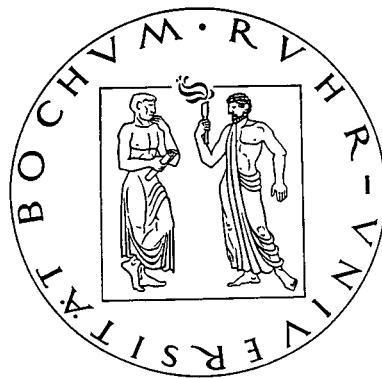


DIPLOMARBEIT

vorgelegt zur Erlangung des Grades eines Diplom-Biologen an der Fakultät für Biologie und
Biotechnologie der Ruhr-Universität Bochum



Identifikation und Charakterisierung von Virulenzfaktoren des biotrophen Pflanzenparasiten *Ustilago maydis*

von

Christian Hanschke

angefertigt im LS Evolution und Biodiversität der Pflanzen, AG Geobotanik

Bochum im Dezember 2009

Referent: Prof. Dr. D. Begerow

Koreferent: Prof. Dr. R. Tollrian

Zusammenfassung

Der Basidiomyzet *Ustilago maydis* dient als Modellorganismus für die Untersuchung von Interaktionen biotropher Pflanzenparasiten mit ihren Wirten. So besitzt er viele sekretierte Proteine unbekannter Funktion, deren Gene in Clustern vorliegen und erst während der Infektion des Wirtes exprimiert werden. Gendeletionsmutanten dieser Cluster zeigten in einigen Fällen im Infektionsverlauf veränderte Phänotypen. Dies führt zu der Annahme, dass sich unter diesen Genen mögliche Virulenzfaktoren befinden. Da diese sich im stetigen Wettstreit mit den Resistenzen des Wirtes befinden und so starken Selektionskräften ausgesetzt sind, ist eine große Anzahl von Allelen dieser Gene zu erwarten. Ziel dieser Arbeit war es daher mit Hilfe von Sequenzanalysen Gene zu identifizieren, die eine hohe intraspezifische Variabilität aufweisen. Die Rolle dieser Gene im Infektionsprozess sollte durch Infektionsversuche mit Gendeletionsmutanten auf verschiedenen Maisrassen charakterisiert werden. Die Gendeletionsmutante des Gens *um10553*, welches in der Sequenzanalyse unauffällig war, zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Infektionsraten. Das Gen *um10554* zeigte in allen Analysen überdurchschnittlich hohe Variabilität. Der Transformant SG200 Δ um10554_12 erwies sich auf allen vier getesteten Maisvarietäten als nahezu apathogen. Allerdings zeigte dieser im Vergleich zu den anderen Transformanten ein gestörtes filamentöses Wachstum. Infektionsversuche mit anderen Transformanten der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554 zeigten das normale Spektrum an Symptomen einer Infektion mit *U. maydis*. Daher müssen die Ergebnisse der Infektionsversuche mit dem Transformanten SG200 Δ um10554_12 kritisch betrachtet werden. Sequenzvergleiche des flankierenden Bereichs mit dem Genom von *U. maydis* zeigten starke Homologien in anderen Abschnitten des Genoms mit denen eine Rekombination stattgefunden haben könnte. Der apathogene Phänotyp von SG200 Δ um10554 basiert daher vermutlich nicht auf der Deletion des Gens *um10554*, sondern auf dem gestörten filamentösen Wachstum, welches durch ein weiteres Rekombinationsereignis verursacht wurde. Wo Teile der rechten Flanke im *U. maydis* Genom rekombiniert haben, lässt sich nur schwer ermitteln. Die Frage ob *U. maydis* für den in dieser Arbeit gewählten Ansatz geeignet ist, bleibt ebenso offen wie die Frage ob SG200 Δ um10554 mit einer Flanke ohne weitere Homologien im *U. maydis* Genom nicht signifikante Unterschiede im Vergleich zu SG200 Δ um10553 aufzeigen würde. Trotz dieser offenen Fragen, zeigt diese Arbeit, dass die Charakterisierung von Gendeletionsmutanten auf verschiedenen Wirtsrassen erfolgen sollte, um die Auswirkungen von Deletionen eindeutig beschreiben zu können und den Einfluss quantitativer Resistenzen auf den beobachteten Phänotyp einschätzen zu können.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BoGa	Botanischer Garten
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CM	complete medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	days past infection
H₂O_{bid}	zweifach destilliertes Wasser
h	Stunde
Hyg	Hygromycin B
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
M	Mol pro Liter
Mb	Megabasenpaare
min	Minute
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
TBE	Tris-Borat- Na ₂ EDTA
Temp	Temperatur
USDA	United States Department of Agriculture
ü.N.	über Nacht

Inhaltsverzeichnis

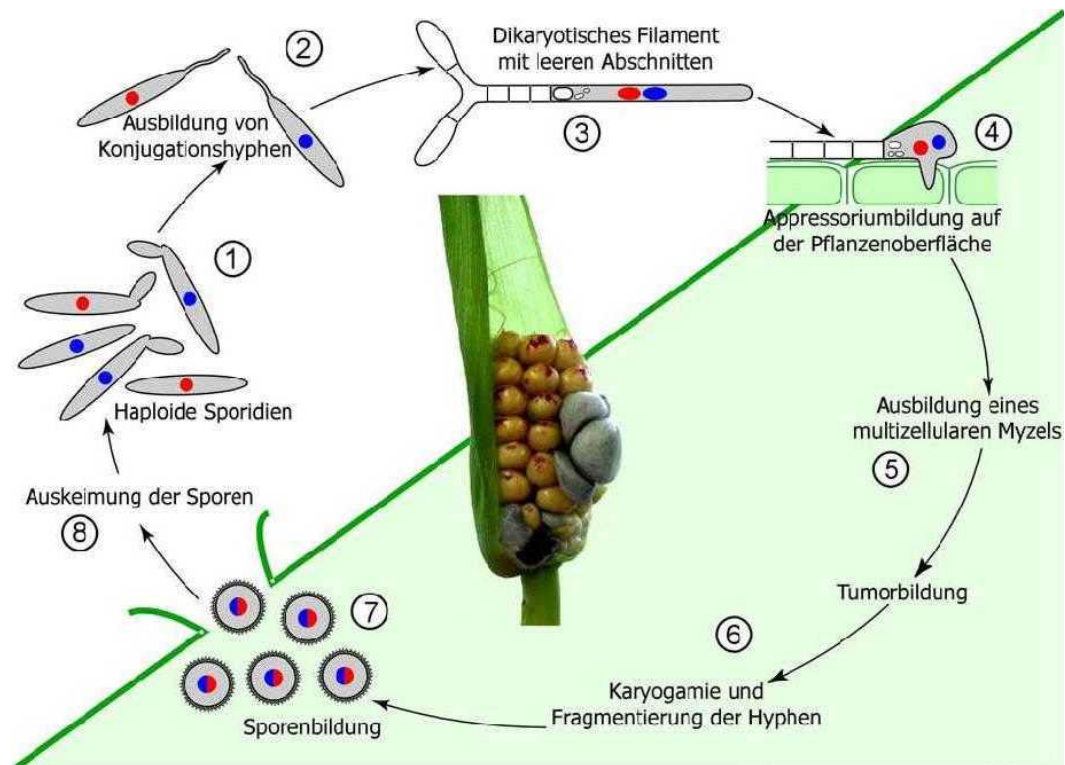
Zusammenfassung.....	I
Abkürzungen und Fachbegriffe.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus.....	1
1.2. Die Rolle von Virulenzfaktoren in der Wirt/Parasit Interaktion.....	4
1.3. Virulenzfaktoren in der Evolution von Wirt/Parasit Systemen.....	6
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	8
2. Material und Methoden.....	9
2.1. Materialien und Bezugsquellen.....	9
2.1.1. Lösungen und Materialien.....	9
2.1.2. Oligonukleotide und Plasmide.....	18
2.1.3. Stämme von <i>U. maydis</i>	21
2.2. Mikrobiologische und genetische Methoden.....	21
2.2.1. Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	21
2.2.2. Arbeiten mit <i>Ustilago maydis</i>	22
2.3. Molekularbiologische Standard-Methoden.....	23
2.3.1. Isolierung von Nukleinsäuren.....	23
2.3.2. Modifikation und Analyse von Nukleinsäuren.....	25
2.3.3. Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren.....	27
2.3.4. Sequenzanalyse.....	28
2.3.5. Bioinformatische Analysen.....	29
2.4. Anzucht und Infektion der Maispflanzen.....	29

3. Ergebnisse.....	31
3.1. Sequenzanalyse.....	31
3.1.1. Substitutionen.....	31
3.1.2. Aminosäure Distanzen.....	32
3.1.3. Verhältnis der nicht synonymen/synonymen Substitutionen.....	34
3.1.4. Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	36
3.2. Gendeletionsmutanten.....	37
3.2.1. SG200 Δ um10553.....	37
3.2.2. SG200 Δ um10554.....	39
3.3. Infektionsversuche.....	42
3.3.1. Infektionsversuche mit SG200 Δ um10553.....	42
3.3.2. Infektionsversuche mit SG200 Δ um10554.....	44
4. Diskussion.....	50
4.1. SG200 Δ um10553.....	50
4.2. SG200 Δ um10554.....	52
4.3. Ursachen für intraspezifische Konservierung potentieller Virulenzfaktoren in <i>U. maydis</i>	54
4.4. Cluster 19A scheint keine wirtsspezifischen Virulenzfaktoren zu tragen.....	55
4.5. Fazit und Ausblick.....	56
5. Literaturverzeichnis.....	58
6. Danksagung.....	63

1. Einleitung

1.1. *Ustilago maydis* als Modellorganismus

Der zu den Brandpilzen im engeren Sinne gehörende Basidiomycet *Ustilago maydis* (DC.) Corda ist ein biotropher Pflanzenparasit, der Mais (*Zea mays* L.) sowie dessen Urform Teosinte (*Zea mays ssp. parviglumis* Iltis & Doebley) befällt (Bölker, 2001). Als Symptome einer Infektion zeigen sich neben Chlorose und Anthozyanbildung der Blätter (Christensen, 1963) auffällige Gallen, die durch die Teliosporenbildung in ihrem Inneren eine schwarze Färbung annehmen. Diese Symptome führten zum deutschen Namen Maisbeulenbrand. Systematisch wird *U. maydis* in die Familie der Ustilaginaceae eingeordnet (Begerow et al., 2006, Hibbet et al., 2007), deren Mitglieder eine große Anzahl von Poaceen befallen (Banuett & Herskowitz, 2002), unter denen auch Nutzpflanzen wie Hirse (*Sorghum spec.* Moench), Hafer (*Avena spec.* L.) und Weizen (*Triticum spec.* L.) (Fischer & Holton, 1957) zu finden sind. Die einzelnen Arten dieser Parasiten zeigen eine große Wirtsspezifität. Meist können nur ein bis zwei Wirtsarten befallen werden (Begerow et al., 2004). In Europa und Nordamerika gilt *U. maydis* als Schädling, wohingegen in Mexiko die Gallen mit den Sporen als Delikatesse in der Küche Verwendung finden (Valverde et al., 1995). *U. maydis* zeigt einen zweigeteilten Lebenszyklus (siehe Abbildung 1), der aus einer saprophytischen und einer biotrophen parasitischen Phase besteht. In der saprophytischen Phase wächst *U. maydis* als haploide, lang gestreckte Hefenzelle (Sporidie) und vermehrt sich vegetativ durch Knospung. Treffen zwei kompatible Sporidien aufeinander, bilden sie Konjugationshyphen und verschmelzen zu einem Dikaryon, welches filamentös wächst. Damit beginnt die biotrophe und parasitische Phase des Lebenszyklus. Auf seiner Wirtspflanze bildet er Infektionshyphen, an deren distalen Enden Appressorien gebildet werden. Im Gegensatz zu melanisierten Appressorien anderer Pflanzenparasiten, wie z.B. den Rostpilzen, die einen hohen Turgordruck aufbauen, um die Epidermis des Wirts zu penetrieren, bauen die Appressorien von *U. maydis* nur einen geringen Druck auf. Sie setzen Enzyme frei, die das Eindringen in den Wirt erleichtern (Doehlemann et al., 2008). Nach erfolgreicher Penetration des Wirtes wächst der Pilz meist intrazellulär, wobei das Plasmalemma der Wirtszellen erhalten bleibt. Am Ende der Proliferation innerhalb des Pflanzengewebes kommt es zur Bildung von Gallen, in denen der Pilz seine diploiden Teliosporen bildet. Die Keimung ist an eine Meiose gebunden, die wieder haploide Sporidien hervorbringt, womit sich der Lebenszyklus schließt.



Haag, 2008 modifiziert nach Feldbrügge et al., 2004

Abbildung 1: Lebenszyklus von *U. maydis*. Der grün hinterlegte Bereich markiert alle Stadien auf der Wirtspflanze. (1) Haploide Sporidien vermehren sich asexuell durch Knospung. (2) Kompatible Sporidien bilden Konjugationshyphen. (3) Diese bilden distal ein dikaryotisches Filament. (4) Bildung eines Appressoriums zur Penetration der Epidermis des Wirtes. (5) Interzelluläres Wachstum als Myzel. (6) Karyogamie innerhalb des Tumorgewebes. (7) Reifung der Teliosporen im Tumor. (8) Keimung und Meiose der Teliosporen.

U. maydis spielt in der Forschung schon lange eine wichtige Rolle z.B. bei Untersuchungen über homologe Rekombination (Holliday, 1961) oder über posttranskriptionale Abläufe (Feldbrügge et al., 2008). Er dient damit als Modellorganismus für biotrophe Wirt/Parasit Interaktionen (Kämper et al., 2006). *U. maydis* ist für genetische Arbeiten sehr gut geeignet, da er sich in der saprophytischen Phase auf künstlichen Nährmedien einfach kultivieren lässt. Das ausgeprägte Rekombinationssystem ermöglicht den gezielten Austausch von einzelnen Genen (Kämper, 2004) z.B. zur Charakterisierung von Gendelektionsmutanten oder zur Identifizierung von regulatorischen Elementen. Zudem steht ein effektives PCR-basiertes Kassettensystem zur Verfügung, um Resistenzen gegen verschiedenste Antibiotika in den Organismus zu transferieren (Brachmann et al., 2004). Da *U. maydis* eine relativ kurze Generationsdauer aufweist und die Wirtspflanze Mais einfach zu kultivieren ist, eignet sich dieses System auch für Infektionsversuche zur Untersuchung von Wirt/Parasit Interaktionen und für die

Charakterisierung von Mutanten. Seit 2003 ist das gesamte Genom von *U. maydis* sequenziert und im Internet über die Datenbank MUMDB frei zugänglich (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>; Kämper et al., 2006). Das Genom umfasst 20.5 Megabasenpaare (Mb) und 6576 Gene (MUMDB 6.11.09). Damit ist das Genom von *U. maydis* im Vergleich zu anderen pflanzenparasitischen Pilzen recht klein (Kämper et al., 2006). So besitzt z.B. *Phytophthora soja* Kaufmann & Gerdemann ein 86 Mb großes Genom mit 19071 Genen und *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr innerhalb von 38.8 Mb 12841 Gene (Cornell et al., 2007). Ein Grund für die vergleichsweise kleine Größe des *U. maydis* Genoms ist die geringe Anzahl an Introns, was auf das effiziente Rekombinationssystem zurückgeführt wird (Holliday et al., 2004). Es gibt keine Anzeichen größerer Dublikationsereignisse im *U. maydis* Genom. Das Genom ist daher weitgehend frei von repetitiven Sequenzbereichen, die z.B. in *Puccinia graminis* einen Anteil von bis zu 30% einnehmen können (Backlund et al., 1993). Auch das Genom der nah verwandten Art *Ustilago hordei* (Pers.) Lagerh. zeigt einen weitaus größeren Anteil an repetitiven Sequenzen (Bakkeren et al., 2006).

In *U. maydis* wurde mit 33 Zellwand degradierenden Proteinen eine vergleichsweise geringe Anzahl dieser Proteine nachgewiesen. Dies steht im Einklang mit der biotrophen Lebensweise dieses Parasiten (Brefort et al., 2009). Im nekrotrophen Pflanzenparasiten *M. grisea* wurden 138 dieser Proteine nachgewiesen (Dean et al., 2005). Allerdings verfügt *U. maydis* über eine große Anzahl an Proteinen unbekannter Funktion (ca. 63%). Einige Gene, die für diese Proteine kodieren, sind in Clustern organisiert (ca. 20%) und während der biotrophen Phase stark hochreguliert (Kämper et al., 2006). Durch Sequenzabgleiche und funktionelle Analysen konnte gezeigt werden, dass diese Proteine sekretiert werden. Gendeletionsmutanten dieser Cluster haben in fünf Fällen unterschiedliche Phänotypen in Infektionsversuchen mit Mais gezeigt. So treten von Hypervirulenz bis zu Apathogenität verschiedenste Ausprägungen auf (Kämper et al., 2006). Es zeigten sich allerdings keine Auffälligkeiten in der Morphologie, im Wachstum oder im Paarungsverhalten der saprophytischen Hefezellen (Müller et al., 2008). Da sich die Symptome auf den biotrophen Teil des Lebenszyklus beschränken, ist anzunehmen, dass es sich um potentielle Virulenzfaktoren handelt, die für die Wirt/Parasit Interaktion wichtig sind.

