

**Untersuchungen zum asexuellen
Gentransfer bei biotrophen Oomyceten
anhand der Fallbeispiele *Plasmopara
halstedii* und *Peronospora tabacina***

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

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Botanik

vorgelegt von
Timo Robin Hammer

aus Heilbronn

2009

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. Otmar Spring
2. berichtende Person: PD Dr. Hanns-Heinz Kassemeyer
Eingereicht am: 16.06.2009
Mündliche Prüfung am: 13.10.2009

Die vorliegende Arbeit wurde am 31.08.2009 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften" angenommen.

*Der Fortgang der wissenschaftlichen
Entwicklung ist im Endeffekt eine
ständige Flucht vor dem Staunen*

Albert Einstein

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	1
TABELLENVERZEICHNIS.....	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
1 EINLEITUNG	4
1.1 Systematische Stellung und Biologie der Oomyceten	4
1.2 Allgemeiner Lebenszyklus biotropher Oomyceten.....	5
1.3 Rekombinationsmöglichkeiten im sexuellen Zyklus	8
1.4 Alternative Rekombinationsmöglichkeiten.....	10
1.5 Anknüpfungspunkte dieser Studie zu vorausgegangenen Arbeiten.....	13
1.5.1 Fallbeispiel <i>Plasmopara</i>	13
1.5.2 Fallbeispiel <i>Peronospora tabacina</i>	16
1.6 Fragestellungen und Ziele	16
2 ERGEBNISSE	18
2.1 Phänotypische Merkmale von <i>Pl. halstedii</i> und <i>Pl. angustiterminalis</i> im Vergleich zum rekombinanten Tochterstamm.....	18
2.1.1 Fungizid-Toleranz und Wirtsspezifität.....	18
2.1.2 Sporangienmorphologie	19
2.1.3 Anzahl Zoosporen pro Sporangium	20
2.2 Genotypischer Nachweis der Merkmalskombination	21
2.2.1 Eltern-spezifische Primer	21
2.2.2 Zellkern-spezifische ITS-Primer	24
2.2.3 Mitochondrium-spezifische <i>coxII</i> -Primer	25
2.2.4 Abschätzung der elternspezifischen Anteile am Genom von R mittels <i>Real-time</i> quantitativer PCR	26
2.2.5 DNA-DNA-Hybridisierung mittels Dot-Blot	29
2.2.6 Vergleich der Genome von <i>Pl. angustiterminalis</i> und R _{F21} mittels AFLP	30
2.2.7 Zusammenfassung des phäno- und genotypischen Vergleichs	32
2.4 Untersuchung von Interaktionen zwischen <i>Pl. halstedii</i> und <i>Pl. angustiterminalis</i> im Wirtsgewebe	34
2.4.1 Entwicklung eines passenden Dualinfektions-Systems.....	34
2.4.2 Mikroskopischer Nachweis von Anastomosen.....	36
2.4.3 Übertritt von genetischem Material durch Anastomosen	38
2.5 Weitergabe von genetischem Material an asexuell gebildete Nachkommen.....	39
2.5.1 Zeitlicher Ablauf der Sporulation	39
2.5.2 Septenbildung während der Sporulation	41
2.5.3 Verteilung von Zellkernen während der Sporulation	42
2.6 Entwicklung eines Transformationssystems zur optischen Markierung von <i>Plasmopara halstedii</i>.....	45

2.6.1	Herstellung neuer Transformationsvektoren.....	46
2.6.2	Entwicklung eines Selektionssystems	49
2.6.3	Vergleich verschiedener Transformationsmethoden	53
2.7	Dualinfektionen mit zwei unterschiedlichen Stämmen von <i>Per. tabacina</i>	55
2.8	Phänotypische Differenzierung bei <i>Peronospora tabacina</i>	58
2.8.1	Sporulationsschnelligkeit.....	58
2.8.2	Sporangienmorphologie	59
2.8.3	Isozym-/Allozym-Muster	60
2.9	Genotypische Differenzierung bei <i>Peronospora tabacina</i>	60
2.9.1	PCR.....	60
2.9.2	DNA-DNA-Hybridisierung mittels Dot-Blot	64
2.9.3	Vergleich von <i>Per. tabacina</i> Met ^R und Met ^S mittels AFLP	65
3	DISKUSSION.....	67
3.1	Vergleich der beiden Modellsysteme	68
3.1.1	Differenzierende Eigenschaften der Elternstämme und Interaktionsstudien	68
3.1.2	Prinzipielle Überlegungen zum asexuellen Genaustausch bei <i>Plasmopara</i>	70
3.2	Diskussion der <i>Plasmopara</i>-Studie anhand des Modells	75
3.3	Mögliche Mechanismen der genetischen Rekombination	77
3.4	Ausblick.....	80
4	MATERIAL UND METHODEN.....	82
4.1	Material	82
4.1.1	Verwendete Chemikalien	82
4.1.2	Verwendete Organismen	82
4.1.3	Primer.....	83
4.1.4	Plasmide.....	84
4.2	Methoden.....	85
4.2.1	Pathogene und Wirtspflanzen	85
4.2.1.1	<i>Nicotiana benthamiana</i> und <i>Peronospora tabacina</i>	85
4.2.1.2	<i>Helianthus annuus</i> , <i>Plasmopara halstedii</i> und <i>Plasmopara angustiterminalis</i>	86
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	90
4.2.2.1	DNA-Extraktion.....	90
4.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	90
4.2.2.3	Gelelektrophorese und Gelextraktion	92
4.2.2.4	Sequenzierung, Sequenzvergleich und Primerkonstruktion	93
4.2.2.5	<i>Real-time</i> quantitative PCR.....	94
4.2.2.6	AFLP (Amplified fragment-length polymorphism)	97
4.2.2.7	DNA-Hybridisierung mittels Dot-Blot.....	98
4.2.2.8	Plasmidkonstruktion und -überprüfung	99
4.2.2.9	Kultivierung und Transformation von <i>Escherichia coli</i>	101

4.2.2.10	Transformation von <i>Phytophthora infestans</i> und <i>Plasmopara halstedii</i>	103
4.2.2.11	Proteinextraktion und Isozym-/Allozym-Auftrennung	105
4.2.3	Mikroskopische Methoden	107
4.2.3.1	Lichtmikroskopie	107
4.2.3.2	Fluoreszenzmikroskopie	108
4.2.3.3	Raster-Elektronenmikroskopie (REM)	109
5	ZUSAMMENFASSUNG	110
6	LITERATUR	113
	DANKESCHÖN	125
	CURRICULUM VITAE	126

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Allgemeiner Lebenszyklus biotropher Oomyceten.....	6
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung der Gametangiogamie bei <i>Bremia lactucae</i>	8
Abb. 1.3:	Mögliche Muster sexueller Rekombination in coenocytischen Meiogametangien bei Oomyceten.....	9
Abb. 1.4:	Schema der Dualinfektion mit <i>Pl. halstedii</i> und <i>Pl. angustiterminalis</i> , Selektion und Klonierung des rekombinanten Tochterstammes R _{FX}	14
Abb. 1.5:	iSSR-PCR-Fingerprint-Vergleiche zwischen <i>Pl. halstedii</i> , <i>Pl. angustiterminalis</i> und R.....	15
Abb. 2.1:	Vergleich der Anzahl freigesetzter Zoosporen pro Sporangium.....	20
Abb. 2.2:	Duplex-PCR an <i>P.h.</i> , <i>P.a.</i> und R _{FX} mit Eltern-spezifischen Primern.....	22
Abb. 2.3:	Duplex-PCR an Einzelsporangien von R _{F7} mit Eltern-spezifischen Primern.....	23
Abb. 2.4:	PCR-Vergleich mit Zellkern-spezifischen ITS-Primern.....	24
Abb. 2.5:	PCR mit artspezifischen <i>coxII</i> -Primern zur Detektion von Mitochondrien von <i>Pl. halstedii</i> und <i>Pl. angustiterminalis</i>	25
Abb. 2.6:	Ergebnis der <i>Real-time</i> quantitativen PCR mit dem Primerpaar Pang_F/R.....	26
Abb. 2.7:	Grafische Darstellung der Ergebnisse der <i>Real-time</i> quantitativen PCR mit den Eltern-spezifischen Primerpaaren Phal_F/R und Pang_F/R.....	28
Abb. 2.8:	DNA-DNA-Hybridisierung mittels Dot-Blot mit DNA der beiden Elternstämme und den verschiedenen Generationen von R.....	30
Abb. 2.9:	AFLP-Vergleich zwischen <i>Pl. angustiterminalis</i> und R _{F21}	31
Abb. 2.10:	Dualinfektionssystem an Sonnenblumen-Hypokotyl.....	34
Abb. 2.11:	Sporulationsraten bei Einfach- und Doppelinfektion von Sonnenblumen-Hypokotyl mit <i>Pl. halstedii</i> (A) und <i>Pl. angustiterminalis</i> (B).....	35
Abb. 2.12:	Anastomosen bei <i>Pl. halstedii</i> (A/-), <i>Pl. angustiterminalis</i> (B/-) und bei Doppelinfektion mit beiden Spezies.....	37
Abb. 2.13:	Nachweis von Zellkernen in einer Anastomose bei <i>Pl. halstedii</i>	38
Abb. 2.14:	Verlauf der Sporulation bei <i>Pl. halstedii</i> (REM).....	40
Abb. 2.15:	Nachweis von Septen während der verschiedenen Sporulationsphasen von <i>Pl. halstedii</i>	42
Abb. 2.16:	Zellkernverteilung während der Sporulation von <i>Pl. halstedii</i>	43
Abb. 2.17:	Detail Zellkernverteilung in ein sich entwickelndes Sporangium von <i>Pl. halstedii</i>	44
Abb. 2.18:	Transiente Expression von <i>gfp</i> bei <i>Pl. halstedii</i>	46
Abb. 2.19:	<i>Escherichia coli</i> nach Transformation mit pBluescriptII-Plasmiden, in die die Gene <i>nptII</i> (a), <i>hph</i> (b) oder <i>mCherry</i> (c) ligiert worden waren.....	47
Abb. 2.20:	Plasmidkarten der konstruierten Oomyceten-Transformationsplasmide.....	48
Abb. 2.21:	Kultivierung von <i>Pl. halstedii</i> auf künstlichen Medien.....	52
Abb. 2.22:	PCR mit spezifischen Primern und einzelnen Sporangienträgern von <i>Peronospora tabacina</i>	55
Abb. 2.23:	Schematische Darstellung des Metalaxyl-Biotests nach Dualinfektionen von <i>Nicotiana benthamiana</i> mit <i>Peronospora tabacina</i> Met ^R und Met ^S	56
Abb. 2.24:	Cellulose-Acetat-Elektrophorese und Isozym-Allozym-Trennung bei <i>Per. tabacina</i> Met ^R und Met ^S	60
Abb. 2.25:	PCR-Fingerprint-Muster von <i>Per. tabacina</i> Met ^R und Met ^S	61
Abb. 2.26:	PCR-Test an europäischen Feldisolaten von <i>Per. tabacina</i> aus dem Jahr 2007..	63
Abb. 2.27:	PCR-Test mit DNA von einem herbarisierten <i>Per. tabacina</i> -Isolat von 1960.....	64
Abb. 2.28:	DNA-DNA-Hybridisierung bei <i>Per. tabacina</i> mittels Dot-Blot.....	64
Abb. 2.29:	AFLP-Vergleich zwischen <i>Per. tabacina</i> Met ^S und Met ^R	66
Abb. 3.1:	Schematische Darstellung der hypothetischen asexuellen Rekombination bei <i>Plasmopara</i> und anschließende Sporulation unter Selektionsbedingungen.....	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Vergleich der Merkmale Wirtsspezifität und Fungizid-Toleranz bei den beiden Kreuzungspartnern und dem asexuell gebildeten Tochterstamm R.....	18
Tab. 2.2:	Vermessung der Sporangien von <i>Pl. halstedii</i> , <i>Pl. angustiterminalis</i> und R _{F2} , R _{F8} , R _{F20}	19
Tab. 2.3:	Ergebnisse der <i>Real-time</i> quantitativen PCR.....	27
Tab. 2.4:	Anzahl der AFLP-Fragmente und Anteil der Polymorphismen der in Abb. 2.9 dargestellten Muster.....	31
Tab. 2.5:	Zusammenfassung des Vergleichs der phäno- und genotypischen Merkmale von <i>Pl. halstedii</i> , <i>Pl. angustiterminalis</i> und R _{FX}	33
Tab. 2.6:	Anwendung verschiedener Standard-Hemmstoffe auf das Pathosystem Sonnenblume/ <i>Pl. halstedii</i>	50
Tab. 2.7:	PCR-Test mit einzelnen Sporangienträgern (F ₁) von <i>Per. tabacina</i> nach Dualinfektion mit den Typen Met ^R und Met ^S	57
Tab. 2.8:	Vermessung der Sporangien von <i>Per. tabacina</i> Typ Met ^R und Typ Met ^S	59
Tab. 2.9:	<i>Peronospora tabacina</i> -Monitoring 2002 – 2008.....	63
Tab. 4.1:	In dieser Arbeit verwendete Organismen mit Herkunft bzw. Literaturnachweis....	82
Tab. 4.2:	In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer, ihre Sequenz und die jeweils optimale Annealingtemperatur (A).....	83
Tab. 4.3:	In dieser Arbeit verwendete Plasmide mit der jeweiligen Bezugsquelle bzw. dem Literaturnachweis.....	84
Tab. 4.4:	Zusammensetzung eines Standard-PCR-Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von 20 µl.....	91
Tab. 4.5:	Allgemeines Standard-PCR-Programm.....	91
Tab. 4.6:	Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für <i>Real-time</i> quantitative PCR mit einem Gesamtvolumen von 20 µl.....	95
Tab. 4.7:	Allgemeines Standard-Programm für <i>Real-time</i> quantitative PCR.....	95
Tab. 4.8:	AFLP-Adapter und –Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	97
Tab. 4.9:	PCR-Bedingungen bei der Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden.....	99
Tab. 4.10:	Fluoreszenzfiltersätze und ihre Anwendung.....	108

Abkürzungsverzeichnis

∅	Mittelwert
A	Annealingtemperatur
AFLP	Amplified fragment-length polymorphism
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>cox</i> /COX	Cytochrom-c-Oxidase
Cp	Crossing Point
cv.	Kultivar
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol-Hydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIG	Digoxigenin
d.p.i.	Tage nach Inokulation
DS	Diluted Salts
DTT	Dithiothreitol
E	Elongationszeit
E _A	Amplifikations-Effizienz
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
<i>H.</i>	<i>Helianthus</i>
H ₂ O	deionisiertes Wasser
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase

iSSR	Inter-simple-sequence-repeat
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilobasen (1000 bp)
LB	Left Border
m	Steigung
Max.	Maximum
MDH	Malat-Dehydrogenase
Met	Metalaxyl-M
Met ^R	Metalaxyl-resistent
Met ^S	Metalaxyl-sensitiv
Min.	Minimum
mtDNA	mitochondriale DNA
N ₀	Anzahl der Moleküle zu Beginn der <i>Real-time</i> -PCR-Amplifikation
N	Anzahl der Moleküle zu einem bestimmten Zeitpunkt der <i>Real-time</i> -PCR-Amplifikation
N _{Ref}	Anzahl der Moleküle des Referenzabschnitts <i>coxII</i> zu einem bestimmten Zeitpunkt der <i>Real-time</i> -PCR-Amplifikation
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QoI	Quinone outside inhibitors
R _{FX}	Rekombinante (in der x-ten Generation)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RB	Right Border
rDNA	ribosomale DNA
REM	Raster-Elektronenmikroskop
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SSR	simple sequence repeat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
× g	Erdbeschleunigung

Bezeichnungen für Gene sind klein und kursiv (z. B. *gfp*), Bezeichnungen für Proteine sind mit Großbuchstaben (z. B. GFP) geschrieben. Der Begriff „Metalaxyl“ beschreibt stets das aktive Enantiomer Metalaxyl-M (Mefenoxam).

