyase EC 4.3.1.24	728	77,95	2233	46 (283)
konservierte Domänen				

Anschließend wurden die Sequenzen mittels PCR aus genomischer DNA von *G. bidwellii* amplifiziert (Tabelle 2.3.) und zur weiteren Bearbeitung in den pGEM[®]-T Easy-Vektor ligiert.

3.4.2. Identifizierung eines geeigneten Transformationssystems für *Guignardia bidwellii*

Nach der Identifizierung der Gensequenzen für die zu untersuchenden Enzyme musste ein geeignetes Transformationssystem für die molekularbiologische Manipulation des Pilzes gefunden werden. *G. bidwellii* konnte bislang nur mittels Protoplastentransformation durch zufällige Mutagenese erfolgreich transformiert werden (Shaw *et al.*, 2001). Demnach sollte zunächst eine Protoplastentransformation zur zufälligen Mutagenese mit einem Plasmid durchgeführt werden, das zur Detektion von Transformanten neben einem Hygromycin-Phosphotransferase-Gen (Staben *et al.*, 1989) auch die kodierende Sequenz für das *green fluorescent protein* (GFP) enthält. Nach Inkubation auf entsprechendem Selektionsmedium konnte allerdings kein Wachstum von entsprechenden Transformanten beobachtet werden.

Daraufhin wurden weitere Transformationssysteme zur Transformation von *G. bidwellii* eingesetzt. Neben der Protoplastentransformation kam die Transformation mittels Elektroporation in Anlehnung an Margolin *et al.* (1997) und die Transformation mittels Lithiumacetat in Anlehnung an Dhawale *et al.* (1984) zum Einsatz. Bei diesen beiden Verfahren konnte ebenfalls kein Wachstum entsprechender Transformanten beobachtet werden.

Die für die Manipulation pilzlicher Genome weit verbreitete Methode der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation wurde ebenfalls für *G. bidwellii* angewendet. Bei dieser Methode liegen die Vorteile gegenüber anderen Transformationsmethoden bei der einfachen Handhabung und der Möglichkeit, unterschiedliches Ausgangsmaterial wie Sporen, Hyphen oder Mycelgewebe für die Transformation zu verwenden. Weiterhin ist bekannt, dass in den meisten Fällen nur eine Kopie der zu transferierenden DNA in das Genom integriert wird (Mullins *et al.*, 2001). Darüber hinaus kann mit dieser Methode eine zielgerichtete Mutagenese durch homologe Rekombination erreicht werden, wenn das zu integrierende Konstrukt von homologen Bereichen aus dem Empfängerorganismus flankiert wird (Gouka *et al.*, 1999).

Für den phytopathogenen Pilz *Guignardia citricarpa* ist bereits ein etabliertes Transformationssystem mittels *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation publiziert (Figueiredo *et al.*, 2010). Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *G. bidwellii* wurde diese Methode in Anlehnung an Figueiredo *et al.* (2010) für die Transformation von *G. bidwellii* angewendet.

Nach der Transformation konnte das Wachstum einer Transformante beobachtet werden. Die Kolonie wurde auf frisches Selektionsmedium überführt und gleichzeitig genomische DNA aus dem Mycel der Kolonie isoliert. Zunächst sollte eine Überprüfung der rekombinanten DNA im Genom von *G. bidwellii* mittels PCR-Analyse durchgeführt werden. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet (Anhang II), die ein Fragment der HPT-Kassette

des integrierten Vektors mit einer Größe von 350 bp spezifisch amplifizieren (Abbildung 3.10.). Als Template diente die genomische DNA, die aus der Transformante von *G. bidwellii* isoliert wurde. Als Positivkontrolle diente Plasmid-DNA aus dem Vektor pCAMBIA-HPT-EFA-GFP und als Negativkontrolle genomische DNA, die aus dem Wildtyp-Stamm isoliert wurde. Zur PCR wurden eine *Annealing*-Temperatur von 54,3 °C und eine Elongationszeit von 40 s verwendet.

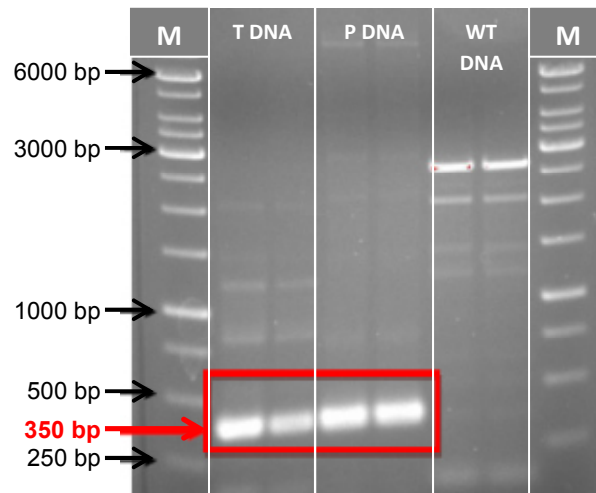


Abbildung 3.10.: Agarosegel zur Analyse genomischer DNA einer Transformante von *Guignardia bidwellii*.

Auftrennung des PCR-Produkts nach Amplifikation mit spezifischen Oligonukleotiden für die HPT-Kassette. Es wurde eine Bandengröße von 350 bp bei der genomischen DNA der Transformante (T-DNA) und der Positivkontrolle (Plasmid-DNA des Vektors pCAMBIA-HPT-EFA-GFP; P-DNA) erwartet. Als Negativkontrolle wurde genomische DNA aus dem Wildtyp-Stamm (WT-DNA) verwendet. In der Probe und der Positivkontrolle war ein Signal mit einer Größe von 350 bp zu beobachten, welches in der Negativkontrolle nicht detektiert werden konnte. M: Größenmarker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze ergab für die Probe mit genomischer DNA, die aus der Transformante von *G. bidwellii* isoliert wurde, ein spezifisches Signal bei einer Größe von 350 bp. Ein identisches Signal konnte bei der Positivkontrolle detektiert werden, welches bei der Negativkontrolle nicht nachweisbar war (Abbildung 3.10.). Damit ließ sich eine erfolgreiche zufällige Integration der HPT-Sequenz in das Genom von *G. bidwellii* nachweisen. Die weiteren Signale bei der Negativkontrolle sind unspezifischen Bindungen der Oligonukleotide mit der genomischen DNA aus dem Wildtyp-Stamm zuzuordnen.

Zur Festigung der Annahme, dass bei der Transformante von *G. bidwellii* ein positives Integrationsereignis und somit eine erfolgreiche Expression des GF Proteins stattgefunden hat, wurde das Mycel dieser Kultur mikroskopisch untersucht. Eine erfolgreiche Expression des GF Proteins konnte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Weitere Untersuchungen sollten unter anderem in Form einer Southern Blot-Analyse und einer ITS-Sequenzierung stattfinden, doch während der Vorbereitungen konnte nach Überführung der Transformante auf frisches Selektionsmedium kein Wachstum mehr festgestellt werden. Offensichtlich war die Integration des Konstruktes in das Genom von *G. bidwellii* nicht stabil, so dass die Kultur ihre Resistenz gegen Hygromycin verloren hatte.

Die Untersuchungen ergaben, dass von den verwendeten Methoden nur die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation zu einem Integrationsereignis bei *G. bidwellii* geführt hat. Daher wurde dieses System für die zielgerichtete Mutagenese und somit zur Disruption der kodierenden Sequenz der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *G. bidwellii* genutzt.

3.4.3. Zielgerichtete Mutagenese in *Guignardia bidwellii* mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation

Für die zielgerichtete Mutagenese wurden zunächst Plasmide generiert, in denen die entsprechende Zielsequenz jeweils durch einen homologen Bereich zur Integrationsposition im Genom von *G. bidwellii* flankiert wurde. Da bekannt ist, dass die zielgerichtete Mutagenese durch homologe Rekombination bei filamentösen Pilzen sehr effizient ist, wenn an beiden Enden des zu transformierenden Konstrukts homologe Bereiche von mindestens 400 bp vorhanden sind (Meng *et al.*, 2007), wurden die kodierenden Sequenzen sowohl in 3'-Richtung als auch in 5'-Richtung um 500 bp verlängert.

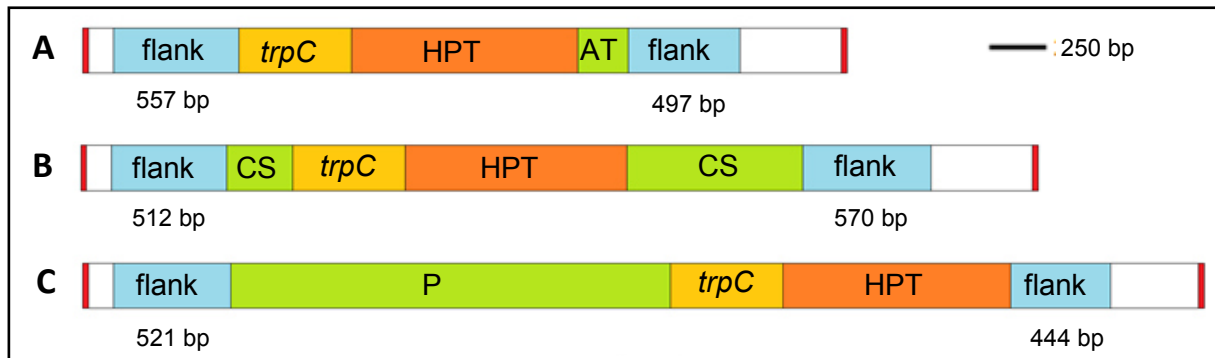


Abbildung 3.11.: Konstrukt zur Inaktivierung der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase (A), der Chorismat-Synthase (B) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (C) in *Guignardia bidwellii* mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von 500 Basenpaaren und Inaktivierung der kodierenden Sequenzen durch ein Hygromycinresistenzgen.

Die jeweiligen Konstrukte wurden in den Vektor pCAMBIA 0380 (weiß) zwischen die Signalsequenzen *left border* und *right border* (rot) ligiert. Die jeweilige Gensequenz (grün) wurde durch ein Hygromycinresistenzgen (HPT; orange), dessen Expression unter der Kontrolle des *trpC*-Promotors (gelb) steht, inaktiviert. Zur Erleichterung der homologen Rekombination wird die manipulierte Sequenz von zur Zielsequenz homologen Bereichen (flank; blau) mit einer Größe von 500 bp flankiert.

AT: Aspartat-Transaminase; CS: Chorismat-Synthase; P: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase; bp: Basenpaare

Zur Inaktivierung der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *G. bidwellii* sollte die kodierende Gensequenz des Enzyms teilweise deletiert werden. Dafür wurde jeweils ein Inaktivierungskonstrukt in den pCAMBIA 0380-Vektor zwischen die Signalsequenzen der *left border* und *right border* ligiert. Die Konstrukte enthalten flankierende, zur Zielsequenz homologe Bereiche von etwa 500 bp, um die homologe Rekombination zu ermöglichen. Die kodierenden Sequenzen sind partiell durch ein Hygromycinresistenzgen ersetzt, dessen Expression unter der Kontrolle des *trpC*-Promotors aus *Aspergillus nidulans* steht (Abbildung 3.11.). Detaillierte Angaben über die verwendeten Inaktivierungskonstrukte sind Tabelle 3.3. zu entnehmen.

Tabelle 3.3.: Angaben über die Inaktivierungskonstrukte mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von etwa 500 Basenpaaren und Hygromycinresistenzkassette.

Die Inaktivierungskonstrukte wurden zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation von *G. bidwellii* verwendet, um die kodierende Sequenz der Aspartat-Transaminase (AsTra-500-HPT), der Chorismat-Synthase (ChoSy-500-HPT) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL-500-HPT) in *G. bidwellii* partiell zu deletieren. bp: Basenpaare

Konstrukt	Größe des übertragenen Inaktivierungskonstrukts [bp]	Größe der flankierenden Bereiche (5' bzw. 3') [bp]	Promotor der Resistenzkassette	Resistenzgen
AsTra-500-HPT	3395	557 bzw. 497	<i>trpC</i>	Hygromycin-Phosphotransferase
ChoSy-500-HPT	4252	512 bzw. 571	<i>trpC</i>	Hygromycin-Phosphotransferase
PAL-500-HPT	4981	444 bzw. 521	<i>trpC</i>	Hygromycin-Phosphotransferase

Die Inaktivierungskonstrukte wurden zur partiellen Deletion der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase in *G. bidwellii* durch die *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation in *G. bidwellii* übertragen. Nach dreiwöchiger Inkubationszeit auf Selektionsmedium und mehrfacher Wiederholung konnten keine Transformanten detektiert werden.

3.4.3.1. Optimierung der flankierenden homologen Bereiche

Es ist bekannt, dass in einigen filamentösen Pilzen die Rekombinationseffizienz in Abhängigkeit von der Größe der flankierenden Bereiche unterschiedlich ist (Kramer, 2008). Nach Michielse *et al.* (2005) haben flankierende, zur Zielsequenz homologe Bereiche von 1000 bp im Gegensatz zu kleineren flankierenden Bereichen zu einer gesteigerten Transformationseffizienz in *Aspergillus awamori* geführt. Andererseits ist aus den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* bekannt, dass bereits zur Zielsequenz homologe Bereiche von 50 – 100 bp für eine effiziente Integration einer Genkassette mittels homologer Rekombination ausreichen (Meyer, 2008).

Daher wurden neue Inaktivierungskonstrukte mit sowohl größeren als auch kleineren homologen Bereichen generiert. Die Gensequenz wurde erneut partiell durch ein Hygromycinresistenzgen unterbrochen, dessen Expression unter der Kontrolle des *trpC*-Promotors steht (Tabelle 2.4.).

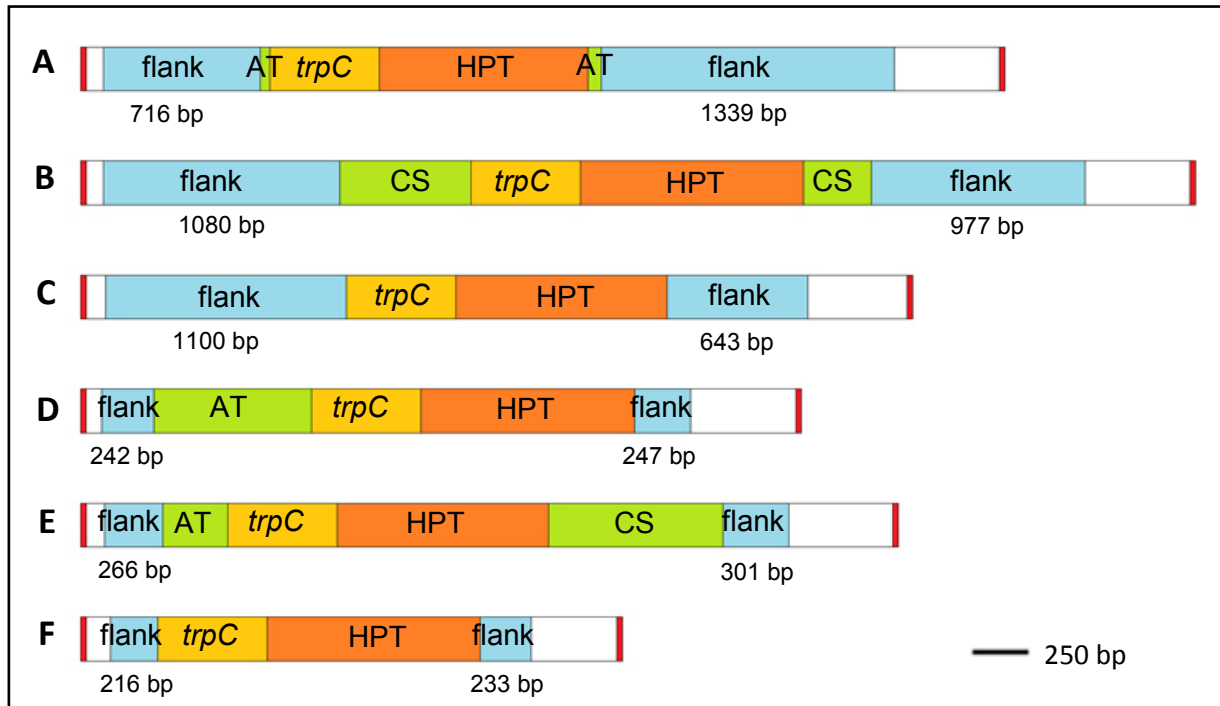


Abbildung 3.12.: Konstrukte zur Inaktivierung der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase (A, D), der Chorismat-Synthase (B, E) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (C, F) in *Guignardia bidwellii* mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von 1000 bzw. 200 Basenpaaren und Inaktivierung der kodierenden Sequenzen durch ein Hygromycinresistenzgen.

Die jeweiligen Konstrukte wurden in den Vektor pCAMBIA 0380 (weiß) zwischen die Signalsequenzen *left border* und *right border* (rot) ligiert. Die jeweilige Gensequenz (grün) wurde durch ein Hygromycinresistenzgen (HPT; orange), dessen Expression unter der Kontrolle des *trpC*-Promotors (gelb) steht, unterbrochen. Für die zielgerichtete Mutagenese wird die Gensequenz von zur Zielsequenz homologen Bereichen (flank; blau) mit einer Größe von etwa 1000 bp (A – C) oder etwa 200 bp (D – E) flankiert.

AT: Aspartat-Transaminase; CS: Chorismat-Synthase; P: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase; bp: Basenpaare

Für eine erfolgreiche Transformation von *G. bidwellii* wurden die zuvor verwendeten Inaktivierungskonstrukte erneut generiert, wobei die zur Zielsequenz homologen Bereiche mit einer Größe von 1000 bp bzw. 200 bp konstruiert wurden. Bei den Konstrukten, die zur Inaktivierung der Expression von Aspartat-Transaminase und Chorismat-Synthase führen sollen, wurde die jeweilige kodierende Sequenz partiell durch ein Hygromycinresistenzgen deletiert, wohingegen die kodierende Sequenz der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase durch das Resistenzgen vollständig ersetzt wurde (Abbildung 3.12.). Tabelle 3.4. gibt einen Überblick über die einzelnen Bestandteile der sechs Inaktivierungskonstrukte.

Tabelle 3.4.: Angaben über die Inaktivierungskonstrukte mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von etwa 1000 bzw. 200 Basenpaaren und Hygromycin-resistenzkassette.

Die Inaktivierungskonstrukte wurden zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation von *G. bidwellii* verwendet, um die kodierende Sequenz der Aspartat-Transaminase (AsTra-1000-HPT; AsTra-200-HPT), der Chorismat-Synthase (ChoSy-1000-HPT; ChoSy-200-HPT) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL-1000-HPT; PAL-200-HPT) in *G. bidwellii* zu inaktivieren. bp: Basenpaare

Konstrukt	Größe des übertragenen Inaktivierungskonstrukts [bp]	Größe der flankierenden Bereiche (5' bzw. 3') [bp]	Promotor der Resistenzkassette	Resistenzgen
AsTra-1000-HPT	4222	716 bzw. 1339	<i>trpC</i>	Hygromycin-Phosphotransferase
ChoSy-1000-HPT	5093	1080 bzw. 977	<i>trpC</i>	Hygromycin-Phosphotransferase
PAL-1000-HPT	3801	1100 bzw. 643	<i>trpC</i>	Hygromycin-Phosphotransferase
AsTra-200-HPT	3294	242 bzw. 247	<i>trpC</i>	Hygromycin-Phosphotransferase
ChoSy-200-HPT	3735	266 bzw. 301	<i>trpC</i>	Hygromycin-Phosphotransferase
PAL-200-HPT	2475	216 bzw. 233	<i>trpC</i>	Hygromycin-Phosphotransferase

Die Konstrukte wurden zur Inaktivierung der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase in *G. bidwellii* zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation eingesetzt.

Auch bei der Transformation mit 1000 bp bzw. 200 bp langen, zur Zielsequenz homologen Bereichen konnten keine Transformanten generiert werden.

Da es bei den Transformationsversuchen mit unterschiedlich großen, zur Zielsequenz homologen Bereichen nicht zum gewünschten Transformationsereignis kam, wurden anstatt der Hygromycinresistenz-Kassette andere Selektionsmarker für die Transformation von *G. bidwellii* eingesetzt.

3.4.3.2. Optimierung der Transformation von *Guignardia bidwellii* durch Austausch des Selektionsmarkers

Die Hygromycinresistenz-Kassette besteht aus einem *trpC*-Promotor aus *A. nidulans* und einem bakteriellen Hygromycin-Phosphotransferase-Gen (Carroll *et al.*, 1994). Der *trpC*-Promotor reguliert die Expression von Genen, die für die Tryptophanbiosynthese wichtig sind (Hamer und Timberlake, 1987). Möglicherweise ist der Promotor nicht kompatibel für eine Transformation von *G. bidwellii*.

Ein häufig verwendeter pilzlicher Promotor für Transformationen ist der *gpdA*-Promotor aus *A. nidulans* (Bowyer, 2001). Er reguliert die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und wurde auch bei bisher erfolgreichen Transformationen von *Guignardia* spp. verwendet (Shaw *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 2010).

Mit diesem Hintergrund wurden neue Inaktivierungsvektoren konstruiert, die anstelle der Hygromycinresistenz-Kassette ein Ammoniumglufosinatresistenzgen (BAR) enthalten, dessen Expression unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors steht. Für die ersten Untersuchungen wurde der pZPBargfp-Vektor von Figueiredo *et al.* (2010) verwendet, da mit diesem Vektor bereits eine erfolgreiche Transformation von *G. citricarpa* publiziert worden war. Der Vektor enthält zusätzlich zur BAR-Kassette auch die kodierende Sequenz für das GFP, dessen Expression unter der Kontrolle des *tef*-Promotors aus *Metarhizium anisopliae* steht und durch den *trpC* Terminator aus *A. nidulans* terminiert wird. Die Sequenzen für die BAR-Kassette und für das GFP wurden in den Vektor pCAMBIA 0380 ligiert, wodurch der Ausgangsvektor pCAMBIA-pzp-BAR-gfp entstand. Ausgehend von diesem Vektor wurde die BAR-Kassette zusammen mit der GFP Sequenz für weitere Klonierungsschritte verwendet.

Die Inaktivierungskonstrukte zur Unterbrechung der kodierenden Sequenz für die Aspartat-Transaminase, die Chorismat-Synthase und die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *G. bidwellii* wurden zunächst mit einem zur Zielsequenz homologen Bereich von jeweils 500 bp konstruiert. Zusätzlich wurden Inaktivierungskonstrukte mit einer BAR-Kassette konstruiert, die einen homologen Bereich von jeweils 200 bp haben (Tabelle 2.4.). Hierbei wurde die BAR-Kassette ohne die GFP Expressionskassette verwendet (Abbildung 3.13.).

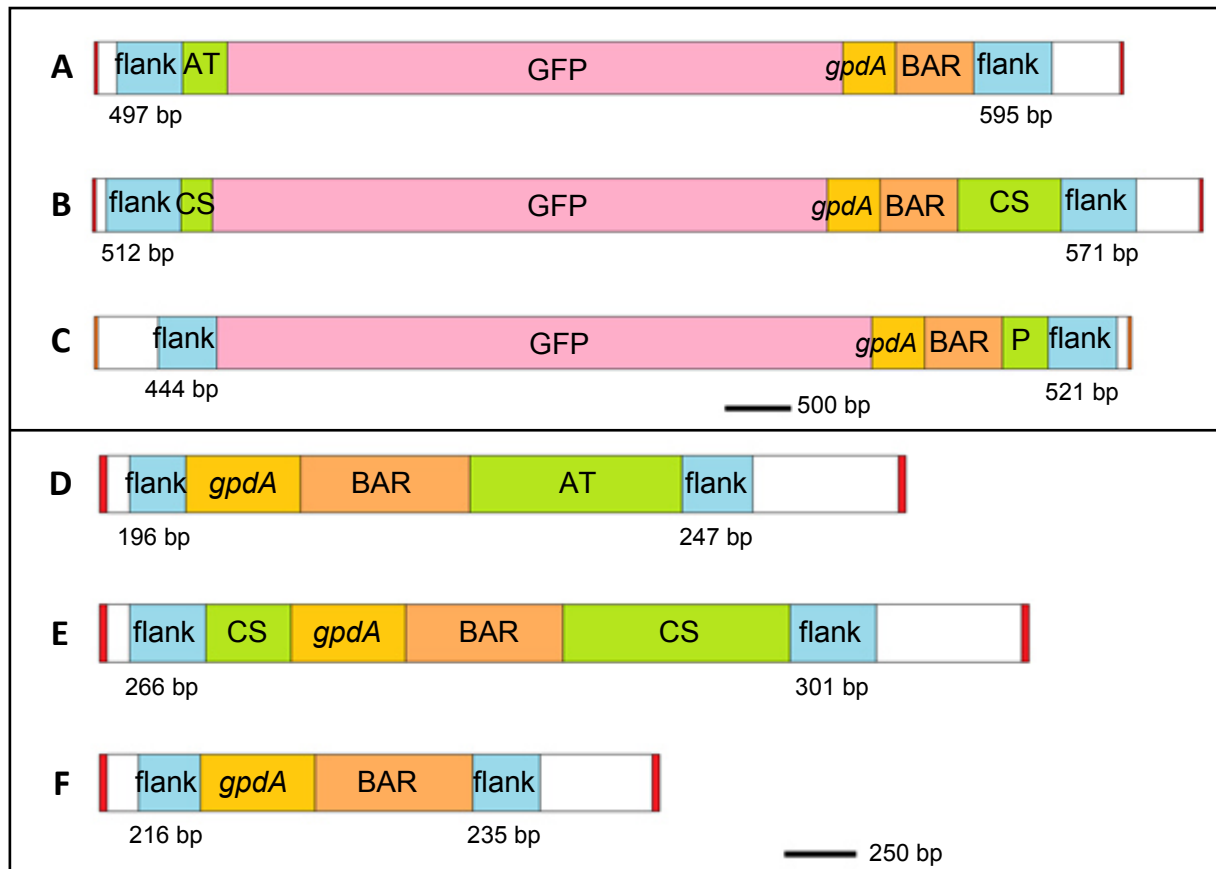


Abbildung 3.13.: Konstrukte zur Inaktivierung der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase (A, D), der Chorismat-Synthase (B, E) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (C, F) in *Guignardia bidwellii* mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von 500 bzw. 200 Basenpaaren und Inaktivierung der kodierenden Sequenzen durch eine Ammoniumglufosinresistenz-Kassette.

Die jeweiligen Konstrukte wurden in den Vektor pCAMBIA 0380 (weiß) zwischen die Signalsequenzen *left border* und *right border* (rot) ligiert. Die Gensequenzen (grün) wurden durch ein Ammoniumglufosinresistenzgen (BAR; orange), dessen Expression unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors (gelb) steht, inaktiviert. Für eine erfolgreiche homologe Rekombination wird die Gensequenz von zur Zielsequenz homologen Bereichen (flank; blau) mit einer Größe von 500 bp (A – C) oder 200 bp (D – E) flankiert. Die Konstrukte mit 500 bp homologen Bereichen enthalten zusätzlich die kodierende Sequenz des *green fluorescence protein* (GFP, pink).

AT: Aspartat-Transaminase; CS: Chorismat-Synthase; P: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase; bp: Basenpaare

Um zu überprüfen, ob das ausbleibende Wachstum von *G. bidwellii* Transformanten dadurch bedingt ist, weil das Hygromycin-Phosphotransferasegen nicht richtig exprimiert wird, wurden Inaktivierungskonstrukte mit einem Bialophosresistenzgen konstruiert, dessen Expression unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors steht. Die zur Zielsequenz homologen Bereiche wurden sowohl mit einer Größe von 500 bp als auch mit einer Größe von 200 bp generiert.

Die kodierende Sequenz der jeweiligen Enzyme wurde in allen Konstrukten durch die Resistenzkassette partiell ersetzt. Nur im Konstrukt zur Inaktivierung der Expression der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase mit flankierenden Bereichen von 200 bp wurde die kodierende Sequenz mit der Resistenzkassette vollständig ersetzt. Tabelle 3.5. gibt einen Überblick über die einzelnen Bestandteile der Inaktivierungskonstrukte.

Tabelle 3.5.: Angaben über die Inaktivierungskonstrukte mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von 500 bzw. 200 Basenpaaren und Ammoniumglufosinat-resistenzkassette.

Die Inaktivierungskonstrukte wurden zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation von *G. bidwellii* verwendet, um die kodierende Sequenz der Aspartat-Transaminase (AsTra-500-BAR; AsTra-200-BAR), der Chorismat-Synthase (ChoSy-500-BAR; ChoSy-200-BAR) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL-500-BAR; PAL-200-BAR) in *G. bidwellii* zu inaktivieren. bp: Basenpaare

Konstrukt	Größe des übertragenen Inaktivierungskonstrukts [bp]	Größe der flankierenden Bereiche (5' bzw. 3') [bp]	Promotor der Resistenzkassette	Resistenzgen
AsTra-500-BAR	7801	497 bzw. 595	<i>gpdA</i>	Phosphinothricin Acetyltransferase
ChoSy-500-BAR	8418	512 bzw. 571	<i>gpdA</i>	Phosphinothricin Acetyltransferase
PAL-500-BAR	7861	444 bzw. 521	<i>gpdA</i>	Phosphinothricin Acetyltransferase
AsTra-200-BAR	2813	196 bzw. 247	<i>gpdA</i>	Phosphinothricin Acetyltransferase
ChoSy-200-BAR	3243	266 bzw. 301	<i>gpdA</i>	Phosphinothricin Acetyltransferase
PAL-200-BAR	1954	216 bzw. 235	<i>gpdA</i>	Phosphinothricin Acetyltransferase

Die Inaktivierungskonstrukte zur Manipulation der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase in *G. bidwellii* wurden zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation eingesetzt.

Trotz ausgetauschter Resistenzkassette und unterschiedlichen Größen der zur Zielsequenz homologen Bereiche konnten auch nach mehreren Wiederholungen keine Transformanten generiert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass bei allen Versuchen der zielgerichteten Mutagenese von *G. bidwellii* mittels *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation kein Erfolg verzeichnet werden konnte, sollte die Frage der Kompatibilität des Promotors der Resistenzkassette grundsätzlich geklärt werden. Dafür wurde die Expression des Hygromycinresistenzgens unter die Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* gestellt.

3.4.3.3. Optimierung der Transformation von *Guignardia bidwellii* durch Konstruktion eines Selektionsmarkers unter der Kontrolle eines pilzeigenen Promotors

Die Expression eines Selektionsmarkergens und die Transformationseffizienz wird durch Verwendung eines pilzeigenen Promotors am besten unterstützt (Bowyer, 2001). Daher wurde mithilfe der Gendatenbank von *G. bidwellii* und bioinformatischen Methoden die Sequenz des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* identifiziert. Dieser Promotor reguliert die Expression des Elongationsfaktors 1 α . Dieser Elongationsfaktor ist ein hoch konserviertes und in Eukaryoten ubiquitär vorkommendes Protein, das an der Translation beteiligt ist (Roger *et al.*, 1999). Außerdem steht der Vektor pCAMBIA-HPT-EFA-GFP, der zur bereits beschriebenen erfolgreichen ungerichteten Transformation genutzt wurde, ebenfalls unter der Kontrolle des *EFA1*-Promotors (aus *M. oryzae*), so dass der *EFA1*-Promotor aus *G. bidwellii* verwendet wurde.