1.2. Die Rolle von Virulenzfaktoren in der Wirt/Parasit Interaktion

Avirulenz-Virulenzgene sind wichtige Virulenzfaktoren. Im weiteren Sinne können auch Gene, die den Stoffwechsel des Pathogens regulieren als Faktoren, die die Virulenz beeinflussen, betrachtet werden. Avirulenz-Virulenz Allele codieren für sekretierte Proteine, die aus den Zellen des Pathogens ausgeschleust werden und so in direkten Kontakt mit dem Wirt treten (van Esse et al., 2007). Dabei ermöglichen es Virulenzgene dem Parasiten seinen Wirt zu infizieren, wohingegen Avirulenzgene eine Infektion verhindern, da sie die Wirtsabwehr auslösen. Sie fungieren damit als exogene Elicitoren, zwischen Parasit und Wirt. Im Gegensatz dazu stehen die endogenen Elicitoren, die zwischen den Zellen eines Organismus vermitteln z.B. als Hormon. Durch Avirulenz-Elicitoren des Pathogens kann der Wirt einen eindringenden Parasiten erkennen und die Abwehr des Pathogens einleiten. Avirulenz Proteine übernehmen daher meist weitere wichtige Funktionen im Parasit wie z.B. die Unterdrückung der Apoptose nach Identifikation eines Parasiten durch den Wirt (Parker et al., 2004). Durch diese erweiterte Funktionalität sollten Avirulenz Gene auch bei starkem Selektionsdruck im Genpool erhalten bleiben. *U. maydis* scheint in der Lage zu sein relativ unerkannt vom Wirt zu bleiben und eine eventuell auftretende Abwehr zu unterdrücken (Doehlemann et al., 2008). Eine mögliche Erklärung dafür könnten die Gene liefern, die durch den Wirt induziert werden. Diese sogenannten *mig* Gene (*maize-induced-genes*) sind während der Infektionsphase stark hochreguliert, werden jedoch in der Hefephase nicht exprimiert. *mig1* kodiert für ein stark polares, sekretiertes Protein unbekannter Funktion (Basse et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein weder essenziell für die Paarung der Hefezellen, noch für das filamentöse Wachstum des Dikaryons ist. Des Weiteren scheint es, dass *mig1* nicht für die Penetration der Wirtsepidermis benötigt wird. Es wird angenommen, dass *mig1* nicht entscheidend zur Pathogenität von *U. maydis* beiträgt. Da es trotzdem während der Infektion stark hochreguliert ist, wird vermutet, dass es sich um einen Elicitor oder um ein Protein handelt, welches für die Nährstoffaufnahme wichtig ist. Die Gene *mig2-1* bis *mig2-5* werden ebenfalls in der biotrophen Phase exprimiert und zeigen Sequenzmotive, die nahe legen, dass sie sekretiert werden. Dies lässt auf eine wichtige Funktionen für die Pathogenität des Organismus schließen. Allerdings ist der *open-reading-frame* (ORF) von *mig2-3* nach der 57ten Aminosäure unterbrochen, was darauf hindeutet, dass es sich bei diesem Gen um ein Pseudogen handelt. Die Gene sind in einem 7,1 kb großen Cluster auf Chromosom 22 organisiert. Die intergenischen Bereiche zwischen ihnen sind 751-

883bp lang. Sie sind stark homolog zueinander und sind vermutlich durch Dublikationen eines dieser Gene entstanden. Flankiert wird dieses Gencluster von zwei *Ustilago*-spezifischen Genen *mlb1* und *mrb1*. Damit ist das *mig2* Gencluster (siehe Abbildung 2) das erste Pflanzen-induzierte Gencluster, dass in *U. maydis* nachgewiesen werden konnte (Basse et al., 2002). Auch in anderen Pathogenen konnten Gencluster gefunden werden, die durch den Wirt induziert werden. Diese werden auch *pathogenicity islands* genannt. Es wird angenommen, dass sie durch horizontalen Gentransfer entstanden sind. Sie zeichnen sich häufig durch einen erhöhten G/C Gehalt aus (Han et al., 2001). Dies konnte allerdings für das *mig2* Cluster nicht bestätigt werden. Jedoch finden sich in der Aminosäuresequenz der einzelnen Gene viele Cysteine, wie sie auch in anderen pilzlichen Avirulenz Genen gefunden wurden. Dort stabilisieren sie durch die Bildung von Schwefelbrücken die Tertiärstruktur der Proteine (Basse et al., 2002). Diese strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten lassen vermuten, dass sich sowohl unter den *mig* Genen, als auch unter den anderen sekretierten und in Clustern organisierten Genen von *U. maydis* Virulenzfaktoren befinden, die als Virulenz Gene in der Wirt/Parasit Interaktion wichtige Funktionen übernehmen .

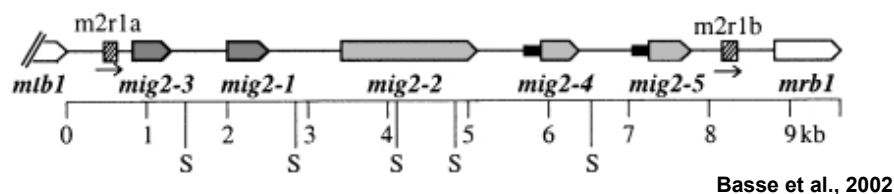
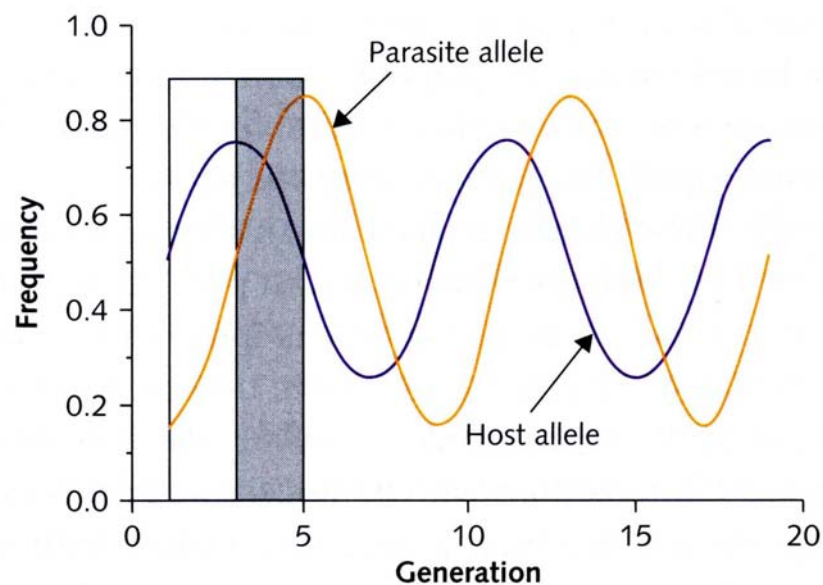


Abbildung 2: Der *mig2* Locus Das *mig2* Gencluster mit intergenischen Bereichen. *m2r1a* und *m2r1b* bilden die Flanken des Clusters. S markiert die durch Cysteine ausgebildeten Schwefelbrücken.

1.3. Virulenzfaktoren in der Evolution von Wirt/Parasit Systemen

Parasiten können starke Selektionsfaktoren für ihre Wirte darstellen, da sie statistisch den dominierenden Genotyp ihres Wirtes am häufigsten befallen. Die Red-Queen-Hypothese erklärt daraus die Notwendigkeit für den Wirt kontinuierlich neue Resistenzen zu entwickeln, um dem Befall durch Parasiten zu entgehen. Daraus folgt, dass Parasiten neue Virulenzen entwickeln bzw. weiterentwickeln müssen, um ihren Wirt weiterhin erfolgreich infizieren zu können. Dies führt zu einer frequenzabhängigen negativen Selektion auf den jeweils dominierenden Genotyp in der Wirts- und Parasitenpopulation (Clay et al., 1997).

Dabei trägt jeder Wirt wenige Resistenzfaktoren, wohingegen jeder Parasit viele Virulenzfaktoren tragen kann (Frank, 1992). Dies und der meist wesentlich schnellere Lebenszyklus der Parasiten wie z.B. bei Bakterien oder Viren scheinen den Wirt zu benachteiligen. Es wurde allerdings gezeigt, dass intragenetische Rekombination innerhalb von Resistenzgenen wie z.B. bei Mais schnell zu neuen Resistenzen gegen Pathogene führen kann (Clay et al., 1997). Zusätzlich zu dieser *Gene-for-Gene resistance* treten in Pflanzen noch weitere Arten von Resistenzen auf. Die sogenannten quantitativen Resistenzen wie z.B. Phytoalexine, Chitinasen oder hydrolytische Enzyme bieten zwar keinen absoluten Schutz vor Parasiten, können aber auch nicht durch Veränderung eines Virulenz Allels des Parasiten umgangen werden (McDonald et al., 2002). Auf der Seite des Parasiten kann schon eine einzelne Punktmutation ein Avirulenz Allel in ein Allel für Virulenz umwandeln bzw. umgekehrt (Thompson et al., 1992). Für die Evolution zwischen Wirt und Parasit muss genetische Variabilität sowohl in der Anfälligkeit des Wirts als auch in der Virulenz des Parasiten vorliegen (Sorci et al., 1997). Des Weiteren muss die Infektion durch Pathogene die Fitness des Wirtes so stark beeinflussen, dass es zu einer Verschiebung der Allelfrequenz innerhalb des Genpools kommt. Gleichzeitig muss die Pathogenpopulation in der Lage sein, schnell auf Veränderungen innerhalb der Wirtspopulation zu reagieren. Da eine Anpassung erst im Laufe der Zeit und nicht spontan erfolgen kann, führt dieses „evolutionäre Wettrüsten“ zu einer phasenverschobenen Frequenz der Wirts- und Parasitallele im Genpool (Clay et al., 1997), siehe Abbildung 3.



Clay et al., 1997

Abbildung 3: Phasenverschobene Abfolge der Wirt/Parasit Allele resultiert aus frequenzabhängiger Selektion. Das Weiß markierte Rechteck zeigt den Bereich in dem der Wirt aufgrund der geringen Anzahl auf ihn spezialisierter Parasiten eine hohe Allelfrequenz erreicht. Der grau hinterlegte Bereich markiert den Zeitpunkt des Zyklus an dem der Anteil spezialisierter Parasit-Genotypen über 50% liegt. Damit korreliert eine Verringerung der Allelfrequenz des Wirtes.

Da die Wirts- und Parasitallele unter positiver Selektion stehen, ist im Vergleich zu Genen unter neutraler Selektion eine erhöhte Substitutionsrate zu erwarten. Zwei Modelle versuchen dieses Szenario zu erklären. Im *gene-for-gene* Modell ist eine Resistenz des Wirtes nur möglich, wenn das Pathogen avirulent und der Wirt resistent ist. Alle anderen Kombinationen führen zu einer erfolgreichen Infektion. Deshalb kann ein Organismus der homozygot für das rezessive Allel „Anfällig“ ist, von jedem Pathogen unabhängig von dessen Virulenz befallen werden. Ein Parasit, der homozygot für das rezessive Allel „Virulent“ ist, kann somit alle Wirte unabhängig von ihrem Genotyp befallen. In einem solchen Fall würden sich alle Virulenzen und Resistenzen im Genpool behaupten. Im *matching allele* Modell kann ein Pathogen nur dann erfolgreich seinen Wirt infizieren, wenn Wirt- und Pathogenallele zueinander passen (Clay et al., 1997). Die frequenzabhängige Selektion auf häufige Genotypen kann zur Bildung und Akkumulation vieler Allele von Virulenz- und Avirulenzgenen führen, um dem Druck der Selektion zu entgehen. Zusätzlich

erscheint es sinnvoll, dass Parasiten für viele Wirtsgenotypen virulent sind, was ihnen ein breiteres Wirtsspektrum liefert. Auch wenn das Wirtsspektrum vieler Pflanzenparasiten sehr eng ist, scheint es ein evolutiver Vorteil zu sein, verschiedene Variabilitäten/Rassen seiner Wirtsart befallen zu können. Dies resultiert in einer erhöhten intraspezifischen Variabilität von Virulenzfaktoren im Vergleich zu Genen des Primärstoffwechsels. Bei Proteinen des Primärstoffwechsels ist keine große Variabilität der Gene zu erwarten, da eine Mutation schnell zu einer Verminderung der Effizienz oder einem Funktionsverlust des betreffenden Proteins führen kann, was in vielen Fällen lethal für das betreffende Individuum ist. Solch eine Mutation könnte sich nicht im Genpool behaupten (Stearns et al., 2005). Die daraus resultierenden Unterschiede in den Substitutionsraten und die damit stark erhöhte Allelfrequenz in Virulenzfaktoren, sollten sich in der Nukleotidsequenz des betreffenden Genes widerspiegeln.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf der Annahme, dass Virulenzfaktoren im stetigen Wettstreit mit den Resistenzen des Wirtes starken Selektionskräften ausgesetzt sind und daher erhöhte intraspezifische Variabilität zeigen, sollen in dieser Arbeit Virulenzfaktoren über Sequenzvergleiche zwischen neun *U. maydis* Stämmen mit großer geographischer Distanz identifiziert und durch Infektionsversuche mit Gendeletionsmutanten verifiziert werden. Die Infektionsversuche werden auf verschiedenen Maisrassen und der Urform von Mais (Teosinte) durchgeführt. Durch den Vergleich der Infektionsraten und der Ausprägung der Symptome, soll versucht werden die zu Grunde gelegten Kriterien möglicher Virulenzfaktoren zu bestätigen oder zu widerlegen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Bezugsquellen

2.1.1. Lösungen und Materialien

Ampicillin-Lösung

10 mg/ml Ampicillin (Roth) in H₂O_{bid}, sterilfiltriert

DIG1

0,1 M Maleinsäure (J.T.Baker)

0,15 M NaCl (J.T.Baker)

in H₂O_{bid}, pH 7,5

DIG2

10 % (v/v) Blockierungslösung in DIG1

DIG3

0,1 M Maleinsäure (J.T.Baker)

0,1 M NaCl (J.T.Baker)

0,05 M MgCl₂ (J.T.Baker)

in H₂O_{bid}, pH 9,5

DIG-Wash

0,3 % (v/v) Tween-20 (AppliChem) in DIG1

Heparin-Lösung

15 mg/ml Heparin in H₂O_{bid}, sterilfiltriert

Hygromycin B-Lösung

10 mg/ml Hygromycin B (ROTH) in H₂O_{bid}, sterilfiltriert

Heringssperma-DNA

10 mg/ml Heringssperma-DNA (SIGMA) in H₂O_{bid}

Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym (Fluka)
10 mM Tris-HCl (AppliChem), pH 8,0
in H₂O_{bid}

Usti-Lysis-Puffer

2% TritonX100 (ROTH)
1% SDS (AppliChem)
100 mM NaCl (J.T.Baker)
10 mM Tris-HCl (AppliChem), pH 8,0
1 mM EDTA (Merck)
in H₂O_{bid}

PBS

7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O (J.T.Baker)
14,5 mM KH₂PO₄ (J.T.Baker)
137 mM NaCl (J.T.Baker)
0,5 mM MgCl₂ (J.T.Baker)
2,7 mM KCl (J.T.Baker)
in H₂O_{bid}

PCR-Puffer (10x)

500 mM KCl (J.T.Baker)
15 mM MgCl₂ (J.T.Baker)
100 mM Tris-HCl (AppliChem), pH 8,3
in H₂O_{bid}

Phenol/Chloroform

50% Phenol (Merck)
50% Chloroform (J.T.Baker)
in TE-Puffer

SCS

20 mM Na-Citrat (J.T.Baker), pH 5,8

1 M Sorbitol (Acros Organics)

in H₂O_{bid}, sterilfiltriert

Southern Hybridisierungspuffer

100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0

1 % (w/v) SDS (AppliChem)

in H₂O_{bid}

Southern Waschpuffer

10,0 % (v/v) 1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 (f.c. 0,1 M)

5,0 % (v/v) 20% SDS (AppliChem) (f.c. 1%)

mit deionisiertem Wasser auf entsprechendes Endvolumen auffüllen

SSC (20x)

400 mM Na-Citrat (J.T.Baker), pH 7,0

3 M NaCl (J.T.Baker)

in H₂O_{bid}

STC

20 mM Na-Citrat (J.T.Baker), pH 5,8

1 M Sorbitol (Acros Organics)

in H₂O_{bid}, sterilfiltriert

STC/PEG

15 ml STC

10 g PEG 4000 (SIGMA)

STET

10 mM Tris-HCl (AppliChem), pH 8,0

100 mM NaCl (J.T.Baker)

1 mM Na₂-EDTA (Merck)

5% (v/v) Triton X-100 (ROTH)

in H₂O_{bid}

TBE (5x)

440 mM Tris-Base pH 8,0 (SIGMA)

440 mM Borsäure (J.T.Baker)

10mM Na₂-EDTA (Merck)

in H₂O_{bid}

3 M Natriumacetat-Lösung

3,0 M Natriumacetat (J.T.Baker)

in H₂O_{bid} ansetzen, 5 min bei 121°C autoklavieren

0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0

0,5 M Na₂-EDTA·2H₂O (Merck)

in H₂O_{bid} ansetzen, pH-Wert auf 8,0 einstellen

1xTE-Puffer pH 8,0

10 mM Tris-Base (SIGMA)

1 mM Na₂-EDTA·2H₂O (Merck)

in H₂O_{bid} ansetzen, pH-Wert auf 8,0 einstellen, 5 min bei 121°C autoklavieren

10xTE-Puffer pH 8,0

100 mM Tris-Base (SIGMA)

1 mM Na₂-EDTA·2H₂O (Merck)

in H₂O_{bid} ansetzen, pH-Wert auf 8,0 einstellen, 5 min bei 121°C autoklavieren

0,25 M HCL

3,26% (v/v) HCL (ROTH) (0,25 % p.a.) (f.c. 250 mM)

in deionisiertem Wasser ansetzen

0,4 M NaOH

0,4 M NaOH (J.T.Baker)

in deionisiertem Wasser ansetzen

2% X-Gal-Lösung

2,0 % (w/v) X-Gal (ROTH)

X-Gal in Dimethylsulfoxid (DMSO) ansetzen, in PPN-Röhrchen lichtgeschützt lagern

Medien für *U. maydis*:

CM-Flüssigmedium

0,25% (w/v) Casaminoacids (Difco)

0,1 % (w/v) Yeast-Extract (AppliChem)

1,0 % (v/v) Vitaminlösung nach Holiday `74

6,25 % (v/v) Salzlösung nach Holiday `74

0,05 % (w/v) DNA degr. Free Acid (Sigma, D-3159)

0,15 % (w/v) NH₄NO₃

in deionisiertem Wasser ansetzen und pH-Wert mit 5 M NaOH auf 7,0 einstellen,

5 min bei 121°C autoklavieren

nach dem Autoklavieren zugeben:

2,0 % (v/v) 50 % Glukoselösung (f.c. 1 %)

CM-Festmedium

0,25% (w/v) Casaminoacids (Difco)

0,1 % (w/v) Yeast-Extract (AppliChem)

1,0 % (v/v) Vitaminlösung nach Holiday `74

6,25 % (v/v) Salzlösung nach Holiday `74

0,05 % (w/v) DNA degr. Free Acid (Sigma, D-3159)

0,15 % (w/v) NH₄NO₃

2,0 % (w/v) Agar (AppliChem)

in deionisiertem Wasser ansetzen und pH-Wert mit 5 M NaOH auf 7,0 einstellen,

Agar zugeben, 5 min bei 121°C autoklavieren

nach dem Autoklavieren zugeben:

2,0 % (v/v) 50 % Glukoselösung (f.c. 1 %)

PD-Flüssigmedium

2,4 % (w/v) Potato Dextrose Boullion (Roth)

in deionisiertem Wasser ansetzen, 5 min bei 121°C autoklavieren

PD-Festmedium

3,9 % (w/v) Potato Dextrose Broth (Roth)

1,0% (v/v) 1 M Tris-HCL (AppliChem), pH 8,0 (f.c. 0,1 M)

in deionisiertem Wasser ansetzen, 5 min bei 121°C autoklavieren

PD-Charocal-Festmedium

3,9 % (w/v) Potato Dextrose Broth (Roth)