1 Einleitung

Pflanzen sind durch ihre sessile Lebensweise ständig abiotischem Stress durch Umwelteinflüsse und biotischem Stress durch Schaderreger ausgesetzt. Im Laufe der Evolution haben die Pflanzen Abwehrmechanismen entwickelt, zugleich haben sich die Krankheitserreger an bestimmte Wirtspflanzen und deren Abwehrstrategien angepasst. Pflanzenkrankheiten sind demnach so alt wie die Pflanzen selbst. Die Erkenntnis, dass Pflanzenkrankheiten durch bestimmte Erreger ausgelöst werden, setzte sich im 18. und 19. Jahrhundert nur langsam durch, da man die Krankheiten zunächst auf den Unwillen verschiedener Götter und später auf negative Umwelteinflüsse zurückführte. Obwohl schon im 18. Jahrhundert von TILLET (1714 – 1791) der Pilz *Tilletia caries* als Auslöser des Weizensteinbrandes nachgewiesen werden konnte, brachten erst die Arbeiten von BERKELEY (1803 – 1889) und DE BARY (1831 – 1888) den entscheidenden Durchbruch. Wegweisend war hierbei die Erkenntnis, dass die Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel, die Mitte des 19. Jahrhunderts zu verheerenden Hungersnöten in Irland führte, durch den pilzlichen Erreger *Phytophthora infestans* ausgelöst wird. Neben *P. infestans* gehören viele weitere wichtige Phytopathogene an Nutzpflanzen zur Abteilung der Oomycota. Diese Erreger und ihre Kontrolle haben eine große ökonomische Bedeutung. So wurden zum Beispiel 2006 allein für die Fungizid-basierte Bekämpfung von Oomyceten ca. 1,2 Milliarden US\$ ausgegeben (GISI & SIEROTZKI 2008).

1.1 Systematische Stellung und Biologie der Oomyceten

Die Abteilung der Oomycota ist dem Reich der Chromista (Straminipila) zugeordnet, zu dem neben den Oomyceten unter anderem auch Braunalgen und Diatomeen gehören. Vertreter der Oomycota besitzen einen diploiden Thallus und Zellwände, die nicht aus Chitin wie bei Echten Pilzen (Eumycota), sondern aus Glucanen, Hydroxyprolin, Hemizellulose und Zellulose bestehen. Werden mobile Zoosporen gebildet, sind diese heterokont begeißelt. Bei der sexuellen Fortpflanzung finden nach vorausgegangener Meiose ein Kontakt der Gametangien und anschließend die Karyogamie statt, und es wird eine dickwandige Oospore gebildet (AGRIOS 2005). Die der Abteilung Oomycota untergeordnete Klasse der Peronosporomycetes wird in drei Unterklassen unterteilt, von denen eine mit den Ordnungen Pythiales und Peronosporales zwei Großgruppen enthält, die mehrheitlich aus biotrophen Pflanzenpathogenen bestehen (DICK 2001). Innerhalb der Peronosporales werden die Falschen Mehltäupilze in der Familie der Peronosporaceae

zusammengefasst, die unter anderem die für diese Arbeit wichtigen Gattungen *Peronospora*, *Plasmopara* und *Bremia* beherbergt. Dabei unterscheidet die Bezeichnung „Falscher Mehltau“ die Vertreter der Peronosporaceae, deren Sporangienträger an der Blattunterseite aus Spaltöffnungen hervortreten, von den Erregern des „Echten Mehltaus“, bei denen der Sporenbelaag an epidermal verankerten Hyphen auf der Blattoberseite sichtbar wird und die zu den Echten Pilzen gehören. Durch neuere morphologische und molekularbiologische Untersuchungen wurde inzwischen ein immer detaillierteres Bild der Peronosporomycetes gewonnen (CONSTANTINESCU 1998; CONSTANTINESCU & FATEHI 2002; RIETHMÜLLER *et al.* 2002; GOEKER *et al.* 2003; SPRING *et al.* 2003; CONSTANTINESCU *et al.* 2005; SPRING *et al.* 2005b; THINES & SPRING 2005; THINES *et al.* 2006; CHOI *et al.* 2007; GOEKER *et al.* 2007; THINES 2007a; THINES *et al.* 2007; CHOI *et al.* 2008; THINES *et al.* 2008). Dadurch wurde eine Ausgliederung bzw. Umgruppierung zahlreicher Gruppen vorgenommen, was letztendlich der Schaffung monophyletischer Einheiten dient. Im Laufe der Evolution fand bei den Oomyceten eine fortwährende Anpassung an das Landleben und eine physiologische Spezialisierung statt, die mit einer Einengung des Wirtspflanzenkreises verbunden war (SCHLÖSSER 1997). So zeigt zum Beispiel *Pythium ultimum*, der Erreger der „Umfall-Krankheit“, eine perthotrophe Lebensweise, da das Wirtsgewebe zunächst abgetötet und dann besiedelt wird. Dieses Pathogen besitzt mit ca. 150 Arten einen recht großen Wirtspflanzenkreis und kann leicht auf künstlichen Medien gehalten werden. *Phytophthora infestans* ist ökologisch biotroph, hat hohe Nährstoffansprüche und lebt von vitalem Wirtsgewebe einiger Solanaceen. Dennoch kann das Pathogen auf komplexen künstlichen Medien gehalten werden. Der Wirtspflanzenkreis beschränkt sich auf Kartoffel und Tomate. Vertreter der Falscher-Mehltau-Erreger, wie zum Beispiel *Plasmopara halstedii* (Falscher Mehltau der Sonnenblume), *Peronospora tabacina* (Tabak-Blauschimmel) oder *Bremia lactucae* (Falscher Mehltau an Salat), sind hingegen obligat biotroph und damit auf lebendes Wirtsgewebe angewiesen. Sie können bislang nicht auf künstlichen Medien kultiviert werden und haben meist ein auf wenige Arten innerhalb einer Gattung beschränktes Wirtsspektrum.

1.2 Allgemeiner Lebenszyklus biotropher Oomyceten

Die Fortpflanzung kann bei den Oomyceten sowohl vegetativ als auch sexuell erfolgen. Im Folgenden ist der allgemeine Lebenszyklus obligat biotropher Oomyceten dargestellt. Die dabei verwendeten Ziffern in eckigen Klammern beziehen sich auf Abbildung 1.1.

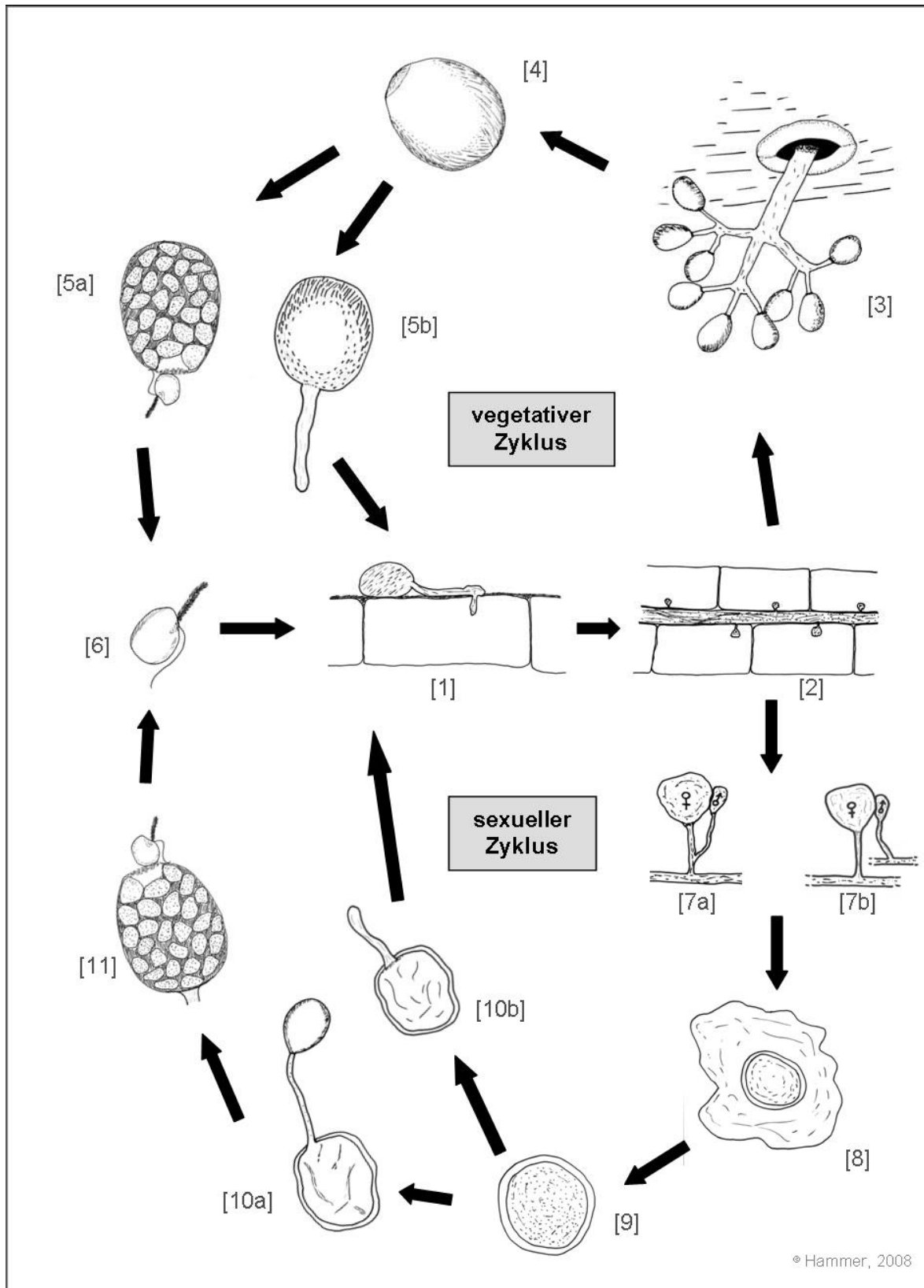


Abb. 1.1: Allgemeiner Lebenszyklus biotropher Oomyeten

Oberer Teil: vegetativer (asexueller) Zyklus, unterer Teil: sexueller Zyklus. Auf die Ziffern in eckigen Klammern wird im Text Bezug genommen.

Vegetative Vermehrung

Die Penetration des Wirtsgewebes [1] erfolgt aktiv über die Ausbildung eines Appressoriums oder durch Spaltöffnungen. Im Wirtsgewebe wachsen dann interzellulär farblose Hyphen [2] unterschiedlichen Durchmessers, die sich in Form und Ausdehnung den Zellzwischenräumen anpassen (AGRIOS 2005). Die Ernährung des Pathogens erfolgt über spezielle Organe, die Haustorien, die in die Wirtszellen eingesenkt werden [2]. Sie können je nach Erreger unterschiedlich geformt sein. Bei kühler Witterung und sehr hoher Luftfeuchtigkeit (Nebel, Regen) treten aus den Spaltöffnungen auf der Blattunterseite der Wirtspflanze verzweigte Sporangienträger hervor, an denen endständig die Sporangien sitzen [3]. Diese stellen die asexuelle Verbreitungseinheit der Pathogene dar und werden über Wind und Regen verbreitet [4]. Je nach Erreger handelt es sich dabei um Zoosporangien, in deren Innern sich eine bestimmte Zahl – bei *Plasmopara halstedii* 15 bis 36 (SPRING *et al.* 1998) – mobiler Zoosporen differenziert [5a], oder um Konidien, die direkt mit einem Keimschlauch auskeimen [5b] und erneut Wirtsgewebe infizieren können. Dabei ist innerhalb der Oomyceten, wie eingangs erwähnt, im Zuge einer evolutiven Anpassung an das Landleben eine Reduktion der wasserabhängigen, schwimmfähigen Stadien erkennbar. Treffen die entlassenen Zoosporen [6] auf frisches Wirtsgewebe, encystieren sie an dessen Oberfläche und bilden einen Keimschlauch aus, mit dem sie das Wirtsgewebe penetrieren können; der vegetative Zyklus ist damit abgeschlossen.

Sexuelle Vermehrung

Die sexuelle Vermehrung erfolgt über die Ausbildung von Gametangien. Dabei bilden sich, gesteuert durch Sterole (HASKINS *et al.* 1964; ELLIOTT 1977), an den Hyphen weibliche Oogonien oder männliche Antheridien. Entstehen beide Organe am selben Thallus, spricht man von Homothallie [7a]; werden die Geschlechtsorgane von Hyphen verschiedener Individuen gebildet, spricht man von Heterothallie [7b]. Bei der Gametangiogamie legt sich das kleinere Antheridium an das größere Oogonium, und es finden die Übertragung und die anschließende Verschmelzung von Zellkernen (Karyogamie) statt; es bleibt in der Regel nur ein diploider Zellkern erhalten. Bei einigen Arten von *Phytophthora* durchwächst das Oogonium das Antheridium und nimmt so die männlich determinierten Zellkerne auf (SCHLÖSSER 1997). Nach Karyogamie wird im Oogonium eine noch unreife, diploide Oospore gebildet [8], in der sich während des nun folgenden Reifevorgangs ein großer Öltropfen und eine stabile Außenwand formen (NISHIMURA 1922). Die reife Oospore [9] ist sehr widerstandsfähig und kann über mehrere Jahre im Boden überdauern. Je nach Erreger-Art stellen die Oosporen somit in einer neuen Anbau-Saison oft die Quelle für Primärinfektionen an Kulturpflanzen dar. Bei geeigneten Bedingungen keimen die Oosporen dann entweder mit einem

Primärsporangium [10a], in dessen Innern sich Zoosporen differenzieren [11], oder direkt mit einem Keimschlauch [10b] aus. Frisches Wirtsgewebe wird durch encystierte auskeimende Zoosporen bzw. bei direkter Keimung durch den Keimschlauch infiziert. Der sexuelle Zyklus ist damit abgeschlossen.

1.3 Rekombinationsmöglichkeiten im sexuellen Zyklus

Genetische Rekombination, also die Neukombination der Gene, durch die bei einem Nachkommen verschiedene einzelne Eigenschaften der Eltern in einer neuen Konstellation erscheinen, erhöht zusammen mit Mutationen die genetische Variabilität einer Population und stellt somit die Quelle der Anpassungsfähigkeit an geänderte Umweltbedingungen dar. Diese ist wiederum Voraussetzung für den Evolutionsprozess. Nur die Neu-Kombination bereits existierender genetischer Information mit neu entwickelten Merkmalen erlaubt die Weiterentwicklung einer Art.

Bei Oomyceten ergibt sich durch die Übertragung von haploiden Zellkernen während der Gametangiogamie und die anschließende Karyogamie im sexuellen Zyklus die Möglichkeit der Rekombination genetischen Materials (vgl. Abb. 1.2).

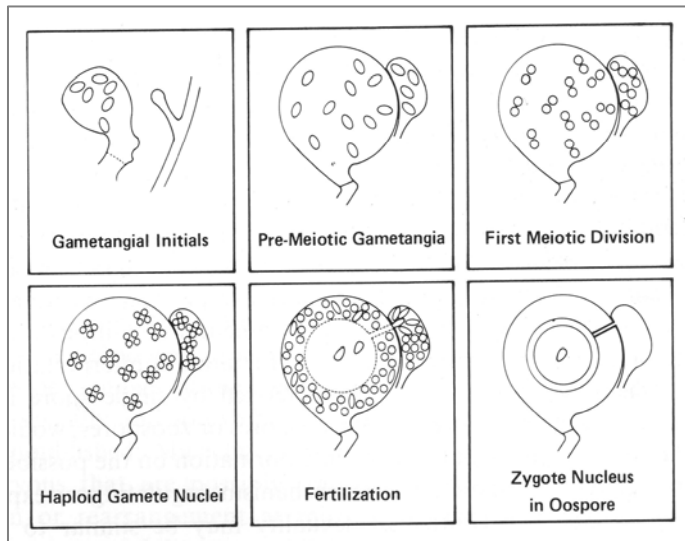


Abb. 1.2:
Schematische Darstellung der Gametangiogamie bei *Bremia lactucae* aus TOMMERUP (1981)
 In Oogonium und Antheridium laufen meiotische Kernteilungen ab, bevor eine Übertragung von haploiden Zellkernen aus dem kleineren Antheridium in das größere Oogonium stattfindet. Nach Karyogamie entsteht die diploide Oospore.