Nach Identifizierung der kodierenden Sequenz des Elongationsfaktors 1 α , konnte *upstream* mittels einer Software (<http://www.softberry.com>) die Promotorsequenz identifiziert werden (Anhang IV).

Mittels PCR wurde ein 1337 bp großes Fragment aus genomischer DNA von *G. bidwellii* amplifiziert, in dem die Sequenz des *EFA1*-Promotors enthalten war. Im weiteren Verlauf wurde die Sequenz der Hygromycinresistenz-Kassette aus dem pCAMBIA-HPT (*Sall*) Vektor mittels entsprechender Oligonukleotide ohne den *trpC*-Promotor amplifiziert. Beide Sequenzen wurden letztendlich in den Grundvektor pCAMBIA 0380 kloniert, so dass der Vektor pCAMBIA-EFA1-HPT mit einer Gesamtgröße von 9280 bp generiert wurde. Dieser Vektor wurde als Ausgangsvektor zur Generierung weiterer Konstrukte zur Inaktivierung der kodierenden Sequenz der Aspartat-Transaminase, der Chorismatsynthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase in *G. bidwellii* verwendet. Die genaue Konstruktion des Vektors ist in Tabelle 2.4. beschrieben.

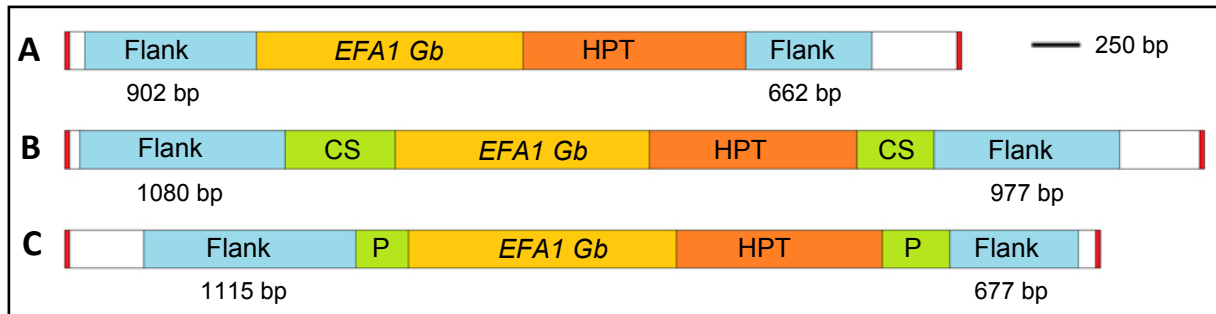


Abbildung 3.14.: Konstrukt zur Inaktivierung der kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase (A), der Chorismat-Synthase (B) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (C) in *Guignardia bidwellii* mit zur Zielsequenz homologen Bereichen von 1000 Basenpaaren und Inaktivierung der kodierenden Sequenzen durch ein Hygromycinresistenzgen, dessen Expression unter der Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *Guignardia bidwellii* steht.

Die Konstrukte wurden in den Vektor pCAMBIA 0380 (weiß) zwischen *left border* und *right border* (rot) ligiert. Die Gensequenz (grün) wurde durch ein Hygromycinresistenzgen (HPT; orange), dessen Expression unter der Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* (*EFA1 Gb*; gelb) steht, unterbrochen. Die zur Zielsequenz homologen Bereiche (flank; blau) haben eine Größe von 1000 bp.

AT: Aspartat-Transaminase; CS: Chorismat-Synthase; P: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase; bp: Basenpaare

Die Inaktivierungskonstrukte wurden mit einer zur Zielsequenz homologen flankierenden Sequenz von 1000 bp und einem Hygromycinresistenzgen, dessen Expression unter der Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* steht, generiert.

Zur Generierung der drei Inaktivierungskonstrukte wurde der Vektor pCAMBIA 0380 verwendet. Die kodierende Sequenz für die Aspartat-Transaminase wurde vollständig durch ein Hygromycinresistenzgen ersetzt, dessen Expression unter der Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* steht. Bei den kodierenden Sequenzen für die Chorismat-Synthase und die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase wurden diese partiell durch die Resistenzkassette ersetzt (Abbildung 3.14.). Detaillierte Angaben über die verwendeten Inaktivierungskonstrukte sind Tabelle 3.6. zu entnehmen.

Tabelle 3.6.: Angaben über die Inaktivierungskonstrukte mit Hygromycinresistenzgen, das unter der Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *Guignardia bidwellii* steht.

Die Inaktivierungskonstrukte wurden zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation von *G. bidwellii* verwendet, um die kodierende Sequenz der Aspartat-Transaminase (AsTra-EFA1-HPT), der Chorismat-Synthase (ChoSy-EFA1-HPT) und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL-EFA1-HPT) in *G. bidwellii* zu inaktivieren.

bp: Basenpaare

Konstrukt	Größe des übertragenen Inaktivierungskonstrukts [bp]	Größe der flankierenden Bereiche (5' bzw. 3') [bp]	Promotor der Resistenzkassette	Resistenzgen
AsTra-EFA1-HPT	4718	902 bzw. 662	<i>EFA1 Gb</i>	Hygromycin-Phosphotransferase
ChoSy-EFA1-HPT	5995	1080 bzw. 977	<i>EFA1 Gb</i>	Hygromycin-Phosphotransferase
PAL-EFA1-HPT	5448	1115 bzw. 677	<i>EFA1 Gb</i>	Hygromycin-Phosphotransferase

Die Konstrukte wurden zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation eingesetzt.

Auch nachdem die Expression des Resistenzgens unter die Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* gebracht wurde, konnten nach mehreren Wiederholungen keine Transformanten erhalten werden.

Da alle Veränderungen an den zu transformierenden Konstrukten nicht zum gewünschten Transformationserfolg geführt haben, wurde die weitere Vorgehensweise dadurch bestimmt, dass nicht die Konstrukte, sondern das verwendete System für *G. bidwellii* optimiert wurde.

3.4.3.4. Optimierung des *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformationssystems

Jeder Pilz benötigt spezifische Bedingungen im Transformationssystem mit *A. tumefaciens*, damit es zu einem positiven Transformationsereignis kommen kann (Michielse *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurden von dem bisher verwendeten Protokoll zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation (Tabelle 3.7. orange hinterlegt) verschiedene Parameter variiert. Bei jedem Ansatz wurde nur ein Parameter verändert (Tabelle 3.7. grau hinterlegt). Bei den Versuchen wurden die Zelldichte der Bakteriensuspension von *A. tumefaciens* bei einer OD₆₀₀, das Mischungsverhältnis von Mycel [g] zu Bakteriensuspension [ml], die Acetosyringon-Konzentration [µM], die Co-Kultivierungsdauer [d] und das Alter der Pilzkultur [d] variiert. Ebenfalls wurden Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum*

[5 mg/ml] oder Trizyclazol [400 µM] zugesetzt, um zu untersuchen, ob die dicke und stark melanisierte Zellwand von *G. bidwellii* (Ullrich *et al.*, 2009) den DNA-Transfer behindern könnte. Zur besseren Übersicht wurden die folgenden Versuche nur mit dem Inaktivierungsvektor PAL-EFA1-HPT durchgeführt. Alle Versuche wurden sowohl mit 500 ng als auch mit 2 µg Plasmid-DNA durchgeführt. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 3.7. gegeben.

Tabelle 3.7.: Optimierung verschiedener Transformationsparameter zur Durchführung einer *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation von *Guignardia bidwellii*.

Variiert wurde die Zelldichte der Bakteriensuspension von *A. tumefaciens* bei einer OD₆₀₀, das Mischungsverhältnis von Mycel [g] zu Bakteriensuspension [ml], die Acetosyringon (AS)-Konzentration [µM], die Co-Kultivierungsdauer [d] und das Alter der Pilzkultur [d]. Zusätzlich wurden Versuche mit verschiedenen Additiven durchgeführt. Beobachtet wurde das Wachstum von Transformanten nach 14 - 28 Tagen bei 24 °C. Die Standardparameter des bisher verwendeten Protokolls sind orange, die jeweils veränderten Parameter des Versuchs grau und der Transformationsversuch, der die Erkenntnisse aus dieser Versuchsreihe kombiniert, ist gelb hinterlegt.

Nr.	Bakterien- dichte OD ₆₀₀	Verhältnis Mycel [g] : Bakterien [ml]	AS- Konzentration [µM]	Co-Kulti- vierungs- dauer [d]	Alter der Pilzkultur [d]	Additiv	Transfor- manten nach 14 – 28 d Inkubation	stabil
x	0,6	2:4	400	2	7	---	---	---
1	0,3	2:4	400	2	7	---	---	---
2	0,8	2:4	400	2	7	---	ja	nein
3	1,0	2:4	400	2	7	---	ja	nein
4	0,6	2:1	400	2	7	---	---	---
5	0,6	2:2	400	2	7	---	---	---
6	0,6	2:6	400	2	7	---	ja	nein
7	0,6	2:8	400	2	7	---	---	---
8	0,6	2:4	200	2	7	---	---	---
9	0,6	2:4	600	2	7	---	---	---
10	0,6	2:4	400	3	7	---	---	---
11	0,6	2:4	400	5	7	---	---	---
12	0,6	2:4	400	6	7	---	---	---
13	0,6	2:4	400	2	12	---	ja	nein
14	0,6	2:4	400	2	7	Trizyclazol [400 µM]	---	---
15	0,6	2:4	400	2	7	Lysing Enzymes [5 mg/ml]	---	---
16	0,8	2:5	400	2	12	---	ja	nein

Bei diesen Versuchen zur Optimierung der Transformation wird deutlich, dass die Bakteriendichte, das Verhältnis von Bakterien zu Pilzmycel und das Alter der Pilzkultur einen deutlichen Einfluss auf die Effektivität der Transformation des Pilzes haben. Ein Wachstum von Transformanten nach Inkubation auf Selektionsmedium war nur dann zu beobachten, wenn die Bakteriendichte zwischen einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 lag, das Verhältnis von Mycel zu Bakterien von 2 g Mycel zu 6 ml Bakteriensuspension stand und die verwendete Kultur von *G. bidwellii* 12 Tage alt war.

Diese Erkenntnisse wurden in einem weiteren Transformationsversuch (Tabelle 3.7. gelb hinterlegt) kombiniert. Bei diesem Versuch konnte anfänglich ein Wachstum von Transformanten auf Selektionsmedium beobachtet werden. Allerdings war die Integration der eingebrachten DNA in allen Fällen nicht stabil.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die molekularbiologische Manipulation von *G. bidwellii* noch nicht standardisiert durchgeführt werden kann. Erste Optimierungsansätze weisen jedoch darauf hin, dass die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation zur zielgerichteten Mutagenese in *G. bidwellii* geeignet ist. Ein Hauptproblem ist vor allem die Stabilität der integrierten Fremd-DNA im Genom von *G. bidwellii*. Diese Instabilität der eingebrachten DNA sollte daher noch näher untersucht werden. Aufgrund der mangelnden Stabilität konnte keine toxfreie Mutante von *G. bidwellii* generiert werden, so dass die Frage zur Erfüllung des vierten Kriteriums von Bender *et al.* (1999), ob eine toxfreie Mutante apathogen ist, weiterhin ungeklärt bleibt.

3.5. Phytotoxine aus *Guignardia bidwellii* als Bioherbizide

Die Sekundärmetabolite aus *G. bidwellii* könnten potentielle Leitstrukturen für neue Herbizide sein, da von den bisher entdeckten neun Sekundärmetaboliten aus *G. bidwellii* fünf Verbindungen als phytotoxisch und nicht-wirtsspezifisch beschrieben wurden (Molitor *et al.*, 2012; Buckel *et al.*, 2013). Besonders interessant ist dabei auch, dass für diese Verbindungen keine weiteren biologischen Aktivitäten beschrieben sind. Sowohl Molitor *et al.*, 2012 als auch Buckel *et al.*, 2013 konnten für diese Naturstoffe keine antimikrobielle oder cytotoxische Eigenschaft nachweisen.

Eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung deutet darauf hin, dass die freie Carboxylgruppe für die phytotoxische Eigenschaft verantwortlich ist (Buckel *et al.*, 2013). Besonders im Hinblick auf die biologische Herbizidforschung wäre es interessant zu prüfen, ob die Verbindungen auch außerhalb von Laborbedingungen bei reiner Applikation auf der Pflanze zu Läsionen an den betroffenen Organen führen. Aus diesem Grund wurde ein Bioherbizid-Freilandversuch mit

diesen Verbindungen in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Molitor (Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann, Belvaux, Luxemburg) geplant und durchgeführt. Bei den Untersuchungen sollten nicht nur die phytotoxischen Eigenschaften der Substanzen im Freiland, und damit deren mögliche Verwendung als Bioherbizid, untersucht werden, sondern auch die Wirtschaftlichkeit und Praktikabilität von deren Anwendung. Da nur eine begrenzte Anzahl an Versuchsgliedern verfügbar war, wurden vor dem Hintergrund der Wirtschaftlichkeit die Verbindungen nicht als Reinsubstanz appliziert, sondern sowohl in Form von lyophilisiertem als auch in Form von extrahiertem Kulturfiltrat. Sollte eine Applikation der Kulturfiltrate zu einer Beeinträchtigung des Wachstums der Unkräuter führen, könnte bei industrieller Verwendung der chromatographische Arbeitsaufwand der Aufreinigung und die damit einhergehenden Kosten reduziert werden. Im Kulturfiltrat waren die Metabolite Alaguignardic acid (13,7 mg/l), Guignardic acid (9,9 mg/l) und Phenguignardic acid (2,1 mg/l) nachweisbar. Phytotoxizitätsversuche im Gewächshaus haben bei einer Applikation der Reinsubstanz Phenguignardic acid mit einer Konzentration von 1 mg/l zu nekrotischen Läsionen an *V. vinifera* geführt (Molitor *et al.*, 2012). Für den Freilandversuch wurden die Kulturfiltrate mit einer Gesamtkonzentration an phytotoxischen Dioxolanonen von etwa 12 mg/l eingesetzt.

Es wurden zwei Applikationen durch Dr. Molitor durchgeführt, einmal im Frühjahr (Abbildung 3.15.; A) und einmal im Sommer (Abbildung 3.15.; B). Die Aufwuchshöhe der behandelten Vegetation wurde wöchentlich bonitiert. Der Versuch wurde in Parzellen auf einer Wiese mit Gräsern und verschiedenen Kleearten angeordnet. Jede Parzelle hatte eine Kantenlänge von 50 cm und wurde in vierfacher Wiederholung für jede Probe behandelt und untersucht. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Parzellen, als Positivkontrolle wurden die entsprechenden Parzellen mit dem Herbizid Roundup® Max nach Herstellerangaben behandelt.

Bei der Behandlung im Frühjahr konnte keine Wirkung der Kulturfiltrate aus der Submersfermentation mit *G. bidwellii* auf das Wachstum der Vegetation in den Parzellen beobachtet werden (Abbildung 3.15., A). Die Wuchshöhen der Unkräuter in den mit dem jeweiligen Kulturfiltrat behandelten Parzellen unterschieden sich nicht von den Wuchshöhen der Gräser in den Parzellen, die nicht behandelt wurden. Ein signifikanter Unterschied in der Wuchshöhe konnte nur in dem Ansatz mit dem Herbizid Roundup® Max festgestellt werden. Die Wuchsminderung betrug bei diesem Ansatz in Bezug auf die Negativkontrolle im Schnitt 62 %.

Bei der zweiten Applikation im Sommer (Abbildung 3.15.; B) mit den gleichen Proben konnte nach Behandlung mit lyophilisiertem Kulturfiltrat aus der Submersfermentation mit

G. bidwellii eine Beeinträchtigung des Wachstums beobachtet werden. Im Schnitt betrug die Hemmung 16 %, bezogen auf die Negativkontrolle. Eine signifikante Hemmung war bei dieser Applikation jedoch nicht zu beobachten. Die Applikation mit extrahiertem Kulturfiltrat beeinflusste die Aufwuchshöhe der Vegetation innerhalb der Parzellen nicht. Ein signifikanter Unterschied in der Wuchshöhe konnte auch hier wieder nur bei der Positivkontrolle mit Roundup® Max mit einer Wuchsminderung von im Schnitt 52 % in Bezug auf die unbehandelten Ansätze festgestellt werden.

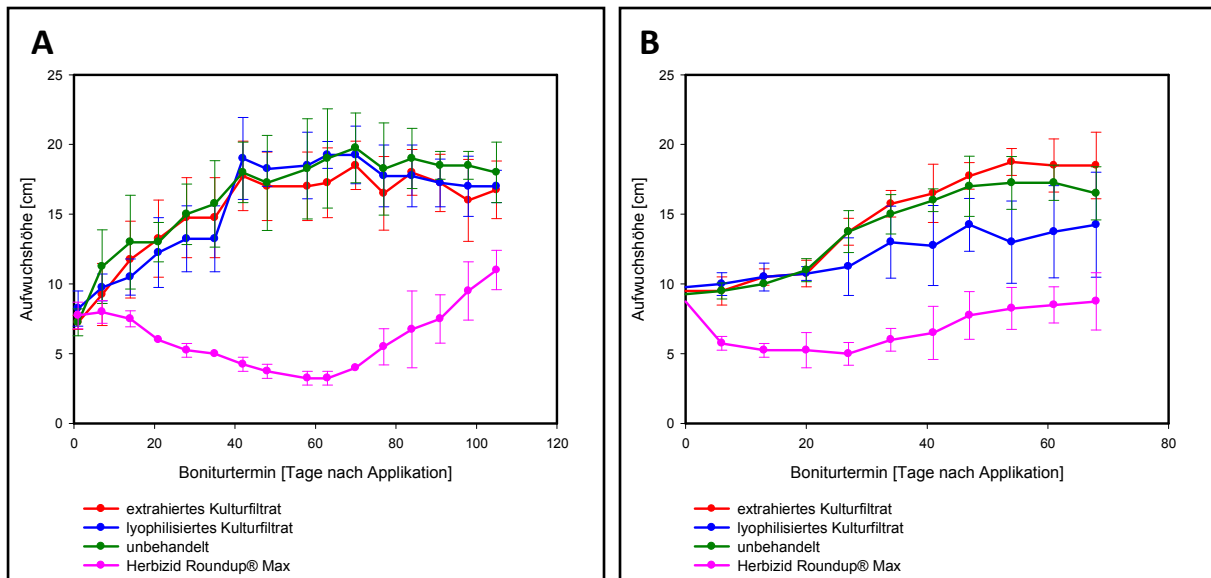


Abbildung 3.15.: Herbizide Aktivität von Kulturfiltraten aus Submersfermentation mit *Guignardia bidwellii* im Freilandversuch.

Für die Untersuchung, ob die Sekundärmetabolite aus *G. bidwellii* als potentielle Herbizide beschrieben werden können, wurde extrahiertes Kulturfiltrat (rot) und lyophilisiertes Kulturfiltrat (blau) aus einer Submersfermentation mit *G. bidwellii* auf die Vegetation einer Wiese im Frühjahr (A) und im Sommer (B) appliziert. Nach Applikation der Proben wurde wöchentlich eine Bonitur durchgeführt und die Aufwuchshöhe der Gräser [cm] dokumentiert. Als Negativkontrolle diente ein unbehandelter Ansatz (grün), als Positivkontrolle wurde die Vegetation mit dem Herbizid Roundup® Max behandelt (pink).

(A): Im Vergleich mit der Positivkontrolle führte die Applikation beider Kulturfiltrate zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums der Unkräuter.

(B): In Bezug auf die Positivkontrolle beeinflusst das lyophilisierte Kulturfiltrat tendenziell das Wachstum der Unkräuter, eine Hemmung kann aber nicht signifikant bestätigt werden. Die Applikation des extrahierten Kulturfiltrats führte zu keiner Inhibierung des Wachstums bei der Vegetation innerhalb der Parzellen.

In diesem Versuch wurden die Sekundärmetabolite von *G. bidwellii* in Gesamtextrakten im Freiland auf ihre Verwendung als Herbizide untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin,

dass die verwendete Gesamtkonzentration der Extrakte zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums der Vegetation im Testsystem geführt hat. Somit konnte keine herbizide Wirkung der Sekundärmetabolite aus *G. bidwellii* im Freilandversuch nachgewiesen werden. Es konnte lediglich eine Tendenz einer phytotoxischen Aktivität bei der Applikation des unbehandelten Kulturfiltrats im Sommer auf die Vegetation festgestellt werden. Da die Applikation des Kulturfiltrats im Laborversuch zu nekrotischen Läsionen an *V. vinifera* geführt hat (Molitor *et al.*, 2012), lag die Vermutung nahe, dass dies ebenfalls im Freilandversuch der Fall sein sollte. Um eine konkrete Aussage über die Verwendung der Substanzen als Herbizide treffen zu können, muss der Versuch zunächst mit den Reinsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen wiederholt werden. Die Applikation der Reinsubstanzen hat im Laborversuch an *V. vinifera*, *Oryza sativa* und *Triticum aestivum* als auch im Gewächshausversuch an *V. vinifera* zu Läsionen geführt. Daher ist zu empfehlen, dass in weiteren Untersuchungen zunächst, unabhängig von der Wirtschaftlichkeit, die bioherbizide Wirkung der Reinsubstanzen im Freiland geprüft werden sollte.

4. Diskussion

Die Schwarzfäule an Reben ist eine Pflanzenkrankheit, die ursprünglich aus Nordamerika stammt und durch den rebenpathogenen Ascomyceten *Guignardia bidwellii* verursacht wird (Hoffman *et al.*, 2002). Erstmals wurde die Erkrankung 1804 in Kentucky beschrieben (Reddick, 1911). Im Laufe der Jahre wurden weitere Schäden, die durch die Schwarzfäule verursacht wurden, in verschiedenen Regionen der Vereinigten Staaten von Amerika dokumentiert (Scribner, 1886). Seit 2002 wird die Schwarzfäule auch vermehrt in deutschen Weinbaugebieten beobachtet (Harms *et al.*, 2005), wobei besonders die Gebiete an Mosel, Mittelrhein und an der Nahe betroffen sind (Loskill *et al.*, 2009). Anfänglich wurde der Befall nur in unbewirtschafteten und verwilderten Weinbergen, sogenannten Drieschen, beobachtet, doch mit der Zeit hat sich der Erreger auch auf bewirtschaftete Weinberge ausgebreitet und kann dort zu Ernteausfällen von bis zu 80 % führen (Harms *et al.*, 2005). Ursachen für das plötzliche Auftreten von *G. bidwellii* in deutschen Weinbaugebieten sind zum einen die wachsende Zahl der Drieschen, die dem Pilz als Reservoir dienen, in dem er sich ungehindert vermehren kann (Loskill *et al.*, 2009), und zum anderen die globale Erderwärmung, die sich durch höhere Jahresmitteltemperaturen und veränderte Regenereignisse auszeichnet. Diese Faktoren führen dazu, dass der Erreger günstige Bedingungen für einen Befall vorfindet und sich somit auch in deutschen Weinbaugebieten etablieren konnte (Maixner, 2004).

Molitor und Beyer (2014) postulieren, dass die nekrotischen Läsionen auf befallenen Pflanzenorganen nach einer Infektion mit *G. bidwellii* ein Anzeichen dafür sind, dass Toxine, die vom Pilz sekretiert werden, an der Infektion beteiligt sein können (Molitor und Beyer, 2014). Die Hypothese wird durch die Identifizierung von verschiedenen phytotoxischen Substanzen aus Kulturen von *G. bidwellii* gestützt (Molitor *et al.*, 2012; Sommart *et al.*, 2012; Buckel *et al.*, 2013).

4.1. Der Sekundärmetabolismus von *Guignardia bidwellii*

Sommart *et al.* (2012) konnten vier Tricycloalternarenderivate (Guignarenone A-D) und die bereits bekannte Substanz (6S,9R)-Vomifoliol (Yamano und Ito, 2005) aus einer Submersfermentation mit *G. bidwellii* (Stamm PSU-G11) isolieren. Guignarenon A wurde als moderat cytotoxisch und (6S,9R)-Vomifoliol als phytotoxisch beschrieben. Für die drei weiteren Derivate von Guignarenon A sind keine biologischen Aktivitäten beschrieben (Sommart *et al.*, 2012). Molitor *et al.* (2012) isolierten zwei phytotoxische Substanzen, die Guignardic acid und die Phenguignardic acid, aus einer Submersfermentation mit *G. bidwellii*

(Stamm CBS 111645). Die Guignardic acid wurde bereits 2001 durch Rodrigues-Heerklotz *et al.* aus *Phyllosticta telopeae* isoliert, allerdings nicht als phytotoxisch, sondern als antibakteriell beschrieben. Die Phenguignardic acid wurde 2012 erstmals durch Molitor *et al.* isoliert. Beide Verbindungen werden einer neuen Naturstoffklasse zugeschrieben, die durch einen Dioxolanonring charakterisiert ist (Molitor *et al.*, 2012). Fermentationsoptimierungen der Submersfermentation mit *G. bidwellii* (Stamm CBS 111645) durch Buckel *et al.* (2013) führten zur Identifikation von sieben neuen Dioxolanonen, der Alaguignardic acid und den Guignardianonen A – F, von denen die Alaguignardic acid, Guignardianon E und Guignardianon F phytotoxisch sind (Buckel *et al.*, 2013).

Eine Applikation von 10 µg der Verbindungen Guignardic acid, Phenguignardic acid und Alaguignardic acid auf Wein-, Reis- und Weizenblätter führten innerhalb von vier Stunden zu einer signifikanten Läsionenbildung. Bei der Applikation von Guignardianon E und Guignardianon F konnte eine Läsionenbildung auf den entsprechenden Blattsegmenten ab 50 µg beobachtet werden (Molitor *et al.*, 2012; Buckel *et al.*, 2013). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die isolierten phytotoxischen niedermolekularen Verbindungen am Infektionsprozess von *G. bidwellii* beteiligt sein könnten und auch als konstitutive Virulenzfaktoren beschrieben werden könnten.

Virulenzfaktoren sind die auf strukturellen und/oder funktionellen Strukturen basierenden Fähigkeiten eines Erregers, in einen Wirtsorganismus einzudringen und sich dort trotz vorhandener Abwehrmechanismen zu vermehren (Stein, 2006). Dabei lassen sich die Virulenzfaktoren nach ihrer Funktion in Adhäsine, Invasine, Aggressine und Evasionsfaktoren einteilen (Mielke, 2004). Adhäsine vermitteln die Anheftung der Erreger an den Wirt, während die Invasine die Aufnahme der Erreger in die Zelle induzieren. Evasionsfaktoren befähigen den Erreger, sich der Abwehrmechanismen des Wirtes zu entziehen. Als Aggressine werden mikrobielle Faktoren bezeichnet, die zu einer direkten Schädigung von Zellen oder Gewebe führen. Dazu zählen vom Erreger sezernierte Toxine und Enzyme (Mielke, 2004).

Gemäß Bender *et al.* (1999) kann ein Toxin nur dann als konstitutiver Virulenzfaktor beschrieben werden, wenn folgende vier Kriterien erfüllt sind:

- 1.) Reproduktion der Krankheitssymptome durch Applikation der Reinsubstanz
- 2.) Korrelation zwischen Toxinmenge und Pathogenität
- 3.) Produktion des Toxins während des aktiven Wachstums des Pathogens in der Pflanze
- 4.) Fehlende Virulenz in Stämmen, die das Toxin nicht bilden können

Die Beobachtung der Läsionenbildung nach Applikation der phytotoxischen Dioxolanone aus *G. bidwellii* auf den Pflanzenblättern von Wein, Reis und Weizen bei Molitor *et al.* (2012) und Buckel *et al.* (2013) bestätigt das erste Kriterium von Bender *et al.* (1999). Ebenfalls konnte eine Korrelation zwischen Toxinmenge und Pathogenität beobachtet werden, so dass auch das zweite Kriterium zur Beschreibung der Substanzen als konstitutive Virulenzfaktoren erfüllt ist (Buckel, 2011).

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Erfüllung der letzten beiden Kriterien von Bender *et al.* (1999) überprüft und damit die Frage geklärt werden, ob es sich bei den phytotoxischen Dioxolanonen aus *G. bidwellii* um konstitutive Virulenzfaktoren handelt. Um die Erfüllung des vierten Kriteriums zu prüfen, ob ein nicht toxischer Stamm des Erregers avirulent ist, sollte eine toxinfreie Mutante von *G. bidwellii* generiert werden. Da bislang noch kein geeignetes Transformationssystem zur zielgerichteten Mutagenese für *G. bidwellii* bekannt ist, lag der Fokus im zweiten Teil dieser Arbeit darauf, ein Transformationssystem zur zielgerichteten Mutagenese von *G. bidwellii* zu etablieren.

4.2. Toxinnachweis *in planta*

Das dritte Kriterium von Bender *et al.* (1999) besagt, dass das Toxin während des aktiven Wachstums des Pathogens in der Pflanze produziert werden muss. Dementsprechend sollte das Toxin in infizierten Pflanzen nachweisbar sein. Die Produktion von Phytotoxinen *in planta* ist eine wichtige Voraussetzung, um beurteilen zu können, ob die Toxine am Infektionsprozess beteiligt sind. Die Produktion eines Phytotoxins unter Laborbedingungen in künstlichem Medium bedeutet nicht, dass dieses Toxin auch während des invasiven Wachstums in der Wirtspflanze sekretiert wird. Eine Produktion von Phytotoxinen in infiziertem Pflanzenmaterial konnte lange nicht nachgewiesen werden (Kohmoto, 1992). Ein Grund dafür lag vor allem in der schwierigen Detektion und Quantifizierung der niedermolekularen Substanzen *in planta*. Viele Phytotoxine sind hoch aktiv, so dass schon geringe Mengen des Toxins ausreichen, um während einer Infektion durch den Produzenten einen toxischen Effekt auf das Wirtsgewebe zu bewirken (Kheder *et al.*, 2012). Durch die Entwicklung und Verwendung der HPLC, einer schnellen und hoch sensitiven Methoden zur Ermittlung von Toxinen in infiziertem Pflanzengewebe, wurden diese Untersuchungen möglich (Kohmoto und Yoder, 1998).

Die Untersuchungen von mit *G. bidwellii* infiziertem Blattmaterial von *Vitis vinifera* führten zur Identifizierung des phytotoxischen Dioxolanons Guignardic acid mit einer Konzentration von 45 µg/g Blattmaterial (nass) im Pflanzenextrakt. Dieses Phytotoxin konnte in der Vergleichsprobe mit nicht-infiziertem Pflanzenmaterial nicht detektiert werden (Abbildung 3.1.). Demnach wird das Toxin Guignardic acid von *G. bidwellii* während des

invasiven Wachstums in der Pflanze gebildet. Dies bestätigt die Hypothese von Molitor und Beyer (2014), dass Phytotoxine für die Bildung der Nekrosen bei einer Infektion von *G. bidwellii* verantwortlich sein können. Die geringe Konzentration von 45 µg/g Blattmaterial (nass) macht die schwierige Detektion und Quantifizierung von niedermolekularen Substanzen *in planta* deutlich. Das dritte Kriterium nach Bender *et al.* (1999) bezüglich einer Beurteilung der Verbindungen als konstitutive Virulenzfaktoren konnte somit bestätigt werden.