1,0% (v/v) 1 M Tris-HCL (AppliChem), pH 8,0 (f.c. 0,1 M)

1,0% (w/v) Charocal (Sigma C-9157)

in deionisiertem Wasser ansetzen, 5 min bei 121°C autoklavieren

Regenerationsagar *U. maydis*

1,0 % (w/v) Yeast-Extract (AppliChem)

2,0 % (w/v) Bacto Pepton (Roth)

2,0 % (w/v) Sucrose (Roth)

18,22 % (w/v) Sorbitol (Sigma S-1876) (f.c. 1 M)

1,5 % (w/v) Agar (AppliChem)

in deionisiertem Wasser ansetzen, 5 min bei 121°C autoklavieren

Salz-Lösung (Holliday, 1974)

16 g KH_2PO_4 (J.T.Baker)

4 g Na_2SO_4 (J.T.Baker)

8 g KCl (J.T.Baker)

4 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (AppliChem)

1,32 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (J.T.Baker)

8 ml Spurenelement-Lösung

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)

60 mg H_3BO_3 (J.T.Baker)

140 mg $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (Merck)

400 mg ZnCl_2 (Fluka)

40 mg $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (J.T.Baker)

100 mg $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (Fluka)

40 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (Fluka)

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)

100 mg Thiamin (SIGMA)
50 mg Riboflavin (SIGMA)
50 mg Pyridoxin (SIGMA)
200 mg Calciumpantothenat (SIGMA)
500 mg p-Aminobenzoessäure (SIGMA)
200 mg Nikotinsäure (SIGMA)
200 mg Cholinchlorid (SIGMA)
1000 mg myo-Inositol (VWR/MERCK)
mit H₂O_{bid} auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren

Medien für *E. coli*:

LB-Flüssigmedium

1,0 % (w/v) Trypton-Pepton (Roth)
0,5 % (w/v) Yeast-Extract (AppliChem)
1,0 % (w/v) NaCl (J.T.Baker)
in deionisiertem Wasser ansetzen, 5 min bei 121°C autoklavieren

YT-Festmedium

0,8 % (w/v) Trypton-Pepton (Roth)
0,5 % (w/v) Yeast-Extract (AppliChem)
0,5 % (w/v) NaCl (J.T.Baker)
1,3 % (w/v) Agar (AppliChem)
in deionisiertem Wasser ansetzen, 5 min bei 121°C autoklavieren

YT-Flüssigmedium

0,8 % (w/v) Trypton-Pepton (Roth)
0,5 % (w/v) Yeast-Extract (AppliChem)
0,5 % (w/v) NaCl (J.T.Baker)
in deionisiertem Wasser ansetzen, 5 min bei 121°C autoklavieren

YT-XGal-Festmedium

0,8 % (w/v) Trypton-Pepton (Roth)

0,5 % (w/v) Yeast-Extract (AppliChem)

0,5 % (w/v) NaCl (J.T.Baker)

1,3 % (w/v) Agar (AppliChem)

0,33 % (v/v) 2% X-Gal (ROTH) (f.c. 0,01‰)

optional Zugabe von Amp oder Kan in gewünschter Konzentration
in deionisiertem Wasser ansetzen, 5 min bei 121°C autoklavieren

Verwendete Enzyme:

Lysozym	Fluka
Phusion Polymerase	Finnzymes
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
T4-DNA Ligase	Roche
Taq Polymerase	Invitrogen

Verwendete DNA-Größenstandards:

1kb Leiter	New England Biolabs; BioBudget
2log Leiter	New England Biolabs

Verwendete Kits:

Plasmid Midi Kit	Qiagen
my Budget Double Pure Kit	Bio Budget
pcrII-TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

weitere Lösungen:

PCR DIG Labeling Mix	Roche
Blockierungslösung	Roche
Antikörper	Roche
CDP-STAR	Roche

Verwendete Materialien und Laborgeräte:

Belly Dancer: The Belly Dancer (Stovall Life Science Inc.)

Cycler: DNA Engine Peltier Thermal Cycler (Bio Rad)

Entwicklermaschine: Curix 50 (AGFA)

Geldokumentation: Vilbert Lourmat Rainbow CCTV RMB 92

Kaffeemaschine: Royal Cappuccino (Saeco)

Kanülen: BD Microlance 3 (Becton Dickinson)

Magnetrührer: IKA RH basic 2 (IKA)

Mikroskop: Axio Star (Zeiss)

Nanodrop Spectrophotometer: ND-1000 (Thermo Scientific)

Netzteil für Gelelektrophorese: Consort EV 243 (SIGMA)

Photometer: BioPhotometer (Eppendorf)

Röntgenfilm: AGFA Cronex 5 (AGFA)

Schüttler: SM30 (Edmund Bühler GmbH)

Sequenzierer: ABI 3120 XL (Applied Biosystems)

Spritzen: Norm-Ject 5ml (Henke Sass Wolf)

Thermo Drucker: Mitsubishi P93

Thermomixer: Thermomixer comfort (Eppendorf)

Vortex: Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

Zentrifugen: Centrifuge 5810R (Eppendorf)

Centrifuge 5424 (Eppendorf)

2.1.2. Oligonukleotide und Plasmide**Verwendete Primer:**

Name	Sequenz	Fragment	Temp
CH13	TAGCAAGATTCTCTGAAATCA		
CH14	CCGAGAGAGAAAATGTAGGG	<i>um05294</i>	51°C
CH15	ATGAGATCTCCCCTCTTCT		
CH16	TGTGACAAATCCGTGACTC	<i>um05295</i>	51°C
CH17	TGAAGATCCTTTCTCTCCTC		
CH18	CCGTCCGAAACTTTGACATA	<i>um12302</i>	51°C
CH19	ATGTTGAAAAGTTCAACCTCG		
CH20	GCTTGACACTATTGACGTCTG	<i>um10553</i>	54°C
CH21	ATGAACCTTTCCTGTGTGGCA		
CH22	AAAACCGTGTAGCGTGATTG	<i>um10554</i>	51°C
CH23	ATGTGCTCGCATCGGAACA		
CH24	TCTTTGCCAGCAACTCTTCC	<i>um05299</i>	53°C
CH25	ATGCACGCAACCTTCCTCT		
CH26	CAGATTAGGACGACGGACTC	<i>um05300</i>	52°C
CH27	GCGTCACATCGCTCTTTCTC		
CH28	CATAGAGCTCGACGATAGGA	<i>um05301</i>	54°C
CH29	TCTAACGATCCTCGTACTGT		
CH30	CCAGCGATGTGACCAAAGTT	<i>um05303</i>	52°C
CH31	CAATTTGTGCTTTGGTTAGC		
CH32	CCATGCCGAACGAAACCTTTC	<i>um10555</i>	57°C
CH33	ATGCGCTCCAGCTTGATTT		
CH34	TGAATCTTTGAGGATAGCCG	<i>um05305</i>	52°C
CH35	ATGCATTCTCTGGCCTTG		
CH36	CTGGATGGGAATTGCAATG	<i>um05306</i>	51°C
CH37	TGAGCATCATAAACGTTGG		
CH38	CAATGCTCACTTTGCGGAG	<i>um05308</i>	51°C
CH39	CCTCTTGTTCAAAAACGCATT		
CH40	GGGGCTCATTTGAAGTAAGG	<i>um05309</i>	53°C
CH41	ACCTTGCTTCTGATAGCTCT		
CH42	AGAGCCACCCGATCACATT	<i>um05310</i>	51°C
CH43	ATGCAGCTCTGCGTCTCCA		
CH44	CGCTTTGCTCGATCAAGCTG	<i>um05311</i>	54°C
CH45	ATGACCTCGCTCCATATATCT		
CH46	TCCAAGAGGAATCGCTTCG	<i>um05312</i>	52°C
CH47	ATGGACACCAGCAAGTCTTG		
CH48	CGAGGCAACTCGTAAATCGA	<i>um05313</i>	53°C
CH49	ATGTTGCACAAGCTTCCAAC		
CH50	CGAGTGGTACAATCCTGTTC	<i>um05314</i>	50°C
CH51	ATGACGATGATCGGCAAGC		
CH52	TTGTAGGATTCTCGCCAGAA	<i>um10557</i>	52°C
CH53	GCAAAAACAAGCCCAGAGA		
CH54	CAGGCCCAATGAAGTTGATT	<i>um05316</i>	50°C
CH55	ATGAAAGTTGGCTTGCCGG		
CH56	AACAACCTCCGTTTGTCTGGT	<i>um05317</i>	53°C
CH57	CTACCTCTTCATCTCCTCTG		
CH58	TTCCGGAAAATGAGCCTCG	<i>um05318</i>	53°C
CH59	ATGCGTAACTCACGGTTCAT		
CH60	GGTCGTCTCGATCTCTGGT	<i>um05319</i>	51°C

Name	Sequenz	Fragment	Temp
CH61	GTTTGACGACTTTGTTTCAGA	<i>um05292</i>	50°C
CH62	AGCTTTGGTGGAGCAGTTG		
CH63	ATGCTGGACGTCAACACTAT	<i>um05291</i>	52°C
CH64	GCGAGTGCTTCGTATTGCT		
CH65	ATGCGGGTCACACTCTTGA	<i>um05290</i>	53°C
CH66	TCTGCTCCCATCCATCGAC		
CH67	ATCAAAGGATCGAAAAGGTC	<i>um10705</i>	53°C
CH68	GACCAAAGTCGGCGAGTTT		
CH69	ATGACAGTGAAAATGCTCC	<i>um10552</i>	53°C
CH70	CCATCAGCACTGAGTAGATT		
CH71	CTTCGCTTCCTTATAAAACG	<i>um10559</i>	53°C
CH72	CGACTCGTCTACAGAGCTAG		
CH73	ATGGTTACGACGTGCGAGT	<i>um05322</i>	50°C
CH74	CGCATACTAGTCGAGCTTTC		
CH75	GATCAAGATCCAACCCATCA	<i>um10560</i>	53°C
CH76	AACCATTGCTGCGTCCTGA		
CH77	ATGTCTACAATACCTCTCCG	<i>um10561</i>	51°C
CH78	GTCCAGTGCTTCTCATCG		
CH79	AGCTGAGGCCATCTAGGCCTGACATTGTTGAAGGTTGCG	RB10553	53°C
CH80	CCGATTTAAATGCAAGAATTGGCGTAGAGATCG		
CH81	CTGATAGGCCCTGAGTGGCCCGTTCTGCCCGTGATTGATC	LB10553	55°C
CH82	CGTCATTTAAATGCCGCTTCCTGGACCTCGATCACGG		
CH83	TCATAGGCCCTGAGTGGCCCGTGCCCTGGGCGAAGGAAG	LB10554	57°C
CH84	TCGGATTTAAATGGGACGAACTGAAAGCTTCGCTGCTG		
CH85	ATCAGGCCATCTAGGCCGCTCTCGGTTGCGCTGTGTGCTATC	RB10554	59°C
CH86	GCGATTTAAATTGTTGCGGTGCTTGACTTTGGC		
CH87	CCGATTTAAATCCGAAGCGCCCTCCTTAC	LB10553	56°C

Name	Test und Sonden Primer	Temp
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	55°C
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	
RoK202	GATTTGTCAACTTGACAGCGG	54°C
RoK203	ACCTCGCTCGATGCTGAC	54°C
RoK235	CAGACCGGACATGGTGCTTG	54°C
RoK236	TCGAAAGATGCCTCGAATGC	54°C
RoK237	ATGAAGCCTTGGCTCTTTCC	54°C
RoK238	AGTGAGACTCGGGTTAAAGG	53°C
RoK239	AAAGTGTGGCGTCACATCTC	53°C
RoK240	CCTGTGGCAAGACCTGAGAG	54°C
RoK241	CGAAATTGCCGTCAACCAAG	53°C
RoK242	CTCTGAGCCACTACAATTGC	53°C

Ausgangsplasmide:

pCRII©-TOPO (Invitrogen)

Vektor zum Klonieren von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCR2.1(Invitrogen)

Vektor zum Klonieren von PCR-Produkten.

pRoK003

Vektor trägt Hygromycin Resistenz Kasette.

In dieser Arbeit erstellte Plasmide:

pRoK004: Plasmid trägt die linke Flanke des Gens um10553.

pRoK005: Plasmid trägt die rechte Flanke des Gens um10553.

pRoK006: Plasmid trägt die linke Flanke des Gens um10554.

pRoK007: Plasmid trägt die rechte Flanke des Gens um10554 in reverser Orientierung.

pRoK008: Plasmid trägt die linke und rechte Flanke des Gens um10553 mit der Hygromycin Resistenz Kasette.

pRoK009: Plasmid trägt die linke und rechte Flanke des Gens um10554 mit der Hygromycin Resistenz Kasette.

pRoK010: Plasmid trägt die rechte Flanke des Gens um10554.

2.1.3. Stämme von *U. maydis*

In dieser Arbeit verwendete Stämme von *U. maydis*

SG200 (Bölker et al., 1995)	
RK122 (Kahmann, R., unveröffentlicht)	Paraguay
RK123 (Kahmann, R., unveröffentlicht)	Paraguay
RK124 (Kahmann, R., unveröffentlicht)	Deutschland
RK126 (Kahmann, R., unveröffentlicht)	Russland
RK127 (Kahmann, R., unveröffentlicht)	Russland
RK134 (Basse, C. W., unveröffentlicht)	Guatemala
RK208 (FB1) (Kämper et al., 2006)	USA
RK209 (FB2) (Kämper et al., 2006)	USA
RK217 (Kellner, R., unveröffentlicht)	Ecuador

In dieser Arbeit erstellte Stämme von *U. maydis*

SG200 Δ um10553
SG200 Δ um10554

2.2. Mikrobiologische und genetische Methoden

2.2.1. Arbeiten mit *Escherichia coli*

Kultivierung von *E. coli*

E. coli Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 800 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf) oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp-Festmedien angeimpft.

Chemische Transformation von *E. coli*

Chemisch kompetente Zellen wurden bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und jeweils 100 μ l mit einer unterschiedlichen Menge Plasmidlösung bzw. Ligationsansatz versetzt.

2.2.2. Arbeiten mit *Ustilago maydis*

Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 800 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf) oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte von *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem BioPhotometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 eingestellt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet.

Protoplastierung von *U. maydis*

Eine Übernachtskultur mit einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 bis 0,5 wurde in einem 50 ml Falcon Tube bei 4 °C für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml vorgekühltem SCS resuspendiert und für weitere 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und der Zustand der Zellen mit Hilfe des Mikroskops (Axio Star, Zeiss) überprüft. Das Pellet wurde in 2 ml SCS (pH 5,8)/Novozym (5mg/ml; sterilfiltriert) resuspendiert und für 5-10 min bei RT inkubiert bis ca 50% der Zellen anprotoplastiert waren. Anschließend wurden 20 ml SCS hinzugefügt und 15 min bei 2300 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Dieser Schritt wurde 3 mal wiederholt und nach jedem Schritt der Zustand der Zellen überprüft. Das so gewonnene Pellet wurde in 10 ml STC resuspendiert und 15 min bei 2400 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in kaltem STC resuspendiert, in 70 µl Portionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Transformation von *U. maydis*

Zur integrativen Transformation wurden 70 µl Protoplasten mit 5 µg/µl bis max. 10 µl DNA und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/40% PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten, antibiotikahaltigen Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 5 bis 7 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Pipettenspitzen auf antibiotikahaltigen CM-Platten vereinzelt.

2.3. Molekularbiologische Standard-Methoden

2.3.1. Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch Lyse und Kochen nach Sambrook et al. (1989). Hierzu wurden *E. coli* Zellen in 1 ml YTamp-Medium übernacht bei 37 °C in einem 2 ml-Reaktionsgefäß auf einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Die Übernachtskultur wurde mit einer Zentrifuge (Centrifuge 5424, Eppendorf) bei 13000 rpm (1 min, RT) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 370 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 30 µl Lysozym-Lösung 60 sek bei 99°C in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Die lysierten Zellen und damit die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13000 rpm pelletiert (Centrifuge 5424, Eppendorf) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 35 µl 3 M NaAc (pH 5,0) und 400 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm (Centrifuge 5424, Eppendorf). Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase aufgenommen.

DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Die Phenol/Chloroform Isolationsmethode wurde modifiziert nach Hoffman & Winston (1987). Dabei wurden 1 ml einer Übernachtskultur von *U. maydis* in PD-Medium zusammen mit 200 µl Glasperlen in einem 2 ml-Reaktionsgefäß pelletiert (13000 rpm, 2 min, RT, Centrifuge 5424, Eppendorf), der Überstand abgegossen und für mindestens 30 min bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl Usti-Lysispuffer und 500 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden 15-30 min auf einem Vortex Genie 2 (Scientific Industries) geschüttelt. Nach Phasentrennung (13000 rpm, 15 min, RT, Centrifuge 5424, Eppendorf) wurden 400 µl des Überstands in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, RT, Centrifuge 5424, Eppendorf) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 10 µg/ml RNase aufgenommen und bei 55 °C auf dem Thermomixer (Eppendorf) für 15 min resuspendiert.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Proben wurde mit einem Nanodrop® Spectrophotometer bestimmt. Dazu wurde 1 µl der zu messenden DNA-Lösung unverdünnt auf den Probenapparat aufgebracht und gemessen. Als Nullwert diente 1 µl Elutionspufferlösung. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren dient der Quotient aus A260 zu A280. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern.