Bei verschiedenen heterothallischen Vertretern der Oomyceten kennt man unterschiedliche „Mating Types“, also Paarungstypen, bei denen sexueller Austausch von genetischem Material nur mit dem jeweiligen anderen Typ möglich ist. Dies ist zum Beispiel bei *Phytophthora infestans* der Fall (GALLENGLY & GALINDO 1958), wo erst Ende der 1980er Jahre mit der Identifizierung des zweiten Paarungstyps außerhalb Mexikos die sexuelle Vermehrung des Pathogens belegt und das Auftreten neuer Stämme

nachgewiesen werden konnte. Die neuen Stämme waren zum Teil wesentlich aggressiver als die bis dahin aufgetretenen und ersetzten diese schnell (AGRIOS 2005). Aufgrund seiner Bedeutung als Pflanzenpathogen wurden die Paarungstypen bei *Phytophthora infestans* intensiv untersucht (DICK 1995; GOODWIN 1997; HERMANSEN *et al.* 2000; LAMOUR & HAUSBECK 2001), und es konnten wichtige Erkenntnisse bezüglich der Variabilität des Erregers gewonnen werden.

Bremia lactucae zeigt ebenfalls heterothallische Gametangiogamie. Obwohl auch bei diesem Erreger unterschiedliche „Mating Types“ bekannt sind, konnte gezeigt werden, dass sexuelle Vermehrung auch bei Beteiligung nur eines Paarungstyps abläuft und Oosporen selbst bei Kultivierung von nur einem Isolat gebildet werden; diese Isolate zeigen also auch homothallische Kapazität (TOMMERUP 1981). Auch bei *Plasmopara viticola* wurde Heterothallie nachgewiesen (WONG *et al.* 2001), und es scheinen zwei Paarungstypen zu existieren, die für den Ablauf sexueller Vermehrung beide beteiligt sein müssen (AGRIOS 2005; SCHERER & GISI 2006). Die unterschiedlichen Rekombinationsmöglichkeiten im sexuellen Zyklus von Oomyceten wurden von DICK (1995) ausführlich beschrieben und sind in Abbildung 1.3 in einer Übersicht dargestellt.

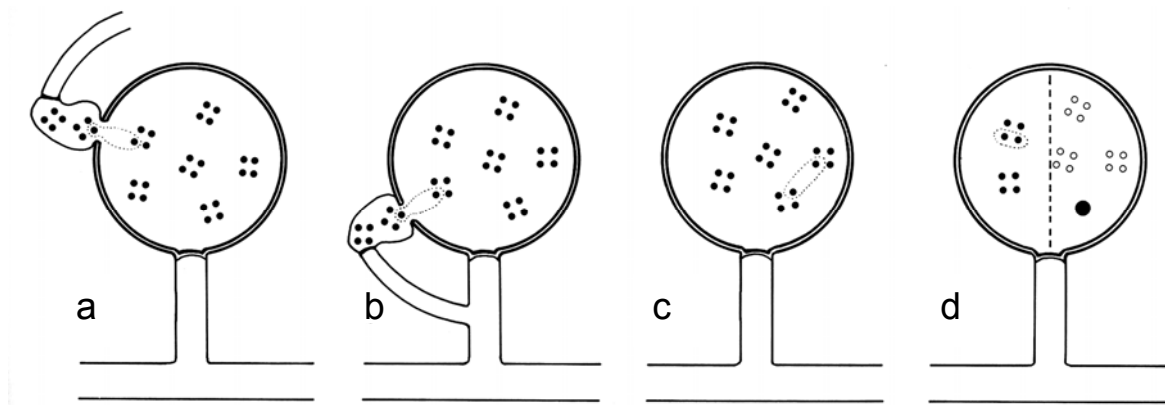


Abb. 1.3: Mögliche Muster sexueller Rekombination in coenocytischen Meiogametangien bei Oomyceten, aus DICK (1995)

- a: Heterothallische Vereinigung von haploiden Nicht-Schwester-Zellkernen
- b: Homothallische Vereinigung von haploiden Schwester-Zellkernen
- c: Homothallische automiktische Vereinigung von haploiden Schwester-Zellkernen ohne die Ausbildung eines Antheridiums
- d: Parthenogamie; Wiedervereinigung von haploiden Zellkernen (links) oder genetisch nicht-funktionale Meiosen und dadurch dauerhafte Koexistenz diploider Zellkerne (rechts)

Bei den in Abb. 1.3 dargestellten Rekombinationsmustern nimmt die genetische Variabilität, die aufgrund der sexuellen Rekombination zu erwarten ist, von links nach rechts ab. Allgemein stellt sich die Frage, wie es bei Oomyceten mit homothallischer Gametangiogamie oder bei Vertretern ohne sexuellen Zyklus überhaupt zu genetischer

Variabilität innerhalb einer Population kommen kann. Homothallie konnte zum Beispiel für *Pythium* sp. (AGRIOS 2005) oder *Plasmopara halstedii* (SPRING 2000) gezeigt werden. Die Vorgänge während der sexuellen Vermehrung lassen auf eine sehr geringe Variabilität schließen, da der Zellkernaustausch nur innerhalb desselben Individuums stattfindet, allerdings unter Einbeziehung der Crossing-over-Ereignisse während der meiotischen Bildung der haploiden Zellkerne. Betrachtet man den gesamten vegetativen und sexuellen Lebenszyklus von *Pl. halstedii*, gibt es keine bekannte Möglichkeit der Rekombination von genetischem Material zwischen verschiedenen Individuen. Dies steht allerdings in klarem Widerspruch zu der beobachteten kontinuierlich zunehmenden phänotypischen Plastizität dieses Erregers (VIRÁNYI & GULYA 1996). In den letzten Jahrzehnten wurden durch Infektionsstudien an Sonnenblumen-Differenziallinien mindestens 36 Pathotypen (physiologische Rassen) von *Pl. halstedii* identifiziert (ROZYNEK & SPRING 2000; VIRÁNYI & WALCZ 2000; GULYA 2007), zudem wurde das Auftreten Fungizid-resistenter Stämme in Europa (ALBOURIE *et al.* 1998; RUIZ *et al.* 2000; SPRING *et al.* 2006) und den USA (GULYA 2000) berichtet. Des Weiteren konnte die genetische Diversität bei *Pl. halstedii* mithilfe molekularbiologischer Ansätze gezeigt werden (BOROVKOVA *et al.* 1992; TOURVIELLE *et al.* 2000a; TOURVIELLE *et al.* 2000b; INTELMAAN & SPRING 2002; KOMJATI *et al.* 2004). Auch bei anderen Oomyceten ist die Lage nicht ganz eindeutig. So konnte zum Beispiel für *Phytophthora sojae* (Erreger von Spross- und Wurzelfäule an Soja) gezeigt werden, dass, obwohl bei diesem Pathogen die Gametangiogamie homothallisch verläuft, ein heterokaryontisches Myzel entstand, wenn dieselbe Wirtspflanze mit zwei unterschiedlichen Isolaten co-inokuliert wurde (LAYTON & KUHN 1990). Man spricht von einem Heterokaryon, wenn ein Zellkernverband aus zwei oder mehreren genetisch unterschiedlichen Kernen innerhalb einer Zelle vorliegt. Die in der Studie gefundenen heterokaryontischen Tochterstämme zeigten Merkmale der beiden Ausgangsstämme in neuer Kombination.

1.4 Alternative Rekombinationsmöglichkeiten

Mutationen sind der Schlüssel, um neues genetisches Ausgangsmaterial für die Evolution bereitzustellen. Die konventionelle Sichtweise beschreibt genetische Variation als Folge einer langsamen, graduellen Akkumulation von mutationsbedingten Veränderungen, die zu neuen Phänotypen führt, an denen natürliche Selektion stattfinden kann. Zusätzlich zu diesen graduellen Veränderungen haben viele Organismen aber das Potenzial, plötzliche genomische Veränderungen zu durchlaufen (SCHARDL & CRAVEN 2003). Bei Bakterien, Einzellern und einigen Pilzen gibt es das Phänomen der Parasexualität. Als solche

bezeichnet man die Übertragung genetischen Materials ohne Bildung von Geschlechtszellen und Befruchtung, bei der nur Teile des Erbguts kombiniert werden. Bei Echten Pilzen wurden parasexuelle Vorgänge wie die Fusion heterothallischer Hyphen schon früh diskutiert (PONTECORVO 1956; BAKERSPIGEL 1965). Die Somatogamie, also die Verschmelzung von gleich gestalteten Körperzellen, ist charakteristisch für Basidiomyceten und findet im Vorfeld der Fruchtkörperbildung statt, wo zwei Hyphen zu einem dikaryontischen Myzel verschmelzen, aus dem anschließend der Fruchtkörper hervorgeht (WEBSTER & WEBER 2007). Die Verschmelzung der Zellkerne (Karyogamie) ist von der Plasmogamie zeitlich und räumlich durch die Dikaryophase getrennt (NULTSCH 2001). Auch bei manchen Chytridiomyceten, bei denen die Fusion undifferenzierter Rhizoide berichtet wurde (MOORE & MILLER 1973; MILLER & DYLEWSKI 1987), und bei Ascomyceten, z. B. bei *Aspergillus nidulans* (ROPER 1966; BOS & SWART 1995), spielen parasexuelle Vorgänge eine wichtige Rolle.

Hyphenverbindungen, über die ein Austausch von Zellinhaltsstoffen und Organellen stattfinden kann, nennt man Anastomosen. Sie können nicht nur zwischen Hyphen auftreten, sondern wurden z. B. auch direkt zwischen Konidien verschiedener *Colletotrichum*-Spezies (ROCA *et al.* 2004) und bei *Neurospora crassa* (ROCA *et al.* 2005) nachgewiesen. Bei den Zygomyceten finden parasexuelle Vorgänge über Anastomosen unter anderem bei Mycorrhiza-Pilzen statt (GIOVANNETTI *et al.* 1999; DE LA PROVIDENCIA *et al.* 2005). Ausführungen über die cytologischen und genetischen Hintergründe vegetativer Zellfusionen bei weiteren Vertretern der Eumycota findet man zum Beispiel bei ZEIGLER (1998), GLASS *et al.* (2000), AIMI *et al.* (2002) und FLEISSNER *et al.* (2005).

Interspezifische Rekombinationsereignisse über Artgrenzen hinweg bieten eine besonders effektive Form des genetischen Austausches. SCHARDL und CRAVEN (2003) geben einen Überblick über interspezifische Hybridisierung bei pflanzenassoziierten Pilzen und Oomyceten. Voraussetzung für alle Hybridisierungsereignisse bei diesen Organismen ist das Vorhandensein eines gemeinsamen Substrates, bei biotrophen Organismen also eine gemeinsame Wirtspflanze. Der parasexuelle Zyklus auf Hyphenebene beginnt stets mit der Fusion vegetativer Zellen durch Anastomosenbildung. Sind die beteiligten Individuen genetisch verschieden, entsteht ein heterokaryontisches Syncytium, also eine Zelle mit mehreren Zellkernen beider an der Fusion beteiligten Stämme. Trotz der Ähnlichkeit dieser Situation zur frühen Phase des sexuellen Austausches von Zellkernen unterscheiden sich die zugrunde liegenden genetischen Mechanismen bezüglich der Kompatibilität der beiden Interaktionspartner deutlich (GLASS & KULDAU 1992; LESLIE 1993; GLASS *et al.* 2000). Interessanterweise sind solche Heterokarya oft instabil und produzieren schnell homokaryontische Nachkommen (SCHARDL & CRAVEN 2003). Alternativ kann es zu einer Zellkernfusion und damit zu

möglichen Crossing-over-Ereignissen zwischen Chromosomen kommen, denen sich der Verlust einzelner Chromosomen anschließt, sodass der ganze Prozess zu zahlreichen neuen Genotypen unter den Nachkommen des Heterokaryons führen kann (PAPA 1979; CATEN 1981). Bei den meisten Pilzen ist Parasexualität durch genetische Selbst-Nichtselbst-Erkennungsmechanismen stark eingeschränkt. Damit zwei Individuen ein lebensfähiges Heterokaryon bilden können, müssen sie entsprechende Allele auf zahlreichen Genloci besitzen, da Anastomosenbildung sonst zur Zerstörung der interagierenden Zellen führt (GLASS & KULDAU 1992; LESLIE 1993). Eine frühe Studie von EMERSON und WILSON (1954) zeigte bereits, dass Hybriden aus zwei verschiedenen *Allomyces*-Spezies gebildet werden können, die dann den Phänotyp einer dritten *Allomyces*-Art und nicht den der beiden Elternstämme aufweisen. Die Studie zeigte auch die Tendenz der pilzlichen Hybriden zur Polyploidie, wie sie auch häufig bei Pflanzen-Hybriden gefunden wird.

Parasexuelle Rekombination stellt also eine mögliche Erklärung für die Variabilität bei Oomyceten dar (GOODWIN 1997; DRENTH & GOODWIN 1999). So könnten Hybridisierungen zwischen verschiedenen Arten, die unterschiedliche ökologische Nischen besetzen, zu „Super-Pathogenen“ mit neuer Wirtsspezifität (BRASIER 1995) führen oder zu einer Kombination der Wirtsspektren der beiden Elternstämme. Diese Möglichkeit der Merkmalskombination ist von großer Tragweite bei der Bekämpfung von Pflanzenpathogenen, sowohl im Bereich der Pflanzenzüchtung als auch bezüglich der Resistenz gegen Fungizide. Erweiterte Wirtsspektren wurden bereits bei künstlich geschaffenen Hybriden aus verschiedenen *Phytophthora*-Spezies gefunden (ÉRSEK *et al.* 1995; ÉRSEK *et al.* 1997; MAN IN 'T VELD *et al.* 1998), und es gibt zudem Hinweise auf natürlich vorkommende *Phytophthora*-Hybriden (MAN IN 'T VELD *et al.* 1998; BRASIER *et al.* 1999). Andere Studien an *Phytophthora* sp. unterstützen die These einer parasexuellen Form der Rekombination (SHATTOCK & SHAW 1976; LAYTON & KUHN 1988; LUCAS *et al.* 1990; GOODWIN & FRY 1993; MAY *et al.* 2003). Nur wenig ist jedoch bislang zu parasexueller Rekombination bei obligat biotrophen Oomyceten bekannt.