4.3. Virulenzverlust in nicht toxischen Stämmen

Zur Bestätigung des vierten Kriteriums nach Bender *et al.* (1999), dass Stämme, die das entsprechende Toxin nicht produzieren, avirulent sind, wurde die Phytotoxinproduktion von drei weiteren bekannten phytopathogenen Arten und einer nicht virulenten Art der Gattung *Guignardia* untersucht. Zu den phytopathogenen Arten gehörten *Guignardia aesculi*, *Guignardia musae* und *Guignardia vaccinii*, während es sich bei der avirulenten Art um *Guignardia mangiferae* handelte.

4.3.1. Phytopathogene *Guignardia* Arten

G. aesculi verursacht die Blattbräune an Rosskastanien und ist in Europa und Nordamerika verbreitet. Die Blattbräune ist eine der bedeutsamsten Erkrankungen an Rosskastanien (Hudson, 1987). Der Pilz befällt im Frühjahr mittels Ascosporen junge Blätter und innerhalb der entstehenden Nekrosen werden Pyknidiosporen gebildet. Diese dienen der Ausbreitung des Pilzes auf weitere Blätter der Rosskastanie und führen dort zu sekundären Infektionen. Die Blätter sterben ab und im Herbstlaub überwintern die Fruchtkörper des Pilzes und neue Ascosporen werden gebildet. Das Schadbild auf Blättern, verursacht durch *G. aesculi*, äußert sich durch gelbe Infektionsflecken, die im Frühjahr erscheinen und sich häufig ab Juli zu unregelmäßig geformten großen braunen Blattflecken entwickeln, die von einem helleren, gelblichen Saum umgeben sind (Wulf und Pehl, 2005).

G. musae verursacht die *freckle disease* an Bananen und ist vor allem in Südostasien, auf den pazifischen Inseln und in Ostafrika weit verbreitet (Punithalingham und Holliday, 1975). Auch hier unterteilt sich die Infektion in eine primäre Infektion, die durch Ascosporen verursacht wird und eine sekundäre Infektion, die durch Pyknidiosporen ausgelöst wird. Die Symptome der Krankheit sind dunkle, braune Flecken auf den Früchten und Blättern, die zumeist von dunkelgrünen Höfen umgeben sind. Erste Anzeichen einer Infektion treten

innerhalb von zwei bis vier Wochen nach Staudenkeimung auf (Punithalingham und Holliday, 1975; Wong *et al.*, 2012).

G. vaccinii befällt die Fruchtknoten der Moosbeere und verursacht dabei die *cranberry fruit rot*. Diese Erkrankung ist vor allem in Nordamerika weit verbreitet und kann zu Ernteaussfällen von 50 – 100 % führen (Polashock *et al.*, 2009). Nach einer Infektion entstehen Nekrosen auf den Blättern und Früchten, die dazu führen, dass die Früchte verrotten und die Blätter abfallen (Weidemann *et al.*, 1982). Oft werden die Symptome auch erst nach der Ernte während der Lagerung beobachtet. Wann eine Infektion auftritt, ist stark von der Temperatur abhängig. Der Pilz wächst optimal bei einer Temperatur von 28 °C (Weidemann und Boone, 1983).

4.3.2. Avirulente *Guignardia* Art

G. mangiferae ist ein Endophyt, der nicht wirtsspezifisch ist. Hauptsächlich besiedelt der Pilz allerdings Zitruspflanzen und verschiedene Tropengewächse in Brasilien. Da es sich bei *G. mangiferae* um eine nicht-virulente Art der Gattung *Guignardia* handelt, zeigen besiedelte Pflanzen keine Anzeichen von Krankheiten (Wickert *et al.*, 2012). *G. mangiferae* ist eine reiche Quelle für Naturstoffe. So wurden 2006 vier Isolate von *G. mangiferae* identifiziert, deren Kulturfiltrate nach Submersfermentation antibakteriell gegen *Staphylococcus aureus* mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) im Bereich von 256 µg/ml bis 512 µg/ml wirkten (Pongpaichit *et al.*, 2006). Die Verbindungen, die für die antibakterielle Aktivität verantwortlich sind, wurden allerdings nicht identifiziert und isoliert. Im Jahr 2010 wurden von Yuan *et al.* drei antibakterielle Naturstoffe aus *G. mangiferae* isoliert und charakterisiert. Dabei handelte es sich um die Verbindungen Guignardon A-C, drei Meroterpene mit einem Grundgerüst, das vermutlich über den Shikimatstoffwechselweg synthetisiert wird (Yuan *et al.*, 2010). Weiterführende Untersuchungen von Guimarães *et al.* (2012) führten zur Identifizierung zweier weiterer Meroterpene, Guignardon D und Guignardon E, sowie einem Tricycloalternaren Derivat, dem Tricycloalternaren F. Eine biologische Aktivität der Verbindungen wurde nicht beschrieben.

4.3.3. Naturstoffanalyse der phytopathogenen *Guignardia* Arten

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Produktion von phytotoxischen Dioxolanonen in den drei phytopathogenen *Guignardia*-Arten in Submersfermentation führten zu dem Ergebnis, dass alle untersuchten Arten bekannte Verbindungen dieser Naturstoffklasse in das Medium sekretieren.

G. aesculi produziert die bekannte phytotoxische Verbindung Phenguignardic acid bis zu einer Konzentration von 41,2 mg/l (Abbildung 3.2.).

G. musae produziert die phytotoxischen Dioxolanone Guignardic acid und Phenguignardic acid, wobei die Konzentration mit 7,9 mg/l und 2,1 mg/l sehr gering war (Abbildung 3.3.).

Bei den Untersuchungen des Kulturfiltrats von *G. vaccinii* konnten eindeutig die Verbindungen Guignardic acid und Phenguignardic acid nachgewiesen werden. Der phytopathogene Pilz produziert diese niedermolekularen Substanzen in hohen Konzentrationen von 208,7 mg/l und 19,9 mg/l (Abbildung 3.4.). Damit ist *G. vaccinii* ein ähnlich guter Produzent für die beiden Verbindungen wie *G. bidwellii*, der Guignardic acid in Konzentrationen von 300 mg/l und Phenguignardic acid in Konzentrationen von 45 mg/l produziert (Buckel, 2011).

Die Tatsache, dass auch weitere phytopathogene *Guignardia*-Arten neben *G. bidwellii* die phytotoxischen Dioxolanone produzieren, bestätigt die Annahme, dass diese Toxine am Infektionsprozess beteiligt sind. Es ist bekannt, dass Phytotoxine, die als Virulenzfaktoren beschrieben wurden, oft charakteristisch für eine ganze Gattung von Pilzen sind (Berestetskiy, 2008). So produzieren beispielsweise alle bisher untersuchten *Drechslera*-Arten das phytotoxische Sesterterpenoid 6-Epiophiobolin (Strobel *et al.*, 1988), das als Virulenzfaktor beschrieben wurde (Xiao *et al.*, 1991). Ein weiteres Beispiel für ein Phytotoxin, das von einer ganzen Pilzgattung produziert wird und als Virulenzfaktor gilt, ist das Cercosporin aus der Gattung *Cercospora* (Fajola, 1978; Choquer *et al.*, 2005). Diese Beispiele lassen vermuten, dass es sich bei den phytotoxischen Dioxolanonen um konstitutive Virulenzfaktoren handelt und dass die bei der Infektion entstehenden Läsionen aus der Sekretion der Phytotoxine resultieren. Dies wird besonders auch in Hinblick darauf bestärkt, dass die drei phytopathogenen *Guignardia*-Arten auch ähnliche Symptome an ihren Wirtspflanzen verursachen wie *G. bidwellii* an *V. vinifera*.

4.3.4. Naturstoffanalyse der avirulenten *Guignardia* Art

Die Untersuchung von Kulturfiltraten aus Submersfermentationen mit dem Endophyten *G. mangiferae* ergaben allerdings, dass auch diese avirulente *Guignardia*-Art die phytotoxische Verbindung Guignardic acid mit einer Konzentration von 7,26 mg/l synthetisieren kann. Dennoch wird diese *Guignardia*-Art eindeutig als avirulent beschrieben (Wickert *et al.*, 2012). Studien zur genetischen Variabilität von *G. mangiferae* weisen aber auch darauf hin, dass ein starker Genfluss zwischen verschiedenen Populationen besteht (Wickert *et al.*, 2012). *G. mangiferae* lebt oft eng assoziiert mit dem phytopathogenen Pilz *Guignardia citricarpa*. Dieser Pilz befällt Citrusfrüchte und verursacht an diesen die

Schwarzfleckenkrankheit (*citrus black spot*, CBS). Wie die anderen schon beschriebenen phytopathogenen Arten, verursacht auch diese *Guignardia*-Art eine primäre Infektion über Ascosporen. Im Laufe des Sommers kommt es zu einer sekundären Infektion mittels Pyknidiosporen, die sich in den durch Ascosporen entstandenen Läsionen entwickeln (Agostini *et al.*, 2006). Die Infektion macht sich durch umgrenzte braune Flecken auf den Früchten bemerkbar, die von einem grünen Hof umgeben sind (Kotzé, 1981). Wickert *et al.* (2012) konnten auch eine enge phylogenetische Beziehung zwischen *G. mangiferae* und *G. citricarpa* nachweisen. Demnach besteht die Möglichkeit, dass zwischen den Arten ein Gentransfer stattgefunden hat, wodurch der Endophyt die nötige genetische Ausstattung zur Synthese der phytotoxischen Dioxolanone erlangt hat, diese aber aufgrund seiner mutualistischen Lebensweise in seiner Wirtspflanze nicht aktiviert. Eine andere Möglichkeit ist, dass *G. mangiferae* grundsätzlich auch innerhalb seines Wirtes die phytotoxischen Dioxolanone produziert, ein Auftreten von entsprechenden Symptomen aber durch die pflanzliche Abwehr verhindert wird. Schulz und Boyle (2005) nehmen an, dass es bei einer Pflanzen-Pilz-Interaktion keine neutrale Interaktion gibt. Vielmehr ist in jedem Endophyten ein gewisser Grad an Virulenz vorhanden, der eine Infektion der Wirtspflanze möglich macht. Die Pflanze hält wiederum Abwehrmechanismen bereit, die die Entwicklung der Erkrankung unterdrückt. Ob ein Endophyt asymptomatisch in seinem Wirt wächst, hängt nicht nur von einer Anpassung an seinen Wirt ab, sondern auch von seiner vorhandenen aber variablen Virulenz, der Abwehrreaktion der Pflanze und von Umweltbedingungen, auch bekannt unter dem Begriff „*disease triangle*“ (Schulz und Boyle, 2005). Kuldau und Yates (2000) beobachteten bei *Fusarium moniliforme* an Mais, dass experimentelle oder suboptimale umweltbedingte Umstände den Wirt stressen können und damit seine Abwehrmechanismen geschwächt werden. Dieser Effekt resultierte in auftretenden Krankheitssymptomen durch den ansonsten asymptomatischen Pilz. Maispflanzen, die keinem Stress ausgesetzt waren, wie beispielsweise durch Hitze oder Wassermangel, wiesen keine derartigen Symptome auf. Demnach kann die Möglichkeit, dass ein Pilz pathogen wird, obwohl er als avirulenter Endophyt isoliert wurde, nicht ausgeschlossen werden (Kuldau und Yates, 2000). Die Prädisposition der Partner und die Umweltbedingungen beeinflussen daher die Balance zwischen Wirt und Endophyt. Schulz und Boyle (2005) postulieren, dass sich eine Erkrankung der Pflanze durch einen Pilz nicht entwickeln kann, so lange die pilzliche Virulenz im Gleichgewicht zur Wirtsabwehr steht. Endophyten und phytopathogene Pilze produzieren beide oft die gleichen Virulenzfaktoren. Die Wirtspflanze kann auf den Endophyten mit den gleichen Abwehrreaktionen wie auf den phytopathogenen Pilz antworten, wobei das Gleichgewicht zwischen Endophyt und Wirtspflanze darin besteht, dass keiner der beiden dabei die Überhand gewinnt (Schulz und Boyle, 2005).

Durch die erhaltenen Ergebnisse aus der Untersuchung von phytopathogenen und avirulenten *Guignardia*-Arten konnte die Frage, ob Stämme, die das entsprechende Toxin nicht produzieren, avirulent sind, nicht endgültig beantwortet werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte daher eine toxinfreie Mutante von *G. bidwellii* generiert werden. Damit sollte die Frage, ob das vierte Kriterium von Bender *et al.* (1999) endgültig bestätigt werden kann, geklärt werden. Um aber regulierend in die Biosynthese der phytotoxischen Verbindungen eingreifen zu können, mussten zunächst erste Erkenntnisse über die Biosynthese dieser Naturstoffe gewonnen werden. Da diese niedermolekularen Substanzen einer neuen Naturstoffklasse zugeordnet werden (Molitor *et al.*, 2012), ist über die Biosynthese der Verbindungen noch nichts bekannt. Kenntnisse über die Biosynthese von Toxinen aus phytopathogenen Pilzen können darüber hinaus zur Entwicklung von Methoden führen, die es möglich machen, die Funktion der Toxine am Infektionsprozess zu untersuchen (Howlett, 2006) und nach spezifischen Inhibitoren der Toxinbiosynthese zu suchen (Berestetskiy, 2008).

4.4. Biosyntheseaufklärung

Bisher wurde vermutet, dass sich die phytotoxischen Dioxolanone von *G. bidwellii* aus jeweils zwei desaminierten Aminosäurevorstufen zusammensetzen. Bei allen bisher bekannten Verbindungen aus dieser Naturstoffklasse wird die Phenylbrenztraubensäure als grundlegender Synthesebaustein postuliert. Der zweite Reaktionspartner variiert je nach Verbindung und es wird eine Beteiligung von Phenylbrenztraubensäure (in Phenguignardic acid), Brenztraubensäure (in Alaguignardic acid), Dimethylbrenztraubensäure (in Guignardic acid) und 4-Hydroxy-Phenylbrenztraubensäure (in Guignardianon E und Guignardianon F) angenommen (Molitor *et al.*, 2012; Buckel *et al.*, 2013). Supplementationsversuche mit Phenylalanin verstärkten diese Hypothese, da experimentell eine Steigerung der Produktionsrate von Phenguignardic acid nach Zugabe von Phenylalanin in Submerskulturen von *G. bidwellii* beobachtet werden konnte (Buckel *et al.*, 2013).

Derartige Hypothesen, basierend nur auf struktureller Betrachtung und Supplementationsversuchen, lassen sich nicht immer bestätigen. Das konnten Schöffler *et al.* (2011) eindrucksvoll mit der Aufklärung der Biosynthese von Allantofuranon aus *Allantophomopsis lycopodina* demonstrieren. Die Struktur von Allantofuranon, die aus zwei Phenylpropanoid-Untereinheiten besteht, führt zu der Vermutung, dass dieser Naturstoff durch die Kondensation von zwei Molekülen Phenylalanin entsteht (Abbildung 4.1.).

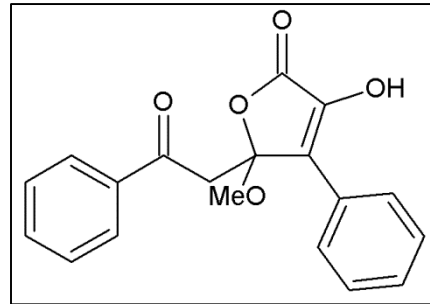


Abbildung 4.1.: Strukturformel von Allantofuranon aus *Allantophomopsis lycopodina*.

Die Struktur von Allantofuranon besteht aus zwei Phenylpropanoid-Untereinheiten, so dass vermutet werden kann, dass der Naturstoff durch eine Kondensation von zwei Molekülen Phenylalanin synthetisiert wird (Schüffler *et al.*, 2011).

Durch Supplementationen mit Phenylalanin in Submerskulturen von *A. lycopodina* konnte zusätzlich eine gesteigerte Produktionsrate von Allantofuranon beobachtet werden. In erweiterten Supplementationsversuchen mit ^{13}C markiertem Phenylalanin wurden allerdings Anreicherungen von ^{13}C an vier Positionen des Naturstoffs, anstelle der erwarteten zwei Positionen, detektiert. Dies führte letztendlich zu der Erkenntnis, dass Allantofuranon nicht durch die Kondensation zweier Phenylalanin Moleküle entsteht, sondern direkt aus der symmetrischen Polyporsäure, welche aus Phenylbrenztraubensäure gebildet wird (Schüffler *et al.*, 2011).

Um grundsätzlich zu klären, ob Aminosäuren als Vorstufen für die Biosynthese der phytotoxischen Dioxolanone aus *G. bidwellii* verwendet werden, wurden Supplementationsversuche in Submersfermentation mit *G. bidwellii* mit einer ^{13}C markierten Aminosäure durchgeführt. Die Phenylbrenztraubensäure (desaminiertes Phenylalanin) wird als zentraler Bestandteil aller Verbindungen betrachtet und deshalb wurde für die Untersuchungen ^{13}C markiertes Phenylalanin verwendet.

Die Untersuchungen mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie führten zu dem Ergebnis, dass Phenguignardic acid aus zwei Molekülen Phenylalanin synthetisiert wird, da eine Anreicherung von ^{13}C an den C-5 und C-6 Positionen im Molekül detektiert werden konnte (Abbildung 3.7.). Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass Phenylalanin als grundlegende Vorstufe für die Biosynthese aller phytotoxischen Dioxolanone verwendet wird, da auch bei den Verbindungen Guignardic acid und Alaguignardic acid eine Anreicherung von ^{13}C an der C-5 Position beobachtet werden konnte (Abbildung 3.8.).

Zur vollständigen Aufklärung der Biosynthese der phytotoxischen Dioxolanone gilt noch zu klären, wie die Verknüpfung der beiden Aminosäurevorstufen vermittelt wird und wie es zur Ausbildung des Dioxolanonrings kommt. Dieser Vorgang ist bisher noch nicht verstanden.

Eine Möglichkeit, den Mechanismus der Verknüpfung der beiden Aminosäurevorstufen zu identifizieren, ist die Verwendung von molekularbiologischen Methoden zur zielgerichteten Manipulation von biosynthetisch relevanten Genen (Howlett, 2006). Dafür müssten passende Kandidatengene oder auch Gencluster identifiziert werden, deren Genprodukte an der Biosynthese beteiligt sein könnten.

Gegen Ende der Arbeit konnten erste Ergebnisse aus der vergleichenden Transkriptomanalyse zwischen den Zuständen der Produktion und Nicht-Produktion durch Dr. Karsten Andresen (IBWF, Kaiserslautern) ermittelt werden. Dabei konnten erste Erkenntnisse über hochregulierte Gene während des Zustandes der Naturstoffproduktion von *G. bidwellii* gewonnen werden. Besonders interessant waren dabei die hochregulierten Gene, die für eine Aspartat-Protease, eine FAD-verbundenen Oxidase, eine FAD-bindenden Monooxygenase und eine Lovastatin Nonaketid Synthase kodieren.

Würde eine Inaktivierung der Gene zu einem toxfreien Phänotypen führen, könnten die Genprodukte der inaktivierten Gene an der Bildung des Dioxolanonrings beteiligt sein. Die Etablierung eines Transformationssystems für *G. bidwellii* ist somit nicht nur bezüglich der Klärung des 4. Kriteriums nach Bender *et al.* (1999) für die Beurteilung der Verbindungen als Virulenzfaktoren von Interesse, sondern kann auch zur Aufklärung der Biosynthese der Naturstoffe beitragen. So konnte beispielsweise ein essentielles Gencluster des biosynthetischen Signalwegs für das Toxin Sirodesmin PL aus *Leptosphaeria maculans* über molekularbiologische Methoden identifiziert werden. Die Gendisruption einer zweimodularen nichtribosomalen Peptidsynthetase (sirP) führte zu der Erkenntnis, dass diese Synthetase für die Biosynthese von Sirodesmin essentiell ist (Gardiner *et al.*, 2004).

4.5. Molekularbiologische Manipulation von *Guignardia bidwellii*

4.5.1. Identifizierung kodierender Sequenzen der zu untersuchenden Enzyme

Die Ergebnisse zur Biosynthese der phytotoxischen Dioxolanone weisen darauf hin, dass der Aminosäurestoffwechsel eine zentrale Position in der Biosynthese der Phytotoxine in *G. bidwellii* einnimmt.

Aus diesem Grund wurden drei Enzyme des Aminosäurestoffwechsels ausgewählt, deren kodierende Sequenzen durch zielgerichtete Mutagenese genetisch manipuliert werden sollten, um den Einfluss des entsprechenden Gens auf die Biosynthese der phytotoxischen Dioxolanone zu untersuchen und möglicherweise eine toxfreie Mutante zu generieren. Die Aspartat-Transaminase, die Chorismat-Synthase und die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase wurden ausgewählt. Diese drei Enzyme sind wichtig im Aminosäuremetabolismus und die letzten beiden katalysieren Reaktionen, die den primären und sekundären Stoffwechsel miteinander verbinden (1.6.). Mittels der *Saccharomyces* Genomdatenbank

(www.yeastgenome.org) wurde ermittelt, ob entsprechende defiziente Mutanten der Hefe als lebensfähig beschrieben wurden. Da dies der Fall war (Giaever *et al.*, 2002), wurde angenommen, dass eine Inaktivierung dieser Gene in *G. bidwellii* ebenfalls zu einem vitalen Phänotyp führen würde.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren keine Daten über Genomsequenzen von *G. bidwellii* verfügbar. Daher mussten die kodierenden Sequenzen der Enzyme zunächst über bioinformatische Methoden identifiziert werden. Zusätzlich wurden in Kooperation mit dem Institut für Molekulargenetik, gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) bei Prof. Dr. Schmidt, eine Genomsequenzierung aus genomischer DNA von *G. bidwellii* und eine Transkriptomanalyse aus RNA von *G. bidwellii* durchgeführt. Die Transkriptomanalyse wurde mit RNA durchgeführt, die sowohl zum Zeitpunkt der Toxinproduktion als auch zum Zeitpunkt, zu dem keine Phytotoxine produziert wurden, isoliert wurde.

Durch Bearbeitung der Rohdaten der Genomsequenzierung durch Dr. Karsten Andresen (IBWF, Kaiserslautern) konnte das Genom von *G. bidwellii* assembliert und die kodierenden Sequenzen der Enzyme eindeutig identifiziert werden (Tabelle 3.2.).

Mit einer Gesamtgröße von 27,13 Mbp ist das Genom von *G. bidwellii* im Vergleich zu dem der verwandten Pilze *Magnaporthe oryzae* oder *Neurospora crassa* verhältnismäßig klein, da die Genomgröße dieser beiden vollständig sequenzierten Pilze 41,7 Mbp bzw 41,04 Mbp beträgt (Dean *et al.*, 2005; Galagan *et al.*, 2003; <http://www.broadinstitit.com>). Zum Abgleich wurden die Gensequenzen und konservierten Domänen mit denen der entsprechenden Enzyme aus *M. oryzae* und *N. crassa* verglichen (Tabelle 4.1.). Die Basisinformationen der Enzyme, wie beispielsweise die Anzahl der Aminosäuren oder Introns, aus den beiden anderen Pilzen sind vergleichbar mit denen aus *G. bidwellii*. Darüber hinaus sind die konservierten Domänen in den entsprechenden Proteinsequenzen bei allen drei Pilzen identisch. Das belegt die korrekte Identifizierung der Sequenzen aus *G. bidwellii*.

Tabelle 4.1.: Basisinformationen der identifizierten Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase von *Guignardia bidwellii* im Vergleich mit Sequenzinformationen aus *Magnaporthe oryzae* und *Neurospora crassa* und zugehörigen konservierten Domänen.

Die Informationen bezüglich der Enzyme aus *G. bidwellii* wurden mit Angaben aus den Datenbanken der verwandten Pilzen *M. oryzae* und *N. crassa* verglichen. Die konservierten Domänen wurden mittels CD-Datenbank von NCBI ermittelt.

kDA: Kilodalton; bp: Basenpaare; ORF: *open reading frame*

Organismus	Aminosäuren	Molekulargewicht [kDa]	ORF mit Introns [bp]	Intronlänge [bp] (Position innerhalb der Sequenz)
<i>Guignardia bidwellii</i>	395	43,98	1340	73 (107) 79 (313)
konservierte Domänen				
<i>Magnaporthe oryzae</i>	458	50,16	1641	95 (241) 172 (396)
konservierte Domänen				
<i>Neurospora crassa</i>	428	47,13	1673	209 (127) 53 (346) 124 (450)
konservierte Domänen				
<i>Guignardia bidwellii</i>	406	43,67	1335	63 (35) 53 (461)
konservierte Domänen				
<i>Magnaporthe oryzae</i>	425	45,18	1275	---
konservierte Domänen				
<i>Neurospora crassa</i>	433	45,98	1421	57 (36) 65 (332)
konservierte Domänen				

Fortsetzung Tabelle 4.1.: Basisinformationen der identifizierten Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase von *Guignardia bidwellii* im Vergleich mit Sequenzinformationen aus *Magnaporthe oryzae* und *Neurospora crassa* und zugehörigen konservierten Domänen.

Organismus	Aminosäuren	Molekulargewicht [kDa]	ORF mit Intron [bp]	Intronlänge [bp] (Position innerhalb der Sequenz)
<i>Guignardia bidwellii</i>	728	77,95	2233	46 (283)
konservierte Domänen				
<i>Magnaporthe oryzae</i>	627	66,53	1881	---
konservierte Domänen				
<i>Neurospora crassa</i>	763	82,92	2368	74 (138)
konservierte Domänen				

Nachdem die putativen Gensequenzen der zu untersuchenden Enzyme identifiziert wurden, musste ein geeignetes Transformationssystem für die molekularbiologische Manipulation von *G. bidwellii* etabliert werden.

4.5.2. Identifizierung eines geeigneten Transformationssystems für *Guignardia bidwellii*

Die Entwicklung eines stabilen Transformationssystems für eine Spezies, für die noch kein System existiert, ist oftmals eine große Herausforderung. Dazu gehört an erster Stelle die Identifizierung von bestehenden und bei anderen artverwandten Spezies erfolgreich anwendbaren Methoden, gefolgt von der Modifizierung dieser Methoden, passend zum gewünschten Zielorganismus (Ruiz-Díez, 2002). Jede Methode muss auf den zu transformierenden Organismus optimiert werden und in der Regel sind je Organismus nur eine oder zwei der untersuchten Methoden erfolgreich (Meyer *et al.*, 2003). Häufig verwendete Transformationssysteme für filamentöse Pilze sind die Protoplastentransformation, die Lithiumacetat-vermittelte Transformation, die Transformation mittels Elektroporation, die biolistische Transformation mittels Genkanone und die

Agrobacterium tumefaciens-vermittelte Transformation (Ruiz-Díez, 2002; Michielse *et al.*, 2005). Eine Übersicht der Systeme ist in Tabelle 4.2. gegeben.

Tabelle 4.2.: Gebräuchliche Strategien für die Transformation von filamentösen Pilzen im Vergleich.

Die bekanntesten Transformationssysteme für filamentöse Pilze sind die Protoplastentransformation (PMT), die Lithiumacetat-vermittelte Transformation (LiAc), die Elektroporation (EP), die biolistische Transformation (BT) und die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation (ATMT), (angepasst nach Meyer, 2008).

Methoden	Prinzip	Vorteile	Nachteile
PMT	Präparation von Protoplasten unter Verwendung lytischer Enzyme.	Verschiedene Zelltypen wie Sporen, Keimlinge oder Mycel, können verwendet werden.	Die Zusammensetzung der lytischen Enzyme ändert die Transformationsrate. Benötigt einen Regenerationsprozess. Regeneration nach Transformation kann limitiert sein. zeitaufwändig Hohe Rate an Mehrfachintegrationen.
LiAc	Erhöhung der Permeabilität der Zellwand durch Verwendung von Alkalimetallionen.	Eine schnelle und einfache Methode mit hoher Stabilität und Zellviabilität.	Das Prinzip der DNA Aufnahme ist noch nicht vollständig verstanden.
EP	Aufnahme der DNA durch reversible Permeabilisierung der Membran, die durch einen lokalen elektrischen Impuls ausgelöst wird.	Verschiedene Zelltypen wie Sporen, Keimlinge oder Mycel, können verwendet werden.	Erfordert oft eine Präparation von Protoplasten, um die Zellen kompetent zu machen. Benötigt einen Regenerationsprozess. Regeneration kann limitiert sein.
BT	Wolframpartikel, die mit DNA ummantelt sind, werden mit hoher Geschwindigkeit in die zu transformierende Zelle befördert.	Zellwand der Empfängerzelle bleibt intakt, eine Vorbehandlung ist nicht notwendig.	Spezielle Geräte werden benötigt. Geringe Rekombinationseffizienz.

Fortsetzung Tabelle 4.2.: Gebräuchliche Strategien für die Transformation von filamentösen Pilzen im Vergleich.

Methoden	Prinzip	Vorteile	Nachteile
ATMT	<i>A. tumefaciens</i> enthält ein binäres Vektorsystem, bei dem sich die T-DNA zwischen den angrenzenden Sequenzwiederholungen auf einem Vektor und die Virulenzgene zur Vermittlung der Transformation auf dem anderen Vektor befindet.	Verschiedene Zelltypen wie Sporen, Keimlinge oder Mycel, können verwendet werden. Geringe Rate an Mehrfachintegrationen. Hohe Rekombinationseffizienz.	Vielzahl von Parametern während der Co-Kultivierung beeinflussen die Transformationsrate. Zeitaufwendiger als andere Methoden.

4.5.2.1. Protoplastentransformation

G. bidwellii konnte bereits erfolgreich mittels Protoplastentransformation genetisch manipuliert werden, indem transgene Stämme generiert wurden, die das calciumsensitive Lumineszenzprotein Apoaequorin exprimieren konnten (Shaw *et al.*, 2001).

Die Protoplastentransformation ist die häufigste Methode zur Transformation von Pilzen (Hynes, 1996). Für die Präparation der Protoplasten wurde langjährig der Enzymmix Novozym 234 genutzt, der aus *Trichoderma viride* isoliert wurde (Fincham, 1989). Dieser Enzymmix enthält verschiedene lytische Enzyme wie Chitinasen, β -1,3-Glucanasen und β -1,6-Glucanasen (Fortwendel *et al.*, 2008). Diese Enzyme sind verantwortlich für den Abbau der Pilzzellwand, deren Hauptkomponenten Chitin, β -1,3- und β -1,6-D-Glucan sind (Kindl, 2013). In den letzten Jahren ist Novozym 234 nicht mehr kommerziell erhältlich (Jung *et al.*, 2000), so dass Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum*, Zymolyase[®] aus *Arthrobacter luteus* und Glusulase[®] aus *Helix pomatia* alternativ verwendet werden. Alle Produkte enthalten eine charakteristische Mischung aus hydrolytischen Enzymen, deren anteilige Zusammensetzung von großer Bedeutung für die erfolgreiche Herstellung von Protoplasten ist (Fincham, 1989). Als pilzliches Ausgangsmaterial zur Generierung von Protoplasten können sowohl Konidien als auch Mycelien verwendet werden. Die Protoplasten werden osmotisch durch die Zugabe von Natriumchlorid, Magnesiumsulfat, Mannitol oder Sorbitol stabilisiert (Hynes, 1996). Hauptsächlich wird Sorbitol mit einer Konzentration zwischen 0,8 M und 1,2 M zur Stabilisierung genutzt (Ruiz-Diez, 2002). Für die Aufnahme der DNA ist die Anwesenheit von Calciumionen (10 mM) für das Transformationsereignis essenziell, gefolgt von einer Zugabe von Polyethylenglucol (PEG) in hohen Konzentrationen. Als Standard werden in vielen Protokollen 10 Volumen einer

40 %igen PEG 4000 Lösung verwendet (Fincham, 1989). PEG vermittelt in Kombination mit Calciumionen eine Bindung zwischen den Oberflächen der Protoplasten, so dass die Zellen verklumpen und die DNA-Aufnahme erleichtert wird (Kao *et al.*, 1974). Sowohl lineare als auch zirkuläre DNA ist für die Transformation als Ausgangsmaterial geeignet (Ruiz-Díez, 2002).