2.3.2. Modifikation und Analyse von Nukleinsäuren

Restriktion

Die Restriktion doppelsträngiger DNA erfolgte mit Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen. Ein durchschnittlicher analytischer Ansatz enthielt:

2-20 µl Genomische oder Plasmid DNA
BSA (100x), optional nach Herstellerangaben an Reaktionsansatz angepasst
Restriktionsenzym nach Herstellerangaben an Reaktionsansatz angepasst
Reaktionspuffer (10x) nach Herstellerangaben an Reaktionsansatz angepasst
mit H₂O_{bid} auf gewünschtes Endvolumen auffüllen

Nach Inkubation für 2 h bei 37°C (bzw. einer anderen für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurde der Ansatz mit Ladepuffer versetzt und die Reaktionsprodukte auf Agarosegelen analysiert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen erfolgten durch kovalente Verknüpfungen mit Hilfe der T4-DNA-Ligase.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

linearisierte DNA-Fragmente
Mengen/Verhältnisse wurden nach folgender Formel berechnet:

$\text{pmol} = \mu\text{g}/\text{kb} \times 3/2$
2 µl 10 x Ligase-Puffer
2 µl T4 Ligase
mit H₂O_{bid} auf 20 µl auffüllen

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Methode ist modifiziert nach Innis et al. (1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt:

1,0 µl „Template“-DNA
0,2 µl Taq-DNA-Polymerase
5,0 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂
1,5 µl MgCl₂
1,0 µl dNTP`s
2 Oligonukleotide bei einer Endkonzentration von 1 µM
aufgefüllt mit H₂O_{bid} auf 50 µl

Das standardmäßig angewendete PCR-Programm war:

Anfangsdenaturierung: 2 min bei 96°C
Denaturieren: 20 sek bei 96°C
Anneling: 40 sek Temp der Primer
Extension: 1 min/1kb 72°C
35 Zyklen
Endextension: 7 min bei 72°C

Ein typischer PCR-Ansatz mit der Phusion Polymerase enthielt:

1,0 µl „Template“-DNA
0,5 µl Phusion Polymerase
10 µl 5x PCR-Puffer mit MgCl₂
1,5 µl DMSO
1,0 µl dNTP`s
2 Oligonukleotide bei einer Endkonzentration von 1 µM
aufgefüllt mit H₂O_{bid} auf 50 µl

Das standardmäßig angewendete PCR-Programm war:

Anfangsdenaturierung: 30 sek bei 98°C
Denaturieren: 10 sek bei 98°C
Anneling: 20 sek Temp der Primer
Extension: 15 sek/1kb 72°C
35 Zyklen
Endextension: 5 min bei 72°C

TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die Taq-Polymerase hängt matrizenunabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden von PCR Produkten. Der linearisierte Vektor pCRII©-TOPO TA (Invitrogen) enthält überhängende 3'-Desoxythymidin-Reste. Dadurch können PCR-Produkte sehr effizient in den Vektor eingebaut werden. 1-5 µl des aufgereinigten PCR-Produktes wurden mit 0,5 µl pCRII©-TOPO TA Vektor und 1 µl Salt Solution gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 100 µl kompetente *E. coli* Zellen hinzugefügt und das Gefäß für weiter 10 min auf Eis gesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 45 sek bei 42°C einem Hitzeschock im Thermomixer (Eppendorf) ausgesetzt. Zu dem Reaktionsansatz wurden 250 µl YT-Flüssigmedium hinzugefügt und für 30 min bei 800 rpm auf dem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Dieser Transformationsansatz wurde auf YT-Amp-Platten mit X-Gal ausgestrichen. Nach 12 h wurden die weißen oder leicht blauen Kolonien gepickt, in YT+Amp-Flüssig-Medium angezogen und auf YT-Amp Platten vereinzelt. Die Plasmide wurden wie unter „Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*“ isoliert.

Auftrennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese

Durch Gelelektrophorese können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden. Es wurden Gele mit 0,8% Agarose verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 5:1 mit Ladepuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5-10 V/cm. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (254 nm) mit einer Geldokumentationsapparatur (Vilbert Lourmat Rainbow CCTV RMB 92) detektiert und auf Thermopapier photographisch dokumentiert. Als DNA-Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese dienten 1 kb- und 2log DNA-Leitern (New England Biolabs).

Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem my Budget Double Pure Kit (Bio Budget) nach Angaben des Herstellers.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem my Budget Double Pure Kit von Bio Budget. Dieser Kit beruht auf dem Prinzip die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen freizuwaschen und schließlich unter Niedrigsalzbedingungen von dieser Matrix zu eluieren. Alle Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.3. Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren

Transfer von DNA-Fragmenten auf eine Nylon-Membran (Southern, 1975)

Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Boehringer Mannheim) erfolgte durch einen Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gezogen. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den

jeweiligen Lagen des Transfersystems. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten und damit den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Zusammensetzung eines Blotaufbaus von unten nach oben:

Blotting Papier (A. Hartenstein) Brücke zum Pufferreservoir

Agarosegel

Nylonmembran (Boehringer Mannheim)

Blotting Papier (A. Hartenstein)

Stapel Papierhandtücher

Glasplatte

Gewicht (ca. 100 g)

Der Kapillar-Blot erfolgte für ca. 3,5 Stunden.

Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

Sonden wurden durch Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) während der PCR markiert. Ein Ansatz enthielt 1 µl genomische DNA, 5 µl PCR-Puffer, 20 µl PCR-DIG-Labeling-Mix, je 2 µl der beiden Primer, 1,0 µl Phusion DNA-Polymerase und 3,0 µl DMSO. Mit H₂O_{bid} wurde auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler DNA Engine Peltier Thermal Cycler (Bio Rad).

PCR-DIG-Labeling-Mix (Roche)

2 mM dATP

2 mM dCTP

2 mM dGTP

1,9 mM dTTP

0,1 mM alkali-labile DIG-11-dUTP (pH 7,0)

in H₂O_{bid}

2.3.4. Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der amplifizierten Fragmente erfolgte in der Analytischen Chemie der Ruhr-Universität Bochum mit einem ABI 3130xl (Applied Biosystems) Sequenziergerät.

2.3.5. Bioinformatische Analysen

Programme zur Bioinformatischen Analyse:

Sequencer 4.7 (Gene Codes Corporation) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

CLONE MANAGER (Version 8 und 9, Scientific & Educational Software) zum Erstellen und Bearbeiten von Plasmiden und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden.

CODEML (Version 4.3, Yang, 2007) Teil des PAML (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood) Packets zum Berechnen des Verhältnisses von synonymen und nicht synonymen Substitutionen.

SeAl (Version 2.0a11) Programm zum Alinieren von Nukleotid- und Proteinsequenzen.

Text Wrangler (Version 3.0 Bare Bones Software Inc) Texteditor.

Vector NTI (Version 10.3, Invitrogen) zum Erstellen und Bearbeiten von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden und zum Erstellen und Bearbeiten von Plasmid- und genomischen Karten.

2.4. Anzucht und Infektion der Maispflanzen

Anzucht der Maispflanzen

Die Anzucht der Maispflanzen erfolgte in Fruhstorfer Erde T in SM H-Container 3,5 l 20,0 x 16,0 cm. Die Maispflanzen wurden in einer Klimakammer unter folgenden Bedingungen angezogen:

Temperatur:	00:00 - 05:30 Uhr	20°C
	05:30 - 20:30 Uhr	28°C
	20:30 - 21:30 Uhr	24°C
	21:30 - 24:00 Uhr	20°C

Feuchte: 00:00 - 06:30 Uhr 60%
06:30 - 21:30 Uhr 40%
21:30 - 24:00 Uhr 60%

Licht: 05:30 - 20:30 Uhr 1 Lampenreihe
06:00 - 21:00 Uhr 2 Lampenreihe
06:30 - 21:30 Uhr 3 Lampenreihe

Pflanzeninfektionen

Maisvarietäten (*Zea mays* spec.): Für die Pflanzeninfektionen wurden die Maisvarietäten Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA), Ki3 (Thailand, USDA), CML277 (Mexiko, USDA) und die Urform von Mais Teosinte (BoGa, Bonn) verwendet.

Die Infektion von Maispflanzen erfolgte mit dem solopathogenen Stamm SG200 und den in dieser Arbeit erstellten Gendelektionsmutanten. Die Stämme wurden auf PD Platten kultiviert. Mit diesen Stämmen wurden 25 ml Flüssig-PD angeimpft und ü.N. bei RT auf einem Schüttler bei 200 rpm bis zu einer OD_{600} von ~ 1 inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden pelletiert und auf eine OD_{600} von 3 in H_2O_{bid} eingestellt. Infiziert wurden sieben Tage alte Maispflanzen durch Injektion der Lösung in die Maispflanzen. Die Bonitierung erfolgte 7 und 14 Tage nach der Infektion (dpi).

3. Ergebnisse

3.1. Sequenzanalysen

3.1.1. Substitutionen

Die mittels PCR amplifizierten und anschließend sequenzierten ca. 500 bp langen Sequenzbereiche der 26 Gene des Clusters 19A, sowie 11 flankierende Gene, wurden manuell mit dem Programm Sequencher 4.7 editiert und nach Substitutionen durchsucht. Diese wurden in synonyme und nicht synonyme Substitutionen unterteilt und beziehen sich auf 1 kb. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

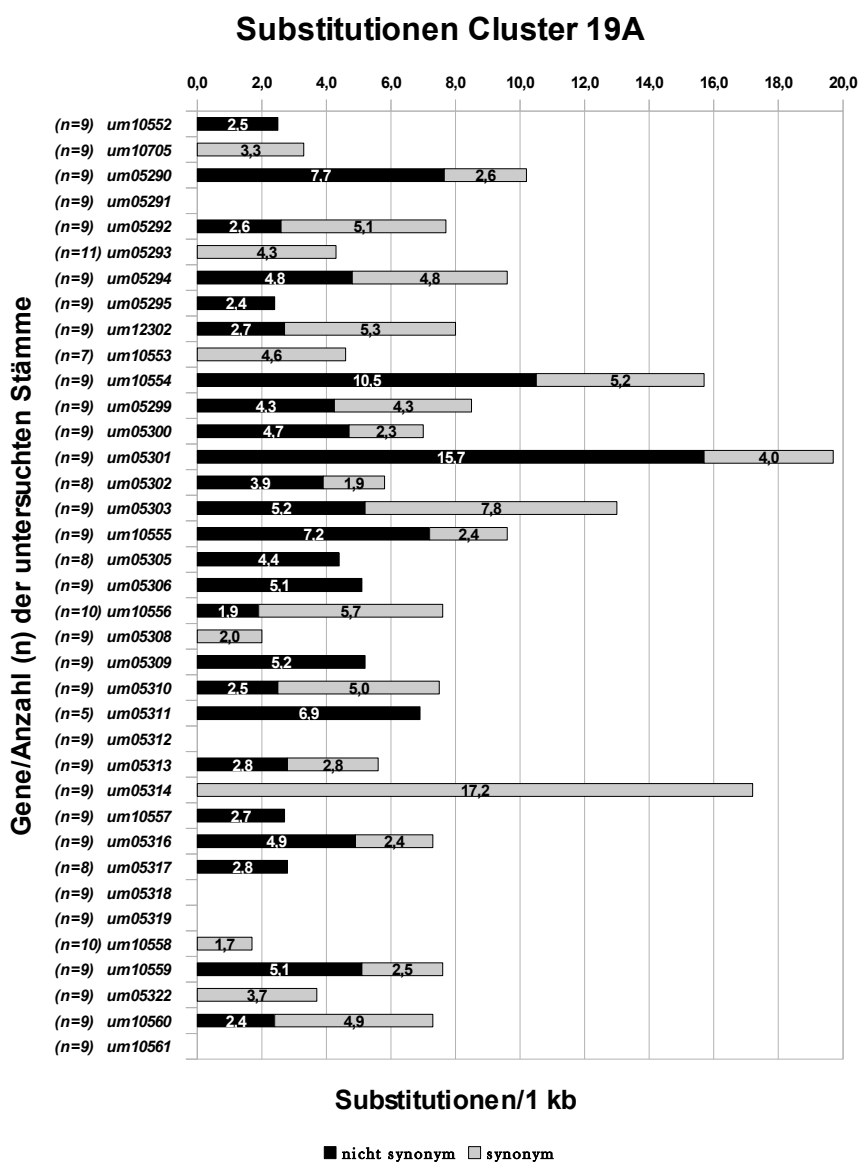


Abbildung 4: Substitutionen im Cluster 19A von *U. maydis*. Die gefundenen Substitutionen sind gegen die Gene des Clusters aufgetragen. Die Reihenfolge der Gene entspricht ihrer Position im Gencluster.

Das Maximum der synonymen Substitutionen liegt bei 17,2 Substitutionen pro 1 kb. Dieser Wert wurde bei Gen *um05314* beobachtet. Dieses Gen weist ausschließlich Substitutionen auf, die zu keiner Veränderung in der AS Sequenz führen. Weitere Gene, die nur synonyme Substitutionen zeigen sind *um10705*, *um05293*, *um10553*, *um05308*, *um10558* und *um05322*. Der Mittelwert der synonymen Substitutionen liegt bei 2,86 pro 1 kb. Deutlich über diesem Wert liegen *um05303* mit 7,8 und *um05314* mit 17,2 synonymen Substitutionen pro 1 kb. Der Mittelwert der nicht synonymen Substitutionen liegt bei 3,26 pro 1 kb. Weit über diesem Wert liegen die Gene *um05301* mit 15,7 (Maximum) und *um10554* mit 10,5 Substitutionen pro 1 kb, welche die Proteinsequenz verändernden. Weitere Gene, die weit über dem Mittelwert der nicht synonymen Substitutionen liegen, sind *um05290* mit 7,7, *um10555* mit 7,2 und *um05311* mit 6,9. Dieses Gen zeigt ausschließlich nicht synonyme Substitutionen. Gene in denen keine Substitutionen beobachtet wurden sind *um05291*, *um05312*, *um05318*, *um05319* und *um10561*.

3.1.2. Aminosäuredistanzen

Mit Hilfe des Programms SeAl (Version 2.0a11) und einer AS-Distanzmatrix (Grantham, 1974) (Abbildung 5) konnten aus den nicht synonymen Substitutionen die AS-Distanzen innerhalb des Clusters 19A von *U. maydis* in Bezug auf die Konsensus Sequenz berechnet werden. Die Distanzen innerhalb dieser Matrix ergeben sich aus den Polaritäten, der chemischen Zusammensetzung und der Molekülmasse der einzelnen AS.

Arg	Leu	Pro	Thr	Ala	Val	Gly	Ile	Phe	Tyr	Cys	His	Gln	Asn	Lys	Asp	Glu	Met	Trp	
110	145	74	58	99	124	56	142	155	144	112	89	68	46	121	65	80	135	177	Ser
	102	103	71	112	96	125	97	97	77	180	29	43	86	26	96	54	91	101	Arg
		98	92	96	32	138	5	22	36	198	99	113	153	107	172	138	15	61	Leu
			38	27	68	42	95	114	110	169	77	76	91	103	108	93	87	147	Pro
				58	69	59	89	103	92	149	47	42	65	78	85	65	81	128	Thr
					64	60	94	113	112	195	86	91	111	106	126	107	84	148	Ala
						109	29	50	55	192	84	96	133	97	152	121	21	88	Val
							135	153	147	159	98	87	80	127	94	98	127	184	Gly
								21	33	198	94	109	149	102	168	134	10	61	Ile
									22	205	100	116	158	102	177	140	28	40	Phe
										194	83	99	143	85	160	122	36	37	Tyr
											174	154	139	202	154	170	196	215	Cys
												24	68	32	81	40	87	115	His
													46	53	61	29	101	130	Gln
														94	23	42	142	174	Asn
															101	56	95	110	Lys
																45	160	181	Asp
																	126	152	Glu
																		67	Met

Abbildung 5: Distanzmatrix nach Grantham 1974. In normaler Schriftstärke sind die AS-Distanzwerte für die einzelnen AS-Substitutionen aufgetragen. Ausserhalb der Matrix sind die AS im jeweiligen Buchstabencode gegeneinander aufgetragen.

Die AS-Distanz zeigt somit nicht nur einen quantitativen Blick auf die Sequenzunterschiede, sondern sie stellt die Veränderungen innerhalb der Proteinsequenz qualitativ dar. Eine einzelne Substitution z.B. von einer hydrophoben zu einer hydrophilen AS hat so eine größere Distanz als mehrere Substitutionen, die zu ähnlichen AS führen. Die aus der AS-Distanzmatrix errechneten Werte beziehen sich auf 1 kb und sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

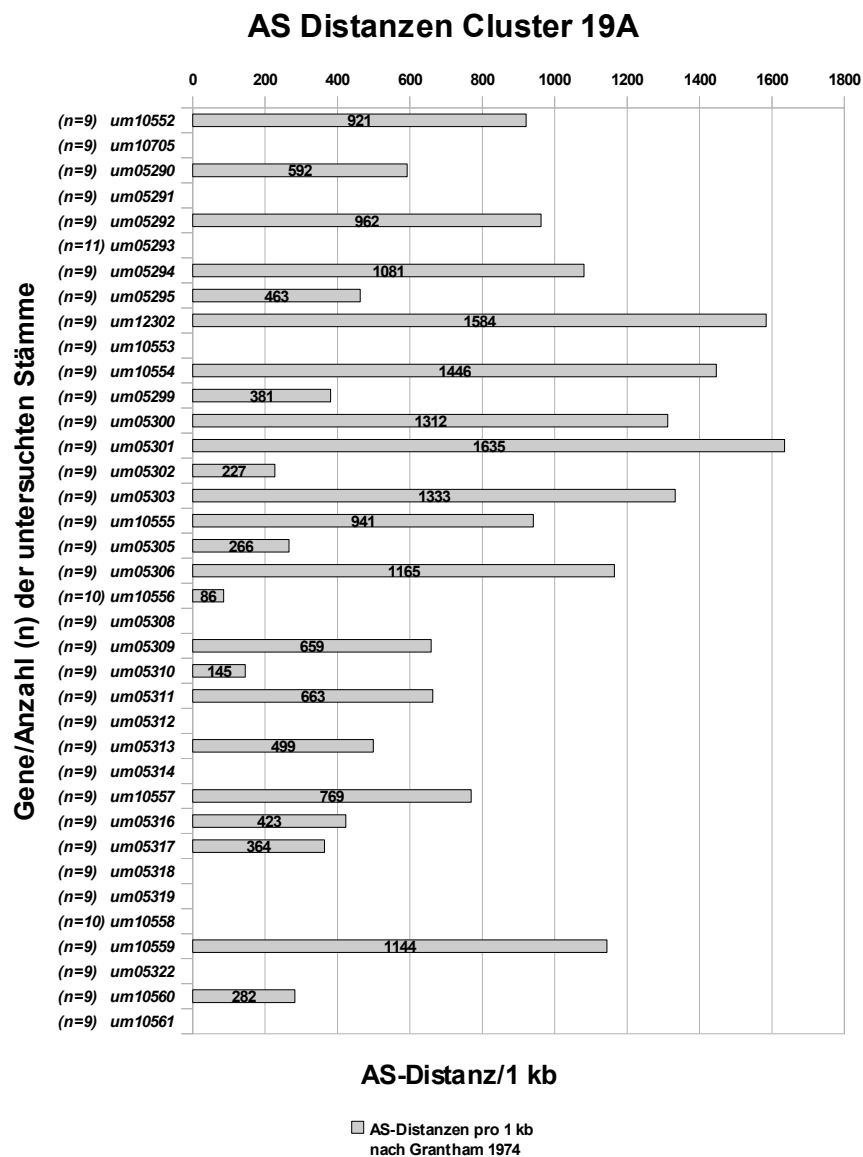


Abbildung 6: AS-Distanzen im Cluster 19A von *U. maydis*. Die AS-Distanzen (nach Grantham 1974) sind gegen die Gene des Clusters aufgetragen. Die Reihenfolge der Gene entspricht ihrer Position im Gencluster.