1.5 Anknüpfungspunkte dieser Studie zu vorausgegangenen Arbeiten

1.5.1 Fallbeispiel *Plasmopara*

Der Falsche Mehltau der Sonnenblume, *Plasmopara halstedii* (FARLOW) BERLESE et DE TONI gilt trotz der homothallischen sexuellen Vermehrung als sehr variabel (vgl. Abschnitt 1.3). Die phänotypische Vielfalt von *Pl. halstedii* gab in der Vergangenheit Anlass, die Ursachen von Merkmalsrekombinationen zwischen verschiedenen Stämmen innerhalb dieser Art zu untersuchen. Es konnte mit Hilfe von Dualinfektionen eine intraspezifische Rekombination der Merkmale Fungizid-Toleranz (gegenüber Metalaxyl) und Wirtsspezifität unter Ausschluss sexueller Vermehrung nachgewiesen werden (SCHEYHING 2001; SPRING & ZIPPER 2006; TSCHESCHNER 2006); diese Ergebnisse wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nochmals bestätigt (Daten nicht gezeigt). Anschließend stellte sich die Frage, ob solche Vorgänge auch zwischen nah verwandten Arten vorkommen können, wenn sich ihr Wirtsspektrum überschneidet. In einer vorausgegangenen Arbeit wurden deshalb Kreuzungsversuche zwischen *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis*, dem Erreger des Falschen Mehltaus der Gewöhnlichen Spitzklette (*Xanthium strumarium*), unternommen (TSCHESCHNER 2006). Beide Arten können die Sonnenblume *Helianthus annuus* befallen, unterscheiden sich aber gleichzeitig phänotypisch in ihrer Sporangienmorphologie, der Anzahl und Freisetzungsgeschwindigkeit der Zoosporen und hinsichtlich ihrer Wirtsspezifität (KOMJÁTI *et al.* 2007). DNA-Sequenz-Unterschiede zwischen den beiden *Plasmopara*-Arten wurden bereits in der Vergangenheit herangezogen, um die phylogenetischen Verhältnisse näher zu beleuchten (SPRING *et al.* 2003; VOGLMAYR *et al.* 2004; KOMJÁTI *et al.* 2007). In den von TSCHESCHNER (2006) durchgeführten Experimenten wurden die Ausgangsstämme *Pl. halstedii* JüB18z (Metalaxyl-toleranter Einzelzoosporen-Stamm) und *Pl. angustiterminalis* X03-A1 (Einzelsporangien-Stamm, infektiös auf *H. annuus* cv. QHP-1) durch Dualinfektionen auf der für beide Arten suszeptiblen Sonnenblumenlinie „Giganteus“ zusammengebracht und die asexuell entstandenen Nachkommen (Zoosporangien) doppelt selektiert, indem als Wirt die Sonnenblumenlinie QHP-1 gewählt und zusätzlich Metalaxyl appliziert wurde. Die Vorgehensweise bei der Dualinfektionsstudie ist zur Verdeutlichung in Abbildung 1.4 grafisch dargestellt.

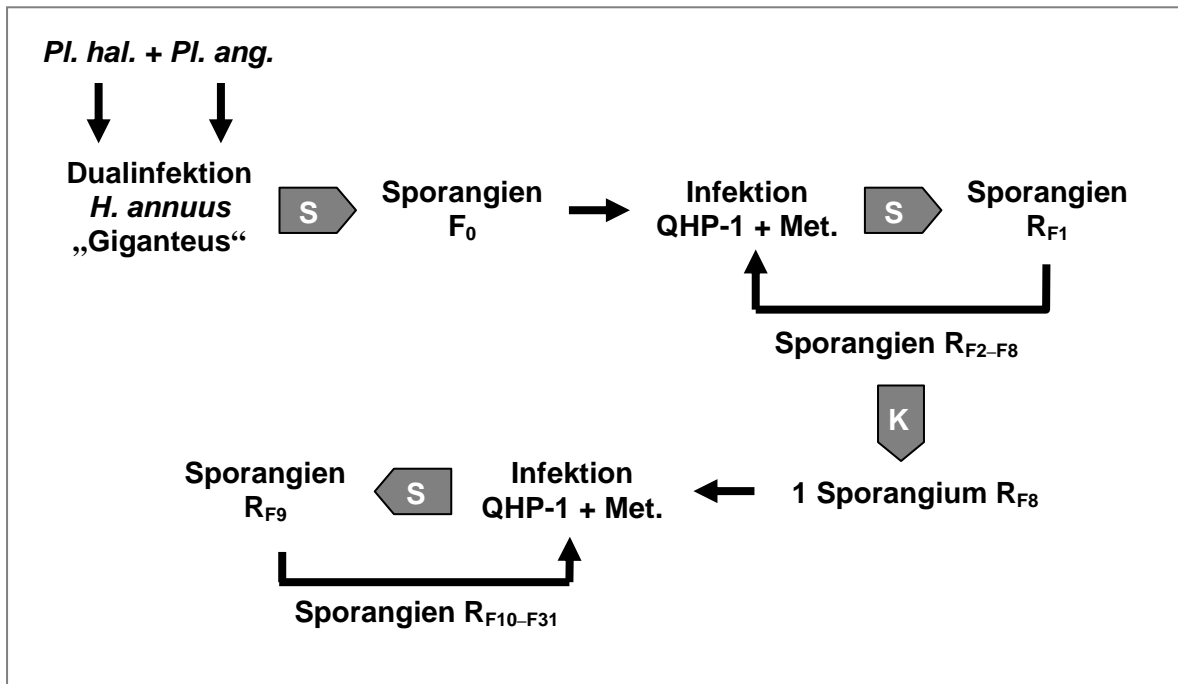


Abb. 1.4: Schema der Dualinfektion mit *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterninalis*, Selektion und Klonierung des rekombinanten Tochterstamms R_{FX}

Pl. hal. = *Plasmopara halstedii*; *Pl. ang.* = *Plasmopara angustiterninalis*; QHP-1 = *H. annuus* cv. QHP-1; Met. = Metalaxyl (1 ppm). → = Inokulation von Sonnenblumen;

⬅ (S) = Sporulation; ⬅ (K) = Einzelsporangien-Klonierung

Es konnte dabei in sieben von 13 unabhängigen Experimenten eine phänotypische Rekombination der Metalaxyl-Toleranz und der Virulenzeigenschaften gegenüber Sonnenblumen gezeigt werden. Für weitere Experimente wurde dabei der rekombinante Tochterstamm „VIII“ ausgewählt, der auch für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde und im Folgenden als Rekombinante „R“ bezeichnet wird.

Um einen ersten Hinweis auf genotypische Rekombination zu erhalten, wurden PCR-Fingerprints mit den Simple-sequence-repeat (SSR)-Primern $(GACA)_4$ und $(GTC)_5$ durchgeführt. Verglichen wurden dabei die Elternstämme *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterninalis* sowie die Rekombinante R in der zweiten Generation. Zum Vergleich wurden zusätzlich die Amplifikate aus DNA-Mischungen beider Elternstämme erzeugt („Mix“). Abbildung 1.5 zeigt die PCR-Fingerprints.

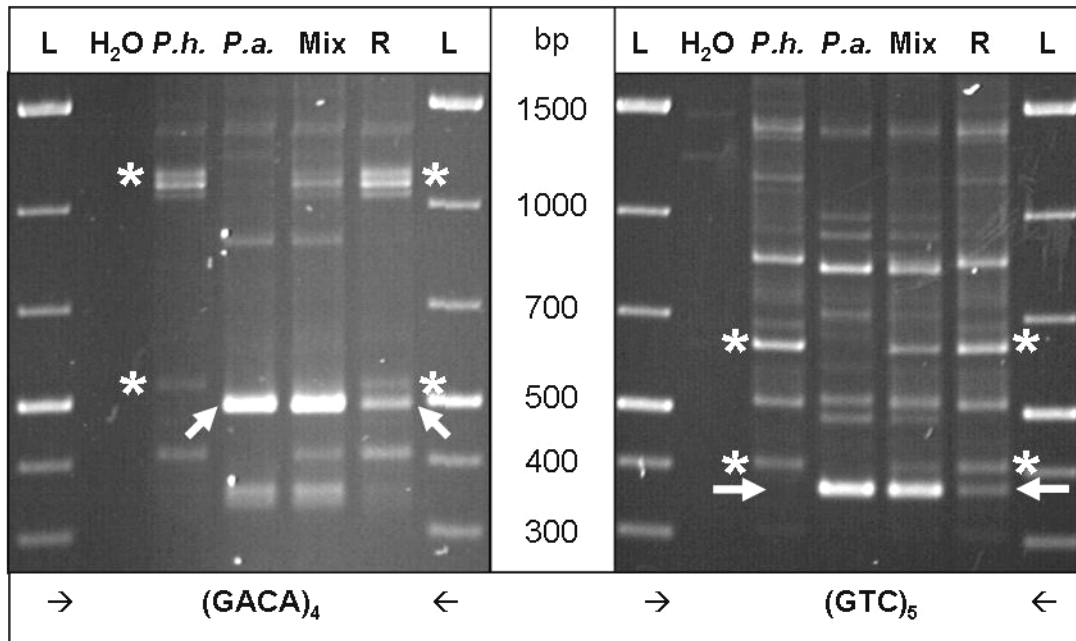


Abb. 1.5: iSSR-PCR-Fingerprint-Vergleiche zwischen *Pl. halstedii*, *Pl. angustiterminalis* und R. Verändert aus TSCHESCHNER (2006)

Links: PCR mit SSR-Primer $(GACA)_4$; rechts: PCR mit SSR-Primer $(GTC)_5$

L = 1-kb-DNA-Leiter; H₂O = Negativkontrolle ohne DNA; *P.h.* = *Pl. halstedii*; *P.a.* = *Pl. angustiterminalis*; Mix = Mischung der DNA von *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis*; R = Rekombinanter Tochterstamm. Die Sterne markieren jeweils die Banden, die charakteristisch für *Pl. halstedii* sind, die Pfeile diejenigen, die charakteristisch für *Pl. angustiterminalis* sind.

Der erste molekularbiologische Vergleich der beiden Ausgangsstämme mit dem aus Mitosporangien nach Doppelinfektion gewonnenen Tochterstamm R lieferte deutliche Hinweise auf rekombinante Eigenschaften von R. Sowohl mit dem SSR-Primer $(GACA)_4$ als auch mit $(GTC)_5$ konnten in Teilen additive Fingerprint-Muster bei R detektiert werden, die Banden, die jeweils charakteristisch für einen der beiden Elternstämme waren, in einem gemeinsamen Bandenmuster zeigten. Der rekombinante Tochterstamm wurde über mitotisch gebildete Zoosporangien in vier Infektionsrunden kultiviert; es wurden Sporangien von jeder Generation bei -70°C eingefroren. Für die vorliegende Studie wurden eingefrorene Sporangien der ersten Sporulation unter Selektionsbedingungen (R_{F1}) erneut zur Infektion gebracht. Ab der dritten Infektionsrunde (R_{F3}) bis zur 31. Generation wurde der Stamm immer parallel ohne Selektionsdruck auf *H. annuus* cv. Giganteus sowie mit doppeltem Selektionsdruck auf *H. annuus* cv. QHP-1 mit 1 ppm Metalaxyl kultiviert. Aus der doppelt selektierten Generation R_{F8} gelang es, ein einzelnes Sporangium für die Weiterkultivierung des Stammes zu verwenden (s. 4.2.1), sodass es sich ab R_{F9} um einen Einzelsporangien-Klon handelte, was die genetische Homogenität von R gewährleistete.

1.5.2 Fallbeispiel *Peronospora tabacina*

Der Tabak-Blauschimmel-Erreger *Peronospora tabacina* ADAM (syn. *P. hyoscyami* De By. f. sp. *tabacina* (ADAM) SKALICKY) verursacht regelmäßig große Schäden im Tabak-Anbau. Der vegetative Vermehrungszyklus von *Per. tabacina* verläuft wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, wobei die Sporangien ausschließlich direkt auskeimen (vgl. Abb. 1.1, [5b]). Ein sexueller Zyklus ist bei dem Pathogen bislang nicht nachgewiesen, wenngleich es einzelne Beschreibungen von Oosporen-ähnlichen Strukturen gibt (WOLF 1947; SPURR & TODD 1980; HEIST *et al.* 2002). Das Fehlen eines sexuellen Vermehrungszyklus spricht zusammen mit der Tatsache, dass ein einzelner Zellkern die genetische Basis der Verbreitungseinheit Sporangium darstellt (TRIGIANO & SPURR JR. 1987), gegen eine hohe Diversität bei *Per. tabacina*. Diese Annahme wird durch Berichte über die geringe genetische Variabilität des Erregers gestützt (SUKNO *et al.* 2002b; ZIPPER *et al.* 2009). So sind bislang nur zwei Phänotypen des Pathogens bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber dem Oomyceten-spezifischen Phenylamid-Fungizid Metalaxyl unterscheiden.

1.6 Fragestellungen und Ziele

In der vorliegenden Arbeit sollte anhand der Fallbeispiele des Falschen Mehltaus der Sonnenblume, *Plasmopara halstedii*, und des Tabak-Blauschimmels, *Peronospora tabacina*, nach Belegen für alternative Rekombinationsmöglichkeiten im vegetativen Lebenszyklus der Peronosporaceae gesucht und der Einfluss einer möglichen parasexuellen Rekombination auf die Variabilität dieser obligat biotrophen Pflanzenpathogene eingeschätzt werden. Es wurden dabei Erreger ausgewählt, denen nach heutigem Wissensstand aufgrund ihrer Homothallie (bei *Plasmopara halstedii*) oder des Fehlens von Sexualstadien (bei *Peronospora tabacina*) keine Rekombinationsmöglichkeiten im sexuellen Zyklus zur Verfügung stehen und die sich außerdem bezüglich ihrer phänotypischen Vielfalt unterscheiden. So gilt *Pl. halstedii* als phänotypisch sehr variabel, wohingegen von *Per. tabacina* bislang nur zwei in ihrer Fungizid-Toleranz unterschiedliche Phänotypen bekannt sind. Für die Studien an *Pl. halstedii* wurde der von TSCHESCHNER (2006) durch Dualinfektionen von Sonnenblumen mit *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* generierte rekombinante Tochterstamm R verwendet. Neben phänotypischen Merkmalen sollten auch weitere genotypische Belege gefunden werden, die es erlauben, die beiden Elternstämme eindeutig zu differenzieren und bei R nach rekombinierten genetischen Mustern zu suchen. Das Dualinfektionssystem sollte außerdem dazu dienen, eventuelle Interaktionen im Gewebe mikroskopisch verfolgen zu

können. Dabei sollte festgestellt werden, ob es zur Ausbildung von Anastomosen kommt und ob über diese Hyphenbrücken genetisches Material ausgetauscht werden kann. Die Weitergabe potenziell neu-kombinierter Eigenschaften und deren Stabilität über mehrere Generationen spielen für das Verständnis der Variabilität ebenfalls eine entscheidende Rolle. Deshalb stellen die Aufklärung der Hintergründe der Verteilung genetischen Materials während der Sporangio-genese sowie die Stabilität bestimmter Merkmale über mehrere Generationen zwei weitere wichtige Ziele dieser Arbeit dar. Des Weiteren sollten Versuche zur Transformation von *Pl. halstedii* unternommen werden, die eine optische Markierung und somit eine mikroskopische Differenzierung der Pathogene im Wirtsgewebe ermöglichen würden.

Auch bei *Peronospora tabacina* sollte nach Hinweisen auf Rekombinationsereignisse im vegetativen Lebenszyklus gesucht werden. Hierfür sollten Marker zur eindeutigen Unterscheidung der beiden bisher aus der Literatur bekannten Phänotypen des Pathogens gefunden und anschließend Dualinfektions-Experimente mit diesen Isolaten durchgeführt werden. Zudem sollten die beiden bislang nur wenig detailliert beschriebenen Erreger-Typen näher charakterisiert werden, um daraus Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen und auf die Variabilität innerhalb des Tabak-Blauschimmels ziehen zu können.

2 Ergebnisse

2.1 Phänotypische Merkmale von *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* im Vergleich zum rekombinanten Tochterstamm

2.1.1 Fungizid-Toleranz und Wirtsspezifität

Tabelle 2.1 zeigt die Ausprägung der Merkmale Wirtsspezifität und Fungizid-Toleranz bei den beiden Ausgangsorganismen *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* sowie dem asexuell gebildeten Tochterstamm R. Der Befall von *H. annuus* cv. QHP-1 wurde nur dann als positiv gewertet, wenn eine Infektion vorlag, bei der das Pathogen auf Kotyledonen oder Blättern zur Sporulation kam. Als Metalaxyl-resistent wurden Pathogenstämme eingestuft, die bei Metalaxyl-Konzentrationen ≥ 1 ppm wachsen und sporulieren. Sensitive Isolate sporulieren hingegen nur bei Metalaxyl-Konzentrationen unter 0,03 ppm (ROZYNEK & SPRING 2001).