In Anlehnung an Shaw *et al.* (2001) wurden Protoplasten aus Mycel von *G. bidwellii* präpariert. Zur Degradierung der Zellwand wurden Lysin Enzymes from *Trichoderma harzianum* verwendet. Abweichend vom oben beschriebenen Standard wurden 60 %iges PEG 4000 und höhere Konzentrationen von Calciumionen und 8 µg/ml DNA gemäß Shaw *et al.* (2001) verwendet. Die osmotische Stabilisierung der Protoplasten wurde mit 1,2 M Sorbitol sichergestellt. Trotz eines vorhandenen Protokolls zur Transformation von *G. bidwellii* mittels Protoplasten und der Versuchsdurchführung in Anlehnung an erfolgreich durchgeführten Transformationen von anderen filamentösen Pilzen konnte keine erfolgreiche Transformation beobachtet werden.

Es gibt Faktoren, die eine Transformation mittels Protoplasten beeinträchtigen können. So ist die Zusammensetzung der lytischen Enzyme zur Zellwanddegradierung wichtig. Auch eine geringere Konzentration des osmotischen Stabilisators im Regenerationsmedium kann zu einer besseren Transformationsrate führen (Ruiz-Díez, 2002). Grundsätzlich ist die Durchführung der Protoplastenpräparation nicht kompliziert, allerdings gibt es speziesspezifische Unterschiede. Aufgrund der langen Regenerationszeit ist es schwierig, die optimalen Bedingungen für jede Spezies zu ermitteln. Dazu kommt, dass bei vielen Pilzstämmen unzureichende Mengen an Protoplasten gebildet werden oder die Regeneration der Protoplasten nach der Transformation limitiert ist (Fincham, 1989).

4.5.2.2. Lithiumacetat-vermittelte Transformation

Um die Präparation von Protoplasten zu vermeiden, gibt es zum einen die Möglichkeit, Mutantenstämme mit permeableren Membranen oder Zellwänden zu verwenden oder zum anderen die Möglichkeit, Alkalimetallionen einzusetzen, um die Permeabilität der Zellwand zur Aufnahme der DNA zu erhöhen (Fincham, 1989). Diese Methode mit Lithiumionen wurde an *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich etabliert (Ito *et al.*, 1983) und konnte auch für Pilze wie *N. crassa*, *Coprinus cinereus* und *Ustilago violacea* erfolgreich angewendet werden (Dhawale *et al.*, 1984; Binnering *et al.*, 1987; Bej und Perling, 1989). Unter Standardbedingungen findet die Transformation der Sporen in Anwesenheit von DNA und 0,1 M Lithiumacetat statt. Dabei kann gleichermaßen lineare sowie zirkuläre DNA eingesetzt werden (Dhawale *et al.*, 1984). Wie genau die Alkalimetallionen die Aufnahme der DNA in die Zellen unterstützen ist noch unklar. Ähnlich wie bei der Protoplasten-vermittelten

Transformation ist die Anwesenheit hoher Konzentrationen von PEG in Verbindung mit Calciumchlorid für die DNA-Aufnahme notwendig (Ruiz-Díez, 2002).

Obwohl diese Methode erfolgreich für einige filamentöse Pilze durchgeführt wurde, konnte nach der Anwendung der Lithiumacetat-vermittelten Transformation bei *G. bidwellii* kein Wachstum von Transformanten beobachtet werden.

Dabei würde eine erfolgreiche Transformation mittels Lithiumacetat zu einer Vielzahl von Vorteilen gegenüber der Protoplastentransformation führen. So beschreiben Dhawale *et al.* (1984), dass es sich um eine schnelle, einfache und zuverlässige Methode handelt, wodurch Zeit und Material gespart werden kann. Weiter konnte diese Arbeitsgruppe eine höhere Anzahl an stabilen Transformanten und eine Zellviabilität von 100 % (im Gegensatz zu 10 % – 50 % Regenerationseffizienz bei Protoplasten) beobachten (Dhawale *et al.*, 1984).

4.5.2.3. Elektroporation und biolistische Transformation

Eine weitere Transformationsmethode für filamentöse Pilze ist die Elektroporation. Diese Methode basiert auf der reversiblen Permeabilisierung der Membran, die durch einen kurzen, aber starken elektrischen Impuls ausgelöst wird. Durch diese Membranveränderung kann die Zelle rekombinante DNA aufnehmen (Ruiz-Díez, 2002). Das Zellmaterial für eine Elektroporation kann entweder mit zellwanddegradierenden Mitteln vorbehandelt werden, um Protoplasten zu generieren (Chakraborty *et al.*, 1991; Kothe und Free, 1996), oder unbehandelt eingesetzt werden (Margolin *et al.*, 1997). Mittels Elektroporation wurden bereits einige filamentöse Pilze, wie unter anderem *N. crassa*, *L. maculans*, *Aspergillus oryzae*, *Scedosporium prolificans*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus fumigatus*, erfolgreich transformiert (Chakraborty *et al.*, 1991; Ozeki *et al.*, 1994; Kwon-Chung *et al.*, 1998; Ruiz-Díez und Martínez-Suárez, 1999).

Bei der Transformation mittels Elektroporation von *G. bidwellii* wurde die Methode von Margolin *et al.* (1997) angewendet, bei der eine Vorbehandlung des Zellmaterials nicht notwendig ist. Die Methode wurde sowohl mit zirkulärer als auch linearisierter Plasmid-DNA mit verschiedenen Einstellungen des Elektroporators durchgeführt. Keine der Experimente resultierten in Transformanten von *G. bidwellii*.

Die bisher beschriebenen Transformationssysteme führten zu keinem Wachstum von Transformanten von *G. bidwellii*. Ein Grund dafür kann vor allem die dicke und stark melanisierte Zellwand von *G. bidwellii* sein (Ullrich *et al.*, 2009). Eine Methode, die sich vor allem bei solchen dickwandigen Pilzsporen durchgesetzt hat, ist die biolistische Transformation mittels Genkanone. Bei dieser Methode macht man sich Wolframpartikel, die

mit der entsprechenden DNA umhüllt werden, zunutze und beschleunigt diese mit hoher Geschwindigkeit direkt auf die Pilzspore. Mit dieser Methode konnten bereits einige filamentöse Pilze wie *N. crassa*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus nidulans* oder *Trichoderma reesei* erfolgreich transformiert werden (Riach und Kinghorn, 1996; Gomes-Barcellos *et al.*, 1998; Hazell *et al.*, 2000; Ruiz-Díez, 2002). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass besonderes Equipment benötigt wird (Meyer, 2008), weswegen diese Methode an *G. bidwellii* nicht durchgeführt wurde.

4.5.2.4. *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation

Eine neue Methode zur Transformation von *S. cerevisiae* wurde 1995 von Bundock *et al.* vorgestellt. Dabei handelt es sich um die Transformation mittels *A. tumefaciens*.

A. tumefaciens ist ein gram-negatives pflanzenpathogenes Bakterium, das Wurzelhalsgallentumore an Pflanzen verursacht (Stafford, 2000). Diese Tumore entstehen durch die Übertragung von Transfer (T)-DNA, die in einem Tumor-induzierenden (Ti)-Plasmid integriert ist. Die Expression der auf der T-DNA lokalisierten Gene führt zum unkontrollierten Wachstum in der Pflanze. Das Ti-Plasmid enthält weiter eine Region mit Virulenzgenen, die für die Übertragung der T-DNA notwendig sind. Dabei ist die T-DNA von einer Signalsequenz umgeben, die als *right border* und *left border* bezeichnet wird, die als Initiations- bzw. Terminationspunkt der zu übertragenden T-DNA dient (Zhu *et al.*, 2000).

Für die Verwendung von *A. tumefaciens* im Labor zur Transformation von Pilzen macht man sich ein modifiziertes binäres Vektorsystem zunutze, bei dem zwei Plasmide Anwendung finden. Auf dem einen Plasmid befindet sich die T-DNA und auf dem anderen Plasmid befinden sich die Virulenzgene. Dadurch wird eine genetische Manipulation der T-DNA-Region möglich (Kempken und Kempken, 2013). Die Transformation wird über die Virulenzgene vermittelt. Phenolische Verbindungen, wie Acetosyringon, induzieren die Transkription dieser Virulenzgene, wodurch der Transfer der T-DNA in *A. tumefaciens* angeregt wird (de Groot *et al.*, 1998). Nach dem Transfer in die Wirtszelle gelangt die T-DNA in den Zellkern und wird mittels homologer Rekombination oder zufällig in das Genom integriert.

Dieses Transformationssystem konnte auch erfolgreich für filamentöse Pilze etabliert werden (de Groot *et al.*, 1998). Darunter auch Pilze, die bislang für andere bekannte Transformationssysteme unzugänglich waren, wie *Calonectria morganii*, *Fusarium circinatum* und *Helminthosporium turcicum* (Malonek und Meinhardt, 2001; Covert *et al.*, 2001; Degefu und Hanif, 2003). Die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation hat viele Vorteile gegenüber den bisher beschriebenen Methoden zur Transformation von Pilzen. So kann verschiedenes Ausgangsmaterial zur Transformation verwendet werden, wie Konidien oder

Mycel. Eine Präparation von Protoplasten ist nicht mehr nötig. Ebenso kann eine hohe Frequenz an Transformanten erzielt werden, bei denen die DNA als *single copy* ins Genom integriert wurde. Ebenso ist die Rekombinationseffizienz hoch.

Aus der Literatur ist ein erfolgreiches Protokoll zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation von *G. citricarpa* bekannt (Figueiredo *et al.*, 2010). In Anlehnung an dieses Protokoll konnte eine erfolgreiche Transformation von *G. bidwellii* mittels *A. tumefaciens* beobachtet werden. Allerdings war die Transformationsfrequenz sehr gering, da nur eine Transformante isoliert werden konnte. Eine Reproduzierbarkeit war auch nicht gegeben. Die Transformante wurde mittels PCR überprüft und eine Integration der HPT-Kassette konnte bestätigt werden (Abbildung 3.10.). Ebenso konnte die Expression der eingebrachten GFP Sequenz beobachtet werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht, die Methode besonders in Hinblick auf eine zielgerichtete Mutagenese mittels homologer Rekombination von *G. bidwellii* zu optimieren.

4.5.3. Zielgerichtete Mutagenese in *Guignardia bidwellii* mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation

Nachdem die kodierenden Sequenzen der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *G. bidwellii* sowie ein geeignetes Transformationssystem für diesen Pilz identifiziert wurden, sollte die Expression der Enzyme auf transkriptioneller Ebene gestört werden, um einen toxfreien Phänotyp zu erhalten und einen daraus resultierenden, möglichen Virulenzverlust zu untersuchen.

In Pilzen kann eine solche zielgerichtete Mutagenese durch homologe Rekombination erreicht werden. Dafür wird der entsprechende Organismus mit einer Insertionskassette transformiert, die eine zur Sequenz des Zielgens homologe Sequenz enthält. Diese Sequenz wird durch ein Selektionsmarkergen unterbrochen oder ersetzt. Die Effizienz der zielgerichteten Mutagenese in filamentösen Pilzen hängt dabei unter anderem von der Länge der flankierenden homologen Bereiche im Genom, dem Grad an Homologie und der Transformationsmethode ab (Weld *et al.*, 2006). Die Wahl des Selektionsmarkergens ist entscheidend, ebenso wie die Wahl des Promotors, mit dem die Expression des Gens kontrolliert wird (Bowyer, 2001).

Für die zielgerichtete Mutagenese durch homologe Rekombination in filamentösen Pilzen eignen sich alle zuvor beschriebenen Transformationssysteme, wobei die biologische Transformation und die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation für eine homologe Rekombination am geeignetsten erscheinen (Weld *et al.*, 2006). Aufgrund der hohen Transformationseffizienz durch *A. tumefaciens* und der Tatsache, dass bei der Verwendung dieses Systems bei der zufälligen Mutagenese in *G. bidwellii* ein erfolgreiches

Transformationsereignis beobachtet werden konnte (3.4.2.), wurde die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation für die Durchführung der zielgerichteten Mutagenese in *G. bidwellii* verwendet.

Für die Transformation von *G. bidwellii* wurde eine Insertionskassette konstruiert, in der die jeweilige kodierende Sequenz des entsprechenden Enzyms aus *G. bidwellii* enthalten war, welche von 200 – 1000 bp großen zur Zielsequenz homologen Bereichen im Genom flankiert wurde. Anschließend wurde die jeweilige kodierende Sequenz mit einem Selektionsmarkergen teilweise oder ganz ersetzt, so dass es bei einem Einbau der rekombinanten DNA ins Genom von *G. bidwellii* zu einer gestörten Genexpression kommen sollte.

Da die Effizienz der Rekombination in filamentösen Pilzen unter anderem von der optimalen Länge der flankierenden homologen Bereiche abhängt (Weld *et al.*, 2006), wurden unterschiedlich lange, zur Zielsequenz homologe Bereiche konstruiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass für eine erfolgreiche homologe Rekombination in Pilzen je nach Organismus unterschiedlich lange homologe Bereiche Anwendung finden. Gemäß Meng *et al.* (2007) ist die zielgerichtete Mutagenese durch homologe Rekombination bei filamentösen Pilzen am effizientesten, wenn an beiden Enden der Zielsequenz homologe Bereiche von mindestens 400 bp vorhanden sind. Der homologe Bereich für die effektive Transformation von filamentösen Pilzen kann aber auch je nach Spezies von 0,5 kb bis 4,5 kb variieren (Bird und Bradshaw, 1997; Nelson *et al.*, 2003). Für eine effiziente Transformation von *S. cerevisiae* werden nur geringe homologe Bereiche von etwa 30 – 50 bp benötigt (Meyer, 2008). In *Aspergillus awamori* konnte die Transformationseffizienz mit einem flankierenden homologen Bereich von 1000 bp um das dreifache gesteigert werden, in Bezug auf Transformationen mit geringeren zur Zielsequenz homologen Bereichen (Michielse *et al.*, 2005).

Demnach wurden flankierende Bereiche von 200 bp, 500 bp und 1000 bp für die Transformation von *G. bidwellii* verwendet. Die Veränderung der Länge der flankierenden homologen Bereiche führte jedoch zu keiner erfolgreichen Transformation.

Für eine erfolgreiche Transformation ist auch die Wahl des Selektionsmarkers relevant. Es gibt verschiedene Resistenzmarkergene, die für Resistenzen gegen Hygromycin B, Bialophos, Phleomycin, Sulfonylharnstoff und Benomyl kodieren (Hynes, 1996; Bowyer, 2001).

Für die Transformation von *G. bidwellii* wurden Selektionsmarkergene verwendet, die für eine Hygromycin B- und Bialophos-Resistenz kodieren. Hygromycin B ist ein aminoglykosidisches Antibiotikum, das das Wachstum von Prokaryoten, Pilzen und Säugerzellen inhibiert, indem es die Proteinbiosynthese zum Zeitpunkt der Translokation stört (Neuman *et al.*, 2001). Bialophos ist ein natürlich vorkommendes Tripeptid, das von *Streptomyces hygroscopicus* produziert wird. Die Verbindung wird zu Phosphinothricin

abgebaut und agiert als Inhibitor der Glutaminsynthese. Das Bialophosresistenzgen BAR kodiert für die Phosphinothricin Acetyltransferase und wird bei der Transformation von vielen filamentösen Pilzen als Selektionsmarker verwendet (Bowyer, 2001). Eine erfolgreiche Transformation konnte mit beiden Selektionsmarkergenen nicht erreicht werden.

Doch nicht nur das Selektionsmarkergen selbst, sondern auch die Wahl des Promotors für die Kontrolle dieses Selektionsmarkergens kann die Transformationseffizienz beeinflussen (Bowyer, 2001). Die verwendete Hygromycinresistenzkassette steht unter der Kontrolle des *trpC*-Promotors aus *A. nidulans* (Carroll *et al.*, 1994). Dieser Promotor reguliert die Expression von Genen, die für die Tryptophan-Biosynthese wichtig sind (Hamer und Timberlake, 1987). Ein oft verwendeter Promotor für Transformationen von Pilzen ist auch der *gpdA*-Promotor aus *A. nidulans* (Bowyer, 2001). Dieser Promotor wurde bei bisher erfolgreichen Transformationen von *Guignardia* sp. verwendet (Shaw *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 2010) und reguliert die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Dieses Enzym katalysiert einen wichtigen Schritt in der Glycolyse und ist daher für alle Lebewesen unentbehrlich (Nelson *et al.*, 2005). Das verwendete Bialophosresistenzgen steht unter der Kontrolle dieses Promotors. Ein weiterer Promotor ist der *EFA1*-Promotor, der konstitutiv ist und somit das Expressionslevel des Selektionsmarkergens deutlich steigern und somit die Transformationseffizienz verbessern kann. Der *EFA1*-Promotor reguliert die Expression des Elongationsfaktor 1 α , der für den effizienten Transport der Aminoacyl-tRNA zu den Ribosomen verantwortlich ist (Steiner und Philippsen, 1994). Das Protein ist hoch konserviert und kommt ubiquitär in Eukaryoten vor (Roger *et al.*, 1999). Der Promotor wurde bereits zur Transformation in anderen Pilzen erfolgreich eingesetzt (Steiner und Philippsen, 1994). Grundsätzlich kann aber gesagt werden, dass die Effizienz der Transformation am größten ist, wenn das Selektionsmarkergen unter der Kontrolle eines pilzeigenen Promotors steht (Bowyer, 2001). Die zielgerichtete Mutagenese von *G. bidwellii* mit dem Hygromycin-Phosphotransferasegen unter der Kontrolle des *trpC*-Promotors war nicht erfolgreich. Möglicherweise ist die Promotorsequenz in *G. bidwellii* nicht hoch konserviert, so dass der Promotor nicht kompatibel für eine Transformation von *G. bidwellii* ist. Die Verwendung des Bialophosgens unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors führte ebenfalls zu keinem Wachstum von Transformanten. Daher wurde, nachdem erste Ergebnisse der Genomsequenzierung von *G. bidwellii* vorlagen, die kodierende Sequenz des Elongationsfaktors 1 α in *G. bidwellii* und darüber hinaus der zugehörige Promotor identifiziert. Ein Kriterium zur Auswahl dieses Promotors aus dem Genom von *G. bidwellii* war, dass der Vektor pCAMBIA-HPT-EFA-GFP, der zur bereits beschriebenen erfolgreichen randomisierten Transformation genutzt wurde (3.4.2.), unter der Kontrolle eines *EFA1*-Promotors aus *Magnaporthe oryzae* steht.

Nach erfolgreicher Identifizierung und Amplifikation der Promotorsequenz wurde der *trpC*-Promotor der Hygromycinresistenzkassette mit dem *EFA1*-Promotor aus *G. bidwellii* ausgetauscht und die neu konstruierte Resistenzkassette wurde zur Inaktivierung der kodierenden Sequenzen der zu untersuchenden Enzyme Aspartat-Transaminase, Chorismat-Synthase und Phenylalanin-Ammoniak-Lyase verwendet. Mit den konstruierten Inaktivierungsvektoren wurde eine Transformation mittels *A. tumefaciens* in *G. bidwellii* durchgeführt. Dabei wurden zur Zielsequenz homologe flankierende Bereiche von 1000 bp verwendet. Eine erfolgreiche Transformation konnte auch mit Verwendung eines pilzeigenen Promotors nicht beobachtet werden.

Da die Transformation von *G. bidwellii* mittels *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation auch nach Modifizierung der zu übertragenden DNA nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden die Bedingungen der Transformationsmethode näher betrachtet und optimiert.

4.5.4. Optimierung der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation

Jeder Pilz benötigt seine eigenen optimalen Bedingungen für eine erfolgreiche Transformation mittels *A. tumefaciens*. Somit gibt es eine Vielzahl an Parametern, die die Transformationsfrequenz beeinflussen können, wie beispielsweise das Alter des verwendeten Ausgangsmaterials oder die Bedingungen der Co-Kultivierung von Bakterium und Pilzmaterial (Michielse *et al.*, 2005).

Da für *G. bidwellii* keine etablierte Methode zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation verfügbar war, wurden einzelne Parameter der bereits beschriebenen Methode für *M. oryzae* (de Groot *et al.*, 1998) auf den rebenpathogenen Pilz optimiert (Tabelle 3.7.).

Bei den Versuchen wurden die Zelldichte der Bakteriensuspension von *A. tumefaciens* bei einer OD₆₀₀, das Mischungsverhältnis von Mycel [g] zu Bakteriensuspension [ml], die Acetosyringon-Konzentration [µM], die Co-Kultivierungsdauer [d] und die Kultivierungsdauer der Pilzkultur [d] variiert. Ebenfalls wurden Transformationsversuche unternommen, bei denen Lysin Enzymes from *Trichoderma harzianum* [5 mg/ml] oder Trizyclazol [400 µM] zugesetzt wurden.

Die Optimierung ergab, dass eine Veränderung der Bakteriendichte, des Verhältnisses von Bakterien zu Pilzmycel und des Alters der Pilzkultur die Transformation des Pilzes positiv beeinflusste.

Bei den Transformationsversuchen von *G. bidwellii*, bei denen die Bakteriendichte vor der Co-Kultivierung eine OD₆₀₀ von 0,6 hatte, konnte nach der Transformation von *G. bidwellii* kein Wachstum von Transformanten beobachtet werden. Bei einer Erhöhung der Bakteriendichte auf eine OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 konnte hingegen nach der Transformation ein

Wachstum von *G. bidwellii*-Transformanten beobachtet werden. Eine gleiche Beobachtung war bei der Erhöhung des Verhältnisses von Bakterien zu Pilzmycel während der Co-Kultivierung möglich. Wurde das ursprüngliche Verhältnis Mycel [g] : Bakteriensuspension [ml] von 2:4 auf 2:6 erhöht, konnte ein Wachstum von Transformanten beobachtet werden. Allerdings konnte dies bei einer weiteren Erhöhung des Verhältnisses auf 1:8 nicht mehr beobachtet werden. Optimierungen an anderen Pilzen haben zu ähnlichen Ergebnissen geführt. So führt eine Erhöhung des Verhältnisses zwischen *A. tumefaciens* und dem zu transformierenden Pilzmaterial in der Regel zu einer erhöhten Transformationsfrequenz (Michielse *et al.*, 2005). Allerdings kann ein zu hoher Anteil von *A. tumefaciens* die Effizienz der Transformation wieder verringern, was vermutlich durch Nährstoff- und Platzmangel bedingt ist (Meyer *et al.*, 2003). Damit ist zu erklären, warum eine Erhöhung des Bakterienanteils auf 1:8 zu keinem Wachstum von Transformanten geführt hat.

Die Kultivierungsdauer der Pilzkultur hat sich ebenfalls positiv auf das Wachstum von Transformanten ausgewirkt. Im Gegensatz zu sieben Tage alten Vorkulturen von *G. bidwellii* konnte ein Wachstum von Transformanten bei Verwendung einer Vorkultur mit einer Kultivierungsdauer von 12 Tagen beobachtet werden. Auch Michielse *et al.* (2005) konnten bestätigen, dass das Alter des Ausgangsmaterials die Transformationsfrequenz beeinflusst, wobei das zunehmende Alter der Konidien von *A. awamori* in einer verringerten Transformationsfrequenz resultierte.

Neben den bisher erwähnten Parametern ist der Transferinitiator Acetosyringon ein wichtiger Faktor für die Transformationseffizienz. Eine Zugabe von Acetosyringon zur Vorkultur der Bakterien ist für eine erfolgreiche Transformation nicht unbedingt notwendig, kann aber bei einigen Pilzen eine höhere Transformationsfrequenz herbeiführen. Ebenso kann eine höhere Konzentration dieser phenolischen Verbindung die Transformation positiv beeinflussen. Leclerque *et al.* (2003) konnten eine gesteigerte Transformationsrate bei einer Erhöhung der Acetosyringonkonzentration bis zu 500 μM beobachten, wenn diese sowohl in der Vorkultur von *A. tumefaciens* als auch während der Co-Kultivierung verwendet wurde.

Bei *G. bidwellii* hatte die Acetosyringonkonzentration keinen Einfluss auf die Effizienz der Transformation. Nach einer Erhöhung der Konzentration bis zu 600 μM sowohl in der Vorkultur von *A. tumefaciens* als auch während der Co-Kultivierung war keine Verbesserung der Transformationseffizienz zu beobachten. Ebenso konnte nicht bestätigt werden, dass die Co-Kultivierungsdauer einen Einfluss auf die Transformationseffizienz von *G. bidwellii* hat, obwohl auch hier verschiedene Studien belegen, dass bei jedem Pilz eine optimale Co-Kultivierungsdauer für die Transformation benötigt wird (Meyer *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2003; Gardiner und Howlett, 2004). Die Verlängerung der Co-Kultivierungsdauer auf bis zu sechs Tage führte bei der Transformation von *G. bidwellii* unter Standardparametern zu keinem Wachstum von Transformanten.

Weitere Parameter, die die Transformationseffizienz bei Pilzen beeinflussen können, sind die Wahl des *A. tumefaciens*-Stamms und des Filters, auf dem die Co-Kultivierung durchgeführt wird. Für die Transformation von *G. bidwellii* wurde der weiterentwickelte Stamm AGL-1 des supervirulenten Stamms A281 verwendet. Bei diesem Stamm ist die Expressionsrate der Virulenzgene erhöht und dessen Verwendung hat bei einer Vielzahl von Pilzen, im Vergleich mit anderen *A. tumefaciens*-Stämmen, wie LBA 1100 oder LBA 4404, zu einer höheren Transformationsfrequenz geführt (Campoy *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004).

Die Co-Kultivierung kann auf Nitrocellulosefiltern, Hybond-N Nylonfiltern, Cellophanfolie oder Polyvinylidenfluorid durchgeführt werden (Michielse *et al.*, 2005). Für die Co-Kultivierung von *G. bidwellii* wurden Nitrocellulosefilter verwendet. Bei Untersuchungen an *A. awamori* und *Phytophthora infestans* konnte beobachtet werden, dass es bei einer Co-Kultivierung auf Nitrocellulosefiltern zu keinem Wachstum von Transformanten kam, wohingegen ein Wachstum bei einer Co-Kultivierung auf anderen Filtern, wie Hybond-N+, beobachtet werden konnte (Vijn und Govers, 2003; Michielse *et al.*, 2005).

Demnach wäre es sinnvoll, weitere *A. tumefaciens*-Stämme für die Transformation von *G. bidwellii* zu untersuchen, um zu prüfen, ob ein anderer Stamm zu einer verbesserten Transformationseffizienz führen würde. Daneben sollte die Verwendung weiterer Filtertypen, wie beispielsweise Hybond-N+ Nylonfilter, für die Co-Kultivierung untersucht werden, um einen Einfluss des Filters auf die Transformationseffizienz beurteilen zu können.

Ein Hauptproblem bei der Transformation von *G. bidwellii* bestand auch darin, dass nach zunächst erfolgreicher Integration der rekombinanten DNA in das Genom von *G. bidwellii*, das Konstrukt offensichtlich nicht stabil integriert wurde. Nach längerer Subkultivierung wurde ein Verlust der Resistenz beobachtet, wodurch eine weitere Kultivierung und Charakterisierung der Transformanten nicht möglich war. Ein Grund für den Verlust des transformierten Phänotyps kann die mitotische Instabilität der Resistenz sein. Monfort *et al.* (2003) beschreiben ein ähnliches Phänomen bei der Transformation von *Mucor miehei*. Obwohl die Anwesenheit von Fremd-DNA mittels PCR-Analysen der Transformanten-DNA bestätigt werden konnte, war die Erhaltung des transformierten Phänotyps in *M. miehei* nur unter kontinuierlichem Selektionsdruck möglich. Sobald der Pilz nicht mehr auf selektivem Medium kultiviert wurde, konnte ein Wachstum nach erneuter Kultivierung auf Selektionsmedium nicht mehr beobachtet werden (Monfort *et al.*, 2003). Der Pilz *Mucor circinelloides* war sogar unter anhaltendem Selektionsdruck in hohem Maße mitotisch instabil (Benito *et al.*, 1995). Doch nicht nur bei Zygomyceten kann dieses Phänomen beobachtet werden. Auch Transformanten des Ascomyceten *Trichoderma reesei* wiesen eine hohe mitotische Instabilität nach Kultivierung auf nicht selektivem Medium auf (Bergès und Barreau, 1991). Gründe für diesen Effekt können nicht klar eingegrenzt werden. Unter

anderem werden spezifische Mechanismen des Pilzes, die die Anwesenheit von Fremd-DNA erkennen und daraufhin eine Deletion dieser DNA einleiten, für diesen Effekt verantwortlich sein (Monfort *et al.*, 2003). Da nicht geklärt werden konnte, welche Faktoren bei *G. bidwellii* für den Verlust der Resistenz nach mehreren Kultivierungsperioden verantwortlich sind, muss dieses Phänomen durch weitere Arbeiten näher untersucht werden.

In letzter Konsequenz muss auch in Betracht gezogen werden, dass sich *G. bidwellii* für eine *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation nicht eignet. Trotz des Erfolges dieser Methode bei vielen Pilzen sind in der Literatur auch Beispiele bekannt, bei denen die Methode nicht anwendbar ist. So konnte bei *Sclerotinia sclerotiorum* auch nach Optimierung des Systems kein Wachstum von Transformanten beobachtet werden (Rolland *et al.*, 2003). Auch bei *A. niger* war die Transformationsfrequenz bei Verwendung dieser Methode selbst nach Optimierung zu niedrig und nicht reproduzierbar (Michielse *et al.*, 2005). Eine Möglichkeit, dennoch Informationen über die Biosynthese durch Mutagenese zu erhalten und eine Mutante zu generieren, die nicht mehr in der Lage ist, die entsprechenden Toxine zu produzieren, wäre die Transformation von *G. vaccinii* oder *G. aesculi*. Beide Pilze produzieren phytotoxische Dioxolanone und sind eventuell für eine Transformation mittels *A. tumefaciens* zugänglicher. Aus Ergebnissen dieser Untersuchungen können dann gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Mechanismen in *G. bidwellii* gezogen werden und entsprechende Inhibitoren der Biosynthese identifiziert werden, um einen toxinfreien Phänotypen von *G. bidwellii* zu generieren.

Ein weiteres Problem kann darin bestehen, dass die Inaktivierung der Gene in *G. bidwellii* zu einem lethalen Phänotyp führen kann. Mutanten von *S. cerevisiae*, bei denen diese Gene inaktiviert wurden, sind als lebensfähig beschrieben (Giaever *et al.*, 2002). Das führte zu der Annahme, dass eine Inaktivierung dieser Gene nicht zu einem lethalen Phänotyp in *G. bidwellii* führen wird. Allerdings kann der lethale Phänotyp auf dieser Basis nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, wäre ein *knock down* der entsprechenden Gene mittels RNA Interferenz (Kück und Hoff, 2010), denn RNA-basierende Transformationsmethoden zur Inaktivierung der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene sind vor allem nützlich, wenn Ansätze zur gezielten Genmodifizierung scheitern, viele Kopien des Zielgens im Genom vorhanden sind, Isogene die Inaktivierung des Zielgens kompensieren oder die Deletion des Zielgens zu einem lethalen Phänotyp führt (Meyer, 2008; Kück und Hoff, 2010).