Die maximale Distanz zwischen den analysierten Sequenzen und dem Konsensus Strang beträgt 1635. Dieser Wert wurde bei dem Gen *um05301* beobachtet. Damit liegt er deutlich über dem Mittelwert von 523. Auffällig ist, dass *um05306* eine große AS-Distanz zeigt, die sich nicht aus der Anzahl der Substitutionen ergibt, sondern aus den qualitativen Auswirkungen auf die Proteinsequenz. Ähnlich verhält es sich mit *um10559*. Sieben Gene zeigen keine AS-Distanzen, da sie nur synonyme Substitutionen tragen.

3.1.3. Verhältnis der nicht synonymen/synonymen Substitutionen

Die editierten Sequenzen wurden mit dem Programm CODEML analysiert. Dieses Programm berechnet das Verhältnis von nicht synonymen (d_N) zu synonymen (d_S) Substitutionen innerhalb von Nukleotidsequenzen/Proteinsequenzen. Dabei berücksichtigt es die Anzahl der Basen-Triplets, die eine AS kodieren, die Position der Substitution im Triplet und die Häufigkeit des Triplets in der Sequenz. Aus diesen Daten wird im Rechenmodell M0 das Verhältnis d_N/d_S ermittelt. Werte größer gleich Eins gelten dabei als Anzeichen positiver Selektion. Ein Vergleich zweier Rechenmodelle, wie es bei diesen Analysen üblich ist, konnte nicht durchgeführt werden, da die jeweils kompatiblen Modelle identische Ergebnisse lieferten. Die Ergebnisse dieser Sequenzanalyse sind in Abbildung 7 dargestellt.

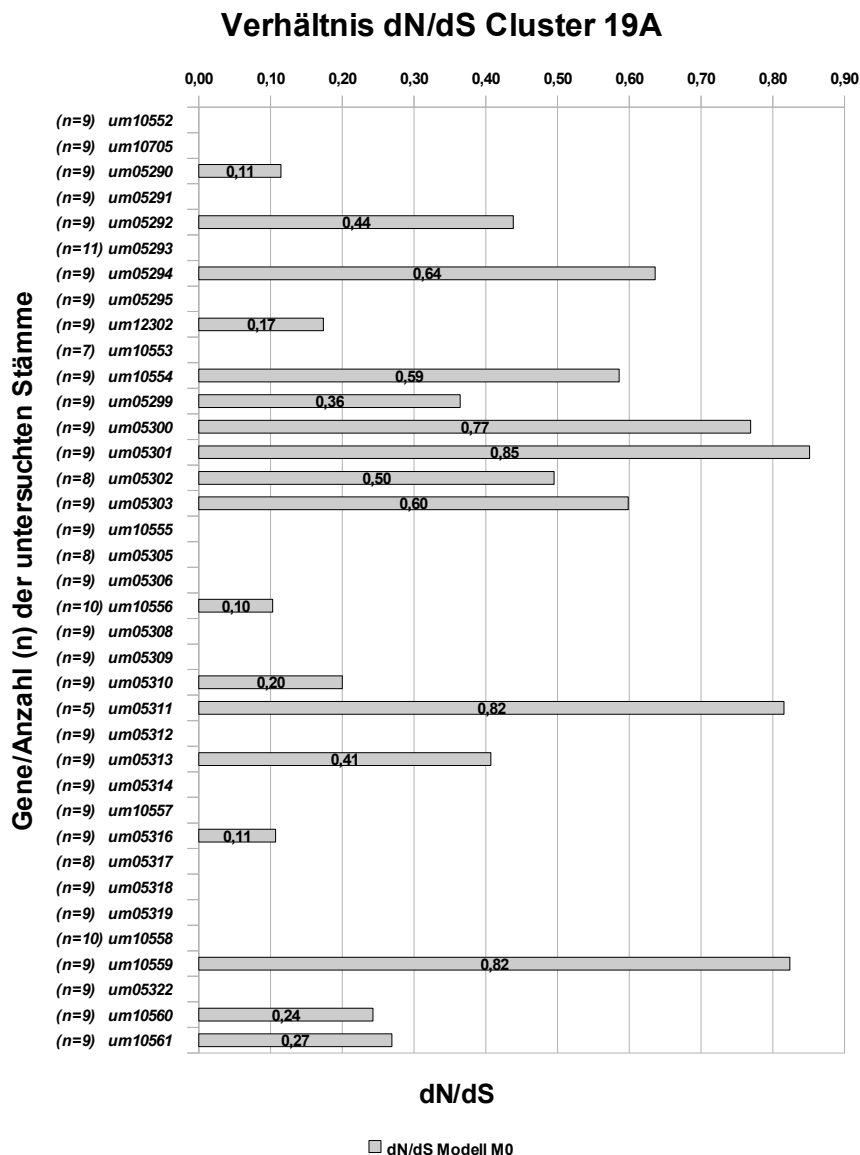


Abbildung 7: Das Verhältnis von nicht synonymen zu synonymen Substitutionen im Cluster 19A von *U. maydis*.
Das Verhältnis ist gegen die Gene des Clusters 19A aufgetragen.
Die Reihenfolge der Gene entspricht ihrer Position im Gencluster.

Keines der analysierten Gene zeigt einen d_N/d_S Wert größer gleich Eins. Die stärksten Hinweise auf positive Selektion finden sich bei den Genen *um05300*, *um05301*, *um05311* und *um10559*. Ihr Verhältnis d_N/d_S liegt zwar unterhalb von Eins, zeigt aber im Gegensatz zum Mittelwert von 0,22 eine deutliche Tendenz in Richtung positiver Selektion. Einige Gene fallen aus der Analyse heraus, da sie entweder nur synonyme oder nur nicht synonyme Substitutionen tragen und so kein Verhältnis zwischen diesen Werten errechnet werden kann.

3.1.4. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Anschließend an die Sequenzanalysen wurden die ermittelten Ergebnisse statistisch mit Hilfe des Programms Statistika durch eine ANOVA Analyse auf Signifikanz hin untersucht. Dabei wurden die jeweiligen Ergebnisse nach verschiedenen Kriterien in vier Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 1). Die Gene, die sich im Cluster 19A befinden, wurden gegen die flankierenden Gene des Clusters getestet. Dies ergab für keinen Wert aus der Sequenzanalyse einen signifikanten Unterschied. Die Aufteilung der Gene in verschiedene Genfamilien ergab für die nicht synonymen Substitutionen, die AS-Distanzen und das Verhältnis d_N/d_S signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Unterteilung nach Expression der Gene während der biotrophen Phase ergab keine signifikanten Unterschiede. Der Test der beiden Gene, die in allen Sequenzanalysen überdurchschnittliche Werte lieferten, gegen die restlichen Gene ergab hohe Signifikanzen für alle Ergebnisse. Die Ergebnisse der ANOVA Analyse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Test der Ergebnisse der Sequenzanalyse auf Signifikanz (p) mittels ANOVA.

	Cluster/Flanken	Genfamilien	Genexpression	<i>um10554 + um05301</i>
Substitutionen				
synonym	-----	-----	-----	-----
nicht synonym	-----	0,038010	-----	0,000001
gesamt	-----	-----	-----	0,000112
AS-Distanzen	-----	0,001010	-----	0,000193
dN/dS	-----	0,022490	-----	0,009446

Basierend auf den Sequenzanalysen und der anschließenden statistischen Auswertung dieser Ergebnisse, wurden zwei Gene als Kandidaten für Gendeletionsmutanten ausgewählt. Dabei wurde ein Gen mit großer Variabilität und ein Gen mit geringer Variabilität ausgewählt.

Die Hygromycin Resistenz Kasette wurde aus dem vorhandenen Plasmid pRoK003 durch einen Sfi1 Verdau mit anschließender Auftrennung über Gelelektrophorese und Aufreinigung der Banden aus dem Gel (siehe Material und Methoden) gewonnen.

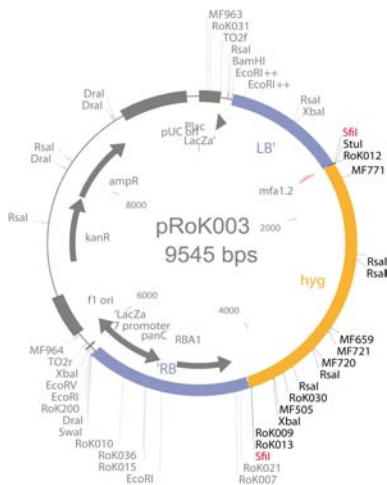


Abbildung 10: Das Plasmid pRoK003. Dieses Plasmid trägt die Hygromycin Resistenz Kasette, die durch einen Sfi1 Verdau gewonnen werden konnte.

Die rechte Flanke (957 bp) des Gens *um10553* wurde ebenfalls in einen TOPO TA Vektor (Invitrogen) kloniert (siehe Material und Methoden) und bildet das Plasmid pRoK005.

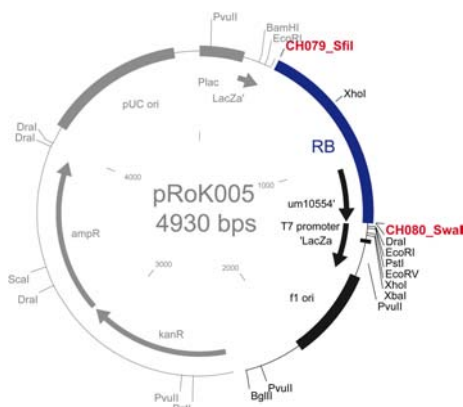


Abbildung 11: Das Plasmid pRoK005. Das Plasmid trägt die rechte Flanke des Gens *um10553*. Transparent dargestellt ist der Bereich des Plasmids, der nach einem BglII und SfiI Verdau herausgeschnitten wird und für die Konstruktion des Plasmid pRoK008 nicht benötigt wird.

Die rechte Flanke (2135 bp) des Gens *um10554* wurde in das Plasmid pRoK010 kloniert (siehe Material und Methoden).

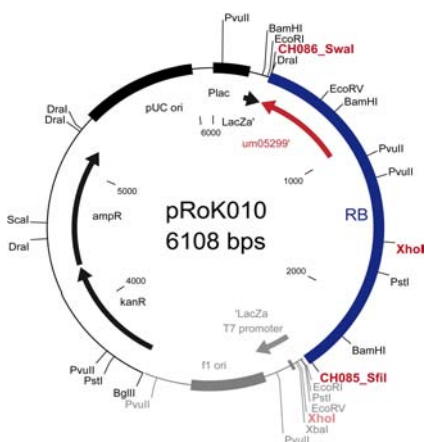


Abbildung 14: Das Plasmid pRoK010.

Das Plasmid trägt die rechte Flanke des Gens *um10554*. Transparent dargestellt ist der Bereich des Plasmids, der nach einem BglIII und SfiI Verdau herausgeschnitten wird und für die Konstruktion des Plasmid pRoK009 nicht benötigt wird.

Die Gendeletionskonstrukte wurden durch enzymatischen Verdau mit Swa1 aus den Plasmiden pRoK008 und pRoK009 gewonnen und über homologe Rekombination in Protoplasten des *U. maydis* Stammes SG200 transferiert (siehe Material und Methoden). Die so gewonnenen Transformanden SG200Δum10553 und SG200Δum10554 wurden mittels analytischer PCR auf Vollständigkeit und richtige Orientierung der Konstrukte untersucht (siehe Material und Methoden). Abschließend wurden die Transformanden durch einen Southern Blot verifiziert (siehe Material und Methoden). Abbildung 15 zeigt den Southern Blot der Transformanden SG200Δum10553 nach einem genomischen Verdau mit dem Restriktionsenzym PstI. Die erste und letzte Spur des Gels zeigt eine 2log DNA-Leiter. In der zweiten Tasche des Gels wurde die Sonde als Positivkontrolle aufgetragen. Die achte Spur zeigt das Schnittmuster des Ausgangsstammes SG200. Erwartungsgemäß zeigt dieser ein anderes Schnittmuster als die Transformanden. Die restlichen Spuren zeigen die erwarteten Schnittmuster mit Fragmentgrößen von 3026 bp und 2677 bp für die Transformanden SG200Δum10553 nach dem PstI Verdau.

Abbildung 16 zeigt den Southern Blot der Transformanden SG200Δum10554 nach einem genomischen Verdau mit dem Restriktionsenzym PstI. In der ersten und letzten Tasche des Gels wurde eine 1kb DNA-Leiter aufgetragen. In der zweiten Tasche des Gels wurde die Sonde als Positivkontrolle aufgetragen. Die dritte Spur zeigt das Schnittmuster des Ausgangsstammes SG200. Dieser zeigt ein anderes Schnittmuster als die Transformanden. Die restlichen Spuren zeigen die Schnittmuster mit Fragmentgrößen von 3960 bp und 1806 bp für die Transformanden SG200Δum10554 nach dem PstI Verdau. Die Transformanden in

Spur vier und fünf zeigen andere Schnittmuster als erwartet und wurden deshalb verworfen.

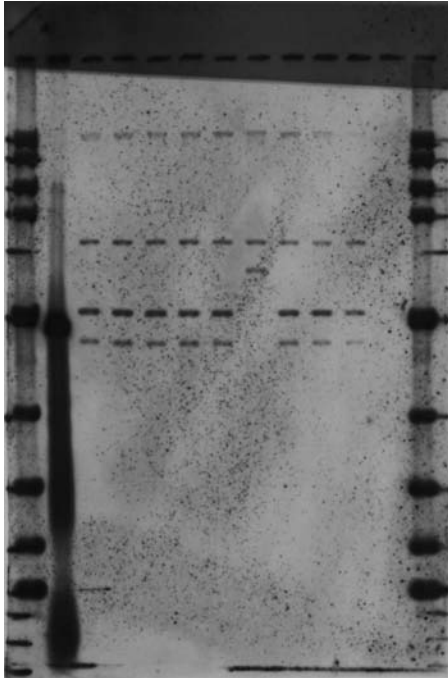


Abbildung 15: Southern Blot des Genomischen PstI Verdaus der Transformanden SG200 Δ um10553.

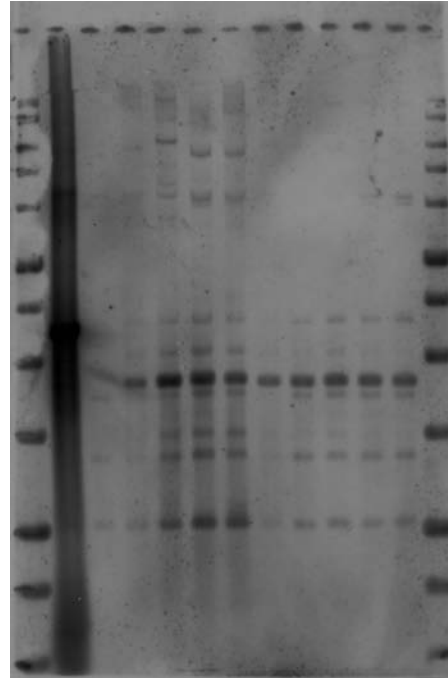


Abbildung 16: Southern Blot des Genomischen PstI Verdaus der Transformanden SG200 Δ um10554.

3.3. Infektionsversuche

3.3.1. Infektionsversuche mit SG200Δum10553

Für die anschließenden Infektionsversuche wurde jeweils ein durch den Southern Blot verifizierter Transformant ausgewählt. Die Transformanten SG200Δum10553 und SG200Δum10554 wurden auf drei verschiedenen Maisrassen und der Urform von Mais (Teosinte) auf Unterschiede in den Infektionsraten getestet. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Infektionsversuche mit der Gendeletionsmutante SG200Δum10553 14 Tage nach der Infektion (dpi).

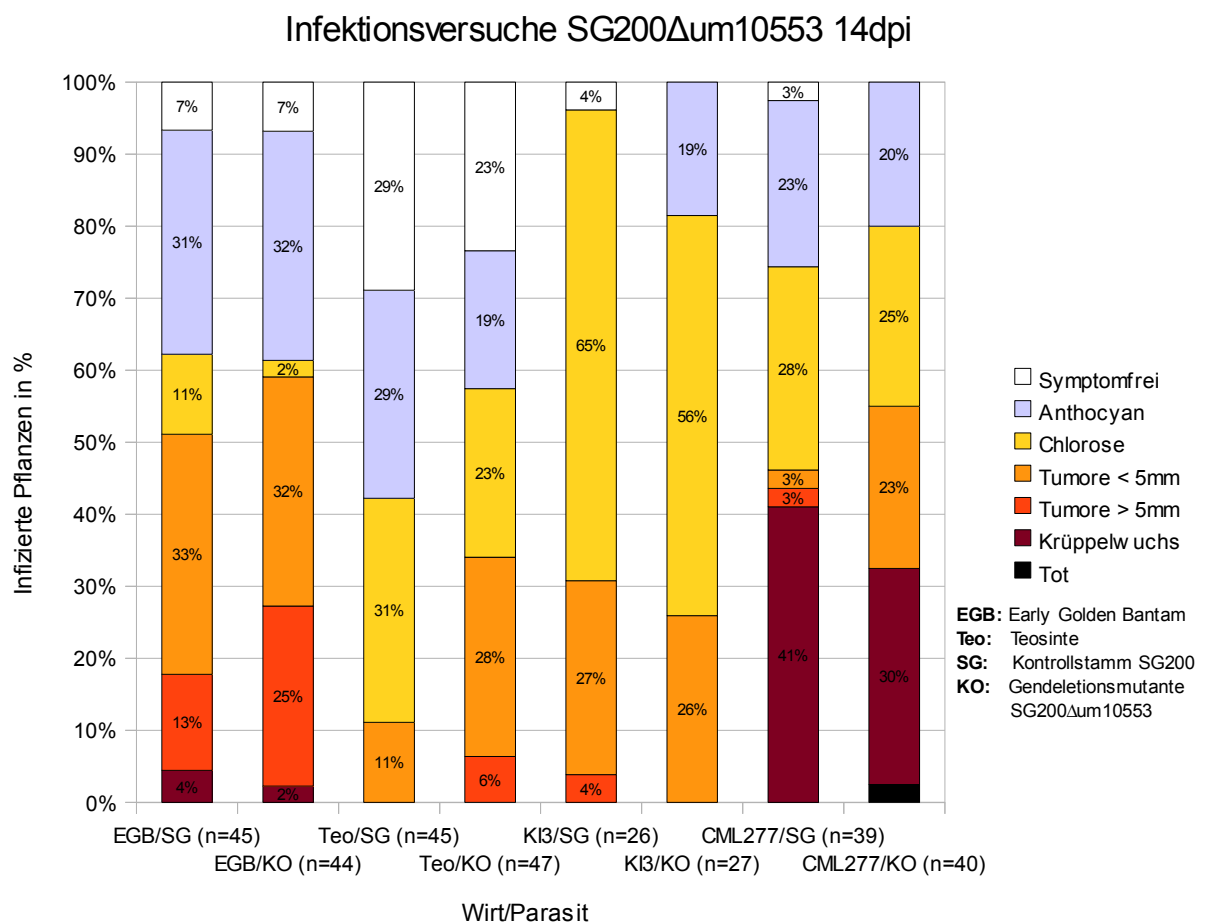


Abbildung 17: Ergebnisse der Infektionsversuche mit der Gendeletionsmutante SG200Δum10553. Auf der X-Achse sind die infizierten Wirte und deren Anzahl (n) mit den jeweiligen Parasiten aufgetragen. Die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der Pflanzen für den beobachteten Phänotyp. Die Ergebnisse wurden nach 14 Tagen aufgenommen.