Tab. 2.1: Vergleich der Merkmale Wirtsspezifität und Fungizid-Toleranz bei den beiden Kreuzungspartnern und dem asexuell gebildeten Tochterstamm R

+ = Eigenschaft vorhanden; – = Eigenschaft nicht vorhanden

Eigenschaft	Elternstamm		Tochterstamm
	<i>Pl. halstedii</i>	<i>Pl. angustiterminalis</i>	R _{F3-F31}
Befall <i>H. annuus</i> QHP-1	–	+	+
Metalaxyl-Resistenz	+	–	+

Um den Einfluss spontaner Mutationen auf das Experiment ausschließen zu können, wurden als Kontroll-Ansätze die Elternstämme unabhängig voneinander ebenfalls denselben doppelten Selektionsbedingungen unterzogen. Dabei kam es in keinem Fall zur Entstehung neuer Merkmale – bei Doppel-Selektion war also kein Pathogen-Wachstum zu beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass das Phänomen der Neukombination der beiden untersuchten phänotypischen Eigenschaften Folge der Interaktion der beiden Kreuzungspartner im Gewebe der Wirtspflanze war. Die beiden kombinierten Selektions-Merkmale bei R waren über 31 Generationen stabil und auch nach Infektionsrunden ohne Selektionsdruck bei anschließender erneuter Selektion noch ausgeprägt. Dabei hatte der Klonierungsschritt zwischen R_{F8} und R_{F9} (s. Abschnitte 1.5 und 4.2.1) keinen Einfluss auf die Merkmalsausprägung bei dem rekombinanten Tochterstamm. Es wurden nun weitere phänotypische Eigenschaften untersucht, um den Befund der Neukombination von elterlichen Merkmalen zu bestätigen.

2.1.2 Sporangienmorphologie

Zum Vergleich der Sporangienmorphologie der beiden Elternstämme mit der von R in verschiedenen Generationen wurden jeweils 100 Sporangien computergestützt anhand mikroskopischer Aufnahmen vermessen (Länge und Breite der Sporangien sowie das Verhältnis Länge zu Breite) und die Signifikanz der Ergebnisse mittels eines *t*-Tests statistisch abgesichert (s. 4.2.3.1). Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Allgemein fällt auf, dass die Sporangienmorphologie insgesamt relativ variabel war, was in Einklang mit neueren Untersuchungen zur Sporangien-Größe der beiden Elternstämme steht (KOMJÁTI *et al.* 2007; SAKR *et al.* 2008). Die Ergebnisse der Messungen machen zudem deutlich, dass sich die Morphologie der Sporangien von R nicht immer intermediär verhielt.

Tab. 2.2: Vermessung der Sporangien von *Pl. halstedii*, *Pl. angustiterminalis* und R_{F2} , R_{F8} , R_{F20} (n = 100)

Ø = Mittelwert, Min. = Minimum, Max. = Maximum, ± = Standardabweichung; Werte mit unterschiedlicher Kennung (a, b, ...) sind signifikant unterschiedlich ($|t| > 1,97$; $p < 0,05$).

Sporangien-Eigenschaft	<i>Pl. halstedii</i>	<i>Pl. angustiterminalis</i>	R_{F2}	R_{F8}	R_{F20}
Länge Ø [µm]	46,9 ± 13,7 a	31,9 ± 6,3 b	25,6 ± 4,6 c	35,4 ± 9,3 d	41,8 ± 10,4 e
Länge Min. [µm]	25,5	21,2	18,6	22,8	21,4
Länge Max. [µm]	90,6	55,1	44,1	71,7	84,5
Breite Ø [µm]	35,7 ± 6,7 a	21,2 ± 2,8 b	17,4 ± 1,9 c	25,2 ± 5,1 d	23,7 ± 3,4 e
Breite Min. [µm]	20,4	16,0	13,8	17,3	15,1
Breite Max. [µm]	50,4	31,1	23,0	43,3	33,9
Länge : Breite Ø	1,30 ± 0,17 a	1,50 ± 0,16 b	1,47 ± 0,18 b	1,40 ± 0,16 c	1,75 ± 0,24 d
Länge : Breite Min.	1,00	1,08	1,16	1,13	1,28
Länge : Breite Max.	1,87	2,01	2,28	1,95	2,49

Die Sporangien der beiden Elternstämme unterschieden sich deutlich, wobei die von *Pl. angustiterminalis* tendenziell kürzer und schmaler waren als die von *Pl. halstedii*. Bei Länge und Breite der Sporangien lagen die bei R_{F8} und R_{F20} gemessenen Werte zwischen denen der beiden Ausgangsstämme, R_{F2} hatte hingegen insgesamt kleinere Sporangien als die beiden Eltern. Die errechneten Standardabweichungen zeigen sowohl bei der Länge als auch bei der Breite, dass *Pl. halstedii* variabler war als *Pl. angustiterminalis* und als R. Beim Vergleich des Verhältnisses Länge zu Breite wird deutlich, dass sich Sporangien von R_{F2} und R_{F8} in dieser Eigenschaft zwar intermediär verhielten, die von R_{F20} aber nicht. Diese junge Generation des rekombinanten Tochterstammes zeigte lange schmale Sporangien, die in ihrer Länge ähnlich zu denen von *Pl. halstedii*, in ihrer Breite

jedoch ähnlich zu den Sporangien von *Pl. angustiterminalis* waren. Der *t*-Test ergab, dass die Unterschiede in der Sporangienmorphologie zwischen *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* signifikant waren. Sowohl im Vergleich zu *Pl. halstedii* als auch im Vergleich zu *Pl. angustiterminalis* wiesen R_{F2} , R_{F8} und R_{F20} mit einer Ausnahme in allen untersuchten Sporangien-Eigenschaften ebenfalls signifikante Unterschiede auf. Einzig das Verhältnis Länge zu Breite der Sporangien von R_{F2} war nicht signifikant verschieden im Vergleich zum Länge-Breite-Verhältnis bei *Pl. angustiterminalis* (vgl. Tab. 2.2).

2.1.3 Anzahl Zoosporen pro Sporangium

Als weiteres phänotypisches Vergleichs-Merkmal wurde die Anzahl der entlassenen Zoosporen pro Sporangium herangezogen, da bekannt ist, dass sich *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* in dieser Eigenschaft unterscheiden (KOMJÁTI *et al.* 2007). Es wurde die Zoosporen-Freisetzung aus je 100 Sporangien auf Wasser-Agar beobachtet (s. 4.2.3.1). Da die Versuche an frischem Pathogen-Material durchgeführt werden mussten, welches zum Versuchszeitpunkt zur Verfügung stand, wurde von R die 36. Generation untersucht, die ohne Selektionsdruck kultiviert worden war.

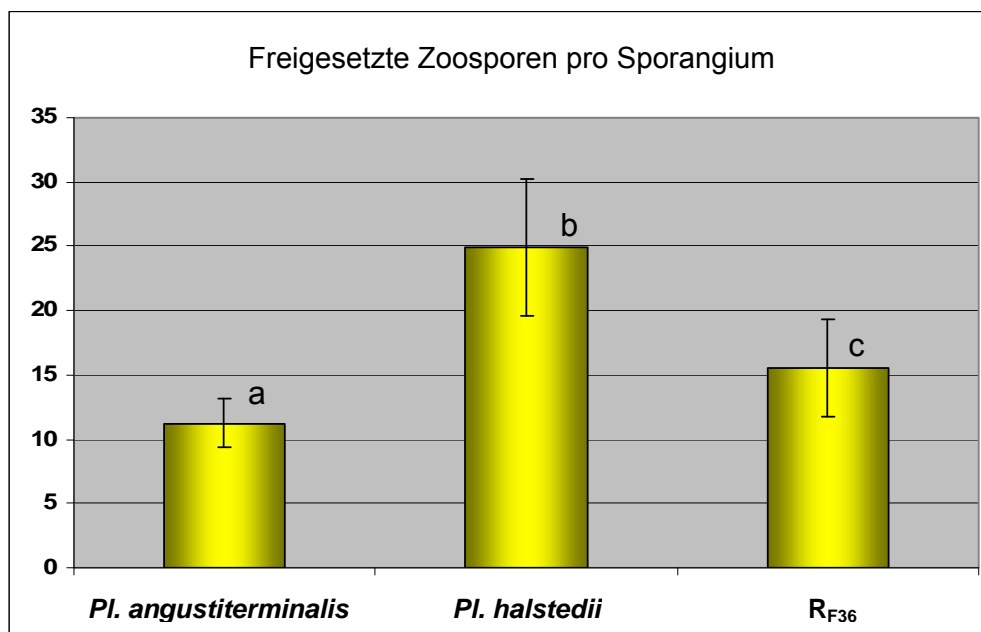


Abb. 2.1: Vergleich der Anzahl freigesetzter Zoosporen pro Sporangium (n = 100)
 R_{F36} = Rekombinanter Tochterstamm; auf der y-Achse ist die durchschnittliche Anzahl der detektierten Zoosporen pro Sporangium aufgetragen. Die Balken markieren die errechnete Standardabweichung. Werte mit unterschiedlicher Kennung (a, b, c) sind signifikant unterschiedlich ($|t| > 1,97$; $p < 0,05$).

Abbildung 2.1 zeigt, dass ein Sporangium von *Pl. halstedii* durchschnittlich 24,9 (\pm 5,4) Zoosporen entließ, während bei *Pl. angustiterminalis* im Schnitt nur 11,2 (\pm 1,9) Zoosporen pro Sporangium freigesetzt wurden. R_{F36} verhielt sich mit durchschnittlich 15,5 (\pm 3,8) freigesetzten Zoosporen pro Sporangium intermediär, lag jedoch näher an den für *Pl. angustiterminalis* gemessenen Werten.

2.2 Genotypischer Nachweis der Merkmalskombination

Um die durch die phänotypischen Untersuchungen erlangten Befunde zu stützen, wurden nun molekularbiologisch genotypische Vergleiche angestellt, die im folgenden Abschnitt erläutert werden. Für *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* wurden molekularbiologische Marker entwickelt, die es erlauben, die beiden potenziellen Interaktionspartner auf molekularer Ebene zu differenzieren und mit dem asexuell gebildeten Tochterstamm R zu vergleichen. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde stets DNA von R_{F2}, R_{F8}, R_{F9}, R_{F10} und R_{F20} herangezogen, um einen eventuellen Einfluss des in Abschnitt 1.5 beschriebenen Klonierungsschrittes zwischen der achten und der neunten Generation auf den Genotyp der Rekombinante erfassen zu können. Auf Basis der Unterschiede in mit SSR-Primern generierten PCR-Fingerprint-Mustern (s. Abb. 1.3) wurden Eltern-spezifische Primer konstruiert und für die PCR genutzt (2.2.1). Des Weiteren wurden Primer eingesetzt, die spezifisch an den nukleären nicht-codierenden DNA-Abschnitt der ribosomalen DNA binden (2.2.2) und damit mittels PCR dieser Teil des Genoms detektiert werden kann. Unterschiede im mitochondrialen Bereich der DNA wurden mit spezifischen Primern für Teile des Cytochrom-*c*-Oxidase-Gens (*coxII*) erfasst (2.2.3). Zur relativen Quantifizierung der unterschiedlichen spezifischen Genom-Anteile wurden *Real-time*-quantitative-PCR-Experimente durchgeführt (2.2.4). Zudem wurden DNA-DNA-Hybridisierungen mittels Dot-Blot zur Abschätzung von Sequenz-Ähnlichkeiten vorgenommen (2.2.5).

2.2.1 Eltern-spezifische Primer

Mit den Eltern-spezifischen Primern konnten die beiden *Plasmopara*-Spezies eindeutig mittels PCR differenziert werden. Es wurden ein Primerpaar spezifisch für *Pl. halstedii* (Phal_F/R) und zwei Primerpaare spezifisch für *Pl. angustiterminalis* (Pang_F/R und Pang2_F/R) konstruiert (zur Vorgehensweise s. 4.2.2.4), die sich für Duplex-PCRs mit vier Primern eignen. Dabei basieren die Primer-Sequenzen von Phal_F und Phal_R auf der Sequenz eines 312 bp langen *Pl. halstedii*-spezifischen DNA-Fragments (Gen-Bank Zugangsnummer F1856002), das mittels Fingerprint-PCR mit dem Primer (GTC)₅

amplifiziert wurde. Pang_F und Pang_R wurden auf Basis der Sequenz eines 490 bp langen *Pl. angustiterminalis*-spezifischen DNA-Fragments (Gen-Bank Zugangsnummer F1856003), gewonnen durch PCR mit dem Primer (GACA)₄, konstruiert. Für die Konstruktion von Pang2_F und Pang2_R wurde die Sequenz eines 388 bp langen, ebenfalls *Pl. angustiterminalis*-spezifischen DNA-Fragments (Gen-Bank Zugangsnummer F1856004) aus PCR mit dem Primer (GTC)₅ herangezogen. Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Die Sequenzierung der Eltern-spezifischen PCR-Fragmente und der anschließende Datenbank-Vergleich (BLAST) mit bekannten Sequenzdaten gaben keinen Aufschluss über die Lokalisation der amplifizierten Fragmente. Es handelt sich folglich mit großer Wahrscheinlichkeit um nicht-codierende Bereiche des Genoms.

Abb. 2.2 zeigt die Ergebnisse einer Duplex-PCR mit den verschiedenen Primer-Kombinationen. Verglichen wurden dabei *Pl. halstedii*, *Pl. angustiterminalis* und die oben erwähnten Generationen von R, sowie eine Negativkontrolle ohne DNA. Die Spezifität der Primer war eindeutig gegeben. So wurde bei Duplex-PCR mit DNA von *Pl. halstedii* ein Fragment von 283 bp Länge amplifiziert. Bei Einsatz von *Pl. angustiterminalis*-DNA wurden Fragmente von 405 bp (PCR mit Primerpaar Pang_F/R), bzw. 203 bp (PCR mit Primerpaar Pang2_F/R) Länge vervielfältigt.

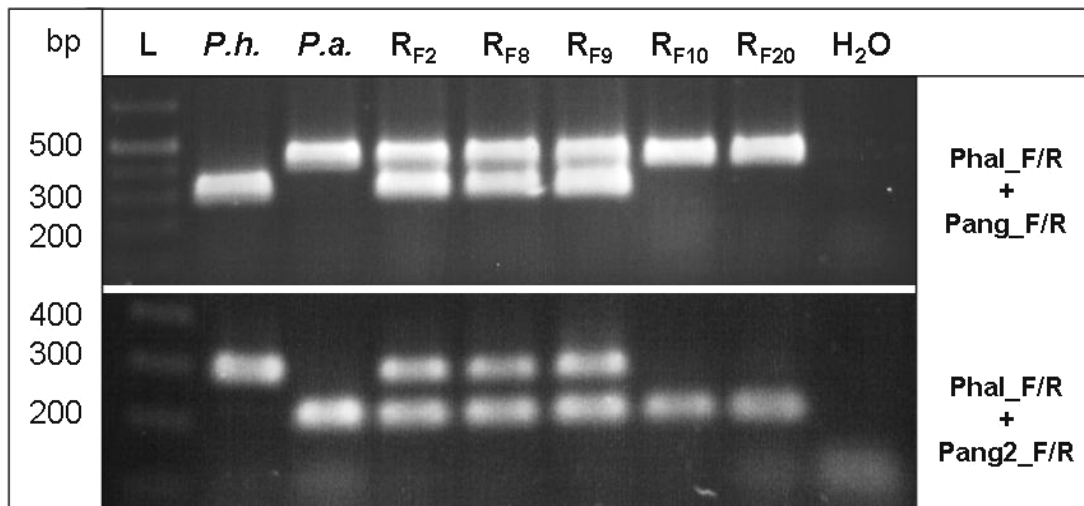


Abb. 2.2: Duplex-PCR an *P.h.*, *P.a.* und R_{Fx} mit Eltern-spezifischen Primern

Oben: Primerpaare Phal_F/R und Pang_F/R; unten: Primerpaare Phal_F/R und Pang2_F/R; L = 1-kb-DNA-Leiter; *P.h.* = *Pl. halstedii*; *P.a.* = *Pl. angustiterminalis*, R_{Fx} = rekombinanter Tochterstamm in der x-ten Generation; H₂O = Negativkontrolle ohne DNA.