4.5.5. RNA Technologien zur zielgerichteten Mutagenese

Bisher haben sich drei RNA basierte Methoden zur Inaktivierung von Genen in Eukaryoten bewährt. Dabei handelt es sich um die *antisense* RNA-Methode, die Hammerhead Ribozym-Methode und die RNA Interferenz (RNAi)-Methode (Meyer, 2008). Eine Übersicht der RNA basierten Methoden ist in Tabelle 4.3. gegeben.

Tabelle 4.3.: RNA basierte Techniken zum Gensilencing in Eukaryoten im Vergleich.

Bisher haben sich drei RNA basierte Methoden zur Stilllegung von Genen in Eukaryoten bewährt, die je nach Anwendungsgebiet Vor- und Nachteile haben.

AS: *antisense* RNA; HHR: Hammerhead Ribozym; RNAi: RNA Interferenz; ds: Doppelstrang; siRNA: kleine interferierende RNAs (angepasst nach Meyer, 2008).

Methode	Prinzip	Vorteile	Nachteile
AS	Exprimierte <i>antisense</i> RNA hybridisiert über Watson-Crick-Paarung mit Ziel-mRNA. Die Translation oder Prozessierung der Ziel-mRNA wird inhibiert.	Einfach und kostengünstig	Manchmal geringe Affinität zur Ziel-RNA aufgrund von sekundären Strukturen des <i>antisense</i> Moleküls.
HHR	Kleine katalytisch aktive RNA Moleküle hybridisieren mit der Ziel-RNA. Sequenzspezifischer Abbau der Ziel-RNA.	Hoch spezifisch	umständlich Schwierig, die beste Zielsequenz vorherzusagen. Manchmal geringe Aktivität
RNAi	dsRNA wird in siRNA gespalten. Diese siRNA hybridisiert mit der Ziel-RNA und leitet diese zum Silencingkomplex (RISC), der die Ziel-RNA abbaut.	Hohe Aktivität	Benötigt die Aktivität eines endogenen Proteinkomplexes. Instabilität möglich

In einer Vielzahl von filamentösen Pilzen konnten Gene bereits mittels *antisense* RNA stillgelegt oder gehemmt werden. *Antisense* RNAs sind kleine, diffusionsfähige, hoch strukturierte RNAs, die komplementär zur mRNA und in der Regel 35 – 150 nt lang sind (Brantl, 2002). Diese kleinen RNAs hybridisieren mit der mRNA und dienen als Substrat für die Ribonuklease H (RNase H). Dieses Enzym degradiert spezifisch den RNA-Strang des gebildeten RNA-DNA-Duplexes während der Transkription. Chemisch modifizierte *antisense* RNAs können von der RNase H nicht mehr erkannt werden, so dass die Translation der mRNA durch sterische Behinderung oder das Splicing der mRNA inhibiert werden (Dorsett und Tuschl, 2004). Dadurch eignet sich die Methode gut zur Minimierung der Transkriptmenge auf posttranskriptioneller Ebene, wobei die Methode auch limitiert ist, da

bisher noch keine vollständige *antisense*-vermittelte Reduktion der Genexpression dokumentiert ist (Meyer, 2008).

Die Verwendung von Ribozymen ist eine alternative Methode zur Minimierung der Transkriptmenge auf posttranskriptioneller Ebene (Meyer, 2008). Ribozyme sind kleine RNA Moleküle, die auch in vollständiger Abwesenheit von Proteinen als Enzyme agieren. Dabei besteht die katalytische Aktivität darin, dass sie hochspezifisch kovalente Bindungen brechen oder bilden (Scherer und Rossi, 2003). Es gibt verschiedene Klassen von Ribozymen, von denen das Hammerhead Ribozym am besten untersucht ist. Dieses Ribozym bildet eine einzigartige sekundäre Struktur aus, wenn es mit der entsprechenden mRNA hybridisiert (Dorsett und Tuschl, 2004). Es ist das kleinste Ribozym mit ca. 30 nt und aufgrund der einfachen Struktur der katalytischen Domäne wird es bevorzugt verwendet. Es kann auch künstlich modifiziert werden, so dass es jede beliebige Ziel-mRNA binden und spalten kann (Scherer und Rossi, 2003).

Eine häufig genutzte und Erfolg versprechende Methode zur posttranskriptionellen Inaktivierung von pilzlichen Genen ist die RNAi-Methode (Meyer, 2008). Hierbei wird die entsprechende mRNA, die komplementär zum gewünschten Zielgen ist, im Pilzkern durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) in doppelsträngige RNA (dsRNA) umgeschrieben und durch die Kernporen in das Cytoplasma transportiert. Dort wird die dsRNA sofort durch Dicerproteine in kleine interferierende RNAs (siRNA) getrennt. Diese RNA-Fragmente haben eine Größe von etwa 20 – 25 bp und sind für den RNA Interferenz Signalweg repräsentativ. Die siRNAs werden von dem RNA-induzierten Silencing Komplex (RISC) erkannt und der Abbau der entsprechenden mRNA wird eingeleitet, wodurch diese für die Genexpression nicht mehr verwendet werden kann (Kück und Hoff, 2010).

Damit das System für eine Repression der Genexpression in Pilzen genutzt werden kann, muss der entsprechende Organismus alle Komponenten der RNAi Silencing Maschinerie, wie RdRP, Dicerproteine und RISC, enthalten. Bei Pilzen wie *Ustilago maydis*, *Candida albicans* und *S. cerevisiae* ist diese Methode nicht praktikierbar, da ihnen Komponenten dieser Maschinerie fehlen (Nakayashiki *et al.*, 2006). Dahingegen konnte die Methode unter anderem bei den Pilzen *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *M. oryzae* oder *N. crassa* erfolgreich angewendet werden (Kadotani *et al.*, 2003; Goldoni *et al.*, 2004; Hammond und Keller, 2005; Henry *et al.*, 2007). In *A. nidulans* führte die reine Zugabe von synthetischen, zum Zielgen korrespondierenden siRNA Molekülen in das Kulturmedium zu einer spezifischen Suppression der Ornithindecaboxylase, die für das Wachstum und die Entwicklung des Pilzes essentiell ist (Khatri und Rajam, 2007). Allerdings kommt es wie bei der *antisense* RNA-Methode nicht immer zu einer vollständigen Reduktion der Genexpression, so dass

keine komplette Inaktivierung der Gene resultiert. Um dieses Problem zu lösen, werden hier bevorzugt Vektorsysteme verwendet, die Intron- oder Spacersequenzen zwischen zwei umgekehrt orientierten Zielfragmenten enthalten. Damit kann eine dsRNA mit einer Haarnadelstruktur exprimiert werden. Diese Stammschleifensysteme ermöglichen stabile und hohe Silencingfrequenzen (Kück und Hoff, 2010). Um damit eine vollständige Repression der Genexpression zu erreichen, kann das RNAi-Konstrukt zusätzlich durch eine erhöhte Kopienzahl oder durch die Verwendung eines starken und induzierbaren Promotors überexprimiert werden (Meyer, 2008). Nachteilig bei dieser Methode ist, dass das verwendete Konstrukt instabil sein kann (Goldoni *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2007). In *A. fumigatus* haben etwa 50 % der Transformanten das RNAi-Konstrukt nach längerer Kultivierung verloren. Die RNAi-Methode ist eine noch recht junge Technologie, so dass noch weitere Untersuchungen an Modellsystemen durchgeführt werden müssen, um ein besseres Verständnis über die Vorgänge und die verantwortlichen Mechanismen in filamentösen Pilzen zu erhalten (Meyer, 2008).

Da bisherige Transformationsversuche mit gezielter Genmodifikation erfolglos verliefen, wäre eine RNA-basierende Methode eine interessante und sinnvolle Alternative zur zielgerichteten genetischen Manipulation von *G. bidwellii*. Möglicherweise könnten dadurch auch Komplikationen, wie beispielsweise die Kompensation der Inaktivierung des Zielgens durch Isogene oder ein resultierender lethaler Phänotyp, umgangen werden.

4.6. Bioherbizide

Unkräuter sind Pflanzenarten, die sich aus menschlicher Sicht an unerwünschten Stellen ausbreiten (Smith und Smith, 2009). Dabei konkurrieren die Unkräuter mit den Kultur- und Nutzpflanzen um Raum, Licht und Nährstoffe und können darüber hinaus auch als Reservoir für pathogene Organismen dienen (Amusa, 2006). Als Konsequenz reduzieren Unkräuter die landwirtschaftlichen Erträge, wodurch eine konsequente Unkrautbekämpfung für die Ernte essentiell ist. Zur Bekämpfung können mechanische, chemische und biologische Methoden zum Einsatz kommen. Die mechanischen Methoden, wie Hacken, Eggen und Jäten, zählen zu den ältesten Methoden, sind aber zeitaufwendig und können auch die Wurzeln der erwünschten Nutzpflanzen schädigen (Eggers und Niemann, 1993). Seit den 1960er Jahren wurden die mechanischen Methoden größtenteils durch chemische Herbizide abgelöst (Smith und Smith, 2009). In den vergangenen Jahrzehnten hat die Verwendung von Herbiziden in einem hohen Ausmaß zugenommen. Mehr als die Hälfte der weltweit eingesetzten Pflanzenschutzmittel entfällt auf diese Gruppe. In Deutschland liegt der mit Herbiziden behandelte Anteil der Ackerfläche bei 80 – 100 %. In Reb- und Obstanlagen beträgt dieser Flächenanteil etwa 50 % (Heitefuss, 2000). Aufgrund der verstärkten

Anwendung von Herbiziden kommt es vermehrt zu Resistenzen bei den Unkräutern, so dass es unabdingbar ist, Herbizide mit neuen Wirkmechanismen zu identifizieren und zu entwickeln. Dabei müssen die neuen Verbindungen umweltfreundlich und gleichermaßen effektiv und selektiv sein (Amusa, 2006). Eine Alternative zur chemischen Unkrautbekämpfung können biologische Methoden durch Pflanzenpathogene sein. Ein Vorteil von Bioherbiziden ist, dass ihre Wirksamkeit meist noch bis zur nächsten Vegetationsperiode anhalten kann und die im Vergleich zu konventionellen chemischen Herbiziden weniger umweltschädlich sind. Somit haben Bioherbizide als preiswerte und umweltfreundliche Mittel zur Unkrautbekämpfung ein großes Potential (Heitefuss, 2000). Neben der direkten Ausbringung von Pflanzenpathogenen sind mikrobiell hergestellte Naturstoffe, wie Phytotoxine, eine erfolgversprechende Methode zur biologischen Bekämpfung von Unkräutern. Pilzliche Naturstoffe sind oft strukturell hoch divers, wodurch sie als Vorlage für neue synthetische chemische Herbizide dienen können (Varejão *et al.*, 2013). Daneben können sie hoch aktiv sein und einzigartige Wirkungsweisen haben, wodurch die Identifizierung von neuen Wirkmechanismen zur Eindämmung der Resistenzbildung bei Unkräutern möglich wird (Amusa, 2006; Berestetskiy, 2008; Varejão *et al.*, 2013).

Der rebenpathogene Pilz *G. bidwellii* produziert Sekundärmetabolite, von denen fünf Strukturen als stark phytotoxisch und nicht-wirtsspezifisch beschrieben wurden. Besonders die Verbindungen Guignardic acid, Phenguignardic acid und Alaguignardic acid führten bereits bei einer Applikation von 10 µg auf Wein-, Reis- und Weizenblättern innerhalb von vier Stunden zu einer starken Läsionenbildung an den Blättern. Demnach wurden sie als potentielle Leitstrukturen für neue Bioherbizide beschrieben (Molitor *et al.*, 2012; Buckel *et al.*, 2013). Da die herbizide Wirkung dieser Verbindungen bislang nur unter Labor- und Gewächshausbedingungen untersucht wurde, sollte in einem Freilandversuch geklärt werden, ob sich diese Sekundärmetabolite tatsächlich als Herbizide zur industriellen Verwendung eignen.

In Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit wurde auf eine Ausbringung von Reinsubstanzen verzichtet. Vielmehr sollte überprüft werden, ob eine Applikation von Kulturfiltraten zu einer Inhibierung des Wachstums bei den Testpflanzen führt. Wäre dies der Fall, wäre die finanzielle Einsparung im Rahmen der industriellen Produktion dieser Substanzen durch den Wegfall von chromatographischen Trennverfahren und zeitaufwendiger Arbeitstechniken beträchtlich. Ein Beispiel für das Scheitern eines potentiellen Herbizids aufgrund finanzieller Aspekte in der Industrie ist das Tentoxin aus *Alternaria tenuissima*. Dieses Toxin wurde als Proherbizid gehandelt, da es hoch selektiv und aktiv war. Da sich die Synthese des Toxins

allerdings als sehr teuer erwies, wurde auf eine industrielle Produktion verzichtet (Berestetskiy, 2008).

Die Untersuchungen der Kulturfiltrate aus der Submersfermentation mit *G. bidwellii* führten zu dem Ergebnis, dass nach Applikation der Proben keine signifikante Hemmung des Wachstums der behandelten Unkräuter beobachtet werden konnte. Als Begründung für die fehlende phytotoxische Wirkung der Naturstoffe im Freilandversuch können verschiedene Faktoren in Frage kommen. Die Untersuchungen sind nicht vergleichbar mit den Versuchen im Labor und Gewächshaus, da auf die Ausbringung von Reinsubstanz verzichtet wurde. Um eine grundlegende Verwendung als Herbizid im Freiland zu überprüfen, müsste zunächst die Wirkung der Reinsubstanz untersucht werden. Die Untersuchungen fanden in einem Gemeinschaftsprojekt statt, so dass nur wenige Versuchsglieder zur Verfügung standen. Sollte sich herausstellen, dass nur eine Applikation der Reinsubstanz zu einer herbiziden Wirkung führt, wäre in Bezug auf die Wirtschaftlichkeit die Verwendung von *G. aesculi* als Produzent zur industriellen Produktion zu empfehlen. Dieser Pilz produziert in Submerskulturen fast ausschließlich Phenguignardic acid (Abbildung 3.2.) in großen Mengen. Phenguignardic acid erwies sich in Gewächshausversuchen an *V. vinifera* als fünf bis zehnfach aktiver als Guignardic acid (Molitor *et al.*, 2012). Daneben würde eine Aufreinigung von Phenguignardic acid aus *G. aesculi* einen geringeren chromatographischen Aufwand mit sich bringen, da weniger Schritte zur Reinigung der Verbindung notwendig wären.

Weitere Gründe für die fehlende Phytotoxizität der Verbindungen im Freiland können auch chemische Instabilität der Verbindungen oder eine geringe Aufnahme der Substanzen durch die Pflanze sein (Munzert *et al.*, 2005). Weiter wirken sich abiotische Faktoren im Freiland wie Licht, Temperatur, Niederschlag, Nährstoffversorgung und Vitalität der Pflanzen auf die Naturstoffe aus, die im Labor nicht gegeben sind (Kleeberg, 2010). Es ist bekannt, dass viele mikrobielle Phytotoxine nicht gegen Umweltbedingungen resistent sind und daher als Herbizide keine Anwendung finden (Berestetskiy, 2008). Diese Instabilität macht im Regelfall eine chemische Modifizierung der Naturstoffe nötig, um die Anwendung zu optimieren (Munzert *et al.*, 2005). Durch die Synthese von Strukturanaloga ist es möglich, stabilere und aktivere Strukturen auf Basis der Naturstoffe zu generieren. Ein Beispiel für eine solche Modifizierung ist der Naturstoff Phosphinotricin aus *S. hygrosopicus*, dessen Strukturanaloga unter dem Handelsnamen Basta[®] als nicht selektives Herbizid registriert ist (Berestetskiy, 2008).

Für die Naturstoffe Guignardic acid und Phenguignardic acid ist die Totalsynthese bereits bekannt (Rodrigues-Heerklotz *et al.*, 2001; Stoye *et al.*, 2013), so dass die Voraussetzung für eine chemische Modifikation der Naturstoffe gegeben ist. Eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung für die phytotoxischen Dioxolanone wurde durch Buckel *et al.* (2013) hergestellt. Mit dieser

Analyse können funktionelle Gruppen identifiziert werden, die für die biologische Aktivität wichtig sind, wodurch Erkenntnisse für synthetische Strukturanaloga gewonnen werden können (Varejão *et al.*, 2013). Anhand dieser Beziehung konnte die freie Carboxylgruppe als dominant verantwortliche funktionelle Gruppe für die Phytotoxizität identifiziert werden (Buckel *et al.*, 2013). Grundsätzlich sollte auch die Wirkungsweise dieser Sekundärmetabolite untersucht werden. Denn auch wenn die Phytotoxine nicht grundsätzlich zum direkten Gebrauch als kommerzielle Herbizide genutzt werden können, kann die Identifizierung des *mode of actions* (MoA) nützlich für die Entwicklung von neuen Herbiziden sein (Duke *et al.*, 2002). Denn es werden dringend neue Wirkmechanismen bei Herbiziden benötigt. Zurzeit werden Herbizide mit zwölf verschiedenen MoA verwendet. Die bekanntesten MoAs sind die Inhibierung der Aminosäurebiosynthese, der Photosynthese, der Auxinrezeptoren, der Zellteilung oder der Lipidbiosynthese (Copping und Hewitt, 1998). Allerdings liegt die letzte Einführung eines Herbizids mit einem neuem MoA etwa 20 Jahre zurück (Duke, 2012). Aufgrund der massiven Resistenzbildung ist die Einführung eines neuen Herbizids mit bislang ungenutztem MoA dringend erforderlich.

5. Ausblick

Diese Arbeit trägt zu einem verbesserten Verständnis der Pathogen-Wirt-Interaktion zwischen *Guignardia bidwellii* und *Vitis vinifera* bei. Sie liefert zum einen neue und bedeutende Erkenntnisse in Bezug auf die Relevanz der phytotoxischen Dioxolanone aus *G. bidwellii* als konstitutive Virulenzfaktoren und deren Biosynthese. Zum anderen wurden entscheidende Fortschritte in der Etablierung eines Transformationssystems zur zielgerichteten Mutagenese erbracht.

Während der Analyse der Naturstoffproduktion in verwandten phytopathogenen *Guignardia*-Arten konnte ein neues Dioxolanonderivat identifiziert werden, das in weiteren Arbeiten isoliert und charakterisiert werden sollte. Die Identifikation neuer Vertreter der phytotoxischen Dioxolanone trägt weiter zum Verständnis der Bedeutung der Naturstoffe im Infektionsprozess von *G. bidwellii* bei.

Zur vollständigen Aufklärung der Biosynthese der phytotoxischen Dioxolanone aus *G. bidwellii* sollte der Mechanismus der Verknüpfung der entsprechenden Aminosäuren untersucht werden. Hierfür sollten die Ergebnisse aus der vergleichenden Transkriptomanalyse zwischen den Zuständen der Produktion und Nicht-Produktion durch Dr. Karsten Andresen (IBWF, Kaiserslautern) verwendet werden. Gegen Ende dieser Arbeit konnten erste Erkenntnisse über hochregulierte Gene während des Zustandes der Naturstoffproduktion von *G. bidwellii* gewonnen werden.

Besonders interessant waren dabei die hochregulierten Gene, die für eine Aspartat-Protease, eine FAD-verbundenen Oxidase, eine FAD-bindenden Monooxygenase und eine Lovastatin Nonaketid Synthase kodieren. Eine Beteiligung eines dieser Enzyme an der Verknüpfung der Aminosäuren zu Dioxolanonen könnten durch eine zielgerichtete Mutagenese mittels *Agrobacterium tumefaciens* untersucht werden. Dafür empfiehlt sich zunächst die Stabilitätsproblematik der fremd eingebrachten DNA zu klären. Im Anschluss können die kodierenden Sequenzen dieser Enzyme gezielt unterbrochen oder deletiert werden und die generierten Mutantenstämme in Hinblick auf die Naturstoffproduktion und Pathogenität phänotypisch untersucht werden.

Sollte sich das Transformationssystem mittels *A. tumefaciens* nach weiterer Optimierung nicht standardisiert anwenden lassen, könnte alternativ dazu untersucht werden, ob die beiden phytopathogenen Pilze *G. aesculi* und *G. vaccinii*, die ebenfalls die phytotoxischen Dioxolanone in großen Mengen produzieren, für eine zielgerichtete Mutagenese mittels *A. tumefaciens* besser zugänglich sind. Alternativ sind RNA-basierende

Transformationsmethoden in Betracht zu ziehen. Möglicherweise ist der Zugang über die posttranskriptionelle Ebene zielführender als die Ansätze einer zielgerichteten Genmodifizierung. Zusätzlich könnten mögliche Hindernisse, wie beispielsweise die Kompensation der Inaktivierung des Zielgens durch Isogene oder Lethalität, umgangen werden.

Die Generierung einer Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, die entsprechenden Toxine zu synthetisieren, würde nicht nur die Aufklärung des Mechanismus der Biosynthese der Verbindungen, sondern darüber hinaus auch die endgültige Beurteilung der Naturstoffe als konstitutive Virulenzfaktoren ermöglichen.

Sobald eine Beteiligung eines der Enzyme an der Biosynthese bestätigt und die Verbindung zwischen Toxinproduktion und Pathogenität durch die weiterführenden Arbeiten hergestellt werden konnte, eignet sich eine heterologe Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als effiziente Methode zur Beurteilung der mechanistischen Details der Enzyme. Um diese beurteilen zu können, sollte anschließend ein *in vitro*-Testsystem etabliert werden, mit dem nach potentiellen biologischen Inhibitoren des entsprechenden Enzyms gesucht werden kann. Spezifische biologische Hemmstoffe der Biosynthese von phytotoxischen Dioxolanonen könnten als Basis zur Entwicklung zielgerichteter Pflanzenschutzmittel verwendet werden, die auch im ökologischen Weinbau Anwendung finden können.

In Bezug auf die Bewertung der phytotoxischen Dioxolanone aus *G. bidwellii* als potenzielle Bioherbizide sollten die Freilandversuche erweitert werden. Hierbei empfiehlt sich zunächst die Applikation der Reinsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen zu untersuchen.

Das verstärkte Auftreten der Schwarzfäule in deutschen Weinbaugebieten und die vermehrten Meldungen über Resistenzen gegen bisher wirksame Fungizide verdeutlichen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien gegen *G. bidwellii*, die sowohl im integrierten als auch im ökologischen Weinbau Anwendung finden können. Dafür sind die genannten weiterführenden Untersuchungen zur vollständigen Aufklärung der Biosynthese der phytotoxischen Dioxolanone und der zweifelsfreien Beurteilung dieser Verbindungen als konstitutive Virulenzfaktoren dringend erforderlich.

6. Zusammenfassung

Bedingt durch den Klimawandel kommt es vermehrt zum Auftreten neuer, meist invasiver Schaderreger, vor allem auch in bislang nicht beeinträchtigten Gebieten. Ein Beispiel ist der rebenpathogene Pilz *Guignardia bidwellii*, der die Schwarzfäule an Reben verursacht. Seit 2002 kann er sich bedingt durch veränderte Umweltbedingungen in deutschen Weinbaugebieten etablieren und zu großen wirtschaftlichen Schäden führen. Aufgrund vermehrt auftretender Resistenzen gegenüber synthetischen Fungiziden steigt der Bedarf nach neuen Bekämpfungsstrategien, deren Entwicklung ein tiefgehendes Verständnis der Pathogen-Wirt-Interaktion voraussetzt.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die Bedeutung der von *G. bidwellii* produzierten phytotoxischen Dioxolanone für den Infektionsprozess und eine Beschreibung der niedermolekularen Verbindungen als Virulenzfaktoren herausgearbeitet werden. Erstmals wurde das phytotoxische Dioxolanon Guignardic acid *in planta* aus *G. bidwellii*-infizierten Weinblättern identifiziert, womit eine Produktion des Toxins während des invasiven Wachstums des Pathogens in der Pflanze bewiesen wurde. Zusätzlich konnte durch Untersuchungen an weiteren phytopathogenen Arten der Gattung *Guignardia* die Bedeutsamkeit dieser Sekundärmetabolite für den Infektionsprozess von *G. bidwellii* bestätigt werden. Alle untersuchten Arten verursachen eine ähnliche Symptomatik an ihren Wirtspflanzen wie *G. bidwellii* an Wein und produzieren unter Laborbedingungen in Submersfermentationen ebenfalls die aus *G. bidwellii* bekannten phytotoxischen Dioxolanone.

Aufgrund der Bedeutung der Naturstoffe für den Infektionsprozess wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Biosynthese der Verbindungen untersucht. Da die Verbindungen einer neuen Naturstoffklasse angehören, ist über deren Synthese noch nichts bekannt. Durch Markierungsversuche mit ^{13}C -Phenylalanin konnte nachgewiesen werden, dass die Aminosäure Phenylalanin das Ausgangssubstrat zur Synthese der phytotoxischen Dioxolanone ist.

Diese entscheidenden Erkenntnisse in der Biosynthese der phytotoxischen Dioxolanone führten zum zweiten Teil dieser Arbeit, in dem eine toxfreie Mutante von *G. bidwellii* generiert werden sollte. Zu Beginn dieser Arbeit war das Genom von *G. bidwellii* nicht sequenziert und es war kein etabliertes Transformationssystem verfügbar. Zunächst wurde das Genom von *G. bidwellii* sequenziert und ein geeignetes Transformationssystem zur Untersuchung der molekularen Basis von Pathogen-Wirt-Interaktionen ermittelt. Aus dem

Genom von *G. bidwellii* konnten die kodierenden Sequenzen von drei Schlüsselenzymen identifiziert werden, die am Aminosäurestoffwechselweg beteiligt sind, die Aspartat-Transaminase, die Chorismat-Synthase und die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase. Das Transformationssystem mittels *Agrobacterium tumefaciens* wurde für eine zielgerichtete Mutagenese in *G. bidwellii* optimiert. Dabei wurden sowohl die zu übertragenden Konstrukte als auch die Parameter der Transformationsmethode direkt modifiziert. Diese Untersuchungen brachten entscheidende Fortschritte in der Etablierung eines Transformationssystems für *G. bidwellii* zur zielgerichteten Mutagenese.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind eine zuverlässige Basis zur Untersuchung der Pathogen-Wirt-Interaktion zwischen *G. bidwellii* und *V. vinifera* und können die Entwicklung von neuen Bekämpfungsstrategien und *biologicals* ermöglichen, die auch im ökologischen Weinbau Anwendung finden können.

V. Literaturverzeichnis

- Agostini**, J.P.; Peres, N.A.; Mackenzie, S.J.; Adaskaveg, J.E.; Timmer, L.W. (2006): Effect of fungicides and storage conditions on postharvest development of citrus black spot and survival of *Guignardia citricarpa* in fruit tissues. *Plant Dis.*, **90**(11): 1419 – 1424.
- Agrios**, G.N. (1997): Plant Pathology. 4. ed., Academic Press, San Diego London Boston New York Sydney Tokyo Toronto.
- Amusa**, N.A. (2006): Microbially produced phytotoxins and plant disease management. *Afr. J. Biotechnol.*, **5**(5): 405 – 414.
- Atkinson**, H.; Dale, J.; Harding, R.; Kiggundu, A.; Kunert, K.; Muchwezi, J. M.; Sagi, L.; Viljoen, A. (2003): Genetic transformation strategies to address the major constraints to banana and plantain production in Africa. *International Plant Genetic Resources Institute*, 125.
- Bej**, A.K. und Perlin, M.G. (1989): A high efficiency transformation system for the basidiomycete *Ustilago violacea* employing hygromycin resistance and lithium-acetate treatment. *Gene*, **80**: 171 – 176.
- Bender**, C.L.; Alarcón-Chaidez, F.; Gross, D.C. (1999): *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**(2): 266 – 292.
- Benito**, E.P.; Campuzano, V.; López-Matas, M.A.; De Vicente, J.I.; Eslava, A.P. (1995): Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of *Mucor circinelloides* OMPdecase-deficient mutants. *Mol. Gen. Genet.*, **248**(2): 126 – 135.
- Berestetskiy**, A.O. (2008): A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **44**(5): 453 – 465.
- Bergès**, T. und Barreau, C. (1991): Isolation of uridine auxotrophs from *Trichoderma reesei* and efficient transformation with the cloned *ura3* and *ura5* genes. *Curr. Genet.*, **19**: 359 – 365.
- Bezerra**, J.D.P.; Santos, M.G.S.; Svedese, V.M.; Lima, D.M M.; Fernandes, M.J.S.; Paiva, L.M.; Souza-Motta, C.M. (2012): Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 1989 – 1995.
- Bhakdi**, S.; Hahn, H.; Miksits, K. (2009): Pathogenität und Virulenz. In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Hahn, H.; Kaufmann, S.H.E.; Schulz, T.F.; Suerbaum, S. (Hrsg). 6. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg, 11 – 12.
- Bilger**, W.; Dauborn, B.; Ober, D.; Linne von Berg, G. (2008): Sekundärstoffwechsel. In: Botanik, Munk, K. (Hrsg.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 359 – 412.
- Binninger**, D.M.; Skrzynia, C.; Pukkila, P.J.; Casselton, L.A. (1987): DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *EMBO J.*, **6**: 835 – 840.

- Bird, D.** und Bradshaw, R. (1997): Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, **255**(2): 219 – 225.
- Bowyer, P.** (2001): DNA-mediated transformation of fungi. In: Molecular and cellular biology of filamentous fungi: a practical approach. Talbot, N.J. (Hrsg.). Oxford University Press, Oxford, 33 – 46.
- Brantl, S.** (2002): Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim. Biophys. Acta*, **1575**: 15 – 25.
- Buckel, I.** (2011): Untersuchungen zum nekrotischen Wachstum des rebenpathogenen Pilzes *Guignardia bidwellii*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern.
- Buckel, I.**; Molitor, D.; Liermann, J.C.; Sandjo, L.P.; Berkelmann-Löhnertz, B.; Opatz, T.; Thines, E. (2013): Phytotoxic dioxolanone-type secondary metabolites from *Guignardia bidwellii*. *Phytochemistry*, **89**: 96 – 103.
- Bugg, T.** (2004): Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. Ausgabe 2. John Wiley and Sons, Hoboken New Jersey, USA.
- Bullock, W.O.**; Fernandez, J.M.; Short, J.M. (1987): XL1-Blue: a high efficiency transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*, **5**(4): 376 – 379.
- Bundock, P.**; den Dulk-Ras, A.; Beijersbergen, A.; Hooykaas, P.J.J. (1995): Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **14**(13): 3206 – 3214.
- Campoy, S.**; Perez, F.; Martin, J.F.; Gutierrez, S.; Liras, P. (2003): Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Curr. Genet.*, **43**: 447 – 452.
- Carroll, A.M.**; Sweigard, J.A.; Valent, B. (1994): Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genetics Reports*, **41**: 22
- Chakraborty, B.N.**; Patterson, N.A.; Kapoor, M. (1991): An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Can. J. Microbiol.*, **37**: 858 – 863.
- Chenna, R.**; Sugawara, H.; Koike, T.; Lopez, R.; Gibson, T.J.; Higgins, D.G.; Thompson, J.D. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.*, **31**(13): 3497 – 3500.
- Choquer, M.**; Dekkers, K.L.; Chen, H.-C.; Cao, L.; Ueng, P.P.; Daub, M.E.; Chung, K.-R. (2005): The *CTB1* gene encoding a fungal polyketide synthase is required für cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **18**(5): 468 – 476.
- Copping, L.G.** und Hewitt, H.G. (1998): Chemistry and mode of action of crop protection agents. Royal Society of Chemistry, London, UK.