Abbildung 17 zeigt die Infektionsraten der einzelnen Parasiten im Vergleich von Wildtyp und der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10553. Eine ANOVA Analyse der Ergebnisse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Infektionen mit SG200 und der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10553. Die Ergebnisse der ANOVA Analyse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Test der Ergebnisse der Infektionsversuche auf Signifikanz (p) mittels ANOVA.

<u>EGB</u>		<u>Teo</u>		<u>Ki3</u>		<u>CML277</u>	
SG	KO	SG	KO	SG	KO	SG	KO
0,4964		0,1006		0,1331		0,1213	

EGB: Early Golden Bantam
Teo: Teosinte
SG: Kontrollstamm SG200
KO: Gendeletionsmutante SG200 Δ um10553

Es konnten signifikante Unterschiede in den Infektionsraten auf den verschiedenen Wirten sowohl für SG200 als auch für SG200 Δ um10553 beobachtet werden. Die Ergebnisse der ANOVA Analyse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Test der Ergebnisse der Infektionsversuche auf Signifikanz (p) mittels ANOVA.

<u>SG</u>				<u>KO</u>			
EGB	Teo	Ki3	CML277	EGB	Teo	Ki3	CML277
0,0000				0,0017			

EGB: Early Golden Bantam
Teo: Teosinte
SG: Kontrollstamm SG200
KO: Gendeletionsmutante SG200 Δ um10553

3.3.2. Infektionsversuche mit SG200 Δ um10554

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Infektionsversuche mit der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554 14 Tage nach der Infektion (dpi).

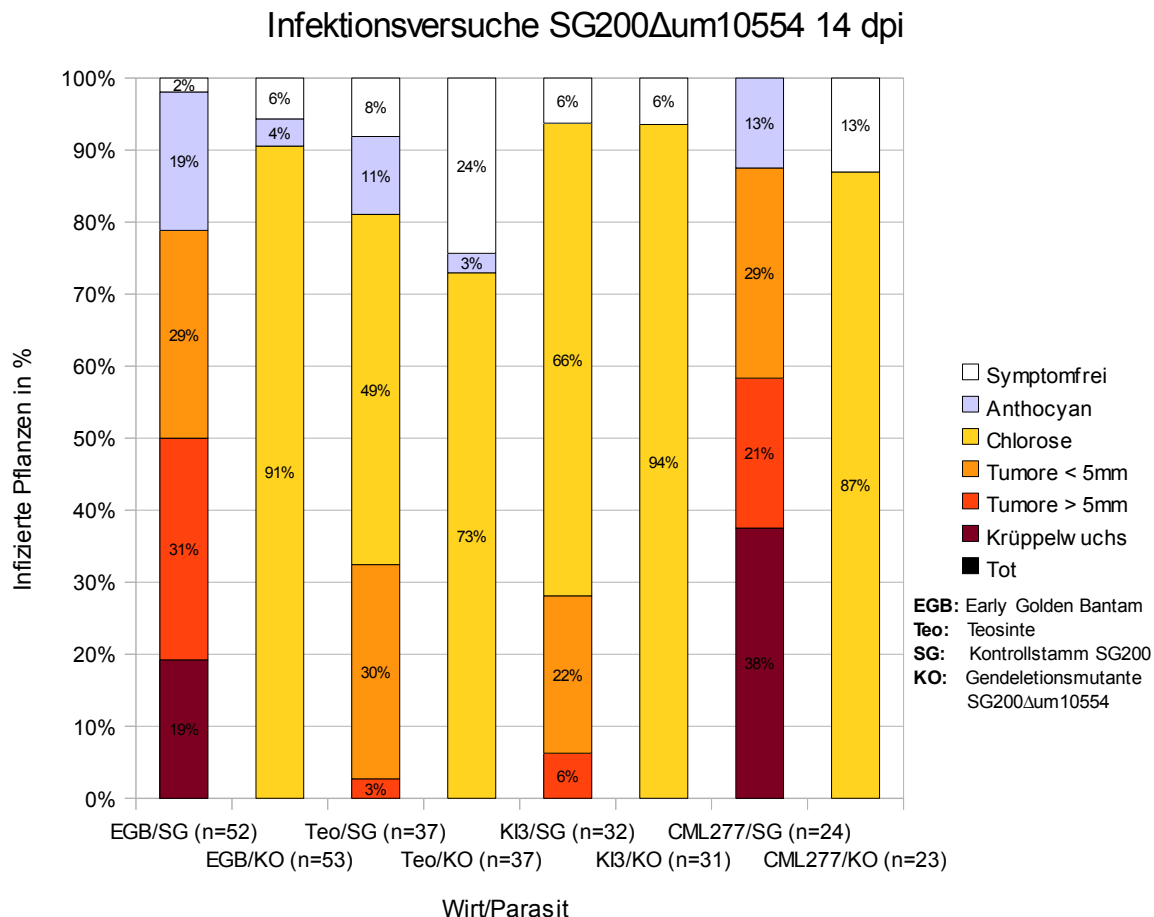


Abbildung 18: Ergebnisse der Infektionsversuche mit der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554. Auf der X-Achse sind die infizierten Wirte und deren Anzahl (n) mit den jeweiligen Parasiten aufgetragen. Die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der Pflanzen für den beobachteten Phänotyp. Die Ergebnisse wurden nach 14 Tagen aufgenommen.

Abbildung 18 zeigt die Infektionsraten der einzelnen Parasiten im Vergleich von Wildtyp und der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554. Eine ANOVA Analyse der Ergebnisse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Infektionen mit SG200 und der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554. Die Ergebnisse der ANOVA Analyse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Test der Ergebnisse der Infektionsversuche auf Signifikanz (p) mittels ANOVA.

<u>EGB</u>		<u>Teo</u>		<u>Ki3</u>		<u>CML277</u>	
SG	KO	SG	KO	SG	KO	SG	KO
0,0000		0,0004		0,0002		0,0000	

EGB: Early Golden Bantam
Teo: Teosinte
SG: Kontrollstamm SG200
KO: Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554

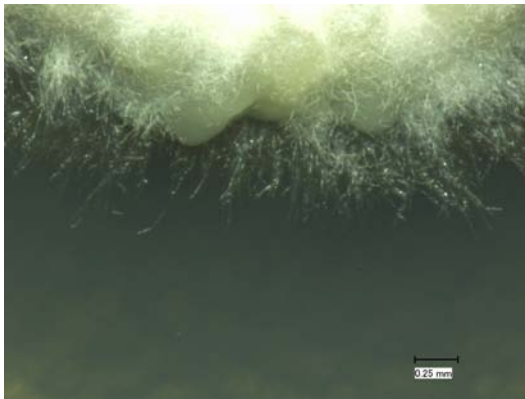
Es konnten ebenfalls signifikante Unterschiede in den Infektionsraten auf den verschiedenen Wirten sowohl für SG200 als auch für SG200 Δ um10554 beobachtet werden. Die Ergebnisse der ANOVA Analyse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Test der Ergebnisse der Infektionsversuche auf Signifikanz (p) mittels ANOVA.

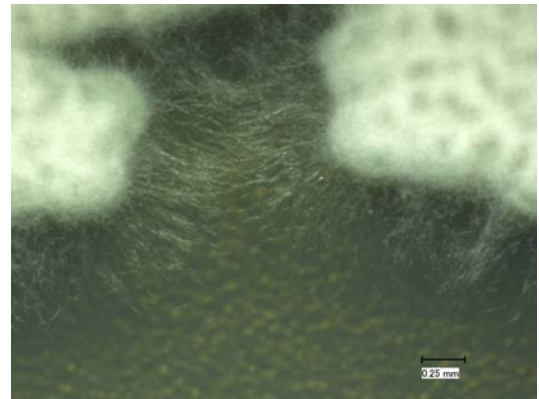
<u>SG</u>				<u>KO</u>			
EGB	Teo	Ki3	CML277	EGB	Teo	Ki3	CML277
0,0000				0,0000			

EGB: Early Golden Bantam
Teo: Teosinte
SG: Kontrollstamm SG200
KO: Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554

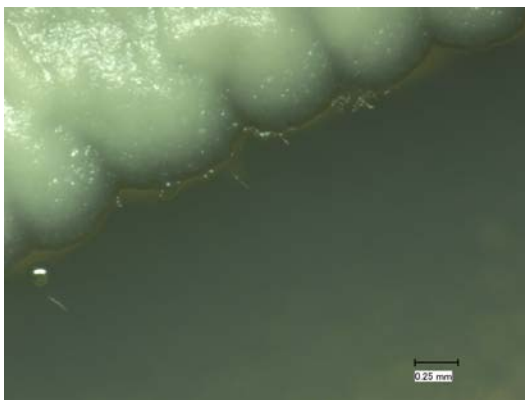
Der für die Infektionsversuche verwendete Transformand SG200 Δ um10554_12 zeigte im Vergleich zu anderen Transformanden der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554 und dem Wildtyp ein gestörtes Wachstum auf PD Festmedium (siehe Abbildung 19).



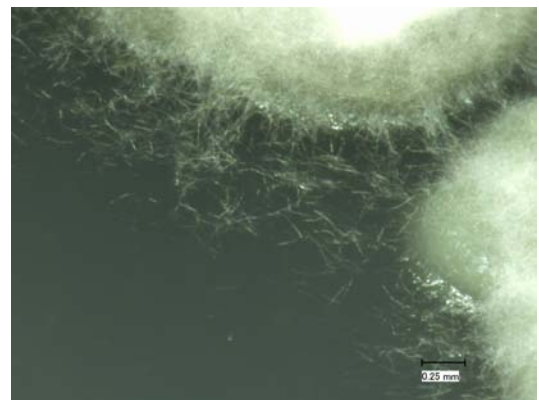
SG200



Transformand_11



Transformand_12



Transformand_13

Abbildung 19: Wachstumsverhalten der Transformanden SG200 Δ um10554.

Wachstumstests in PD-Flüssigmedium zeigten keine abweichenden Wachstumsraten der verschiedenen Transformanden der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554. (siehe Abbildung 20).

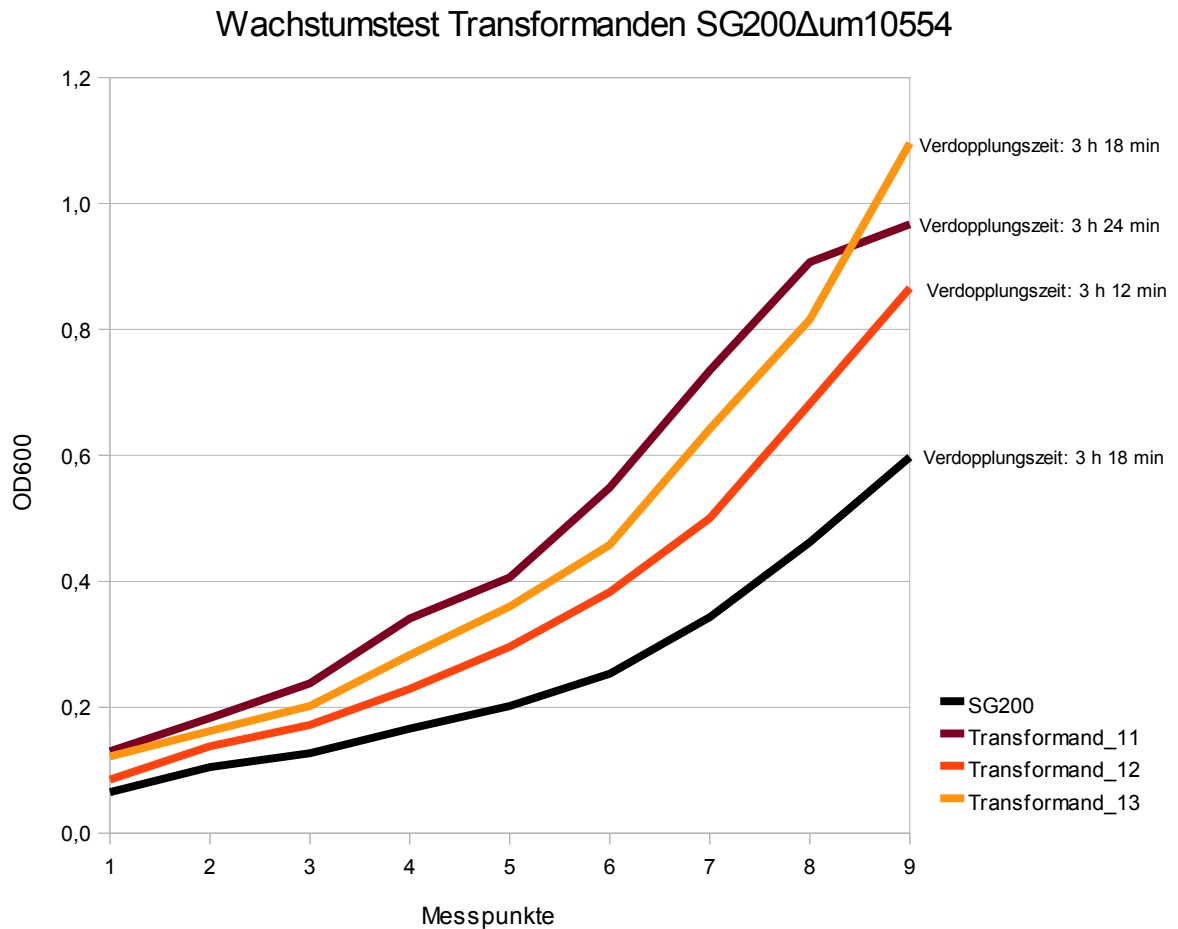


Abbildung 20: Wachstumskurven der Transformanden SG200 Δ um10554.

Infektionsversuche mit verschiedenen Transformanden der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554 ergaben deutliche Unterschiede in den Infektionsraten (siehe Abbildung 21).

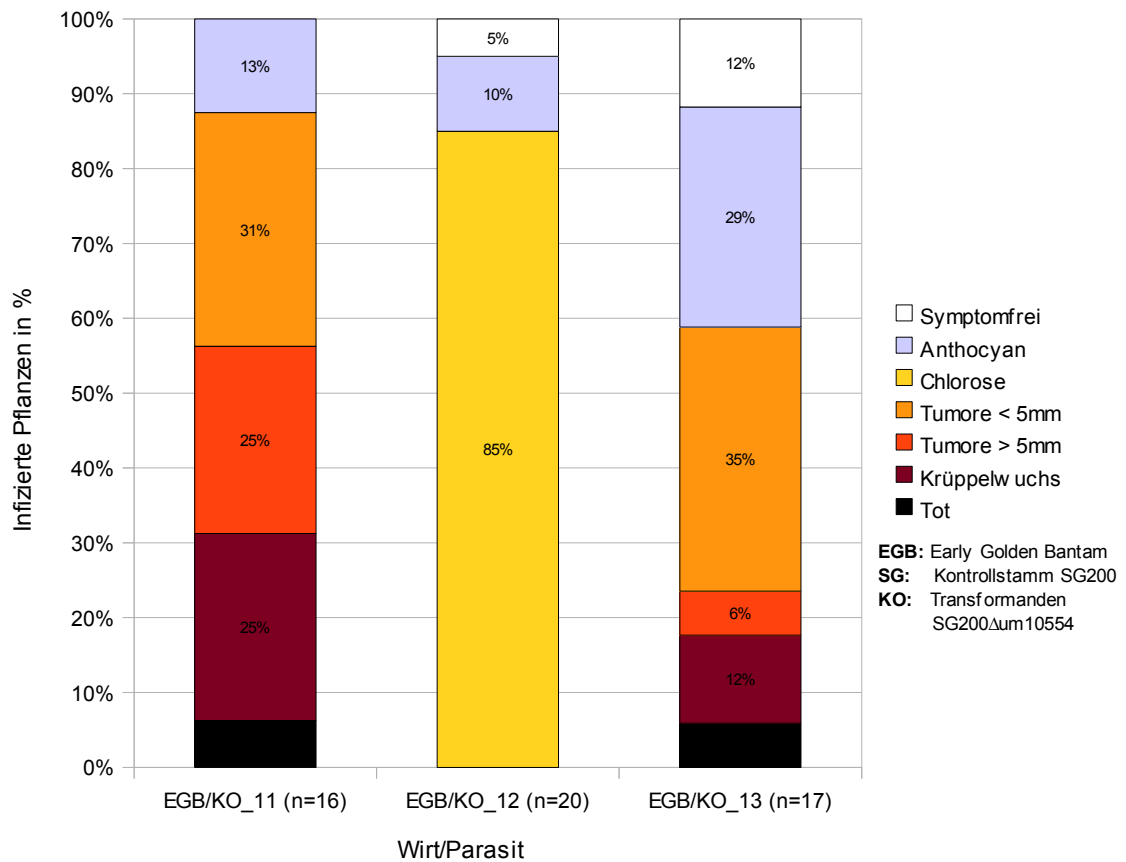
Infektionsversuche Transformanden SG200 Δ um10554 14dpi

Abbildung 21: Infektionsversuche mit verschiedenen Transformanden der Gendelektionsmutante SG200 Δ um10554. Auf der X-Achse sind die infizierten Wirte und deren Anzahl (n) mit den jeweiligen Parasiten aufgetragen. Die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der Pflanzen für den beobachteten Phänotyp. Die Ergebnisse wurden nach 14 Tagen aufgenommen.