Der aus Dualinfektion mit anschließender doppelter Selektion hervorgegangene Tochterstamm R wies bei beiden Duplex-PCR-Ansätzen bis zur neunten Generation ein

additives Banden-Muster auf. Bei PCR mit DNA der zehnten und 20. Generation von R wurde dagegen nur noch das *Pl. angustiterminalis*-spezifische Fragment amplifiziert.

PCR mit Einzelsporangien von R_{F7}

Die in Abb. 2.2 gezeigten Ergebnisse belegen, dass auch nach dem Klonierungsschritt durch Einzelsporangien-Vermehrung zwischen R_{F8} und R_{F9} (vgl. 1.5.1) immer noch Signale beider Eltern-Spezies detektiert wurden. Dies impliziert, dass es einzelne heterokaryontische Sporangien von R gab, die Zellkerne beider Ausgangsstämme enthielten und diese Sporangien den doppelten Selektionsdruck überleben konnten. Zudem ist jedoch zu erwarten, dass es auch Sporangien gab, die ausschließlich Zellkerne von *Pl. halstedii* oder *Pl. angustiterminalis* enthielten, diese Individuen aber durch den doppelten Selektionsdruck nicht überlebten. Um diese Annahmen zu überprüfen, wurden die spezifischen Primer in PCR-Ansätzen eingesetzt, zu denen statt DNA je Reaktion ein einzelnes Sporangium von R_{F7} gegeben wurde (s. 4.2.2.2). Es wurden auf diese Art und Weise 92 Einzelsporangien von R_{F7} dem PCR-Test unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.3 dargestellt.

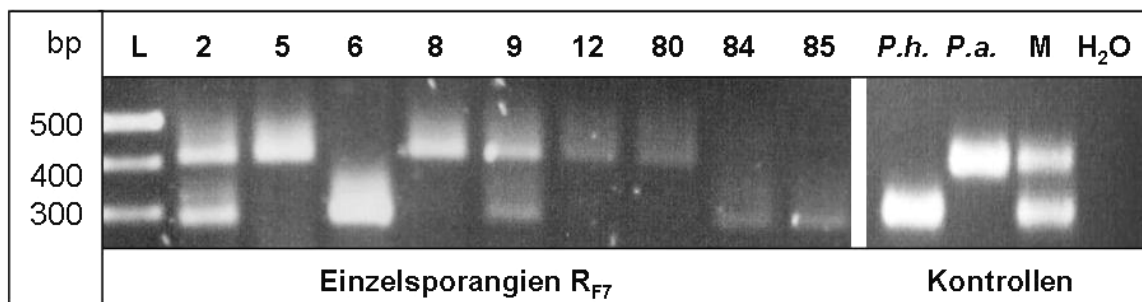


Abb. 2.3: Duplex-PCR an Einzelsporangien von R_{F7} mit Eltern-spezifischen Primern

Eingesetzt wurden die Primerpaare Phal_F/R und Pang_F/R.

L = 1-kb-DNA-Leiter; 2, 5,..., 85 = positive Proben von 92 getesteten Einzelsporangien von R_{F7}; P.h. = *Pl. halstedii*; P.a. = *Pl. angustiterminalis*, M = DNA-Mix von P.h. + P.a.; H₂O = Negativkontrolle ohne DNA.

Die Ergebnisse in Abb. 2.3 zeigen das Vorhandensein sowohl von Einzelsporangien, die die Information beider Elternstämme enthielten (2, 9), als auch von Sporangien, bei denen ausschließlich das *Pl. halstedii*-spezifische Signal (6, 84, 85) oder das *Pl. angustiterminalis*-spezifische Signal (5, 8, 12, 80) detektiert werden konnte. Somit wurden erstmals Individuen biotropher Oomyceten nachgewiesen, die nach asexueller Interaktion zweier verschiedener Spezies genetisches Material beider Elternstämme in einem Sporangium aufweisen.

2.2.2 Zellkern-spezifische ITS-Primer

Da zur Konstruktion der spezifischen Primer Unterschiede im PCR-Fingerprint-Muster herangezogen wurden, die basierend auf Gesamt-DNA entstanden waren, war nicht klar, ob die spezifischen Primer im Kerngenom oder im mitochondrialen Genom binden. Um Informationen über die Lokalisation der Eltern-spezifischen Anteile des Genoms von R und damit einen Hinweis darauf zu bekommen, welche Organellen an der Übertragung von genetischem Material beteiligt sind, wurden PCR-Experimente mit Zellkern-spezifischen ITS-Primern und Mitochondrium-spezifischen *coxII*-Primern durchgeführt. Die ribosomale RNA, die einen wichtigen strukturellen Bestandteil der Ribosomen darstellt, wird von der rDNA codiert. In den Zellkernen von Eukaryonten liegt die rDNA als Transkriptionseinheiten in tandemartigen Wiederholungen vor, bei denen hintereinander die Gene für die 18-S-rRNA, die 5,8-S-rRNA und die 28-S-rRNA liegen. Diese Gene werden auf DNA-Ebene durch „Abstandshalter“, so genannte ITS (Internal Transcribed Spacer), getrennt, die aufgrund ihrer artspezifisch unterschiedlichen Längen und DNA-Sequenzen häufig für taxonomische Untersuchungen herangezogen werden. Bei Oomyceten wurden diese Abschnitte der DNA z. B. zum Pathogen-Nachweis (RISTAINO *et al.* 2007) oder für phylogenetische Studien (SPRING *et al.* 2005a; THINES *et al.* 2005; THINES 2007b; THINES 2007a) benutzt. Basierend auf feinen Unterschieden in der ITS-Sequenz existieren ITS-Primer (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Thines, Universität Hohenheim), die eine differenzierte spezifische Detektion von Zellkern-codierten DNA-Abschnitten aus *Pl. halstedii* bzw. *Pl. angustiterminalis* und somit einen weiteren Vergleich der beiden Organismen mit dem Tochterstamm R erlaubten.

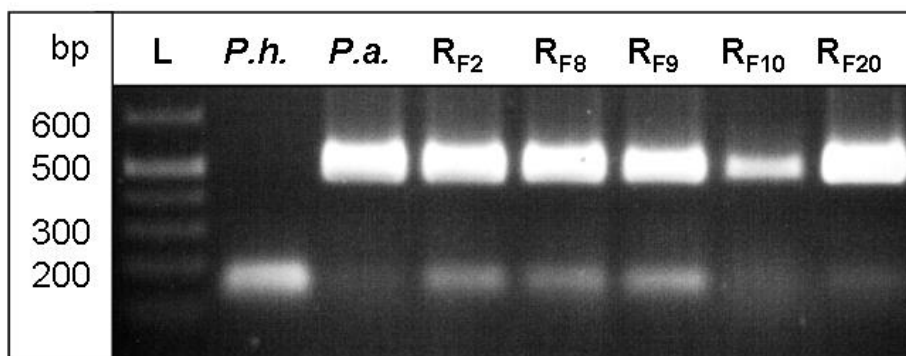


Abb. 2.4: PCR-Vergleich mit Zellkern-spezifischen ITS-Primern

Eingesetzt wurden die Primer ITS_F und ITS_R. L = 1-kb-DNA-Leiter; *P.h.* = *Pl. halstedii*; *P.a.* = *Pl. angustiterminalis*; R_{Fx} = rekombinanter Tochterstamm in x-ter Generation.

Im Gegensatz zu den im vorherigen Abschnitt vorgestellten Eltern-spezifischen Primern *Phal_F/R* und *Pang_F/R*, mit denen bei R ein additives PCR-Muster bei Betrachtung des Gesamt-Genoms gezeigt wurde, wurde mit den *ITS_F/R*-Primern nur das Zellkern-Genom detektiert. Abb. 2.4 zeigt, dass sich die mit diesen Primern generierten PCR-Muster von *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* deutlich unterschieden. Während bei der PCR mit DNA von *Pl. halstedii* ein Fragment von ca. 200 bp amplifiziert wurde, ergab die PCR mit DNA von *Pl. angustiterminalis* ein Amplifikat von ca. 500 bp Länge. Das PCR-Muster der Rekombinante R war bei R_{F_2} , R_{F_8} und R_{F_9} additiv und zeigte die beiden Eltern-spezifischen Fragmente in einem Muster. Bei $R_{F_{10}}$ und $R_{F_{20}}$ konnte nur das *Pl. angustiterminalis*-spezifische Zellkern-Fragment amplifiziert werden. Somit konnte erneut gezeigt werden, dass der rekombinante Tochterstamm R bis zur neunten Generation zumindest Teile der Zellkern-Genome beider *Plasmopara*-Spezies enthielt.

2.2.3 Mitochondrium-spezifische *coxII*-Primer

Um Mitochondrien-spezifische DNA-Abschnitte zu detektieren, wurden in der PCR Primer verwendet, die an das Gen für eine Untereinheit der Cytochrom-*c*-Oxidase (COX) binden. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer binden an das *coxII*-Gen, das für die Untereinheit II des Enzyms codiert. Basierend auf feinen Sequenzunterschieden lagen *coxII*-Primer vor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Thines, Universität Hohenheim), die spezifisch für Mitochondrien von *Pl. halstedii* bzw. *Pl. angustiterminalis* sind.

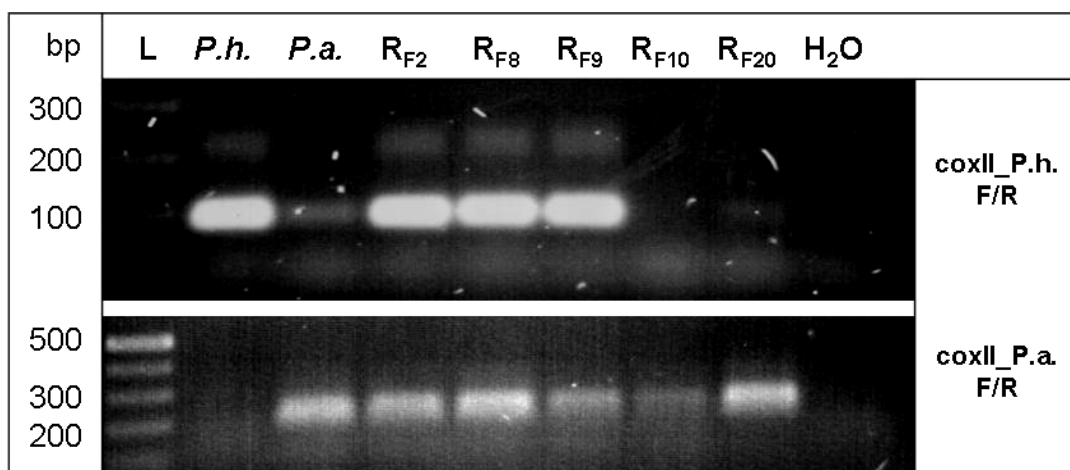


Abb. 2.5: PCR mit artspezifischen *coxII*-Primern zur Detektion von Mitochondrien von *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis*

Oben: *coxII*-Primer spezifisch für *Pl. halstedii*; unten: *coxII*-Primer spezifisch für *Pl. angustiterminalis*; L = 1-kb-DNA-Leiter; *P.h.* = *Pl. halstedii*; *P.a.* = *Pl. angustiterminalis*; R_{F_x} = Rekombinanter Tochterstamm in x-ter Generation; H₂O = Negativkontrolle ohne DNA.

Die Anwendung dieser Primer in der PCR mit DNA der beiden *Plasmopara*-Spezies und dem Tochterstamm R belegte erneut das intermediäre Verhalten von R bis zur neunten Generation (s. Abb. 2.5). Bei R konnten bis zur neunten Generation sowohl das *Pl. halstedii*-spezifische, als auch das *Pl. angustiterminalis*-spezifische Signal detektiert werden, ab der zehnten Generation jedoch ausschließlich das *Pl. angustiterminalis*-spezifische Signal. Somit konnte mtDNA beider *Plasmopara*-Spezies in der aus R_{F2}, R_{F8} und R_{F9} isolierten DNA detektiert werden, in DNA von R_{F10} und R_{F20} nur mtDNA von *Pl. angustiterminalis*.

2.2.4 Abschätzung der elternspezifischen Anteile am Genom von R mittels *Real-time* quantitativer PCR

Um Erkenntnisse über die Gewichtung der elterlichen Anteile am Genom von R gewinnen zu können, wurden Analysen mittels *Real-time* quantitativer PCR durchgeführt. Als Primerpaare wurden eingesetzt: Phal_F/R und coxII_P.h._F/R (jeweils spezifisch für *Pl. halstedii*), sowie Pang_F/R und coxII_P.a._F/R (jeweils spezifisch für *Pl. angustiterminalis*). Als Referenz wurden die Primer coxII_F/R eingesetzt, die für die PCR bei verschiedensten Vertretern der Peronosporomycetes verwendet werden können (HUDSPETH *et al.* 2000). Jeder Ansatz enthielt 35 ng der jeweiligen Template-DNA (vgl. 4.2.2.5). Abbildung 2.6 zeigt exemplarisch einen Auszug der *Real-time*-PCR-Kurven bei PCR mit dem Primerpaar Pang_F/R.

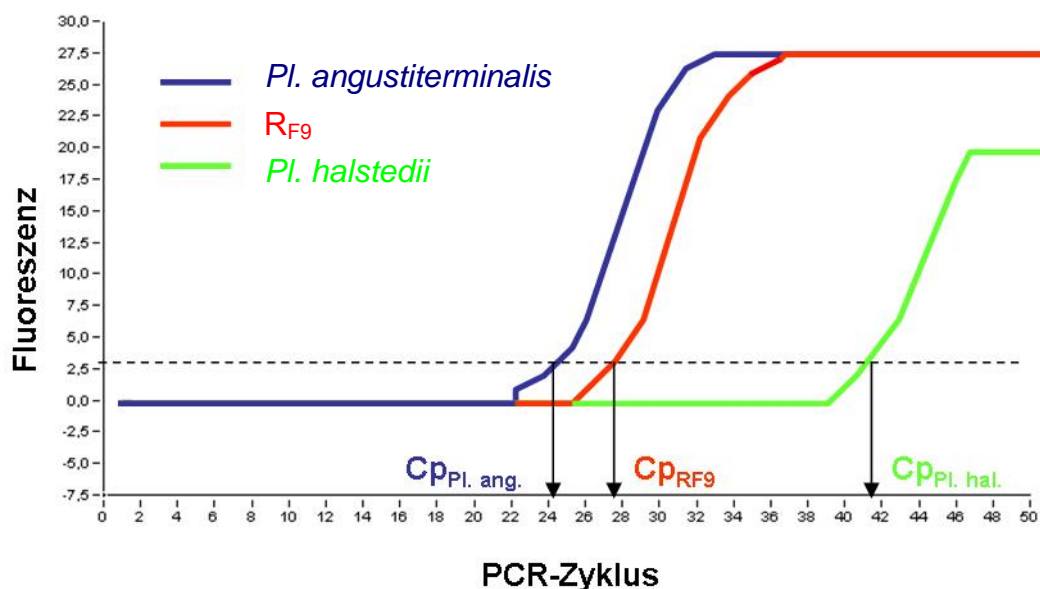


Abb. 2.6: Ergebnis der *Real-time* quantitativen PCR mit dem Primerpaar Pang_F/R
Anhand der Fluoreszenzkurven kann der jeweilige Crossing Point (Cp), also der Zyklus, an dem ein bestimmter Fluoreszenzwert (gestrichelte Linie) überschritten wird, abgelesen werden.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie in Abschnitt 4.2.2.5 beschrieben. Hierfür wurden von den Amplifikationen die Steigung m der jeweiligen Detektionskurve und die Crossing Points C_p benötigt. Dieser Punkt beschreibt den PCR-Zyklus, an dem die detektierte Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (vgl. Abb. 2.6). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.3 dargestellt, wobei zur Berechnung jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen PCR-Läufen verwendet wurden.