- Covert**, S.F.; Kapoor, P.; Lee, M.; Briley, A.; Nairn, J. (2001): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol. Res.*, **105**(3): 259 – 264.
- de Groot**, M.J.A.; Bundock, P.; Hooykaas, P.J.J.; Beijersbergen, A.G.M. (1998): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.*, **16**(9): 839 – 842.
- Dean**, R.A.; Talbot, N.J.; Ebbole, D.J.; Farman, M.L.; Mitchell, T.K.; Orbach, M.J.; Thon, M.; Kulkarni, R.; Xu, J.R.; Pan, H.; Read, N.D.; Lee, Y.H.; Carbone, I.; Brown, D.; Oh, Y.Y.; Donofrio, N.; Jeong, J.S.; Soanes, D.M.; Djonovic, S.; Kolomiets, E.; Rehmeyer, C.; Li, W.; Harding, M.; Kim, S.; Lebrun, M.H.; Bohnert, H.; Coughlan, S.; Butler, J.; Calvo, S.; Ma, L.J.; Nicol, R.; Purcell, S.; Nusbaum, C.; Galagan, J.E.; Birren, B.W. (2005): The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**, 980 – 986.
- Degefu**, Y. und Hanif, M. (2003). *Agrobacterium-tumefaciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leaf-blight fungus. *Arch. Microbiol.*, **180**(4): 279 – 284.
- Demain**, A.L. (1986): Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure & Appl. Chem.*, **58**(2): 219 – 226.
- Deml**, G.; Gräfenhan, T.; Nirenberg, H.I.; Strumpf, T. (2009): Biologische Kontrolle von Pilzkrankheiten mit antagonistischen Mikroorganismen der Gattung *Trichoderma* im Weinbau – eine Bestandsaufnahme. *Gesunde Pflanz.*, **61**: 73 – 85.
- Dhawale**, S.S.; Paietta, J.V.; Marzluf, G.A. (1984): A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. *Curr. Genet.*, **8**(1): 77 – 79.
- Dorsett**, Y. und Tuschl, T. (2004): siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, **3**(4): 318 – 329.
- Dower**, W.J.; Miller, J.F.; Ragsdale, C.W. (1988): High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**(13): 6127 – 6145.
- Duke**, S.O. (2012): Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest. Manag. Sci.*, **68**: 505 – 512.
- Duke**, S.O.; Dayan, F.E.; Rimando, A.M.; Schrader, K.K.; Aliotta, G.; Oliva, A.; Romagni, J.G. (2002): Chemicals from nature for weed management. *Weed Science*, **50**: 138 – 151.
- Ebermann**, R. und Elmadfa, I. (2011): Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. Springer Verlag, Heidelberg.
- Eggers**, T. und Niemann, P. (1993): Alternativen zur chemischen Unkrautbekämpfung. In: Spektrum der Wissenschaft 7, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH (Hrsg.), Heidelberg: 102.
- Ellis**, M.A. (2008): Fact sheet Agricultural and Natural Resources: Grape black rot. Department of Plant Pathology. The University of Ohio State Extension.
- Eze**, L.C. und Echetebe, C.O. (1980): Some properties of aspartate and alanine aminotransferases from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.*, **120**: 523 – 527.

- Fajola, A.O.** (1978): Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp.. *Physiol. Plant Pathol.*, **13**: 157 – 164.
- Ferrin, D.M.** und **Ramsdell, D.C.** (1978): Influence of conidia dispersal and environment on infection of grape by *Guignardia bidwellii*. *Phytopathology*, **68**: 892 – 895.
- Figueiredo, J.G.**; **Goulin, E.H.**; **Tanaka, F.**; **Stringari, D.**; **Kava-Cordeiro, V.**; **Galli-Terasawa, L.V.**; **Staats, C.C.**; **Schrank, A.**; **Glienke, C.** (2010): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. *J. Microbiol. Methods*, **80**: 143 – 147.
- Fincham, J.R.S.** (1989): Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.*, **53**(1): 148 – 170.
- Fischer, J.** (2014): Untersuchungen zur Esca-Erkrankung von Weinpflanzen: Pilz-Pflanze und antagonistische Interaktionen. Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Follmann, H.** (2001): Biochemie: Grundlagen und Experimente. Teubner Studienbücher, Ausgabe 1, Vieweg & Teubner, Wiesbaden.
- Fortwendel, J.R.**; **Fuller, K.K.**; **Stephens, T.J.**; **Bacon, W.C.**; **Askew, D.S.**; **Rhodes, J.C.** (2008): *Aspergillus fumigatus* RasA regulates asexual development and cell wall integrity. *Eukaryotic Cell*, **7**(9): 1530 – 1539.
- Fulmer, G.R.**; **Miller, A.J.M.**; **Sherden, N.H.**; **Gottlieb, H.E.**; **Nudelman, A.**; **Stoltz, B.M.**; **Bercaw, J.E.**; **Goldberg, K.I.** (2010): NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics*, **29**: 2176 – 2179.
- Galagan, J.E.**; **Calvo, S.E.**; **Borkovich, K.A.**; **Selker, E.U.**; **Read, N.D.**; **Jaffe, D.**; **FitzHugh, W.**; **Ma, L-J.**; **Smirnov, S.**; **Purcell, S.**; **Rehman, B.**; **Elkins, T.**; **Engels, R.**; **Wang, S.**; **Nielsen, C.B.**; **Butler, J.**; **Endrizzi, M.**; **Qui, D.**; **Ianakev, P.**; **Bell-Pedersen, D.**; **Nelson, M.A.**; **Werner-Washburne, M.**; **Selitrennikoff, C.P.**; **Kinsey, J.A.**; **Braun, E.L.**; **Zelter, A.**; **Schulte, U.**; **Kothe, G.O.**; **Jedd, G.**; **Mewes, W.**; **Staben, C.**; **Marcotte, E.**; **Greenberg, D.**; **Roy, A.**; **Foley, K.**; **Naylor, J.**; **Stange-Thomann, N.**; **Barrett, R.**; **Gnerre, S.**; **Kamal, M.**; **Kamvysselis, M.**; **Mauceli, E.**; **Bielke, C.**; **Rudd, S.**; **Frishman, D.**; **Krystofova, S.**; **Rasmussen, C.**; **Metzenberg, R.L.**; **Perkins, D.D.**; **Kroken, S.**; **Cogoni, C.**; **Macino, G.**; **Catcheside, D.**; **Li, W.**; **Pratt, R.J.**; **Osmani, S.A.**; **DeSouza, C.P.C.**; **Glass, L.**; **Orbach, M.J.**; **Berglund, J.A.**; **Voelker, R.**; **Yarden, O.**; **Plamann, M.**; **Seiler, S.**; **Dunlap, J.**; **Radford, A.**; **Aramayo, R.**; **Natvig, D.O.**; **Alex, L.A.**; **Mannhaupt, G.**; **Ebbole, D.J.**; **Freitag, M.**; **Paulsen, I.**; **Sachs, M.S.**; **Lander, E.S.**; **Nusbaum, C.**; **Birren, B.** (2003): The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, **422**(6934): 859 – 868.
- Gardiner, D.M.** und **Howlett, B.J.** (2004): Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. *Curr. Genet.*, **45**(4): 249 – 255.
- Gardiner, D.M.**; **Cozijnsen, A.J.**; **Wilson, L.M.**; **Pedras, M.S.C.**; **Howlett, B.J.** (2004): The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Microbiol.*, **53**: 1307 – 1318.

- Giaever**, G.; Chu, A.M.; Ni, L.; Connelly, C.; Riles, L.; Véronneau, S.; Dow, S.; Lucau-Danila, A.; Anderson, K.; André, B.; Arkin, A.P.; Astromoff, A.; El-Bakkoury, M.; Bangham, R.; Benito, R.; Brachat, S.; Campanaro, S.; Curtiss, M.; Davis, K.; Deutschbauer, A.; Entian, K.D.; Flaherty, P.; Foury, F.; Garfinkel, D.J.; Gerstein, M.; Gotte, D.; Güldener, U.; Hegemann, J.H.; Hempel, S.; Herman, Z.; Jaramillo, D.F.; Kelly, D.E.; Kelly, S.L.; Kötter, P.; LaBonte, D.; Lamb, D.C.; Lan, N.; Liang, H.; Liao, H.; Liu, L.; Luo, C.; Lussier, M.; Mao, R.; Menard, P.; Ooi, S.L.; Revuelta, J.L.; Roberts, C.J.; Rose, M.; Ross-Macdonald, P.; Scherens, B.; Schimmack, G.; Shafer, B.; Shoemaker, D.D.; Sookhai-Mahadeo, S.; Storms, R.K.; Strathern, J.N.; Valle, G.; Voet, M.; Volckaert, G.; Wang, C.Y.; Ward, T.R.; Wilhelmy, J.; Winzeler, E.A.; Yang, Y.; Yen, G.; Youngman, E.; Yu, K.; Bussey, H.; Boeke, J.D.; Snyder, M.; Philippsen, P.; Davis, R.W.; Johnston, M. (2002): Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**(6896): 387 – 391.
- Goedecke**, M. (2008): Klimawandel und Landwirtschaft: Eine umweltökonomische Analyse. Band 15, Diplomica Verlag, Hamburg.
- Goldoni**, M.; Azzalin, G.; Macino, G.; Cogoni, C. (2004): Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 1016 – 1024.
- Gomes-Barcellos**, F.; Pelegrinelli-Fungaro, M.H.; Furlaneto, M.C.; Lejeune, B.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Azevedo, J.L. (1998): Genetic analysis of *Aspergillus nidulans* unstable transformants obtained by biolistic process. *Can. J. Microbiol.*, **44**: 1137 – 1141.
- Gouka**, R.J.; Gerk, C.; Hooykaas, P.J.J.; Bundock, P.; Musters, W.; Verrips, T.V.; de Groot, M.J.A. (1999): Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nat. Biotechnol.*, **17**: 598 – 601.
- Grocholl**, J. und Mersch, I. (2014): Landwirtschaft im Klimawandel: Wege zur Anpassung. Landwirtschaftskammer Niedersachsen: 1 – 24.
- Guimarães**, D.O.; Lopes, N.P.; Pupo, M.T. (2012): Meroterpenes isolated from the endophytic fungus *Guignardia mangiferae*. *Phytochem. Lett.*, **5**: 519 – 523.
- Hall**, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **41**: 95 – 98.
- Hamer**, J.E. und Timberlake, W.E. (1987): Functional organization of the *Aspergillus nidulans trpC* promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **7**(7): 2352 – 2359.
- Hammond**, T.M. und Keller, N.P. (2005): RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerases. *Genetics*, **169**: 607 – 617.
- Harms**, M.; Holz, B.; Hoffmann, C.; Lipps, H.P.; Silvanus, W. (2005): Occurrence of *Guignardia bidwellii*, the causal fungus of Black Rot on grapevine, in the vine growing areas of Rhineland-Palatinate, Germany. Alford, D.V. und Backhaus, G.F. (Hrsg.).
- Hazell**, B.W.; Te'o, V.S.; Bradner, J.R.; Bergquist, P.L.; Nevalainen, K.M. (2000): Rapid transformation of high cellulose-producing mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. *Let. Appl. Microbiol.*, **30**: 282 – 286.
- Heitefuss**, R. (2000): Pflanzenschutz: Grundlagen der praktischen Phytomedizin. 3. neubearbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Henry, C.;** Mouyna, I.; Latge, J.P. (2007): Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Genet.*, **51**: 277 – 284.
- Hewitt, L.** und McDonnell, J.M. (2004): Screening and optimizing protein production in *E. coli*. In: Protein nuclear magnetic resonance techniques. Biomed Protocols, Band 278 von Methods in molecular biology, Downing, A.K. (Hrsg.), Springer Science & Business Media, New York, USA.
- Hoffman, L.E.;** Wilcox, W.F.; Gadoury, D.M.; Seem, R.C. (2002): Influence of grape berry age on susceptibility to *Guignardia bidwellii* and its incubation period length. *Phytopathology*, **92**: 1068 – 1076.
- Hoffman, L.E.** und Wilcox, W.F. (2002): Utilizing epidemiological investigations to optimize management of grape black rot. *Phytopathology* **92**: 676 – 680.
- Howlett, B.J.** (2006): Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**(4): 371 – 375.
- Hudson, H.J.** (1987): *Guignardia* leaf blotch of horsechestnut. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **89**(3): 400 – 401.
- Hynes, M.J.** (1996): Genetic transformation of filamentous fungi. *J. Genet.*, **75**(3): 297 – 311.
- Ito, H.;** Fukuda, Y.; Murata, K.; Kimura, A. (1983): Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**(1): 163 – 168.
- Jones, D.R.** und Alcorn, J.L. (1982): Freckle and black sigatoka disease of banana in far North Queensland. *Australas. Plant Pathol.*, **11**: 7 – 9.
- Jones, J.D.G.** und Dangl, J.L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**: 323 – 329.
- Jung, M.K.;** Ovechkina, Y.; Prigozhina, N.; Oakley, C.E.; Oakley, B.R. (2000): The use of beta-D-glucanase as a substitute for Novozym234 in immunofluorescence and protoplasting. *Fungal Genetics Newsletter*, **47**: 65 – 66.
- Kadotani, N.;** Nakayashiki, H.; Tosa, Y.; Mayama, S. (2003): RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **16**: 769 – 776.
- Kao, K.N.;** Constabel, F.; Michayluk, M.R.; Gamborg, O.L. (1974): Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta*, **120**(3): 215 – 227.
- Kempken, F.** und Kempken, R. (2013): Gentechnik bei Pflanzen: Chancen und Risiken. Springer Verlag, Heidelberg.
- Khatri, M.** und Rajam, M.V. (2007): Targeting polyamines of *Aspergillus nidulans* by siRNA specific to fungal ornithine decarboxylase gene. *Med. Mycol.*, **45**: 211 – 220.
- Kheder, A.A.;** Akagi, Y.; Takao, K.; Akamatsu, H.; Kodama, M. (2012): Fungal growth and *in planta* distribution of host-specific AAL-toxin in tomato plants infected with the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. *Mycotoxins*, **62**(1): 7 – 13.
- Kindl, H.** (2013): Biochemie der Pflanzen. Springer Verlag, Heidelberg.

- Kirk**, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W.; Stalpers, J.A. (2008): Dictionary of Fungi. 10. Auflage. CAB International, Wallingford, UK, 771.
- Kleeberg**, H. (2010): Idee, Entwicklung und Etablierung am Markt von Pflanzenextrakten für den Pflanzenschutz. *Journal für Kulturpflanzen*, **62**(3): 75 – 80.
- Kohmoto**, K. (1992): Determination of host-selective toxins. In: Plant Toxin Analysis, Modern Methods of Plant Analysis, Linskens, H.F. und Jackson, J.F. (Hrsg.), Volume 13, Springer Verlag, Heidelberg, 51 – 73.
- Kohmoto**, K. und Yoder, O. (1998): Molecular genetics of host-specific toxins in plant disease: Proceedings of the 3rd Tottori International Symposium on host-specific toxins. In: Developments in Plant Pathology, Volume 13, Springer Science & Business Media, New York, USA.
- Kothe**, E (2007): Pilze. In: Allgemeine Mikrobiologie. Fuchs, G. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 78 – 79.
- Kothe**, G.O. und Free, S.J. (1996): Protocol for the electroporation of *Neurospora spheroplasts*. *Fungal Genetics Newsletters*, **43**: 31 – 33.
- Kotzé**, J.M. (1981): Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Dis.*, **65**(12): 945 – 950.
- Kramer**, B. (2008): Identifizierung und Charakterisierung neuer Pathogenitätsfaktoren in einem MAPK-Signalweg des weizenpathogenen Pilzes *Mycosphaerella graminicola*. Dissertation am Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern.
- Kramer**, B.; Thines, E.; Foster, A.J. (2009): MAP kinase signalling pathway components and targets conserved between the distantly related plant pathogenic fungi *Mycosphaerella graminicola* and *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* **46**, 667 – 681.
- Kück**, U. und Hoff, B. (2010): New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**: 51 – 62.
- Kuldau**, G.A. und Yates, I.E. (2000): Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In: Microbial Endophytes, Bacon, C.W. und White, J. (Hrsg.). CRC Press, London, UK: 85 – 117.
- Kuo**, K.C. und Hoch, H.C. (1996): The parasitic relationship between *Phyllosticta ampellicida* and *Vitis vinifera*. *Mycologia*, **88**(4): 626 – 634.
- Kwon-Chung**, K.J.; Goldman, W.E.; Klein, B.; Szaniszlo, P.J. (1998): Fate of transforming DNA in pathogenic fungi. *Med. Mycol.*, **36**: 38 – 44.
- Lamb**, C. und Dixon, R.A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Pathol.*, **48**: 251 – 275.
- Lazo**, G.R.; Stein, P.A.; Ludwig, R.A. (1991): A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Nat. Biotechnol.*, **9**: 963 – 967.
- Leach**, J.; Lang, B.R.; Yoder, O.C. (1982): Methods for selection of mutants and in vitro culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *Microbiology*, **128**(8): 1719 – 1729.

- Leclerque**, A.; Wan, H.; Abschutz, A.; Chen, S.; Mitina, G.V.; Zimmermann, G.; Schairer, H.U. (2003): *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Curr. Genet.*, **45**: 111 – 119.
- Leiritz**, E. (2011): Risikoanalyse an bedeutenden Kulturen in Europa unter besonderer Berücksichtigung des Erregers der Schwarzfäule an Reben *Guignardia bidwellii*. Disserta Verlag, Hamburg.
- Liebl**, H. (2013): Nachweis stabiler Isotope. In: Künstliche Radioaktive Isotope in Physiologie Diagnostik und Therapie, Schwiegk, H. und Turba, F. (Hrsg.). Springer Verlag, Heidelberg, 311 – 320.
- Löffler**, G. (2008): Basiswissen Biochemie: Mit Pathobiochemie. Ausgabe 7. Springer Verlag, Heidelberg.
- Loskill**, B.; Molitor, D.; Koch, E.; Harms, M.; Berkelmann-Löhnertz, B.; Hoffmann, C.; Kortekamp, A.; Porten, M.; Louis, F.; Maixner, M. (2009): Strategien zur Regulation der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) im ökologischen Weinbau. Abschlussbericht 2009, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Bernkastel-Kues.
- Luttrell**, E.S. (1974): Parasitism of fungi on vascular plants. *Mycologia* **66**: 905 – 924.
- MacDonald**, M.J. und D’Cunha, G.B. (2007): A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem. Cell Biol.*, **85**(3): 273 – 282.
- Maixner**, M. (2004): Phytopathologische Risiken für den Weinbau durch Klimaänderung. *ALVA Tagungsbericht 2004*: 27 – 28.
- Malonek**, S. und Meinhardt, F. (2001): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morgani*. *Curr. Genet.*, **40**:152 – 155.
- Margolin**, B.S.; Freitag, M.; Selker, E.U. (1997): Improved plasmids for gene targeting at the his-3 locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genet. Newsl.* **44**: 34 - 36
- Meng**, Y.; Patel, G.; Heist, M.; Betts, M.F.; Tucker, S.L.; Galadima, N.; Donofrio, N.M.; Brown, D.; Mitchell, T.K.; Li, L.; Xu, J-R.; Orbach, M.; Thon, M.; Dean, R.A.; Farman, M.L. (2007): A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, **44**: 1050 – 1064.
- Meyer**, V. (2008): Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. *Biotechnol. Adv.*, **26**: 177 – 185.
- Meyer**, V.; Mueller, D.; Strowig, T.; Stahl, U. (2003): Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Curr. Genet.*, **43**(5): 371 – 377.
- Michielse**, C.B.; Hooykaas, P.J.J.; van den Hondel, C.A.M.J.J.; Ram, A.F.J. (2005): *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.*, **48**: 1 – 17.

- Mielke**, M. (2004): Pathogenese und Diagnostik von Infektionen. In: Infektionskrankheiten: verstehen, erkennen, behandeln, Suttorp, N. (Hrsg.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 14 – 36.
- Möbius**, N. und Hertweck, C. (2009): Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**(4): 390 – 398.
- Mohr**, H.D. (2005): Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Molitor**, D. (2009): Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) an Weinreben. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Molitor**, D. und Beyer, M. (2014): Epidemiology, identification and disease management of grape black rot and potentially useful metabolites of black rot pathogens for industrial applications – a review. *Annals of Applied Biology* **165**(3): 305 – 317.
- Molitor**, D.; Liermann, J.C.; Berkelmann-Löhnertz, B.; Buckel, I.; Opatz, T.; Thines, E. (2012): Phenguignardic acid and Guignardic acid, phytotoxic secondary metabolites from *Guignardia bidwellii*. *J. Nat. Prod.*, **75**: 1265 – 1269.
- Monfort**, A.; Cordero, L.; Maicas, S.; Polaina, J. (2003): Transformation of *Mucor miehei* results in plasmid deletion and phenotypic instability. *FEMS Microbiol. Lett.*, **224**: 101 - 106.
- Mülhardt**, C. (2007): Klonierung von cDNA. In: Gentechnische Methoden. Jansohn, M. (Hrsg.), 4. Auflage, Elsevier GmbH, München, 207 – 244.
- Mullins**, E.D.; Chen, X.; Romaine, P.; Raina, R.; Geiser, D.M.; Kang, S. (2001): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, **91**(2): 173 – 180.
- Munzert**, M.; Beck, R.; Lepschy, J.; Nast, D.; Rieder, J.; Schuster, M.; Wurzing, A. (2005): Jahresbericht 2005, Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising-Weihenstephan.
- Nakayashiki**, H.; Kadotani, N.; Mayama, S. (2006): Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. *J. Mol. Evol.* **63**:127 – 135.
- Nelson**, D.; Cox, M.; Cox, M.M. (2005): Lehninger Biochemie. Ausgabe 3. Springer Verlag, Heidelberg.
- Nelson**, R.T.; Pryor, B.A.; Lodge, J.K. (2003): Sequence length required for homologous recombination in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.*, **38**: 1 – 9.
- Neuman**, B.; Cavanagh, D.; Britton, P. (2001): Use of defective RNAs containing reporter genes to investigate targeted recombination for avian infectious bronchitis virus. In: The Nidoviruses: (coronaviruses and Arteriviruses); [proceedings of the VIII International Symposium in Nidoviruses], Lavi, E.; Weiss, S.R.; Hingley, S.T. (Hrsg.), Springer Science & Business Media, New York, USA: 513 – 518.

- Ozeki**, K.; Kyoya, F.; Hizume, K.; Kanda, A.; Hamachi, M.; Nunokawa, Y. (1994): Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **58**: 2224 – 2227.
- Panaccione**, D.G.; Johnson, R.D.; Rasmussen, J.B.; Friesen, T.L. (2002): Fungal Phytotoxins. In: Agricultural Applications, The Mycota Volume 11, Kempken, F. (Hrsg.). Springer Verlag, Heidelberg, 311 – 340.
- Park**, S-M. und Kim, D-K. (2004): Transformation of a filamentous fungus *Cryphonectria parasitica* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**: 217 – 222.
- Pastirčáková**, K.; Pastirčák, M.; Celar, F.; Shin, H-D. (2009): *Guignardia aesculi* on species of *Aesculus*: new records from Europe and Asia. *Mycotaxon*, **108**: 287 – 296.
- Phongpaichit**, S.; Rungjindamai, N.; Rukachaisirikul, V.; Sakayaroj, J. (2006): Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **48**(3): 367 – 372.
- Podbregar**, N.; Schwanke, K.; Frater, H. (2008): Wetter, Klima, Klimawandel: Wissen für eine Welt im Umbruch. Springer Science & Business Media, New York, USA.
- Polashock**, J.J.; Caruso, F.L.; Oudemans, P.V.; McManus, P.S.; Crouch, J.A. (2009): The North American cranberry fruit rot fungal community: A systematic overview using morphological and phylogenetic affinities. *Plant Pathol.*, **58**: 1116 – 1127.
- Punithalingham**, E. und Holliday, P. (1975): *Guignardia musae*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, **47**: 467.
- Ramsdell**, D.C. und Milholland, R.D. (1988): Black rot. *Compendium of Grape Diseases*. Pearson, R.C. und Goheen, A.C. (Hrsg.). *The American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota, USA, 15 – 17.
- Reddick**, D. (1911): *Cornell University Bulletin 293. The Black Rot Disease of Grapes*. Ithaca, NY, USA: Cornell University.
- Riach**, M.B.R. und Kinghorn, J.R. (1996): Genetic transformation and vector developments in filamentous fungi. In: Fungal Genetics: Principles and Practice, Bos, C.J (Hrsg.) Marcel Dekker, New York, USA, 209 – 233.
- Rodrigues-Heerklotz**, K.F.; Drandarov, K.; Heerklotz, J.; Hesse, M.; Werner, C. (2001): Guignardic acid, a novel type of secondary metabolite produced by the endophytic fungus *Guignardia* sp.: Isolation, structure elucidation, and asymmetric synthesis. *Helv. Chim. Acta*, **84**: 3766 – 3772.
- Roger**, A.J.; Sandblom, O.; Doolittle, W.F.; Philippe, H. (1999): An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, **16**(2): 218 – 233.
- Rolland**, S.; Jobic, C.; Fevre, M.; Bruel, C. (2003): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Curr. Genet.*, **44**: 164 – 171.

- Romão**, A.S.; Spósito, M.B.; Andreote, F.D.; Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. (2011): Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. *Genet. Mol. Res.*, **10**(1): 243 – 252.
- Ruiz-Díez**, B. (2002): Strategies for the transformation of filamentous fungi. *J. Appl. Microbiol.*, **92**: 189 – 195.
- Ruiz-Díez**, B. und Martínez-Suárez, J.V. (1999): Electrotransformation of the human pathogenic fungus *Scedosporium prolificans* mediated by repetitive rDNA sequences. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **25**: 275 – 282.
- Sambrook**, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (2001): Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd edition, Book 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scharnhop**, H. (2008): Untersuchungen zur Biosynthese aromatischer Sekundärmetabolite in Zellkulturen von *Sorbus aucuparia* L. und *Centaurium erythraea* RAFN. Cuvillier Verlag, Göttingen.
- Scherer**, L.J. und Rossi, J.J. (2003): Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnol.*, **21**(12): 1457 – 1465.
- Schüffler**, A.; Liermann, J.C.; Opatz, T.; Anke, T. (2011): Elucidation of the biosynthesis and degradation of Allantofuranone by isotopic labelling and fermentation of modified precursors. *ChemBioChem*, **12**(1): 148 – 154.
- Schulz**, B. und Boyle, C. (2005): The endophytic continuum. *Mycol. Res.*, **109**(6): 661 – 686.
- Scribner**, F.L. (1886): *Report on the Fungus Diseases of the Grapevine*. Washington, DC, USA: Washington Government Printing Office.
- Shaw**, B.D.; Kozlova, O.; Read, N.D.; Turgeon, B.G.; Hoch, H.C. (2001): Expression of recombinant aequorin as an intracellular calcium reporter in the phytopathogenic fungus *Phyllosticta ampellicida*. *Fungal Genet. Biol.*, **34**: 207 – 215.
- Smith**, T.M. und Smith, R.L. (2009): Ökologie. Pearson Deutschland GmbH.
- Snowdon**, A.L. (1990): Post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables Volume 1. Manson Publishing, London, UK.
- Sommart**, U.; Rukachaisirikul, V.; Trisuwan, K.; Tadpetch, K.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. (2012): Tricycloalternarene derivatives from the endophytic fungus *Guignardia bidwelii* PSU-G11. *Phytochem. Lett.*, **5**: 139 – 143.
- Staben**, C.; Jensen, B.; Singer, M.; Pollock, J.; Schechtman, M.; Kinsey, J.; Selker, E. (1989): Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genet. Newsl.*, **36**: 79 – 81.
- Stafford**, H.A. (2000): Crown gall disease and *Agrobacterium tumefaciens*: A study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. *The Botanical Review*, **66**(1): 99 – 118.
- Stein**, J. (2006): Molekulare Mikrobiologie und Immunpathogenese von *Helicobacter pylori*. In: Infektiologie des Gastrointestinaltraktes, Caspary, W.F.; Kist, M.; Stein, J. (Hrsg.). Springer Verlag, Heidelberg, 151 – 157.

- Steiner**, S. und Philippsen, P. (1994): Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Gen. Genet.*, **242**: 263 – 271.
- Stoye**, A.; Kowalczyk, D.; Opatz, T. (2013): Total synthesis of (+)-Phenguignardic acid, a phytotoxic metabolite of *Guignardia bidwellii*. *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**(26): 5952 – 5960.
- Strobel**, G.; Kenfield, D.; Sugawara, F. (1988): The incredible fungal genus – *Drechslera* – and its phytotoxic ophiobolins. *Phytoparasitica*, **16**(2): 145 – 152.
- Subramanyam**, K.; Muralidhararao, D.; Devanna, N. (2009): Novel molecular approach for optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis and genetic diversity assessment of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *Current Biotica*, **3**(1): 1 - 12.
- Sutton**, B.C.; British Mycological Society (1996): A century of mycology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tkacz**, J.S. und Lange, L. (2004): Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine. Ausgabe 1. Springer Verlag, Heidelberg.
- Ullrich**, C.I.; Kleespies, R.G.; Enders, M.; Koch, E. (2009): Biology of the black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, its development in susceptible leaves of grapevine *Vitis vinifera*. *Journal für Kulturpflanzen*, **61**(3): 82 – 90.
- Varejão**, E.V.V.; Demuner, A.J.; Barbosa, L.C.A.; Barreto, R.W. (2013): The search for new natural herbicides – Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. *Crop Prot.*, **48**: 41 – 50.
- Verma**, L.R. und Sharma, R.C. (1999): Diseases of horticultural crops: fruits. Indus Publishing, New Delhi, India.
- Vermerris**, W. und Nicholson, R. (2007): Phenolic compounds biochemistry. Springer Science & Business Media, New York, USA.
- Vijn**, I. und Govers, F. (2003): *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol.*, **4**: 459 – 467.
- Vollborn**, M. und Georgescu, V. (2012): Kein Winter, nirgends: Wie der Klimawandel Deutschland verändert. BoD – Books on Demand, Berlin.
- Weidemann**, G.J. und Boone, D.M. (1983): Incidence and Pathogenicity of *Phyllosticta vaccinii* and *Botryosphaeria vaccinii* on Cranberry. *Plant Disease*, **67**:1090 – 1093.
- Weidemann**, G.J.; Boone, D.M.; Burdsall, H.H. (1982): Taxonomy of *Phyllosticta vaccinii* (Coelomycetes) and a new name for the true anamorph of *Botryosphaeria vaccinii* (Dothideales, Dothioraceae). *Mycologia*, **74**(1), 59 – 65.
- Weingärtner**, L. und Trentmann, C. (2011): Handbuch Welternährung. Deutsche Welthungerhilfe e.V. (Hrsg.). Campus Verlag, Frankfurt am Main.
- Weld**, R.J.; Plummer, K.M.; Carpenter, M.A.; Ridgway, H.J. (2006): Approaches to function genomics in filamentous fungi. *Cell Res.*, **16**: 31 – 44.