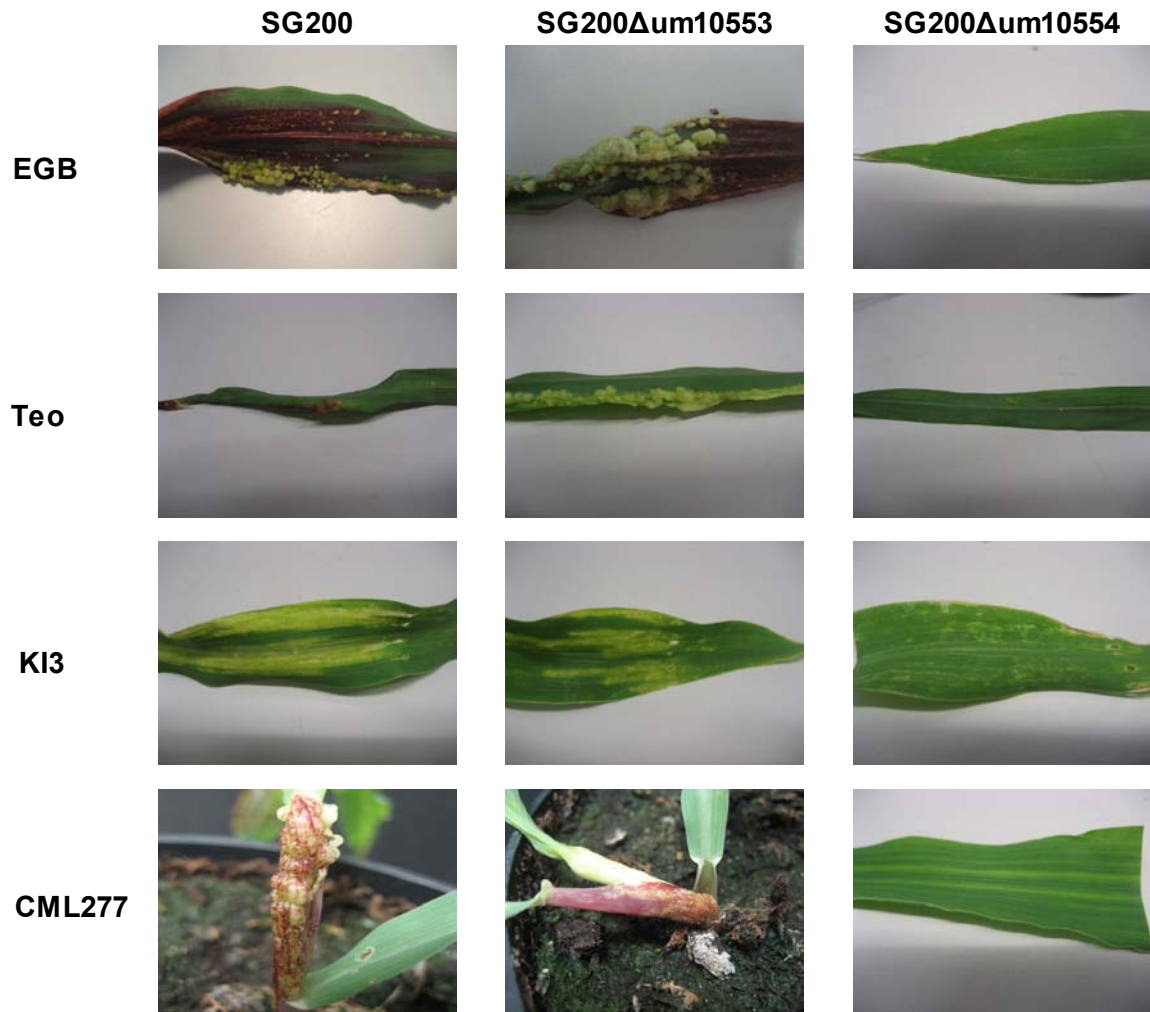


Abbildung 22: Die dominierenden Symptome der einzelnen Maisrassen hervorgerufen durch eine Infektion mit den verschiedenen *U. maydis* Genotypen

EGB: Early Golden Bantam
 Teo: Teosinte

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Virulenzfaktoren in *U. maydis* mit Hilfe von Sequenzanalysen identifiziert werden können. Dafür wurden Sequenzabschnitte von neun *U. maydis* Stämmen für die 26 Gene des Cluster 19A und 11 flankierende Gene dieses Clusters ausgewertet. Ein Gen mit hoher intraspezifischer Variabilität in der Nukleotidsequenz und ein Gen dessen Proteinsequenz stark konserviert erschien, wurden für die Generierung von Gendeletionsmutanten ausgewählt. Diese wurden durch Infektionsversuche auf verschiedenen Maisrassen auf Unterschiede in ihren Infektionsraten untersucht und somit ihre Rolle in der Wirt/Parasit Interaktion charakterisiert.

4.1. SG200 Δ um10553

Die Gendeletionsmutante SG200 Δ um10553 zeigte, im Vergleich zu dem Ausgangsstamm SG200, in den Infektionsversuchen einen statistisch nicht signifikant abweichenden Phänotyp. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Sequenzanalysen. Im Gen *um10553* konnten nur synonyme Substitutionen beobachtet werden. Daher gibt es keine Variabilität innerhalb der Proteinsequenz von *um10553*. Intraspezifische Variabilität, wie sie für Virulenzfaktoren einer Wirt/Parasit Interaktion beschrieben wird (Clay et al., 1997), konnte somit nicht beobachtet werden. Das Gen *um10553* kodiert für ein sekretiertes Protein und befindet sich in einem Gencluster. Damit erfüllt es Kriterien für mögliche Virulenzfaktoren (van Esse et al., 2007, Han et al., 2001, Basse et al., 2002). Die fehlende Variabilität zeigt allerdings deutlich, dass dieses Gen nicht unter dem Einfluss positiver Selektion steht. Daher kann vermutet werden, dass es in keinem evolutiven Bezug zu einem oder mehreren Wirtsgenen steht.

Die stark signifikanten Unterschiede sowohl des Ausgangsstammes SG200 als auch der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10553 auf verschiedenen Maisrassen lassen sich durch quantitative Resistenzen der verschiedenen Maisvarietäten erklären. Quantitative Resistenzen führen dazu, dass nicht nur anfällige und resistente Genotypen innerhalb einer Population, sondern auch alle denkbaren Abstufungen auftreten (Glazebrook, 2005). Quantitative Resistenzen sind das Ergebnis vieler *gene-for-gene* Loci, wobei jeder Locus einen kleinen Teil zur Resistenz beiträgt. Diese Art der Resistenz unterscheidet nicht zwischen verschiedenen Pathogengentypen. Damit ist eine quantitative Resistenz keine absolute, aber eine universelle Abwehr gegen Parasiten (Clay et al., 1997). Dies entspricht exakt den

Beobachtungen der Infektionsversuche mit der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10553 und dem Ausgangsstamm SG200. Die Maisvarietät CML277 zeigte einen überdurchschnittlich hohen Anteil an Pflanzen, die mit Krüppelwuchs auf die Infektion sowohl mit der Gendeletionsmutante als auch mit dem Ausgangsstamm reagierten (siehe Abbildung 17). Dies lässt vermuten, dass CML277 keine oder nur eine geringe quantitative Resistenz gegen verschiedene Genotypen von *U. maydis* besitzt. Im Gegensatz dazu, zeigte die Maisrasse Ki3 eine wesentlich geringere Ausprägung der Symptome nach einer Infektion mit den beiden *U. maydis* Genotypen. Ki3 bildete meist nur wenige kleine Tumore. Der überwiegende Teil der Symptome beschränkte sich auf die Bildung von Chlorose (siehe Abbildung 17). Dieses Symptom kann aber auch durch andere Faktoren wie mechanische Verletzungen durch die Infektion oder beim Gießen der Pflanzen hervorgerufen werden. Daraus lässt sich ableiten, dass Ki3 eine im Vergleich zu CML277 größere quantitative Resistenz gegen verschiedene Genotypen von *U. maydis* besitzt. Ähnlich verhält es sich mit dem Infektionsverlauf bei Teosinte. Auch hier ist ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu den anderen Maisvarietäten zu beobachten. Teosinte weist einen hohen Anteil nicht infizierter Pflanzen auf. Dies könnte nach dem Konzept der quantitativen Resistenzen mit einem hohen Anteil additiver *gene-for-gene* Loci erklärt werden (Clay et al., 1997). Allerdings gestaltet sich die Infektion sieben Tage alter Teosintepflanzen aufgrund ihrer geringen Größe und des geringen Stengelquerschnitts ungleich schwieriger, als die Infektion gleichaltriger Maispflanzen. Daher ist es möglich, dass bedingt durch die Methode einige als symptomfrei bonitierten Pflanzen nicht erfolgreich infiziert werden konnten. Early Golden Bantam zeigt von allen vier getesteten Maisvarietäten die homogenste Reaktion auf die Infektion mit den verschiedenen *U. maydis* Genotypen. Nach der Hypothese der quantitativen Resistenzen, ist deshalb eine in etwa gleich große Anzahl von Loci zu erwarten, die für die allgemeine Abwehr von Parasiten kodieren. Quantitative Resistenzen sind stark von Umwelteinflüssen abhängig. Daher ist es schwer zwischen dem Einfluss des Parasiten und den Umwelteinflüssen auf den Wirtsphänotyp, der durch die quantitative Resistenz hervorgerufen wird, zu unterscheiden (McDonald et al., 2002). Obwohl die abiotischen Faktoren wie z.B. Licht, Luftfeuchtigkeit und Temperatur in den Infektionsversuchen für alle Maispflanzen konstant waren, kann der Einfluss anderer Faktoren, wie z.B. unterschiedliche Mengen an Wasser beim Gießen oder geringfügige Temperaturunterschiede in der Klimakammer bedingt durch die Lüftung, auf die

Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Um den Einfluss dieser Faktoren zu minimieren und zu verifizieren, müssten zusätzliche Infektionsversuche durchgeführt werden. Aus zeitlichen Gründen war dies im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich.

4.2. SG200Δum10554

Ausgehend von der Hypothese, dass Virulenzfaktoren im Vergleich zu Genen z.B. des Primärstoffwechsels eine höhere intraspezifische Variabilität aufweisen, da sie starken Selektionskräften ausgesetzt sind, die aus dem stetigen Wettstreit mit den Resistenzen des Wirtes resultieren, wurde die Gendeletionsmutante SG200Δum10554 auf Unterschiede in den Infektionsraten verschiedener Maisrassen getestet. Das Gen *um10554* zeigte in allen Sequenzanalysen überdurchschnittliche Variabilität. Über 60% der im Gen *um10554* gefundenen Substitutionen sind nicht synonym und führen somit zu einer Veränderung in der Proteinsequenz. Daher erscheint das Gen *um10554* im Vergleich zu anderen Genen des Clusters 19A deutlich variabler. Dies entspricht den Erwartungen von Genen, die als Virulenzfaktoren in der Wirt/Parasit Interaktion beteiligt sind (Clay et al., 1997).

Die Infektionsversuche mit dem Transformanden SG200Δum10554_12 zeigten einen stark signifikant abweichenden Phänotyp im Vergleich zum Ausgangsstamm SG200. Infektionen mit dem Transformanden SG200Δum10554_12 führten weder zu Krüppelwuchs noch zur Bildung von Tumoren. Die einzigen beobachteten Symptome beschränkten sich auf Chlorose und vereinzelt Anthozyanbildung (siehe Abbildung 18). Dies schien im Einklang mit den Ergebnissen der Sequenzanalysen zu stehen, in denen das Gen *um10554* überdurchschnittliche Werte zeigte und damit als potenzieller Virulenzfaktor angenommen wurde. Eine Deletion dieses Gens sollte demnach eine Veränderung in den Infektionsraten nach sich ziehen. Allerdings zeigte der Transformand SG200Δum10554_12 beim Wachstum auf Festmedium einen stark abweichenden Phänotyp im Vergleich zu allen anderen Transformanden dieser Gendeletionsmutante. Auf PD-Festmedium konnte nur vereinzelt filamentöses Wachstum dieses Transformanden beobachtet werden, wohingegen alle anderen Transformanden, wie für solopathogene Stämme von *U. maydis* zu erwarten, zu filamentösem Wachstum auf Festmedium fähig waren (Siehe Abbildung 19). Wachstumstests in PD-Flüssigmedium zeigten keine signifikant abweichenden Wachstumsraten der Transformanden (Siehe Abbildung 20). Allerdings kann in Wachstumstests nicht zwischen filamentösem Wachstum und dem Wachstum in der

hefeähnlichen Phase unterschieden werden. Infektionsversuche mit zwei weiteren Transformanden der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554 zeigten das gesamte Spektrum an Symptomen einer Infektion mit *U. maydis* (Siehe Abbildung 21). Da die Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554 zu Transformanden mit unterschiedlichem Phänotyp geführt hat, kann nicht zweifelsfrei geklärt werden, welcher Phänotyp aus der Deletion des Gens *um10554* resultiert. Da aber sechs der sieben Transformanden der Gendeletionsmutante SG200 Δ um10554 auf Festmedium zu filamentösem Wachstum fähig waren und zwei dieser Transformanden in Infektionsversuchen Symptome einer Infektion mit *U. maydis* zeigten, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Transformanden SG200 Δ um10554_12 nicht um die zu erwartende Gendeletionsmutante aus der Deletion des Gens *um10554* handelt. Dies bestätigt auch ein Sequenzabgleich der rechten Flanke des Gendeletionskonstruktes mit dem Genom von *U. maydis*. Es zeigte sich, dass Homologien von über 75% zu anderen Bereichen bestehen, über die Rekombination stattgefunden haben kann. Daher beruht der als apathogen beschriebene Phänotyp des Transformanden SG200 Δ um10554_12 vermutlich nicht auf der Deletion des Gens *um10554*, sondern auf einem anderen durch die Transformation entstandenen Gendefekt. An welchen Stellen im *U. maydis* Genom es zur Rekombination gekommen ist, lässt sich im Nachhinein nur äußerst schwer bestimmen.

In *U. maydis* sind mehrere Gendeletionen bekannt, die zu einem apathogenen Phänotyp führen. Solche Phänotypen zeigen sich z.B. bei Mutanten, in denen das Gencluster 5B deletiert wurde. Der aus der Deletion des Clusters 5B resultierende Phänotyp zeigt den Abbruch der Wirt/Parasit Interaktion in der frühen Phase der Penetration. Dies lässt vermuten, dass sich im Cluster 5B Gene befinden, die für die Etablierung einer Verbindung zwischen Pilz- und Pflanzenzelle unabdingbar sind (Kämper et al., 2006).

In einer weiteren als apathogenen beschriebenen Mutante wurde das Gen *um01987*, dass als *Pep1* (*Protein essential during penetration 1*) bezeichnet wird, deletiert. Dies führt zu einem kompletten Stop der Virulenz kurz nach der Penetration der Wirtsepidermis (Brefort et al., 2009). Außerdem rufen diese Gendeletionsmutanten nach dem Eindringen in den Wirt heftige Abwehrreaktionen wie z.B. Apoptose hervor (Doehlemann et al., 2009). Die genaue Funktion von *pep1* ist noch unklar. Es findet sich allerdings in *Ustilago hordei* ein zu *pep1* orthologes Gen. Gendeletionsmutanten können mit dem Gen der nah verwandten Art komplementiert werden. Dies lässt vermuten das *pep1* ein wichtiger Virulenzfaktor in allen Brandpilzen ist (Brefort et al.,

2009). *pep1* ist nicht Teil eines Genclusters. Das Protein Pep1 wird sekretiert, ist aber umgeben von zwei nicht sekretierten Proteinen, die von den Genen *um01988* und *um01986* kodiert werden. Außerdem weist das Verhältnis der nicht synonymen (d_N) zu synonymen Substitutionen (d_S) $d_N/d_S = 0,21$ zwischen *U. maydis* und *U. hordei* eindeutig auf eine konservierte Proteinsequenz hin (Doehlemann et al., 2009). Damit zeigt das als Virulenzfaktor identifizierte Gen *um01987* nur eine der in dieser Arbeit berücksichtigten Eigenschaften von Virulenzfaktoren. Allerdings ist Pep1 wie bereits erwähnt möglicherweise in vielen Brandpilzen ein wichtiger Virulenzfaktor. Daher scheint es möglich, dass dieses Protein nicht für die Interaktion mit einer Wirtsart, sondern einer Wirtsgruppe z.B. den Poaceae wichtig ist. Dies würde den Vergleich dieses Gens und dessen Eigenschaften mit den in dieser Arbeit untersuchten potenziellen Virulenzfaktoren relativieren.

4.3. Ursachen für intraspezifische Konservierung potentieller Virulenzfaktoren in *U. maydis*

Die Identifizierung variabler Gene im Cluster 19A erweist sich als äußerst schwierig, da insgesamt nur sehr wenig Variabilität in den Nukleotidsequenzen von *U. maydis* nachzuweisen ist. Diese geringe intraspezifische Variabilität ist vermutlich das Resultat einer Spezialisierung auf die Kulturpflanze Mais. Es wird vermutet, dass Vorfahren von *U. maydis* schon seit 10-25 Millionen Jahren auf verschiedenen Mitgliedern der Familie der Poaceae parasitieren (Munkacsi et al., 2007). Unter diesen ursprünglichen Wirten ist auch die Urform von Mais Teosinte zu finden. Allerdings wird keine der heute existierenden Populationen von *U. maydis* älter als 10000 Jahre geschätzt (Munkacsi et al., 2008). Daher wird angenommen, dass die Domestizierung von Teosinte vor ca. 6000-10000 Jahren eine schrittweise Spezialisierung des Parasiten auf den nun immer häufiger auftretenden Wirt nach sich zog. Andere Wirte als Mais sind für diesen Pflanzenparasiten nicht beschrieben (Duran, 1987). Die anthropogene Verbreitung der Wirtspflanze ausgehend von ihrer ursprüngliche Heimat Mexiko nach Nord- und Südamerika wurde von *U. maydis* begleitet. Fünf große *U. maydis* Subpopulationen konnten auf dem amerikanischen Kontinent nachgewiesen werden. Auch die ursprüngliche und damit älteste Subpopulation aus Mexiko zeigt im Vergleich zu den anderen wesentlich jüngeren Populationen keine größere Variabilität. In allen Subpopulationen zeigen sich Anzeichen für *bottleneck* Ereignisse und kürzlich erfolgte Ausbreitung. Dies bestätigt den großen Einfluss der Domestizierung des Wirtes auf die genetische

Zusammensetzung des Genpools des Parasiten (Munkacsı et al., 2008). Monokulturen verändern die Artzusammensetzung eines Ökosystems und können damit die Resistenzen der Wirtspopulationen reduzieren (Cohen, 2000, Tishkoff et al., 2001). Die daraus resultierende verminderte Konkurrenz zwischen Wirt und Parasit begünstigt die Evolution und Etablierung weniger spezialisierter Genotypen (Cohen, 2000). Zusätzlich könnte die fehlende Variabilität im Genpool des Wirtes zu einer Verschiebung der Selektionskräfte führen. In Monokulturen würde vermutlich auf Effizienz des Parasiten auf den dominierenden Wirtsgenotyp selektioniert, anstatt auf Variabilität wie in natürlichen Systemen. Daher scheint eine intraspezifische Konservierung von Virulenzfaktoren in *U. maydis* möglich. Die Einführung von Genmais mit multiplen Resistenzen (Lubberstedt et al., 1998, Wisser et al., 2006, Baumgartner et al., 2007) gegen verschiedene *U. maydis* Genotypen könnte zur allmählichen Bildung neuer Virulenzen in *U. maydis* führen (McDonald & Linde, 2002, Carbone & Kohn, 2004), da der genetisch veränderte Mais neue Variabilität in den Genpool des Wirtes bringt. Damit imitiert Genmais eine sprunghafte Evolution des Wirtes und initiiert somit die Evolution neuer Virulenzen in seinem Parasiten.