Tab. 2.3: Ergebnisse der Real-time quantitativen PCR

C_p = Crossing Point; $N_0/N_0(\text{Ref})$ = Molekül-Ausgangsmenge in Relation zum Referenzgen *coxII*.

Primer	DNA	C_p	$N_0 / N_0(\text{Ref})$
Phal_F/R	<i>Pl. halstedii</i>	22,59	0,929
	<i>Pl. angustiterminalis</i>	32,79	0,001
	R _{F2}	24,73	5,035
	R _{F8}	25,59	1,257
	R _{F9}	26,10	0,963
	R _{F10}	36,96	0,002
	R _{F20}	32,50	0,007
Pang_F/R	<i>Pl. halstedii</i>	38,64	0,000
	<i>Pl. angustiterminalis</i>	24,66	0,189
	R _{F2}	25,43	3,294
	R _{F8}	25,17	1,621
	R _{F9}	27,10	0,525
	R _{F10}	28,59	0,303
	R _{F20}	22,98	2,390
cox_P.h._F/R	<i>Pl. halstedii</i>	20,31	3,687
	<i>Pl. angustiterminalis</i>	42,33	0,000
	R _{F2}	21,11	45,148
	R _{F8}	21,91	11,690
	R _{F9}	22,3	9,630
	R _{F10}	39,05	0,001
	R _{F20}	35,86	0,001
cox_P.a._F/R	<i>Pl. halstedii</i>	46,00	0,000
	<i>Pl. angustiterminalis</i>	27,70	0,030
	R _{F2}	34,95	0,010
	R _{F8}	33,16	0,013
	R _{F9}	36,34	0,002
	R _{F10}	24,55	3,500
	R _{F20}	23,67	1,573

Mit den Ergebnissen der *Real-time* quantitativen PCR lassen sich Aussagen darüber treffen, in welchem Verhältnis die *Pl. halstedii*-, bzw. *Pl. angustiterminalis*-spezifischen Anteile des Genoms von R zueinander stehen. Dabei wurden sowohl Untersuchungen zum Gesamt-Genom (Primer Phal_F/R und Pang_F/R) als auch zum mitochondrialen Genom (Primer coxII_P.h._F/R) vorgenommen. Um die Daten, die mit den Eltern-spezifischen Primern in der *Real-time* quantitativen PCR gewonnen wurden, zu veranschaulichen, sind in Abbildung 2.7 die relativen Anteile der beiden Eltern-Signale am Gesamt-Signal der sieben untersuchten DNA-Proben dargestellt.

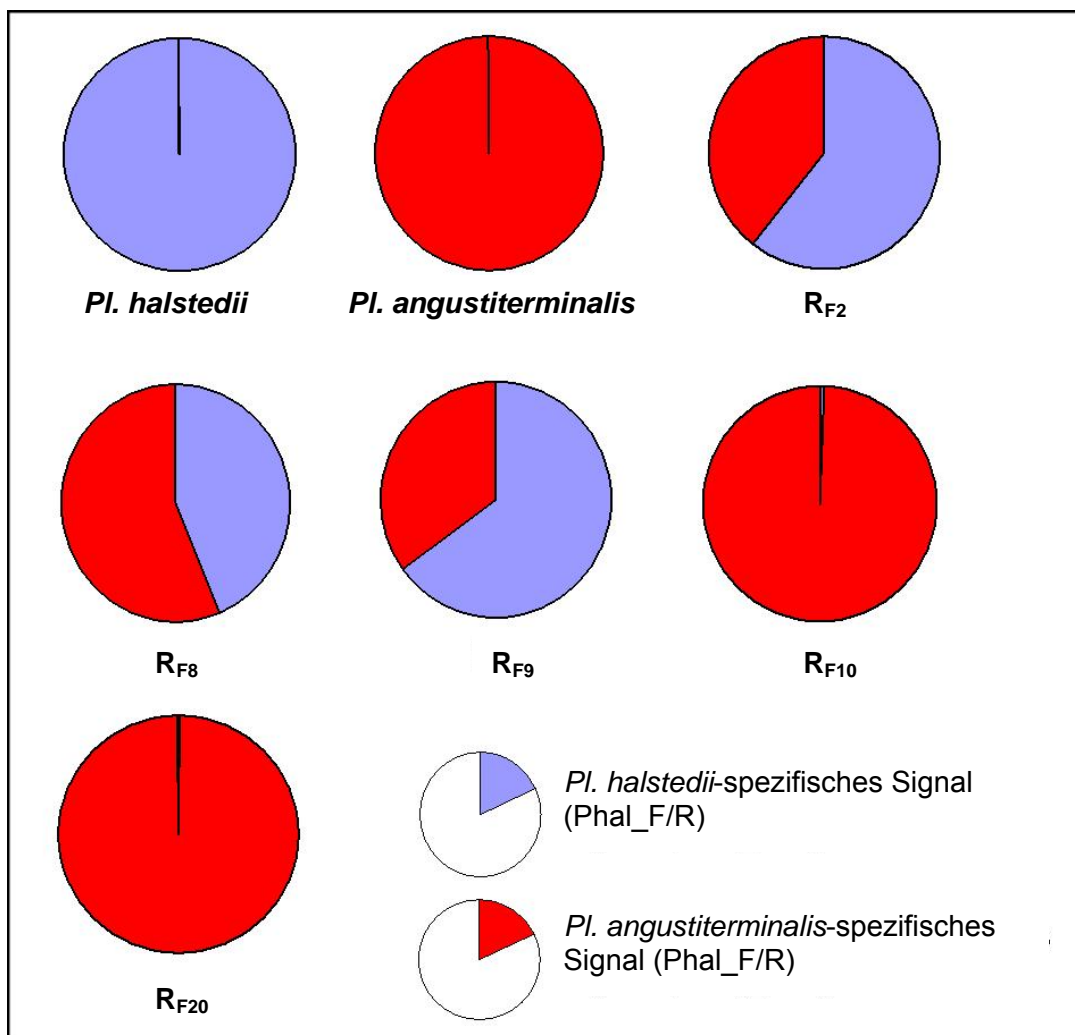


Abb. 2.7: Grafische Darstellung der Ergebnisse der *Real-time* quantitativen PCR mit den Eltern-spezifischen Primerpaaren Phal_F/R und Pang_F/R

Der *Pl. halstedii*-spezifische Anteil am Gesamtsignal ist blau, der *Pl. angustiterminalis*-spezifische rot dargestellt.

Die Ergebnisse der *Real-time* quantitativen PCR unterstützen die Resultate der Standard-PCRs. So weist die DNA von R_{F2}, R_{F8} und R_{F9} Teile beider Eltern-Genome auf,

wohingegen sich die Proben R_{F10} und R_{F20} ausschließlich wie *Pl. angustiterminalis* verhalten. Diese Tatsache galt sowohl bei PCR mit den Eltern-spezifischen Primern Phal_F/R und Pang_F/R als auch bei spezifischen *coxII*-Primern, wenngleich mit dem Primerpaar *cox_P.a._F/R* bei den meisten Proben nur eine schwache Amplifikation stattfand und so mit diesem Primerpaar trotz Modifikationen der Annealingtemperatur kein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht werden konnte. Das Ausbleiben der Amplifikation mit diesem Primerpaar, auch in der Positivkontrolle *Pl. angustiterminalis*, konnte selbst nach Rücksprache mit dem Hersteller des *Real-time*-PCR-Kits nicht geklärt werden. Die geringen *Pl. halstedii*-spezifischen Signale, die bei Einsatz der Primer Phal_F/R auch in den Proben *Pl. angustiterminalis*, R_{F10} und R_{F20} detektiert wurden, sind auf Primer-Dimere zurückzuführen. Diese konnten bei Betrachtung der jeweiligen Produkt-Schmelzkurve von den tatsächlichen Amplifikaten differenziert werden.

Bei den Proben R_{F2}, R_{F8} und R_{F9} konnten spezifische Signale beider Elternstämme nachgewiesen werden, wenngleich auch in unterschiedlichem Verhältnis zueinander. So überwiegt bei R_{F2} und R_{F9} der *Pl. halstedii*-spezifische Anteil des PCR-Signals, während R_{F8} einen größeren Anteil des *Pl. angustiterminalis*-spezifischen Signals zeigt. Dies lässt vermuten, dass das Verhältnis der beiden Eltern-Genome in R von Generation zu Generation uneinheitlich war und bestätigt die in Abschnitt 2.2.1 gezogene Schlussfolgerung, dass bis zu R_{F9} keine echte Rekombination der beiden Genome stattgefunden hat, sondern ein Heterokaryon vorlag.

2.2.5 DNA-DNA-Hybridisierung mittels Dot-Blot

Zur Abschätzung der DNA-Sequenz-Ähnlichkeit der zu vergleichenden Pathogen-Stämme wurden Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Um DNA-DNA-Hybridisierungen mit Gesamt-DNA von *Pl. halstedii*, *Pl. angustiterminalis* bzw. R_{Fx} detektieren zu können, wurden zunächst spezifische Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonden hergestellt (s. 4.2.2.7). Dazu wurde die in Abschnitt 2.2.1 beschriebene artspezifische Amplifikation von PCR-Fragmenten bei Einsatz der spezifischen Primer Phal_F/R und Pang_F/R genutzt. Die DIG-markierten Sonden wurden nach Angaben des Herstellers isoliert und für den Einsatz bei der DNA-DNA-Hybridisierung vorbereitet. Auf die positiv geladene Nylon-Membran, auf der die Hybridisierung stattfand, wurden von jeder der sieben DNA-Proben 280 ng DNA aufgetropft und anschließend mit den Eltern-spezifischen Sonden bei 45 °C hybridisiert. Die Ergebnisse des Dot-Blots sind in Abbildung 2.8 dargestellt.

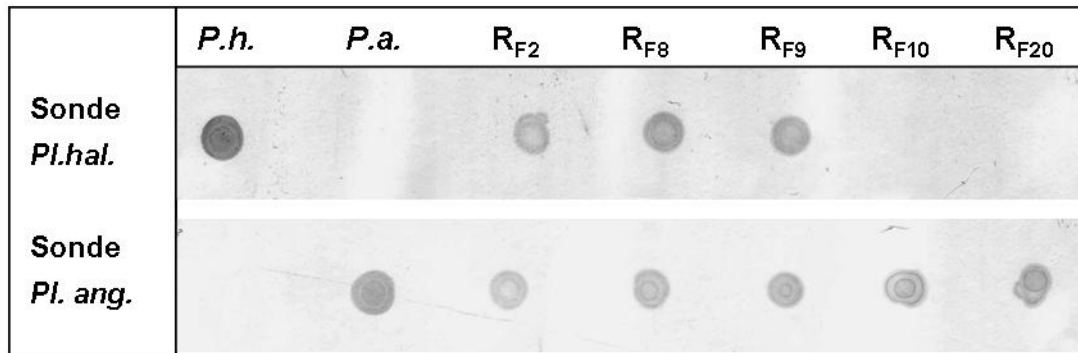


Abb. 2.8: DNA-DNA-Hybridisierung mittels Dot-Blot mit DNA der beiden Elternstämme und den verschiedenen Generationen von R

Von allen Proben wurden 280 ng DNA aufgetragen. Oben: DIG-Sonde spezifisch für *Pl. halstedii*; unten: DIG-Sonde spezifisch für *Pl. angustiterninalis*; *P.h.* = *Pl. halstedii*; *P.a.* = *Pl. angustiterninalis*; R_{F x} = Rekombinanter Tochterstamm in x-ter Generation. Hybridisierungstemperatur: 45 °C.

Bei der Hybridisierung mit der *Pl. halstedii*-spezifischen Sonde (Abb. 2.8, oben) konnten starke Signale bei DNA von *Pl. halstedii* sowie bei R_{F2}, R_{F8} und R_{F9} detektiert werden. Bei *Pl. angustiterninalis* und den anderen beiden Generationen von R war keine Farbreaktion zu sehen. Die Sonde ist also spezifisch für DNA von *Pl. halstedii* und bindet an DNA von R_{F2}, R_{F8} und R_{F9}. Bei der Hybridisierung mit der *Pl. angustiterninalis*-spezifischen Sonde (Abb. 2.8, unten) gab es eindeutige Signale bei allen Proben, außer bei der DNA von *Pl. halstedii*.

2.2.6 Vergleich der Genome von *Pl. angustiterninalis* und R_{F21} mittels AFLP

Der Phänotyp des rekombinanten Tochterstammes R blieb in den Eigenschaften Wirtsspezifität und Metalaxyl-Toleranz über 31 Generationen unverändert. So konnten alle dazwischen liegenden Generationen auf *H. annuus* cv. QHP-1 und 1 ppm Metalaxyl kultiviert werden. Dennoch belegen die bisher vorgestellten Ergebnisse eine Veränderung von R nach der neunten Generation und ab der zehnten Generation eine genotypische Ähnlichkeit von R ausschließlich mit *Pl. angustiterninalis* (vgl. Übersicht in Tab. 2.5). Ein Iso-/Allozym-Vergleich der beiden Eltern-Spezies mit R_{F20} bestätigte diesen Befund (Daten nicht gezeigt). Da sich die späteren Generationen von R durch das Selektionsmerkmal Metalaxyl-Resistenz und durch die Sporangienmorphologie dennoch deutlich von dem Elternteil *Pl. angustiterninalis* unterschieden, wurde gezielt nach Veränderungen im Gesamtgenom von R_{F21} im Vergleich zu *Pl. angustiterninalis* gesucht.

Als Methode zum Vergleich zweier sehr ähnlicher Individuen eignet sich Amplified-fragment-length polymorphism, kurz AFLP (Vos *et al.* 1995). Die Methode basiert auf der

Fragmentierung des Gesamtgenoms durch Restriktionsenzyme und der anschließenden mehrstufigen Amplifikation bestimmter Genomfragmente. Nach Gelelektrophorese erhält man dann im Idealfall Bandenmuster, die spezifisch für einzelne Individuen sind. Die Vorgehensweise zum Erhalt der AFLP-Muster von *Pl. angustiterminalis* und R_{F21} entsprach weitestgehend der von MUNDA *et al.* (2009) und wird in Abschnitt 4.2.2.6 näher beschrieben. In der zweiten Amplifikationsstufe wurden dabei Primer mit je zwei selektiven Nukleotiden verwendet.

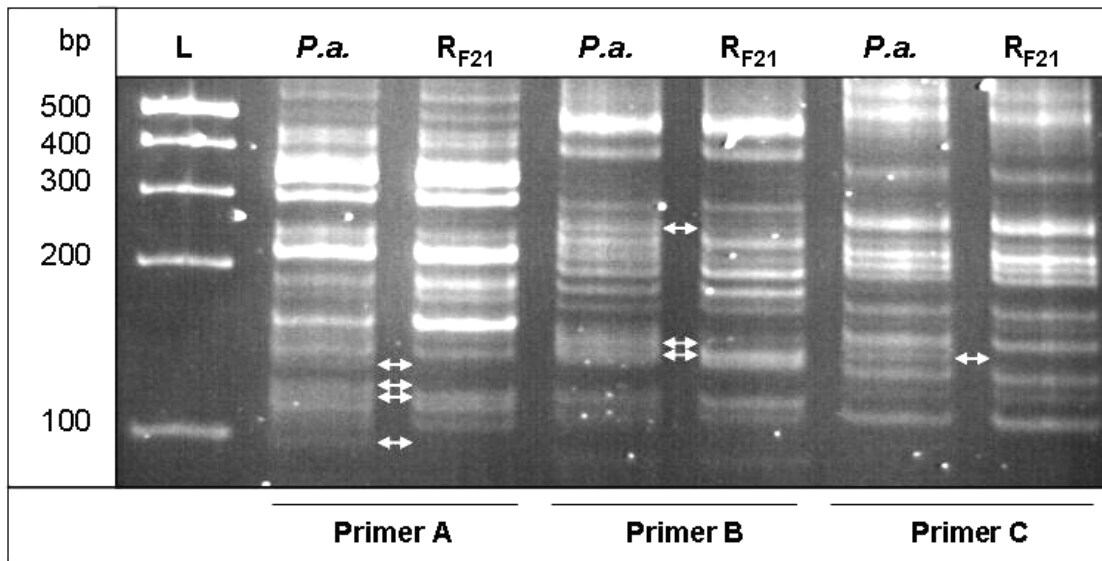


Abb. 2.9: AFLP-Vergleich zwischen *Pl. angustiterminalis* und R_{F21}

Die Fragmente wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in einem 10%-Gel aufgetrennt. Bei 3 von 14 getesteten Primerpaaren (A, B, C) mit je 2 selektiven Nukleotiden waren Unterschiede im Bandenmuster detektierbar. Diese Unterschiede sind durch die Doppelpfeile markiert.