- Wenzel, C.** (2014): Identifizierung und Charakterisierung von putativen Virulenzfaktoren des Gerstenpathogens *Rhynchosporium commune*. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg.
- Wickert, E.;** de Macedo Lemos, E.G.; Kishi, L.T.; de Souza, A.; de Goes, A. (2012): Genetic diversity and population differentiation of *Guignardia mangiferae* from „Tahiti“ acid lime. *Sci. World J.*, **2012**: 1 – 11.
- Wong, M-H.;** Crous, P.W.; Henderson, J.; Groenewald, J.Z.; Drenth, A. (2012): *Phyllosticta* species associated with freckle disease of banana. *Fungal Diversity*, **56**: 173 – 187.
- Wulf, A. und Pehl, L.** (2005): Schaderreger an der Rosskastanie neben der Miniermotte. LWF Wissen **48**, 21 – 27.
- Xiao, J.Z.;** Tsuda, M.; Doke, N.; Nishimura, S. (1991): Phytotoxins produced by germinating spores of *Bipolaris oryzae*. *Phytopathology*, **81**(1): 58 – 64.
- Yamano, Y. und Ito, M.** (2005): Synthesis of optically active Vomifoliol and Roseoside stereoisomers. *Chem. Pharm. Bull*, **53**(5): 541 – 546.
- Yuan, W.H.;** Liu, M.; Jiang, N.; Guo, Z.K.; Ma, J.; Zhang, J.; Song, Y.C.; Tan, R.X. (2010): Guignardones A-C: Three Meroterpenes from *Guignardia mangiferae*. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**(33): 6348 – 6353.
- Zhang, Z. und Gurr, S.J.** (2000): Walking into the unknown: a ‘step down’ PCR-based technique leading to the direct sequence analysis of flanking genomic DNA. *Gene*, **253**: 145 – 150.
- Zhu, J.;** Oger, P.M.; Schrammeijer, B.; Hooykaas, P.J.J.; Farrand, S.K.; Winans, S.C. (2000): The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.*, **182**(14): 3885 – 3895.

VI. Anhang

Anhang I: Massen- und UV-Spektren der nachgewiesenen Toxine

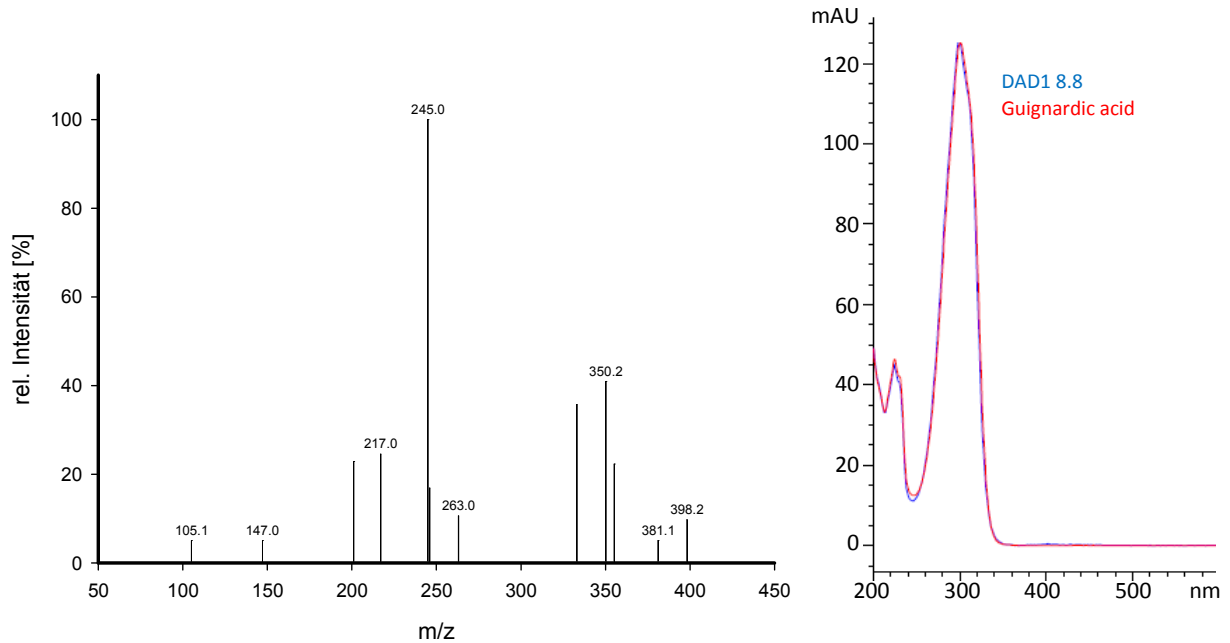


Abbildung A1: Massen- und UV-Spektrum der *in planta* nachgewiesenen Guignardic acid.

Massenspektrum mit positiver Ionisierung und UV- Spektrum bei einer Wellenlänge von 300 nm von dem phytotoxischen Dioxolanon Guignardic acid, das in Extrakten von mit *G. bidwellii* infizierten *Vitis vinifera* Blättern identifiziert wurde.

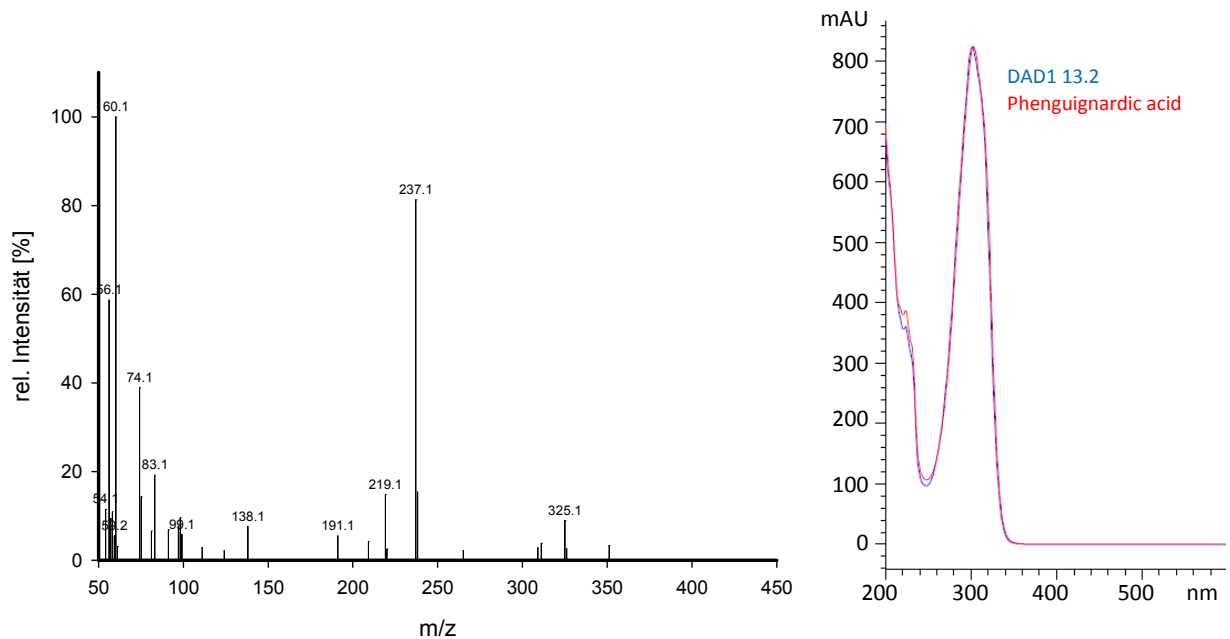


Abbildung A2: Massen- und UV-Spektrum des Toxins aus Submersfermentationen mit *Guignardia aesculi*.

Massenspektrum mit positiver Ionisierung und UV- Spektrum bei einer Wellenlänge von 300 nm von dem phytotoxischen Dioxolanon Phenguignardic acid, das in Extrakten aus Submersfermentationen mit *G. aesculi* identifiziert wurde.

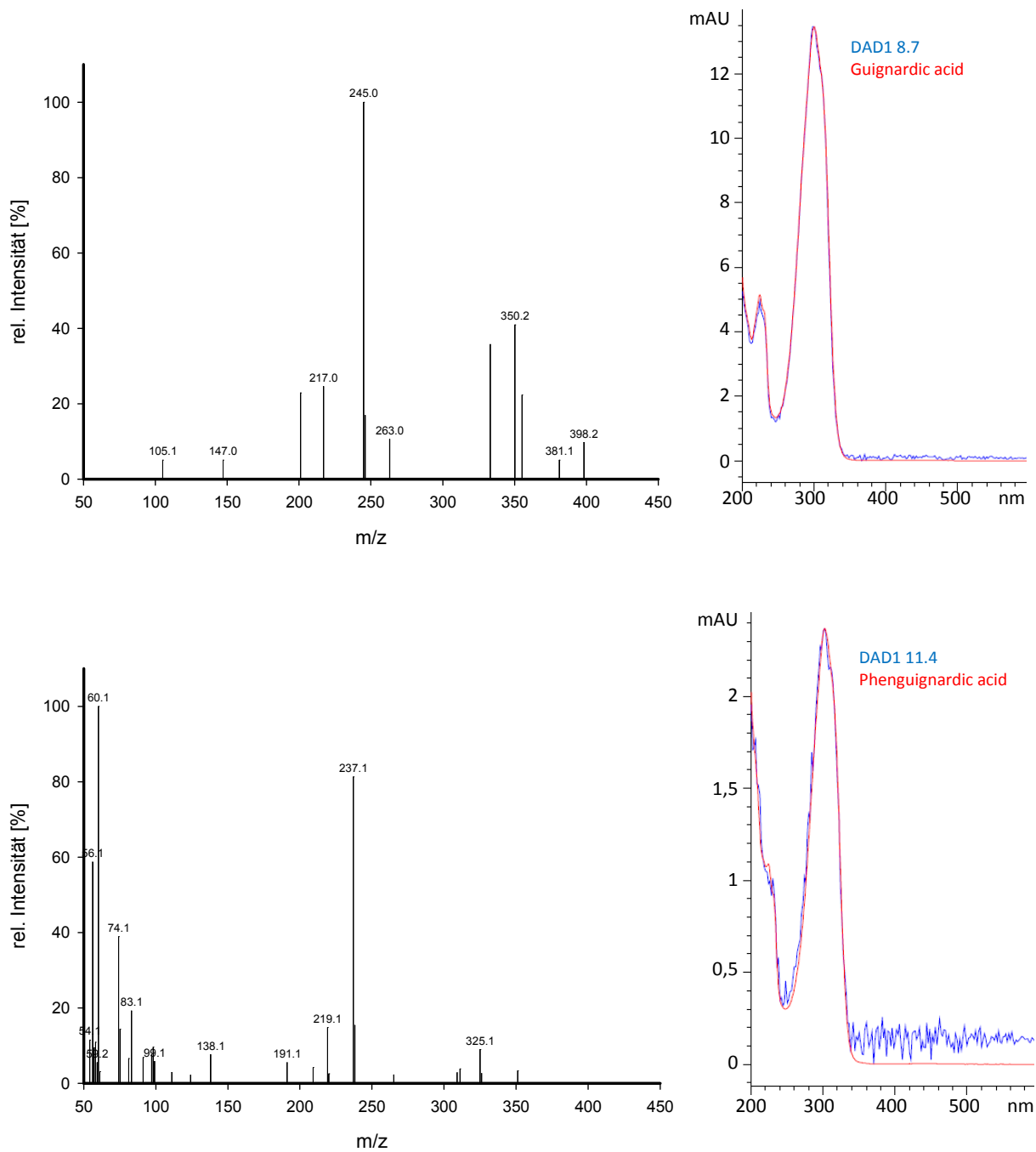


Abbildung A3: Massen- und UV-Spektren der Toxine aus Submersfermentationen mit *Guignardia musae*. Massenspektren mit positiver Ionisierung und UV- Spektrum bei einer Wellenlänge von 300 nm von den Toxinen Guignardic acid und Phenguignardic acid, die in Extrakten aus Submersfermentationen mit *G. musae* identifiziert wurde.

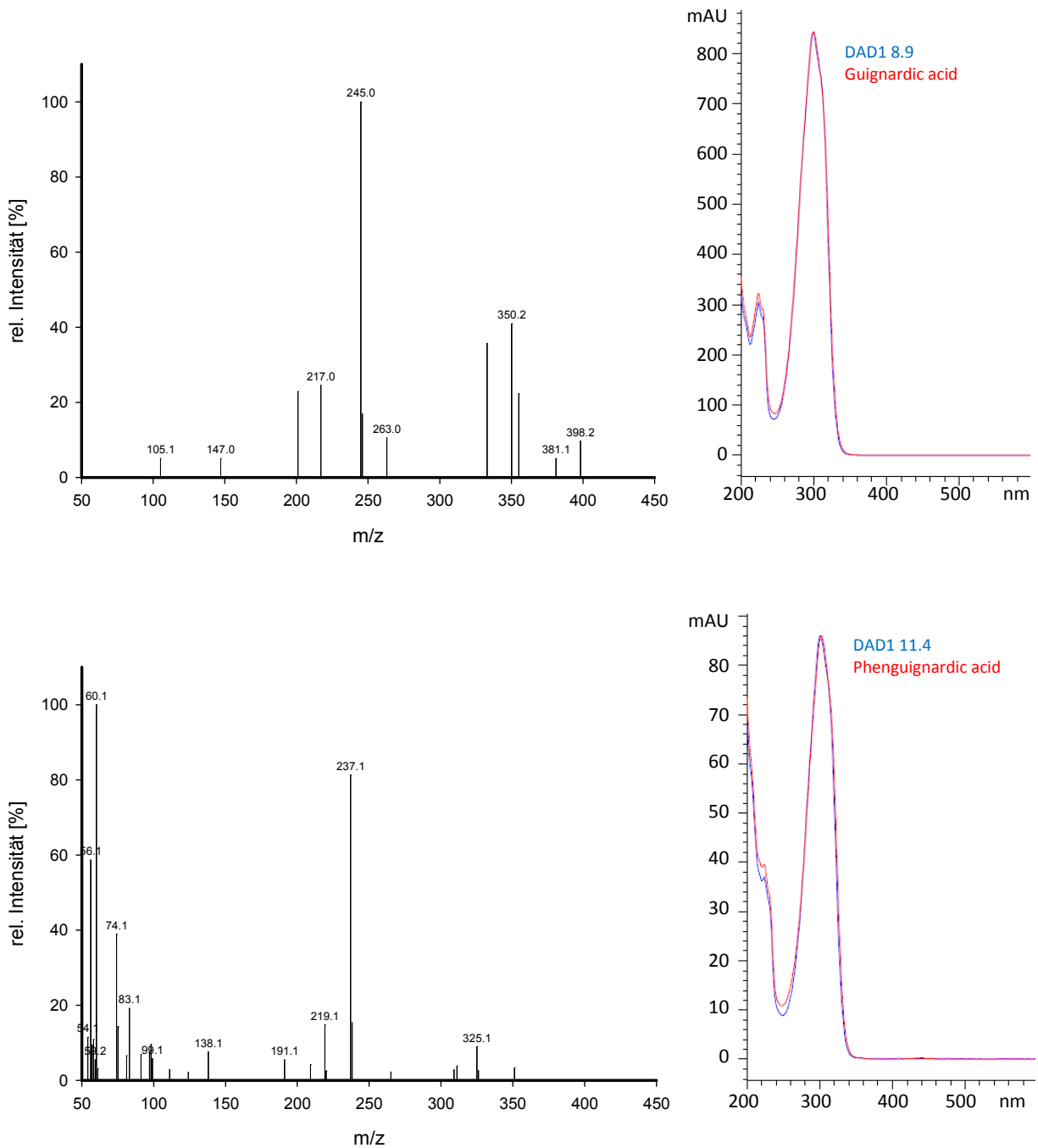


Abbildung A4: Massen- und UV-Spektren der Toxine aus Submersfermentationen mit *Guignardia vaccinii*.

Massenspektren mit positiver Ionisierung und UV- Spektrum bei einer Wellenlänge von 300 nm von den Toxinen Guignardic acid und Phenguignardic acid, die in Extrakten aus Submersfermentationen mit *G. vaccinii* identifiziert wurde.

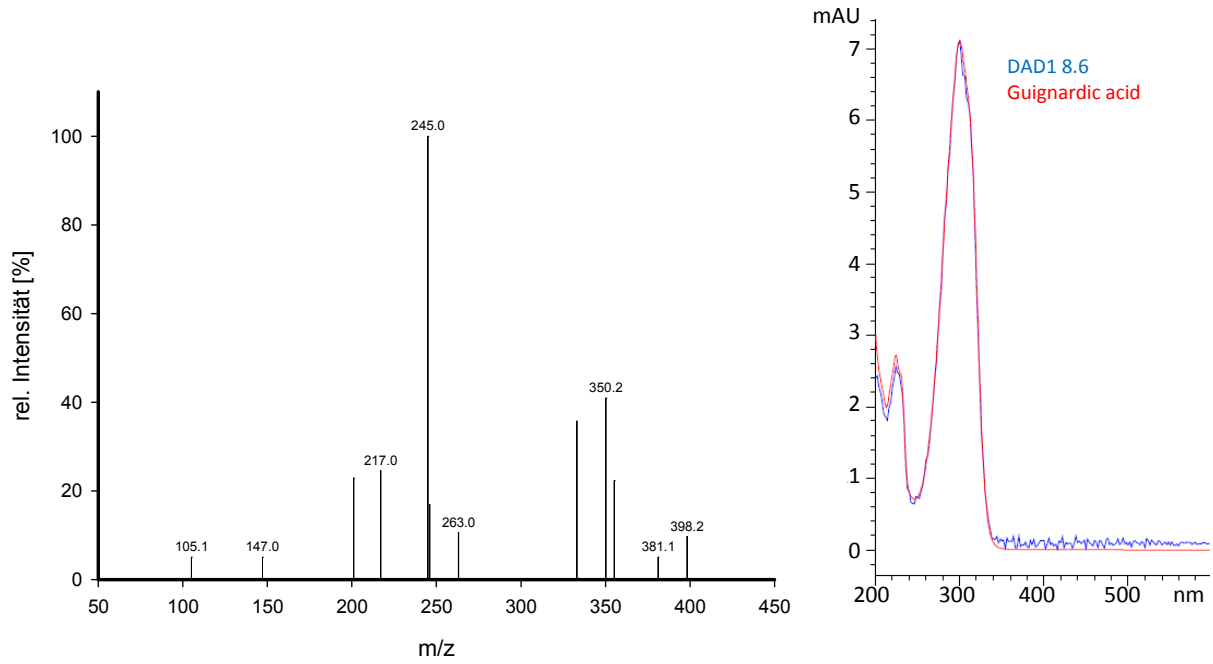


Abbildung A5: Massen- und UV-Spektrum des Toxins aus Submersfermentationen mit *Guignardia mangiferae*.

Massenspektrum mit positiver Ionisierung und UV- Spektrum bei einer Wellenlänge von 300 nm von dem phytotoxischen Dioxolanon Guignardic acid, das in Extrakten aus Submersfermentationen mit *G. mangiferae* identifiziert wurde.

Anhang II: Oligonukleotide

Die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende angegeben.

Tabelle A1: Oligonukleotide zur Identifizierung der kodierenden Sequenz der Aspartat-Transaminase in *Guignardia bidwellii*.

Degenerierte, spezifische und für die *Step Down* PCR-Methode nach Zhang und Gurr (2000) benötigte innere Oligonukleotide zur Identifizierung der kodierenden Sequenz der Aspartat-Transaminase aus *G. bidwellii*.

Bezeichnung	Länge [nt]	Tm [°C]	Sequenz [5' → 3']
AsTra_deg_for	26	68,7	GGTNYTNCCNGTYGTCAAGAWGGCCG
AsTra_deg_rev	30	67,7	GATRCGVCCRTTCTTSGTCATGTARAYGTG
AsTra_spez_for	20	57,3	GATGGTGCTTTTGGCACATG
AsTra_spez_rev	20	57,3	GCGCAACATAGACATGGAAG
AsTra_innen_for	21	67,6	CCATCTCTGGCACCGGAGCCG
AsTra_innen_rev	29	66,7	GAGATTTGCGCTGCGCTGAAGAATCTTGAG

Tabelle A2: Oligonukleotide zur Identifizierung der kodierenden Sequenz der Chorismat-Synthase in *Guignardia bidwellii*.

Degenerierte, spezifische und für die *Step Down* PCR-Methode nach Zhang und Gurr (2000) benötigte innere Oligonukleotide zur Identifizierung der kodierenden Sequenz der Chorismat-Synthase aus *G. bidwellii*.

Bezeichnung	Länge [nt]	Tm [°C]	Sequenz [5' → 3']
ChoSy_deg_for	26	65,8	GTHACBACCTAYGGMGARTCVCAYTG
ChoSy_deg_rev	26	67,7	GCNGCCATKGYTTCNACRATRGGHAC
ChoSy_spez_for	24	67,8	GTCACGACCTACGGAGAGTCCCAC
ChoSy_spez_rev	25	67,9	CCGTCCACCTCATCGTAGGTACACAG
ChoSy_innen_for	27	66,5	CACTCTAGGAActCCAATTGGCATGCCG
ChoSy_innen_rev	23	67,8	GCCGGCGCCTTGATGAAAGGGTC

Tabelle A3: Oligonukleotide zur Identifizierung der kodierenden Sequenz der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase in *Guignardia bidwellii*.

Degenerierte und spezifische Oligonukleotide zur Identifizierung der kodierenden Sequenz der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *G. bidwellii*.

Bezeichnung	Länge [nt]	Tm [°C]	Sequenz [5' → 3']
PAL_deg_for	17	53,6	ATHWSNGCNWSNGGNGA
PAL_deg_rev	17	54,0	GCYTGRAARTTNCCNCC
PAL_spez_for	20	59,4	ATGGGCGACTACAGACTTCC
PAL_spez_rev	20	59,4	CCATCACGGCAGGATACAAC

Tabelle A4: Oligonukleotide zur Amplifikation des genomischen Bereichs, der die kodierende Sequenz der Zielsequenz aus *Guignardia bidwellii* mit 200 bp flankiert.

Die Oligonukleotide wurden zur Amplifikation des genomischen Bereichs, der jeweils die kodierende Sequenz der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *G. bidwellii* mit 200 bp flankiert, verwendet.

Bezeichnung	Länge [nt]	Tm [°C]	Sequenz [5' → 3']
AsTra_200_for	23	62,4	GTCGTAAGAGCAGCTGAAAGGAG
AsTra_200_rev	23	62,4	CCTAGGAGTAGACGCGGAATAAC
ChoSy_200_for	23	60,6	CAGGTAACCGTTGAATTCACCAC
ChoSy_200_rev	23	60,6	CGCTCTCAATGACGTACATCAAG
PAL_200_for	22	60,3	AAGACGTACACCAACAACACGG
PAL_200_rev	22	60,3	CTCGGTCTCTCTGTTTCGATAC

Tabelle A5: Oligonukleotide zur Amplifikation des genomischen Bereichs, der die kodierende Sequenz der Zielsequenz aus *Guignardia bidwellii* mit 500 bp flankiert.

Die Oligonukleotide wurden zur Amplifikation des genomischen Bereichs, der jeweils die kodierende Sequenz der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *G. bidwellii* mit 500 bp flankiert, verwendet.

Bezeichnung	Länge [nt]	Tm [°C]	Sequenz [5' → 3']
AsTra_500_for	19	58,8	GTTGGTCCAGGACTCTCAC
AsTra_500_rev	20	59,4	GAGATTGTGTGTGTGCGTGC
ChoSy_500_for	23	58,9	CAATTTGGACGGTTGGGTATATC
ChoSy_500_rev	23	58,9	CCACATAGATATGGAGCATGATC
PAL_500_for	24	64,4	GATTACCTGGAGGAGCTGGGATTG
PAL_500_rev	23	64,4	GAACGGGAGACCGACAGCTAATC

Tabelle A6: Oligonukleotide zur Amplifikation des genomischen Bereichs, der die kodierende Sequenz der Zielsequenz aus *Guignardia bidwellii* mit 1000 bp flankiert.

Die Oligonukleotide wurden zur Amplifikation des genomischen Bereichs, der jeweils die kodierende Sequenz der Aspartat-Transaminase, der Chorismat-Synthase und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *G. bidwellii* mit 1000 bp flankiert, verwendet.

Bezeichnung	Länge [nt]	Tm [°C]	Sequenz [5' → 3']
AsTra_1000_for	24	62,5	GCCACTCACTGGTATGCGCCACTC
AsTra_1000_rev	27	62,8	CCTTTCACCACCAGACGTGGTACAGAG
ChoSy_1000_for	23	58,8	CATCGTCATGCACAACCGGATGG
ChoSy_1000_rev	26	59,5	CGTCACTATATTCGCGTATGGGACTC
PAL_1000_for	26	64,3	GGAACGGGAGACCGACAGCTAATCGC
PAL_1000_rev	27	64,3	GATCAGGGAGAACCGAGCTCGACACAG

Tabelle A7: Oligonukleotide zur Konstruktion einer Hygromycinresistenz-Kassette mit einem *EFA1*-Promotor aus *Guignardia bidwellii*.

Die Oligonukleotide wurden zur Amplifikation der genomischen Sequenz des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* und zur Amplifikation des Hygromycinresistenzgens, sowie zur Konstruktion des PAL-*EFA1*-HPT-Vektors verwendet. Unterstrichene Nukleotide dienen der Generierung von Restriktionsstellen und sind bei der Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) nicht berücksichtigt.

Bezeichnung	Länge [nt]	T_m [°C]	Sequenz [5' → 3']
EFA1_Promo_for	20	61,4	GCACCTGGTCTCTGTTGACG
EFA1_Promo_rev	20	61,4	GATACCACGCTCACGCTCAG
HPT-o-Prom_for	24	62,7	ATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCG
HPT-o-Prom_rev	22	62,1	CTCTTGTTCCGGTCGGCATCTAC
EFA1-HPT-BglII_f	31	59,8	<u>gaagatcttc</u> ATTTCGATGCACCTGGTCTCTG
EFA1-HPT-Asc_r	33	60,6	<u>aggcgcgcct</u> CATGGTGGACTCCTCTTAAAGCT

Tabelle A8: Oligonukleotide für allgemeine Anwendungen.

Die Oligonukleotide wurden bei Sequenzierungen, zur *Step Down* PCR-Methode nach Zhang und Gurr (2000) und zur Amplifikation der Hygromycinresistenz-Kassette verwendet.

Bezeichnung	Länge [nt]	T_m [°C]	Sequenz [5' → 3']
M13_seq_for	18	53,7	TGTAACACGACGGCCAGT
M13_seq_rev	18	53,7	CAGGAAACAGCTATGACC
HPH 1	20	59,4	GCCTGACCTATTGCATCTCC
HPH 2	20	57,3	GTCAATGACCGCTGTTATGC
PP1	22	51,0	GTAATACGACTCACTATAGGGC
PP2	19	59,0	ACTATAGGGCACGCGTGGT
PPR1	14	---	PO4-CTAGGGCCACCACG-NH2
PPR2	14	---	PO4-CCGGTGCCACCACG-NH2
Pad1	35	76,8	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTGGCC
Pad2	35	76,7	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTGGCA

Anhang III: Klonierungsstrategie

Für die Konstruktion des AsTra-200-HPT-K.O.-Vektors wurde ein 1830 bp großes PCR-Produkt (Größe der flankierenden Bereiche: 247 und 242 bp) mit den Oligonukleotiden AsTra-200-for und AsTra-200-rev von genomischer DNA aus *G. bidwellii* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *BssHII* / *NheI* restringiert. Dadurch wurde ein 389 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *AscI* / *NheI* restringierte HPT-Sequenz aus pCAMBIA-HPH (*SaI*) ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *AvrII* / *NotI* / *Asel* restringiert und das erhaltene Fragment von 2714 bp wurde in den mit *PspOMI* / *AvrII* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor AsTra-200-HPT-K.O. mit einer Größe von 9510 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des AsTra-200-BAR-K.O.-Vektors wurde auf die vorhandene Sequenz im pGEM[®]-T Easy zurückgegriffen und anstelle einer HPT-Sequenz eine BAR-Sequenz aus dem pCAMBIA-BAR (*SaI*) eingebaut. Die Vorgehensweise war identisch wie bei der Konstruktion von AsTra-200-HPT-K.O., außer, dass die Restriktion des BAR-Konstrukts mit *NdeI* / *Apal* durchgeführt wurde. Dementsprechend wurde der pCAMBIA0380 mit *Apal* / *Asel* restringiert und der Inaktivierungsvektor AsTra-200-BAR-K.O. mit einer Größe von 9052 bp erzeugt (Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des ChoSy-200-HPT-K.O.-Vektors wurde ein 1903 bp großes PCR-Produkt (Größe der flankierenden Bereiche: 301 und 266 bp) mit den Oligonukleotiden ChoSy-200-for und ChoSy-200-rev von genomischer DNA aus *G. bidwellii* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* / *MfeI* restringiert. Dadurch wurde ein 259 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *HindIII* / *EcoRI* restringierte HPT-Sequenz aus pCAMBIA-HPH (*SaI*) ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *NotI* / *Asel* restringiert und das erhaltene Fragment von 3164 bp wurde in den mit *PspOMI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor ChoSy-200-HPT-K.O. mit einer Größe von 9976 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des ChoSy-200-BAR-K.O.-Vektors wurde auf die vorhandene Sequenz im pGEM[®]-T Easy zurückgegriffen und anstelle einer HPT-Sequenz eine BAR-Sequenz aus dem pCAMBIA-BAR (*SaI*) eingebaut. Die Vorgehensweise war identisch wie bei der Konstruktion von ChoSy-200-HPT-K.O., außer, dass die Restriktion des BAR-Konstrukts mit *NdeI* / *Apal* / *Asel* durchgeführt wurde. Dementsprechend wurde der pCAMBIA0380 mit *Apal* / *Asel* restringiert und der Inaktivierungsvektor ChoSy-200-BAR-K.O. mit einer Größe von 9484 bp erzeugt (Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des PAL-200-HPT-K.O.-Vektors wurde ein 2740 bp großes PCR-Produkt (Größe der flankierenden Bereiche: 277 und 229 bp) mit den Oligonukleotiden PAL-200-for und PAL-200-rev von genomischer DNA aus *G. bidwellii* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* / *MfeI* restringiert. Dadurch wurde ein 1333 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *HindIII* / *EcoRI* restringierte HPT-Sequenz aus pCAMBIA-HPH (*SaI*) ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *SpeI* / *Apal* restringiert und das erhaltene Fragment von 1975 bp wurde in den mit *SpeI* / *Apal* restringierten

pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor PAL-200-HPT-K.O. mit einer Größe von 8714 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des PAL-200-BAR-K.O.-Vektors wurde auf die vorhandene Sequenz im pGEM[®]-T Easy zurückgegriffen und anstelle einer HPT-Sequenz eine BAR-Sequenz aus dem pCAMBIA-BAR (*Sall*) eingebaut. Die Vorgehensweise war identisch wie bei der Konstruktion von PAL-200-HPT-K.O. und der Inaktivierungsvektor PAL-200-BAR-K.O. wurde mit einer Größe von 9052 bp erzeugt (Tabelle 2.4.).