4.4. Cluster 19A scheint keine wirtsspezifischen Virulenzfaktoren zu tragen

Möglicherweise trägt das Cluster 19A von *U. maydis* keine wirtsspezifischen Virulenzfaktoren, sondern vielmehr Gene der strukturellen Etablierung im Wirt oder des sog. *resource tracking*. Die Deletion des gesamten Cluster 19A führt zu einer deutlich verringerten Virulenz, wobei *U. maydis* den Wirt erfolgreich penetrieren kann und im Wirtsgewebe proliferiert. Erst die Bildung von Tumoren und Teliosporen ist stark vermindert (Kämper et al., 2006). Dieser Phänotyp basiert somit auf Proteinen die erst vier bis acht Tage nach der Infektion vom Pilz sekretiert werden (Brefort et al., 2009). Daher wird vermutet, dass sich im Cluster 19A Gene befinden, die für die Bildung von Tumoren essentiell sind. Weitere denkbare Funktionen wären die Unterdrückung von pflanzlichen Abwehrmaßnahmen gegen den Parasit oder die Umleitung von Metaboliten in Richtung des Parasiten (Kämper et al., 2006). Möglicherweise wäre die Untersuchung der Gene des Clusters 2A, dessen Deletion zu einer Hypervirulenz führt (Kämper et al., 2006) aufschlussreicher gewesen. Es wird vermutet, dass sich im Cluster 2A Gene befinden, die die Proliferation des Pilzes im Wirt regulieren. Dies ist ein entscheidender Faktor für die Lebensweise biotropher Pflanzenparasiten. Ein uneingeschränktes Wachstum innerhalb des Wirtes könnte dazu führen, dass der Wirt abstirbt, bevor der Pilz seinen Lebenszyklus vollenden

kann (Kämper et al., 2006). Eine Hypervirulenz würde sich bereits kurz nach der Infektion durch uneingeschränkte Bildung von Tumoren zeigen und sich somit in einem eindeutig identifizierbaren Phänotyp widerspiegeln.

4.5. Fazit und Ausblick

In *U. maydis* gibt es mögliche Virulenzfaktoren, die unterschiedliche Eigenschaften in den in dieser Arbeit gewählten Kriterien für Effektoren einer Wirt/Parasit Interaktion zeigen. Daher scheint eine Identifizierung von Virulenzfaktoren basierend auf den in dieser Arbeit untersuchten Eigenschaften als äusserst schwierig. Intraspezifische Variabilität als Kriterium für Virulenzfaktoren scheint in *U. maydis* aufgrund der insgesamt niedrigen Variabilität in den in dieser Arbeit betrachteten Sequenzbereichen ebenfalls als wenig aussagekräftig. Dies bestätigt auch die geringe intraspezifische Variabilität in dem Virulenzfaktor *pep1*. Allerdings wurden in dieser Arbeit nur Fragmente von Genen untersucht. Über die Variabilität im gesamten Cluster 19A kann somit keine eindeutige Aussage getroffen werden. Da aber weltweit nur wenige verschiedene Maisrassen in großen Monokulturen angebaut werden, gibt es im Wirt von *U. maydis* nur geringe intraspezifische Variabilität. Diese fehlende Variabilität könnte sich in *U. maydis* widerspiegeln. Wenig Variabilität im Wirtsorganismus bedarf auch nur geringer Variabilität auf der Seite des Parasiten. Dies würde sich als Umkehrschluss aus der Red Queen Hypothese ergeben (Clay et al., 1997). Daher sollten andere Kriterien hinzugezogen werden um wirtsspezifische Virulenzfaktoren in *U. maydis* zu identifizieren. Die Analyse des G/C Gehalts, sowie die Suche nach Proteinen mit erhöhter Anzahl an Cysteinen wären mögliche Ansatzpunkte.

Allerdings könnte sich die Analyse von Sequenzen mit den in dieser Arbeit gewählten Kriterien in natürlich evolvierenden Wirt/Parasit-Systemen als akkurates Mittel erweisen, um Virulenzfaktoren zu identifizieren. In den Ustilaginaceae finden sich Pflanzenparasiten mit unterschiedlichen Wirtsspektren. So zeigt *Ustilago vetiveriae* Padwick ein sehr enges Wirtsspektrum. Der einzige bekannte Wirt dieses Pflanzenparasiten ist *Vetiveria zizanioides* Stapf. Ein interessanter Pflanzenparasit mit breitem Wirtsspektrum ist *Ustilago striiformis* (Westend.) Niessl, der verschiedene Wirte aus der Familie der Poaceae befallen kann. Damit stehen zwei weitere Organismen zur Verfügung, die aufgrund ihres unterschiedlichen Wirtsspektrums Differenzen in der Anzahl und in der intraspezifischen Variabilität von wirtsspezifischen Virulenzfaktoren zeigen sollten. Erkenntnisse aus anderen

Parasiten wie z.B. dem Erreger der Malaria tropica *Plasmodium falciparum* Welch oder anderer gut untersuchter humanpathogener Organismen könnten Hinweise auf Eigenschaften von Virulenzfaktoren bringen, die sich auch in *U. maydis* wiederfinden lassen. Auch wenn es schwierig ist Virulenzfaktoren in *U. maydis* zu identifizieren, eignet sich dieser Organismus sehr gut für die Untersuchung von Effektoren in einer Wirt/Parasit Interaktion, da er die Möglichkeit einer genetischen Manipulation potentieller Effektoren bietet. Dies und die Anwendbarkeit von Erkenntnissen nah verwandter Arten aus der Gruppe der Ustilaginaceae in funktionellen Studien, machen *U. maydis* weiterhin zu einem sehr guten Modellsystem für die Untersuchung von Wirt/Parasit Interaktionen biotropher Pflanzenparasiten (Kämper et al., 2006). Auch wenn die in dieser Arbeit als potentielle Virulenzfaktoren identifizierten Gene nicht als wirtsspezifische Effektoren charakterisiert werden konnten, scheint die Identifikation von Virulenzfaktoren basierend auf Sequenzanalysen dennoch ein geeignetes Mittel zur Untersuchung von Wirt/Parasit Interaktionen zu sein.

5. Literaturverzeichnis

- BACKLUND, J. E. & SZABO, L. J.** (1993). Physical characteristics of the genome of the phytopathogenic fungus *Puccinia graminis*. *Curr. Genet.* **24**, 89-93.
- BAUMGARTEN, A. M., SURESH, J., MAY, G. & PHILLIPS, R. L.** (2007). Mapping QTLs contributing to *Ustilago maydis* resistance in specific plant tissues of maize. *Theor. Appl. Genet.* **114**, 1229-1238.
- BAKKEREN, G. G., JIANG, R. L., WARREN, Y., BUTTERFIELD, H., SHIN, R., CHIU, R., LINNING, J., SCHEIN, N., LEE, G., HU, D. M., KUPFER, Y., TANG, B. A., ROE, S., JONES, M. & KRONSTAD, J. W.** (2006). Mating factor linkage and genome evolution in basidiomycetous pathogens of cereals. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 655-666.
- BANUETT, F. & HERSKOWITZ, I.** (2002). Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* **37**, 149-170.
- BASSE, C. W., KOLB, S. & KAHMANN, R.** (2002). A maize-specific expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology.* **43**, 75-93.
- BEGEROW, D., GÖKER, M., LUTZ, M. & STOLL, M.** (2004). On the evolution of smut fungi on their host. *Frontiers of Basidiomycete Mycology.* IHW-Verlag. 81-98.
- BEGEROW, D., STOLL, M. & BAUER, R.** (2006). A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia.* **98**, 906-916.
- BÖLKER, M., BOHNERT, H. U., BRAUN, K. H., GORL, J. & KAHMANN, R.** (1995). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet.* **248**, 547-552.
- BÖLKER, M.** (2001). *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology.* **147**, 1395-1401.
- BRACHMANN, A., KÖNIG, J., JULIUS, C. & FELDBRÜGGE, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.
- BREFORT, T., DOEHLEMANN, G., MENDOZA-MENDOZA, A., REISSMANN, S., DJAMEI, A. & KAHMANN, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**, 423-445.
- CARBONE, I. & KOHN, L.** (2004). Inferring process from pattern in fungal population genetics. *Applied mycology and biotechnology.* **4**, 29-58.
- CHRISTENSEN, J. J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer. Phytopathol. Soc. Monogr.* **2**.
- CLAY, K. & KOVER, X. P.** (1997). The Red Queen Hypothesis and Plant/Pathogen Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 29-50.

- COHEN, M. L.** (2000). Changing patterns of infectious disease. *Nature*. **406**, 762-767.
- CORNELL, M. J., ALAM, I., SOANES, D. M., WONG, H. M., HEDELER, C., PATON, N. W., RATTRAY, M., HUBBARD, S. J., TALBOT, N. J. & OLIVER, S. G.** (2007). Comparative genome analysis across a kingdom of eukaryotic organisms: Specialization and diversification in the Fungi. *Genome Res.* **17**, 1809-1822.
- DEAN, R. A., TALBOT, N. J. EBBOLE, D. J. et al. (35 CO-AUTHORS).** (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*. **434**, 980-986.
- DURAN, R.** (1987). Ustilaginales of Mexico: taxonomy, symptomatology, spore germination, and basidial cytology. Pullman, WA: Washington State University
- DOEHLEMANN, G., WAHL, R., HORST, R. J., VOLL, L. M., USADEL, B., POREE, F., STITT, M., PONS-KÜHNEMANN, J., SONNEWALD, U., KAHMANN, R. & KÄMPER, J.** (2008). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant Journal*. **56**, 181-195.
- DOEHLEMANN, G., VAN DER LINDE, K., ASSMANN, D., SCHWAMMBACH, D. & HOF, A.** (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis* is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathogens*. **5**, e1000290.
- FELDRÜGGE, M., KÄMPER, J., STEINBERG, G. & KAHMANN, R.** (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 666-672.
- FELDRÜGGE, M., ZARNACK, K., VOLLMEISTER, E., BAUMANN, S., KOEPKE, J., KÖNIG, J., MÜNSTERKÖTTER, M. & MANNHAUPT, G.** (2008) The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol.* **45**, 40-46.
- FISCHER, G. W. & HOLTON, C. S.** (1957). Biology and control of the smut fungi. The Ronald Press Company. New York.
- FRANK, S. A.** (1992). Models of plant-pathogen coevolution. *Trends in Genetics*. **8**, 213-219.
- GLAZEBROOK, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Ann Rev Phytopathol.* **43**, 205-227.
- GRANTHAM, R.** (1974). Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution. *Science*. **185**, 862-864.
- HAAG, C.** (2008). Die funktionelle Charakterisierung des RNA-bindenden Proteins Khd4 in *Ustilago maydis*. Diploma Thesis. Philipps-Universität Marburg.
- HAN, Y., LIU, X., BENNY, U., KISTLER, H. C. & VANETTEN, H. D.** (2001). Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. *Plant J.* **25**, 305-314.

- HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O. E., HUHNDORF, S., JAMES, T., KIRK, P. M., LÜCKING, R., LUMBSCH, H. T., LUTZONI, F., MATHENY, P. B., MCLAUGHLIN, D. J., POWELL, M. J., REDHEAD, S., SCHOCH, C. L., SPATAFORA, J. W., STALPERS, J. A., VILGALYS, R., AIME, M. C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G. L., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., DAI, Y. C., GAMS, W., GEISER, D. M., GRIFFITH, G. W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D. L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R. A., HYDE, K. D., IRONSDALE, J. E., KÖLJALG, U., KURTZMAN, C. P., LARSSON, K. H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J. M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASTO, E., REEB, V., ROGERS, J. D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J. P., SCHÜSSLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R. G., TIBELL, L., UNTEREINER, W. A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WEISS, M., WHITE, M. M., WINKA, K., YAO, Y. J. & ZHANG, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res.* **111**, 509-547.
- HOFFMAN, C. S. & WINSTON, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene.* **57**, 267-272.
- HOLLIDAY, R. (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb. Soc.* **2**, 204-230.
- HOLLIDAY, R. (2004). Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair.* **3**, 671-682.
- INNIS, M. A. & GELFAND, D. H. (1990). Optimization of PCRs. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. ed. M. A. Innis *et al.* p. 3-12. Academic Press. San Diego, CA.
- KÄMPER, J. (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- KÄMPER, J., KAHMANN, R., BÖLKER, M., MA, L. J., BREFORT, T., SAVILLE, B. J., BANUETT, F., KRONSTAD, J. W., GOLD, S. E., MÜLLER, O., PERLIN, M. H., WÖSTEN, H. A., DE VRIES, R., RUIZ-HERRERA, J., REYNAGA-PEÑA, C. G., SNETSELAAR, K., MCCANN, M., PÉREZ-MARTÍN, J., FELDBRÜGGE, M., BASSE, C. W., STEINBERG, G., IBEAS, J. I., HOLLOMAN, W., GUZMAN, P., FARMAN, M., STAJICH, J. E., SENTANDREU, R., GONZÁLEZ-PRIETO, J. M., KENNEL, J. C., MOLINA, L., SCHIRAWSKI, J., MENDOZA-MENDOZA, A., GREILINGER, D., MUNCH, K., ROSSEL, N., SCHERER, M., VRANEŠ, M., LADENDORF, O., VINCON, V., FUCHS, U., SANDROCK, B., MENG, S., HO, E. C., CAHILL, M. J., BOYCE, K. J., KLOSE, J., KLOSTERMAN, S. J., DEELSTRA, H. J., ORTIZ-CASTELLANOS, L., LI, W., SANCHEZ-ALONSO, P., SCHREIER, P. H., HÄUSER-HAHN, I., VAUPEL, M., KOOPMANN, E., FRIEDRICH, G., VOSS, H., SCHLÜTER, T., MARGOLIS, J., PLATT, D., SWIMMER, C., GNIRKE, A., CHEN, F., VYSOTSKAIA, V., MANNHAUPT, G., GÜLDENER, U., MÜNSTERKÖTTER, M., HAASE, D., OESTERHELD, M., MEWES, H. W., MAUCELI, E. W., DECAPRIO, D., WADE, C. M., BUTLER, J., YOUNG, S., JAFFE, D. B., CALVO, S., NUSBAUM, C., GALAGAN, J. & BIRREN, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature.* **444**, 97-101.

- LUBBERSTEDT, T., KLEIN, D. & MELCHINGER, A.** (1998). Comparative QTL mapping of resistance to *Ustilago maydis* across four populations of European flint-maize. *Theor. Appl. Genet.* **97**, 1321-1330
- MCDONALD, B. A. & LINDE, C.** (2002). Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 349-379.
- MUNKACSI, A. B., STOXEN, S. & MAY, G.** (2007). Domestication of maize, sorghum, and sugarcane did not drive the domestication of their smut pathogens. *Evolution.* **61**, 388-403.
- MUNKACSI, A. B., STOXEN, S. & MAY, G.** (2008). *Ustilago maydis* populations tracked maize through domestication and cultivation in the Americas. *Proc. R. B.* **275**, 1037-1046.
- MÜLLER, O., SCHREIER, P. H. & UHRIG, F. J.** (2008). Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics.* **279**, 27-39.
- PARKER, I. M. & GILBERT, G. S.** (2004). The evolutionary ecology of novel plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **35**, 675-700.
- SAMBROOK, J., FRISCH, E. F. & MANIATIS, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- SORCI, G., MOLLER, P. A. & BOULINIER, T.** (1997). Genetics of host-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution.* **12**, 196-200.
- SOUTHERN, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**, 503-517.
- STEARNS, C. S. & HOEKSTRA, F. R.** (2005). *Evolution an introduction* (second edition). Oxford University Press. Oxford.
- THOMPSON, N. J. & BURDON, J. J.** (1992). Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature.* **360**, 121-125.
- Tishkoff, S. A., Varkonyi, R., Cahinhinan, N. et al. (17 co-authors)** (2001). Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science.* **29**, 455-462.
- TYLER, B. M.** (2009). Entering and breaking: virulence effector proteins of oomycete plant pathogens. *Cell Microbiol.* **11**, 13-20.
- VALVERDE, M. E., PAREDES-LOPES, O., PATAKY, J. K. & GUEVARA-LARA, F.** (1995). Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source: biology, composition, and production. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* **35**, 191-229.

VAN ESSE, H., BOLTON, M. D., STERGIOPOULOS, I., DE WITT, P. J. G. M. & THOMMA, B. P. H. J. (2007). The Chitin-Binding *Cladosporium fulvum* Effector Protein Avr4 Is a Virulence Factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **20**, 1092-1101.

WISSER, R. J., BALINT-KURTI, P. J. & NELSON, R. J. (2006). The genetic architecture of disease resistance in maize: a synthesis of published studies. *Phytopathology*. **96**, 120-129.

YANG, Z. (2007). PAML 4 Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. *Molecular biology and evolution*. **24**, 1586-1591.

6. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dominik Begerow für die Möglichkeit diese Diplomarbeit anfertigen zu können und für vielfältige Einblicke hinter die Kulissen der Wissenschaft.

Ich danke meinem Koreferenten Herrn Prof. Dr. Ralph Tollrian für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ich danke Ronny Kellner für die exzellente wissenschaftliche Betreuung im Labor und beim Schreiben dieses Epos. Außerdem danke ich ihm für seine unglaubliche Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Andrey Yurkov danke ich für seinen „statistical support“ und die vielen hilfreichen Diskussionen abseits meines Themas.

Danken möchte ich Dr. Martin Kemler und Dr. Wolfgang Maier für Tipps und Ideen diese Arbeit betreffend und die tolle Zeit im Gelände (Ein Traum-Schotter!!!).

Sabine Kühle und unserer TA Ilse Wesel für die Unterstützung während meiner Zeit in der AG Geobotanik.

Frau Tolle, die mir stets erstklassige Sequenzen aus noch so schlechten PCR-Produkten gestrickt hat, danke ich.

Frau Rattay für das allmorgendliche Frühstück aus der NC Cafete sei gedankt.

Ich danke unserer Kaffeemaschine, ohne ihren unermüdlichen Einsatz wäre diese Arbeit unmöglich gewesen.

Allen Studenten sei gedankt die mich in meinem Studium ein Stück weit begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Angela Maria Schäfer für unzählige Kaffeepausen und CPMs. Sie stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, wenn mal wieder alles ~~schon~~ nicht so toll war und führte mich in die Feinheiten der schwäbischen Sprache und Küche ein.

Meinen Eltern danke ich für ihre Geduld und Unterstützung während meines gesamten Studiums.