Die Vektoren mit flankierenden Bereichen von 200 bp wurden nach Vorgaben der Klonierungsstrategie von Frau Monika Rheinheimer im Rahmen ihrer Masterarbeit konstruiert.

Für die Konstruktion des AsTra-500-HPT-K.O.-Vektors wurde ein 2640 bp großes PCR-Produkt (Größe der flankierenden Bereiche: 800 und 497 bp) mit den Oligonukleotiden AsTra-500-for und AsTra-500-rev von genomischer DNA aus *G. bidwellii* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *AvrII* / *XhoI* restringiert. Dadurch wurde ein 1358 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *Sall* / *NheI* restringierte HPT-Sequenz aus pCAMBIA-HPH (*HpaI*) ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *NotI* / *BspHI* restringiert und das erhaltene Fragment von 2816 bp wurde in den mit *PspOMI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor AsTra-500-HPT-K.O. mit einer Größe von 9635 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des AsTra-500-BAR_gfp-K.O.-Vektors wurde auf die vorhandene Sequenz im pGEM[®]-T Easy zurückgegriffen. Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *AvrII* / *BssHII* restringiert. Dadurch wurde ein 1242 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *BssHII* / *SpeI* restringierte BAR-gfp-Sequenz aus pCAMBIA-pzp-BAR-gfp ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *SpeI* / *PvuI* restringiert und das erhaltene Fragment von 7292 bp wurde in den mit *SpeI* / *PvuI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor AsTra-500-BAR_gfp-K.O. mit einer Größe von 14038 bp erzeugt (Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des ChoSy-500-HPT-K.O.-Vektors wurde ein 2418 bp großes PCR-Produkt (Größe der flankierenden Bereiche: 512 und 571 bp) mit den Oligonukleotiden ChoSy-500-for und ChoSy-500-rev von genomischer DNA aus *G. bidwellii* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *MfeI* / *HindIII* restringiert. Dadurch wurde ein 259 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *EcoRI* / *HindIII* restringierte HPT-Sequenz aus pCAMBIA-HPH (*Sall*) ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *Apal* / *SbfI* restringiert und das erhaltene Fragment von 3719 bp wurde in den mit *Apal* / *PstI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor ChoSy-500-HPT-K.O. mit einer Größe von 10495 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des ChoSy-500-BAR_gfp-K.O.-Vektors wurde auf die vorhandene Sequenz im pGEM[®]-T Easy zurückgegriffen und anstelle einer HPT-Sequenz eine BAR-gfp-Sequenz aus pCAMBIA-pzp-BAR-gfp eingebaut. Die Vorgehensweise war identisch wie bei der Konstruktion von ChoSy-500-HPT-K.O., außer, dass die Restriktion des BAR-Konstrukts mit *NotI* durchgeführt wurde.

Dementsprechend wurde der pCAMBIA0380 mit *PspOMI* restringiert und der Inaktivierungsvektor ChoSy-500-BAR_gfp-K.O. mit einer Größe von 14659 bp erzeugt (Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des PAL-500-HPT-K.O.-Vektors wurde ein 3205 bp großes PCR-Produkt (Größe der flankierenden Bereiche: 459 und 521 bp) mit den Oligonukleotiden PAL-500-for und PAL-500-rev von genomischer DNA aus *G. bidwellii* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *MfeI* / *BglII* restringiert. Dadurch wurde ein 286 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *EcoRI* / *BglII* restringierte HPT-Sequenz aus pCAMBIA-HPH (*Sall*) ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *Apal* / *SpeI* restringiert und das erhaltene Fragment von 4481 bp wurde in den mit *Apal* / *SpeI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor PAL-500-HPT-K.O. mit einer Größe von 11220 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des PAL-500-BAR_gfp-K.O.-Vektors wurde auf die vorhandene Sequenz im pGEM[®]-T Easy zurückgegriffen. Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *MfeI* / *BssHII* restringiert. Dadurch wurde ein 1892 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *EcoRI* / *BssHII* restringierte BAR-gfp-Sequenz aus pCAMBIA-pzp-BAR-gfp ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *EcoRI* restringiert und das erhaltene Fragment von 7288 bp wurde in den mit *EcoRI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor PAL-500-BAR_gfp-K.O. mit einer Größe von 14100 bp erzeugt (Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des AsTra-1000-HPT-K.O.-Vektors wurde ein 3395 bp großes PCR-Produkt (Größe der flankierenden Bereiche: 1339 und 716 bp) mit den Oligonukleotiden AsTra-1000-for und AsTra-1000-rev von genomischer DNA aus *G. bidwellii* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *NheI* / *AvrII* restringiert. Dadurch wurde ein 1631 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *NheI* / *AvrII* restringierte HPT-Sequenz aus pCAMBIA-HPH (*Sall*) ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *NotI* restringiert und das erhaltene Fragment von 3359 bp wurde in den mit *PspOMI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor AsTra-1000-HPT-K.O. mit einer Größe von 10171 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des ChoSy-1000-HPT-K.O.-Vektors wurde ein 3392 bp großes PCR-Produkt (Größe der flankierenden Bereiche: 977 und 1080 bp) mit den Oligonukleotiden ChoSy-1000-for und ChoSy-1000-rev von genomischer DNA aus *G. bidwellii* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *NheI* / *MfeI* restringiert. Dadurch wurde ein 435 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *NheI* / *EcoRI* restringierte HPT-Sequenz aus pCAMBIA-HPH (*Sall*) ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *NotI* restringiert und das erhaltene Fragment von 4522 bp wurde in den mit *PspOMI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor ChoSy-1000-HPT-K.O. mit einer Größe von 11334 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des PAL-1000-HPT-K.O.-Vektors wurde ein 4025 bp großes PCR-Produkt (Größe der flankierenden Bereiche: 1115 und 677 bp) mit den Oligonukleotiden PAL-1000-for und PAL-1000-rev von genomischer DNA aus *G. bidwellii* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *MfeI* / *HindIII* restringiert. Dadurch wurde ein 2337 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches entfernt und durch eine mit *EcoRI* / *HindIII* restringierte HPT-Sequenz aus pCAMBIA-HPH (*SaI*) ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *EcoRI* restringiert und das erhaltene Fragment von 3228 bp wurde in den mit *EcoRI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor PAL-1000-HPT-K.O. mit einer Größe von 10040 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und Tabelle 2.4.).

Die Vektoren mit flankierenden Bereichen von 1000 bp wurden nach Vorgaben der Klonierungsstrategie von Frau Maria Matheja im Rahmen ihrer Bachelorarbeit konstruiert.

Für die Konstruktion des pCAMBIA_HPT-o-Prom-Vektors wurde ein 1094 bp großes PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden HPT-o-Prom_for und HPT-o-Prom_rev aus dem Vektor pCAMBIA-HPH (*SaI*) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *PspOMI* / *PstI* restringiert. Die resultierende Sequenz von Hygromycin mit einer Größe von 1101 bp wurde in den mit *PspOMI* / *PstI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert und der Vektor pCAMBIA_HPT-o-Prom mit einer Größe von 7873 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und 2.4.).

Für die Konstruktion des pCAMBIA_EFA1_Gb-Vektors wurde ein 1337 bp großes PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden EFA1_Promo_for und EFA1_Promo_rev von genomischer DNA aus *G. bidwellii* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *PspOMI* / *PstI* restringiert. Die resultierende Sequenz des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* mit einer Größe von 1415 bp wurde in den mit *PspOMI* / *PstI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert und der Vektor pCAMBIA_EFA1_Gb mit einer Größe von 8187 bp erzeugt (Tabelle 2.3. und 2.4.).

Für die Konstruktion des pCAMBIA_EFA1_HPT-Vektors wurde der pCAMBIA_EFA1_Gb-Vektor mit *Asel* / *SpeI* restringiert und das erhaltene Fragment von 1413 bp wurde in den mit *Asel* / *AvrII* restringierten pCAMBIA_HPT-o-Prom-Vektor ligiert. Damit wurde der Vektor pCAMBIA_EFA1_HPT mit einer Größe von 9280 bp erzeugt (Tabelle 2.4.).

Für die Konstruktion des AsTra-EFA1-HPT-K.O.-Vektors wurde der pGEMT-AsTra-HPT (Zwischenvektor der Konstruktion des AsTra-1000-HPT-K.O.-Vektors, Tabelle 2.4.) mit den Restriktionsenzymen *AvrII* / *BglII* restringiert. Dadurch wurde die HPT-Kassette mit einer Größe von 1542 bp entfernt und durch die mit *AvrII* / *BglII* restringierte HPT-Kassette unter der Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* aus pCAMBIA_EFA1_HPT ersetzt. Der resultierende Vektor wurde mit *NgmIV* / *SbfI* restringiert und das erhaltene Fragment von 4167 bp wurde in den mit *Crf9I* / *PstI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor AsTra-EFA1-HPT-K.O. mit einer Größe von 10958 bp erzeugt.

Für die Konstruktion des ChoSy-EFA1-HPT-K.O.-Vektors wurde der pGEM-T-ChoSy_1000-Vektor aus der Konstruktion des ChoSy-1000-HPT-K.O.-Vektors (Tabelle 2.4.) mit dem Restriktionsenzym *NcoI* restringiert. Das resultierende Fragment des flankierenden Bereiches mit einer Größe von 1353 bp wurde in den mit *NcoI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert (pCAMBIA-Flank2). Der pCAMBIA_EFA1_HPT-Vektor wurde mit *PstI* / *AvrII* restringiert und das erhaltene Fragment (HPT-Kassette unter der Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii*) mit einer Größe von 2524 bp wurde in den mit *PstI* / *AvrII* restringierten pCAMBIA-Flank2 ligiert (pCAMBIA-Flank2_EFA1-HPT). Anschließend wurde der pGEM-T-ChoSy_1000-Vektor mit dem Restriktionsenzym *SpeI* restringiert. Das resultierende Fragment des zweiten flankierenden Bereiches mit einer Größe von 1668 bp wurde in den mit dem Restriktionsenzym *AvrII* restringierten pCAMBIA-Flank2_EFA1-HPT-Vektor ligiert. Damit wurde der Inaktivierungsvektor ChoSy-EFA1-HPT mit einer Größe von 12301 bp erzeugt.

Für die Konstruktion des PAL-EFA1-HPT-K.O.-Vektors wurde ein 2524 bp großes PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden EFA1-HPT-BgIII_f und EFA1-HPT-Asc_r aus dem Vektor pCAMBIA_EFA1_HPT amplifiziert, um die PAL-Sequenz mit geeigneten Restriktionsstellen für die weitere Konstruktion zu erhalten. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Easy ligiert und der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* / *NotI* restringiert. Das erhaltene Fragment mit einer Größe von 4046 bp wurde in den mit *PspOMI* / *SpeI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Der resultierende Vektor wurde mit *AscI* / *BglII* restringiert. Dadurch wurde ein 1606 bp großes Fragment des kodierenden Bereiches für PAL entfernt und durch die mit *AscI* / *BglII* restringierte HPT-Kassette unter der Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* aus pCAMBIA_EFA1_HPT ersetzt. Damit wurde der Inaktivierungsvektor PAL-EFA1-HPT mit einer Größe von 11677 bp erzeugt.

Die Vektoren zur Generierung einer Resistenzkassette, in der die Expression des Hygromycinresistenzgens unter der Kontrolle des *EFA1*-Promotors aus *G. bidwellii* steht und die Inaktivierungsvektoren mit dieser Resistenzkassette wurden nach Vorgaben der Klonierungsstrategie von Frau Isabell Büttel im Rahmen ihrer Projektarbeit konstruiert.

Anhang IV: Identifizierte Sequenzen aus *Guignardia bidwellii*

Tabelle A9: Identifizierte Sequenz der Aspartat-Transaminase aus *Guignardia bidwellii*.

Die kodierende Sequenz mit 1188 nt und die Proteinsequenz mit 396 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 43,98 kDa der Aspartat-Transaminase aus *G. bidwellii*.

nt: Nukleotide; aa: Aminosäuren; kDa: Kilodalton.

Aspartat- Transaminase	Sequenz
kodierende Sequenz (1188 nt)	<p>ATCGCAGCTTACCGCGCCGACCCATTGACCAAGAAGGTTGACCTGGGCATTGGTGCATATCGCGA CGACAATGCAAAGCCATGGGTTTTGCCCGTGGTGAAGAAGGCTGATGAAATACTCCGTC AAGACCC CGAACTCAATCACGAGTACCTGCCATTGCTGGTCTTGCAAACCTCACCTCGGCGTCGCAGAAGCT CATCCTGGGAGCAGATAGTCCGGTCATTGCTGAGAAGCGGGTCACCTCTCTCCAGACCATCTCTG GTACCGGAGCCGTCATCTCGGCGCTCTCTCCTCTCAAAGTTTTATAGCAAGCAAGGTGACAAGG AAGTGTACTTCTCGAACCCGACATGGGCCAACCACCACCAATCTTCACCAACGTCAACCTGCCAT TCAAGACGTATCCCTACTTTTCAATGCAGACTCGCGGTCTCGACTTCGATGGCATGATTGCAGCCAT CAAGGCAGCTCCGGAGGGTAGCATCATCTTGTGTCACGCTTGTGCCACAACCCCACTGGTGTCTG ACCCACACAAGAAGCAGTGAAGATGATTGCTGAAGTGTGCGCGCCGCAATCATTTCCTCTCT TCGACACAGCTTATCAAGTTTTCGCGTCGGGAGACCTTCACCGCGACGCTGGTGCATCCGCTAC TTTGCCAGCCAAGGCTTTGAGATGGTCGTCGCGCAGAGCTACGCAAAGAAGCTTTGGCTTGACGGC GAGCGTGCAGGATGCTTTCACCTCATCACGTCGCCCGGAGCCGACGCAGCTGACACAGTTGTCCG CGTCGACTCGCAGCTCAAGATTCTTCAGCGCAGTGAAATATCCAACCCGCCCGCTACGGCGCGC GAATCGTCTCGCTCGTTTTGAACGACCCAGCGCTCTTCGCCGAATGGGAGGAAAAGCTTGCACG ATGAGCGGCCGCATCATCGAGATGCGCAAAGCGTTACGCGCTAAACTCGAGGCCTTGGGCACGCC GGGCACCTGGAATCACATCACAGATCAGATTGGCATGTTGAGCTTCACGGGTCTGTGGAGAAGCA GGTCCTCACCATCCGCGAGCAGGCTCACGTCTACATGACCAAGAACGGGCGCATCTCTATGGCCG GCCTTAACACCAAGAAGCTTACTACTTTGCGCAAGCCGTCGACAAGGTCGTGAGGGGAACGCAG CAGAATTAG</p>
Protein (395 aa, 43,98 kDa)	<p>MAAYRADPFDKVDLIGAYRDDNAKPWVLPVVKKADEILRQDPELNHEYLP IAGLANFTSASQKLILGA DSPVIAEKRVTSLQTISGTGAVHLGALFLSKFYKQGDKEVYFSNPTWANHHQIFTNVNLPFKTYPYFSM QTRGLDFDGMIAAIKAAPEGSIIILLHACAHNPTGVDPTQEQWKMIAEVMRARNHFPFFDTAYQGFASGD LHRDAWSIRYFASQGFEMVVAQSYAKNFGLYGERAGCFHFITSPGADAADTVVRVDSQLKILQRSEISN PPAYGARIVSLVNDPALFAEWEENLRTMSGRIEMRKALRAKLEALGTPGTWNHITDQIGMFSFTGLSE KQVLTIREQAHVYMTKNGRISMAGLNTKNVDYFAQAVDKVVRGTQQN.</p>

Tabelle A10: Identifizierte Sequenz der Chorismat-Synthase aus *Guignardia bidwellii*.

Die kodierende Sequenz mit 1221 nt und die Proteinsequenz mit 406 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 43,67 kDa der Chorismat-Synthase aus *G. bidwellii*.

nt: Nukleotide; aa: Aminosäuren; kDa: Kilodalton.

Chorismat-Synthase	Sequenz
kodierende Sequenz (1221 nt)	<p>ATGTCGACCTTCGGCAACCACTTCCGCGTCACCACTTATGGCGAGTCGCACTGCCTCTCTGTCGGA TGCATTGTGCGATGGTGTCCCTCCGGGCATGCGCCTCACAGAAGCAGACATCCAACCTCAAATGACA CGCCGTCGCCCAGGACAAAGTGCCATCACGACCCCGCGAAACGAGAAGGATCGCGTGAAAATACA ATCAGGCACCGAGTTTGAATCACTCTAGGAACACCAATTGGTATGCGTGTGCATGAATGAAAACCA ACGGCCAAGGACTACGGCGACAACACCATGGACAGGTTCCCTAGACCAAGCCATGCTGATTGGA CTTACCTTGAGAAGTACGGCGTCAAGGCCAGCAGCGGTGGTGGTAGAAGCAGTGCTCGGGAAACG ATTGGCCGTGTTGCTGCAGGCGCGATTGCCGAAAAGTATCTAAGAGAAGCTTACGGAGTCGAGATT GTCGCTTCACTGCCTCTATTGGCAAGGAATCCTGTTTAGTCCGACCCCTGAGCACCCCTACTGCTT CGACGAACCCGATTTCTCGATCTCATCGACAAGATTGACCGCAAGACCGTGGATAGCTTTGTCC CTGTCCGCTGCCAAGCGAAGAGGCTAGCAAGCGCATGGAGAACTAGTTGAGGAATACAGGGAC CAGCACGACAGTATAGGCGGCACAGTCACCTGTGTGATTGTAACGTGCCACTGGACTGGGCGA GCCTTGCTTCGACAAGCTCGAGGCCCTTGTCTGCCACGCAATGCTGAGCATTCTGCAACAAAGG GGTTGAGATTGGTTCTGGTTTTGGTGGCTGCCAGGTGCCGGGTTGCGTTCACAATGACCCTTTA TCAAGGCGCCGGCTCAGAATGGCACTCCGGGACCTGCCAAGCCAAGACTGACAACGAAGACCAAC AACTCGGGTGGCATTGAGGGAGGCATTTCCAACGGTGTCTACATCTACTTCAACGTTGGCTTCAAG TCAGCGGCGACTATCGGTCAAGCCCAGCAAAGTGTGACCTACGACGAGGTGGACGGTGTGTTTGA AGCCAAGGGTAGGCACGACCCATGCGTTGTTCCACGAGCTGTGCCGATTGTGGAGTCCATGGCGG CACTGGTCATCATGGATGCAGTCATGGCTCAACAGTCAAGACAGATGACGAGAAGCATGCTGCCCC CTCTGGACAAAACCATTCCACTGACCGGAGGTGGCGCTTAA</p>
Protein (406 aa 43,67 kDa)	<p>MSTFGNHFRVTTYGESHCLSVGCIVDGVPPGMRLTEADIQPMTRRRPGQSAITTPRNEKDRVEIQSG TEFGITLGTPIGMVMNENQRPKDYGDNTMDRFPSPSHADWYLEKYGVKASSGGRRSSARETIGRVA AGAIAEKYLREAYGVEIVAFTASIGKEFLSPTPEHPTASTNPDFLDLIDKIDRKTVDSEVFPVRCPSEEASK RMEKLVEEYRDQHDSIGGTVTVCVIRNVPTGLGEPDFKLEALLAHAMLSIPATKFEIGSGFGGCQVPG SVHNDPFKAPAQNGTPGPAKPRLTTKTNSSGGIQGGISNGAHIYFNVGFKSAATIGQAQQTIVTYDEVD GVLEAKGRHDPVVPRAVPIVESMAALVIMDAVMAQQSRQMTRSMPLPLDKTIPLTGGGA.</p>

Tabelle A11: Identifizierte Sequenz der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *Guignardia bidwellii*.

Die kodierende Sequenz mit 2187 nt und die Proteinsequenz mit 728 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 77,95 kDa der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *G. bidwellii*.

PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase; nt: Nukleotide; aa: Aminosäuren; kDa: Kilodalton.

PAL	Sequenz
kodierende Sequenz (2187 nt)	<p> ATGGGCGACTACAGACTTCCATCCCCTACCGTCGAAATGCCACTATACCTTCCCACGTCCGTATAACCC ATCAGGCATGGTCCAAGCTACAAGCAAATAGGACCAACAGTCCCCCGCCGGTCGTGCTCGATGGCGAGT CTTTGGACATTGCCTCTCTCGTCGCCGTGGCCAGGTACGGCTCGATGCCGGAGCTGGACCGGAGTCCCA AGACCTTGGACCGGATTGAGAAGAGCGTGGAAATGCTCAAGAGGCATCTCGAACGGGAGATCTCGTTT ACGGTGTCAACACTGGCTATGGAGGCAGTGCAGATACTCGACCAAAGACCTCAAGTCGCTCCAGCAGG CTCTCGTCCAGCACCAACAGTCTGGCATCTGACCTCCATCGACACGGGACAGGCCGATATTGGCGAGC AGCAGGTTTACCCACCCACCTCGAGGACTTTGGCAGCCTCGCCATGCCACCAGCCTGGGTCAAGGGC CTGATGTTGCAGCGTGTCAACAGCATCATCCGCGGTCACTCTGGTGTCTCGTTGCCATCATCGAGTCGA TTGTGAATCTGCTCCAGAAAGACATTACCCCGATCGTCCCTCTGCGTGGCAGCATCTCTGCGTCTGGCGA TTTGTCTCGCTCTTACATTGCTGGCGCCATCTCTGGAACCCCGATATTTTTGCCGTGTCGGCAATC CTCCTGTCATAATGAATGCCGAGCAGCGCTCGAGGCCACGAAGTGCAGCCAGTGGTCTTGGCCCA AGGAAGGTCTTGGTCTTTGAACGGCACGGCGCCCTCTGCTTCGGCGGCTTCTTGGCAGTACAAGAGA GCAACCAACTGGCTCTTCTGTCTCAGGTTCTACTGCCACCTGTGTCGAGGCGCTCTGTGGCAGCGCCG AGAGCTTCAACCCCTTGGTTGCCAACATTGCGCCACACAGAGGCCAGCTTGAGGTGCTTGAACATTTT CAACTTCTCAAGGCTCGCGGCTCGCATCTGGCCTCGAAGGTGAGAAGAGCGAAGATCACCTTCTTGG TCTTGCCAAGACCGGTACCCCTTGCGAACGTCTCAGTGGATTGGCCCGCAGCTCGAGGATCTCCT TCTCGCCACCGAGCAAGTCTCGGTGCAACTTAACTCGACCACGGACAACCTCTGATCGACGTGACGCGC CGACCTCATCCACCACGGGGCAACTTCAAGCGGCCAGCCTGAGCTCCGCCATGGAAAAGACGCGGC TCAGCCTGCAGATGCTGGGCAAGCTTATGTTCTCGCAAGGGACGAGCTGATCAACTGCGCGCTCAATA AAGGGCTGCCGCCAACCTGGCTGCTGACGACCCGAGCCTGAGCTTACGTGCAAGGAATCGACATC AACATCGCGGCTTACATGAGCGAGCTGGCGTACCTGGCCAACCCCGTCTCGTGCACGTGCAGAGCGC CGAGCTGCATAACCAGGCCGTCAACAGCCTGGCCCTCGTCTCGGCCCGCTACACGCTGCAGGCCGTGCG AGGTGCTCTACAAATGTGCGCCGCCTACATCTTACACTGTGCCAGGCACTCGACTTGCAGCGTCTGCG AGTACCGCTTCTACAACAGGCGCATGTAGATGTTTGCAGCGCTCCTCACGTGCGCGTTGGCCGCTCCT CCTCCTCCTCGTCTGTCGTCTCAACGGCCTCGACGCTCCGCCCTCGTCTCGGCCCGCTACACGCTGCAGGCCGTGCG CCATGAAAGAAACCTGGAGCGCCGCCACGAACATGGACCTTGCAGCGGAGCCGCCCGCGCCGCCCGC GCCGGCGTCTCGCCTTCTCTACGAAACGGGCGCGCCGCGGTCTGCCATGCCGTTCTCGAAGAACA GCTCGCCACCACGCTCTCCAGCTCTACACGTCCCAACGCGACCGCATGTTTCAGGATCACGTGCGCAT CACGCCGTATACCTGGGCATCGCCTCGAAGCGCATATACCTCTGCGTCCGCGGCACCCTGGGAGTGG CCATGAGCCGAGGCCTCGTCTGACTACCCTGGGTACATGGGCGGTGCCGAGGTGGGCCGGCGCCGAGGC GACGGGGGGCGAGGACAACAGGAGGACGATCGGCACGTTTGTGAGTGGATCTACGAGGCGTTGAGGG GCGGCGAGTTGTATCGTCCCGTATGGAGGCAGTCGAGGAGGCGGGTATCTAG </p>
Protein (728 aa 77,95 kDa)	<p> MGDYRLPSRTVEMPTIPSHVRITHQAWSKLQANRTNSPPPVLVDGESLDIASLVAVARYGSMPELDRSPKTL RIEKSVEMLKRHLERGDLYGVNNTGYGGSADTRTKDLKSLQQALVQHQSGILTSIDTGRPDIGEQQVSPH EDFGLAMPTAWVKGLMLQRVNSIIRGHSGVSLPIESIVNLLQKDITPIVPLRGSISASGDLSSLSYIAGA ISGNP DIFCRVGNPPVIMNARAALAEHLQPVVLAKEGLGLLNGTAAASASAASLAVQESNLALLSQVL TATCVEALC GSAESFNPFVANIRPHRQLEVASNIFNQLQSRSLASGLEGEKSEDHLLGLAQDRYPLRTSS QWIGPQLEDLL LATEQVSVELNSTTDNPLIDVDADLIHGGNFQAASLSSAMEKTRLSLQMLGKLMFSQ GTELINCALNKGPPN LAADDPSSLFTCKGIDINIAAYMSELAYLANPVSSHVQSAELHNQAVNSLALV SARYTLQAVEVLSQMCAAYIFT LCQALDLRVLQYRFLQQAHDVDCALLTSALAASSSSSSSSSSSNGLD ASALVASIWPTMKETWSAATNMDLAPR AARAARAGVLAFLYETGAPRSAMPFLEEQLATTLSTLYTS QRDRMFEDHVRITPSYLGIAASKRIYLCVRGTLGV AMSRGLVDYPGYMGGAEVGGAEATGGEDNRRT IGTFSRIYEALRGGELYRAVMEAVEEAGI. </p>

Tabelle A12: Identifizierter Sequenzbereich des EFA1-Promotors aus *Guignardia bidwellii*.

In gelb ist die durch bioinformatische Analysen vorausgesagte Promotorsequenz markiert. Auf die lila hinterlegten Sequenzabschnitte wurden spezifische Oligonukleotide konzipiert, um den Sequenzbereich mit EFA1-Promotor zu amplifizieren.

Sequenzbereich EFA1-Promotor aus <i>Guignardia bidwellii</i>	Zusatzinformationen
<p>ATTGGCGGCATCACGGTGGTTTGTCCCGACAAGCGTTCCGGCCA CTGGCATTGAGACTTTTCAAGTGCACAGCGCACCTGGTCTCTGTT GACCGCTGTTCAAAGCACAAAGCACAGTGAAGCAGAGGATTGCAG GCTGGACTTGTTTCGCGAAGGAAGTGAACAACAGCAACAGCAAC AGCATTGATGGCTTGGCTGCATTGCATGTAGCGGTTCACTGG CGAGCAGATTTGCAGCTTTGGTGGGTGCGGTGAAGGGTTGGGC GGCTAGCGGCGAGAGATATCCACCACACACCACCTAGAGCCCAA TCGCATGACAGTTCAGAGGGTCAAGTGCAGAGTGTCACTGTC AGAGTGCAGAGTGCAGAGTGCAGAGTGCAGAGTGTGCGAGGGG AAGAGTCATCAGTCGAGCGCGCGCATGTTGGGCTAGTTGTTGG TTGTTAGTTGTCAATTGTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGGGGTAGCTC ACTGCGGCCCGCTGAGCTGGCTGCCCGGGTGCAGGGTGGCTCC CTCGCACAGTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGGTAGCTC CTGCCCCGCCATTGTTTGGTCTCGCTCTTGCCTCTTGCCGCAC CTTGCAAAAATTCTGCTTGTGACCTAATGGGACTAGCGCCACC ATGCCGCCCGCTTAAAAACCTTGGGACTCCCCTCCTACACCATC CTTTTCTCTTTTTCTGCGCCCATACCACGAAACATCCAGCTTTC GTTCTGAGCTTAACACACTTCAACTCCAACTTCCAACCTCACAA CAATCACCATGGCGTAAGTTTTGATGTCCCCGCTGCGAGGTTTC TCAACGCCTGCAATCCAGCCTTTTTCGCATCGAGTCACCTGTGG CACCTCAGGCAGCTTCCCAACACCTCACCACCTCACCTGAGCCG AGCTGACAAATGGCTGTAGTCCCAAGGAGAAGACCCACATCAACG TCGTCGTCATCGGCCACGTGACTCTGGCAAGTCGACGACCACC GGTCGTAAGTGCTTGGTCAACCGGATCGACCAGCGCAACTCGC TCACAAAACCAACAGACTTGATCTACAAGTGCGGTGGTATCGACA AGCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTCAGTGCCCTCAAATAT TTCTTTGAGCGCAGGGCAGGTCGCTCGTCGCGCCACCTGGAGC CGCCTCGCCTGAGGGGCATTTTTGGGTGGTGGTGGGCGCTA CGCTAAGCTGCTTTGGCGCCTTCGGCAACATGGCCCAAAGCAGC CCTGCGCACCACTTCACTTTGGTGGGACAACATTTTGCTAAACCT CTCTCAGGAAGCCGCGGAGCTCGGCAAGGGTTCCCTCAAGTATG CCTGGGTCTCGACAAGCTGAAGGCTGAGCGTGAGCGTGGTAT CACCATCGACATTGCTCTCTGGAAGTTTCGAGACCCCGAAGTACT ACGTCACCGTCATTGACGCCCGGTCACCGTGACTTCATCAAG AAC</p>	<p>Length of sequence- 1500 Thresholds for TATA+ promoters - 0.02, for TATA- /enhancers - 0.04 1 promoter/enhancer(s) are predicted Promoter Pos: 767 LDF- 0.06 Transcription factor binding sites/RegSite DB: for promoter at position - 767 627 (+) RSP00026 gctttgaTGACtcaaacac 679 (-) RSP00096 GGTTT 671 (-) RSP00127 AGCGGG 498 (-) RSP00127 AGCGGG 723 (-) RSP00148 CGACG 717 (-) RSP00161 WAAAG 708 (-) RSP00161 WAAAG 659 (+) RSP00202 CATGCCGCC 703 (+) RSP00305 CCTTTT 678 (-) RSP00339 RTTTTTTR 625 (-) RSP00339 RTTTTTTR 667 (-) RSP00438 GCGCGC 675 (-) RSP00477 TTAA 608 (+) RSP00483 GCCGC 662 (+) RSP00483 GCCGC 492 (-) RSP00483 GCCGC 480 (-) RSP00483 GCCGC 702 (+) RSP00508 gcaTTTTTatca 711 (+) RSP00508 gcaTTTTTatca 680 (-) RSP00508 gcaTTTTTatca 627 (-) RSP00508 gcaTTTTTatca 481 (-) RSP00512 cttgtaacCATCAgccaatcgaccagccaatcattc http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter</p>