Von 14 getesteten Primerpaaren ergaben sich bei dreien Unterschiede zwischen den AFLP-Mustern von *Pl. angustiterminalis* und R_{F21} (vgl. Abb. 2.9). Die Quantifizierung dieser Polymorphismen ist in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tab. 2.4: Anzahl der AFLP-Fragmente und Anteil der Polymorphismen der in Abb. 2.9 dargestellten Muster

Primer-Kombination	Amplifizierte Fragmente	Polymorphe Fragmente	Polymorphismus [%]
A: E-AC / M-TC	19	4	21,0
B: E-GT / M-TC	15	3	20,0
C: E-GT / M-TA	16	1	6,3

Um die polymorphen Fragmente näher charakterisieren zu können, wurden sie aus dem Gel extrahiert, in *E. coli* kloniert und einer Sequenzanalyse unterzogen. Datenbankvergleiche (BLAST) der so erhaltenen DNA-Sequenzen ergaben in Teilen Ähnlichkeiten von maximal 89 % mit in der Datenbank gelisteten Sequenzen. Da es sich dabei stets um bakterielle DNA-Sequenzen, z. B. von *Erwinia tasmaniensis* handelte, es aber äußerst unwahrscheinlich ist, dass sich diese, auf Apfel- und Birnenbäumen in Australien beschriebene Bakterien (GEIDER *et al.* 2006) auf den für die DNA-Extraktion verwendeten Sporangien befanden, ist eine Aussagekraft der Sequenzdaten bezogen auf die vorliegende Studie nicht gegeben. Da bei der AFLP-Methode auch DNA der Wirtspflanze und von kontaminierenden Mikroorganismen erfasst wird, müssen Unterschiede im Bandenmuster stets mit Vorsicht beurteilt werden. Dies ist vor allem im Hinblick auf die obligat biotrophe Lebensweise der untersuchten Oomyceten von Bedeutung, da eine sterile Kultivierung dieser Erreger praktisch nicht möglich ist. Dennoch wurden die beiden untersuchten Stämme auf derselben Wirtspflanze unter den exakt gleichen Kulturbedingungen angezogen, sodass die Unterschiede in den AFLP-Mustern einen Hinweis darauf geben, dass das Genom von R_{F21} nicht identisch mit dem Genom von *Pl. angustiterninalis* war, obwohl sich R ab der zehnten Generation, abgesehen von der Metalaxyl-Toleranz, wie *Pl. angustiterninalis* verhielt.

2.2.7 Zusammenfassung des phäno- und genotypischen Vergleichs

Die Ergebnisse der Studie zeigen übereinstimmend, dass:

1. die Pathogeneigenschaften von R über 31 Vermehrungszyklen, auch nach Einzelsporangien-Vermehrung in R_{F8}, konstant erhalten blieben;
2. die cytomtrischen Eigenschaften von R überwiegend intermediär, aber mit großer Schwankungsbreite erhalten blieben;
3. die genotypischen Eigenschaften von R bis zum 9. Vermehrungszyklus die Präsenz nukleärer und mitochondrialer DNA-Abschnitte beider Eltern indizieren, ab R_{F10} jedoch nur noch Genom-Abschnitte von *Pl. angustiterninalis* nachweisbar waren. In Einzelsporangien von R_{F7} konnten Signale beider Eltern-Spezies nachgewiesen werden.

Um einen Überblick über die Ergebnisse der untersuchten phäno- und genotypischen Merkmale im Vergleich von *Pl. halstedii*, *Pl. angustiterminalis* und den verschiedenen Generationen von R zu bekommen, sind sie in Tabelle 2.5 nochmals zusammenfassend dargestellt.

Tab. 2.5: Zusammenfassung des Vergleichs der phäno- und genotypischen Merkmale von *Pl. halstedii*, *Pl. angustiterminalis* und R_{Fx}

+ = Merkmal vorhanden; – = Merkmal nicht vorhanden; *P.h.* = Signal wie bei *Pl. halstedii*; *P.a.* = Signal wie bei *Pl. angustiterminalis*; n.b. = Datenerhebung nicht möglich

Eigenschaft	<i>Pl. hal.</i>	<i>Pl. ang.</i>	R _{F2}	R _{F8}	R _{F9}	R _{F10}	R _{F20}
Befall <i>H. annuus</i> cv. QHP-1	–	+	+	+	+	+	+
Metalaxyl-Toleranz ≥ 1 ppm	+	–	+	+	+	+	+
Ø Länge Sporangium [µm]	46,9	31,9	25,6	35,4	n.b.	n.b.	41,8
Ø Breite Sporangium [µm]	35,7	21,2	17,4	25,2	n.b.	n.b.	23,7
Ø Länge : Breite Sporangium	1,30	1,50	1,47	1,40	n.b.	n.b.	1,75
PCR-Fragment mit Phal_F/R	+	–	+	+	+	–	–
PCR-Fragment mit Pang_F/R	–	+	+	+	+	+	+
PCR-Fragment mit Pang2_F/R	–	+	+	+	+	+	+
PCR-Fragment mit ITS_F/R	<i>P.h.</i>	<i>P.a.</i>	<i>P.h. + P.a.</i>	<i>P.h. + P.a.</i>	<i>P.h. + P.a.</i>	<i>P.a.</i>	<i>P.a.</i>
PCR-Fragment mit coxII_P.h._F/R	+	–	+	+	+	–	–
PCR-Fragment mit coxII_P.a._F/R	–	+	+	+	+	+	+
Signal <i>Real-time</i> quantitative PCR	<i>P.h.</i>	<i>P.a.</i>	<i>P.h. + P.a.</i>	<i>P.h. + P.a.</i>	<i>P.h. + P.a.</i>	<i>P.a.</i>	<i>P.a.</i>
Dot-Blot <i>Pl. halstedii</i> -Sonde	+	–	+	+	+	–	–
Dot-Blot <i>Pl. angustiterminalis</i> -Sonde	–	+	+	+	+	+	+
			R _{F36}				
Ø Anzahl Zoosporen pro Sporangium	24,9	11,2	15,5				

2.4 Untersuchung von Interaktionen zwischen *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* im Wirtsgewebe

Da die postulierten Interaktionen zwischen den beiden Pathogenstämmen in der Phase des vegetativen Wachstums im Wirtsgewebe stattfinden, wurde das in der Vergangenheit bereits angewandte Doppelinfections-System (HAMMER 2005) weiterentwickelt. Es erlaubt das Zusammenbringen der beiden Oomyceten im Wirtsgewebe und gleichzeitig die einfache mikroskopische Untersuchung des Interaktionsbereiches auf Strukturen, die einen Austausch von genetischem Material auf Hyphenebene ermöglichen könnten.

2.4.1 Entwicklung eines passenden Dualinfektions-Systems

Sonnenblumen-Hypokotyl erwies sich als am besten geeignetes Wirtsgewebe für Dualinfektionen. Wurden die infizierten Hypokotyl-Abschnitte auf 0,8 % Wasser-Agar inkubiert, bei dem zuvor in der Mitte ein Streifen entfernt worden war, um eine Vermischung der Pathogene im Vorfeld der Interaktion zu vermeiden, konnten sie über einen Zeitraum von bis zu drei Wochen mikroskopisch untersucht werden (vgl. Abb. 2.10 a). Zudem erreichte man im Interaktionsareal ein nahezu paralleles Wachstum der Hyphen in den sich longitudinal erstreckenden Interzellularräumen, was die Beobachtung von Hyphenbrücken erleichtert (s. Abb. 2.10 b, c).

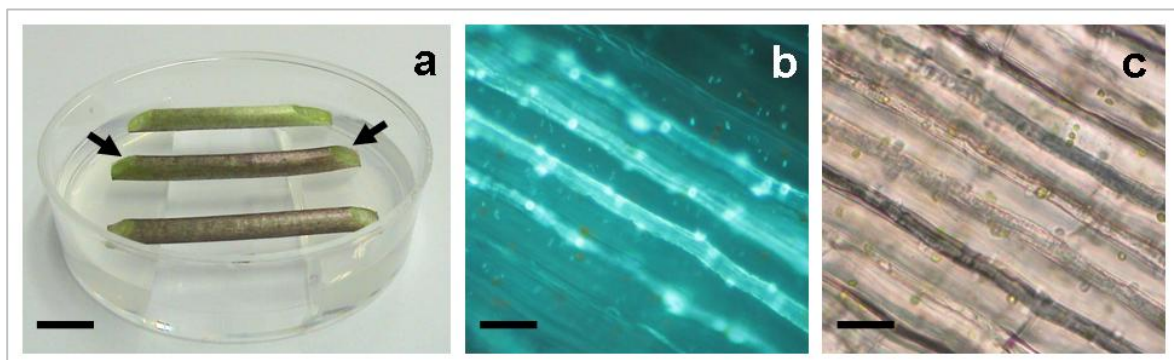


Abb. 2.10: Dualinfektionssystem an Sonnenblumen-Hypokotyl

a: Hypokotylstücke mit angeschrägten Enden auf Wasseragar; das mittlere Drittel des Agars wurde entfernt. Die Pfeile markieren die Stellen, wo die Sporangien-Suspensionen als Tropfen aufgetragen wurden. Maßstab = 1 cm

b: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Schnittes durch mit *Pl. halstedii* infiziertes Sonnenblumen-Hypokotyl; Färbung mit Anilinblau. Maßstab = 50 μ m

c: Gleicher Ausschnitt wie b im Hellfeld

Die Infektionseffizienz bei diesem System wurde anhand der Sporulation der Interaktionspartner an den Enden der Hypokotyl-Abschnitte überprüft (s. Abb. 2.11).

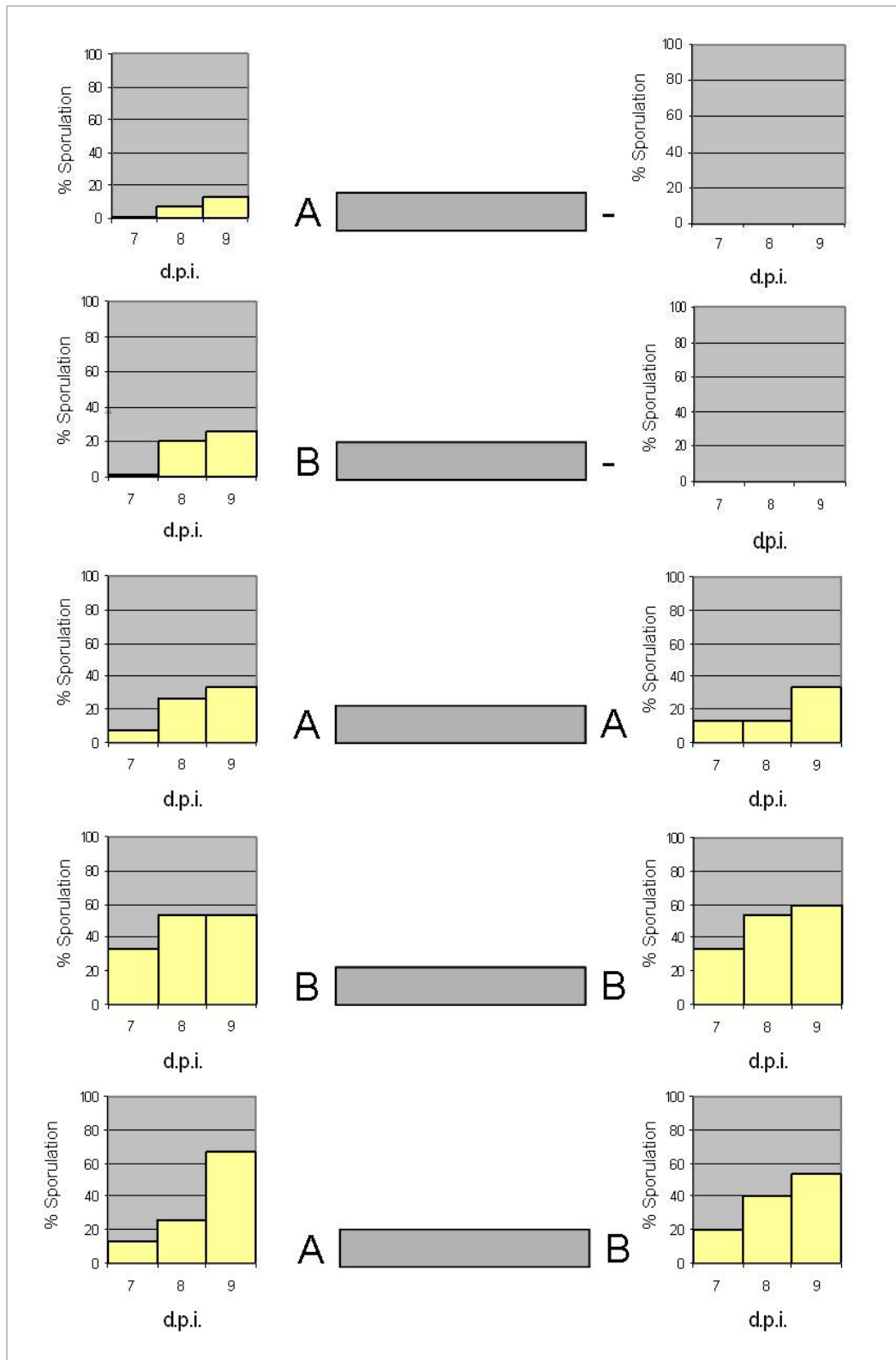


Abb. 2.11: Sporulationsraten bei Einfach- und Dualinfektionen von Sonnenblumen-Hypokotyl mit *Pl. halstedii* (A) und *Pl. angustiterminalis* (B)
 Aufgetragen sind auf der y-Achse der Anteil der Hypokotylstücke mit Sporulation und auf der x-Achse die Tage nach Inokulation (d.p.i.). Die grauen Balken in der Mitte symbolisieren die Hypokotyl-Abschnitte, die an den Enden mit *Pl. halstedii* (A) oder *Pl. angustiterminalis* (B) inokuliert wurden. Pro Ansatz wurden 15 Hypokotylstücke inokuliert.

Hierfür wurden pro Versuchsansatz 15 Hypokotylstücke der Sonnenblumenlinie „Giganteus“ mit Sporangien-Suspensionen der jeweiligen Pathogene inokuliert, im Klimaschrank bei 16 °C inkubiert und sieben, acht und neun Tage nach Inokulation bonitiert. Wenn nach zehn Tagen keine Sporulation an den inokulierten Enden des Wirtsgewebes und entlang des Hypokotyl-Stückes zu sehen war, ergab die mikroskopische Untersuchung stets, dass auch keine Hyphen des Pathogens zu finden waren, also keine Infektion stattgefunden hatte. Die Sporulation der beiden *Plasmopara*-Arten begann jeweils etwa nach gleicher Inkubationszeit. Ferner konnten keine Hinweise auf Unterschiede in der Infektionsstärke bei Inokulation des apikalen oder des basipetalen Endes des Hypokotyl-Stückes gefunden werden. Die Effizienz der Doppelinfektionen lag zwischen 33 % und 67 %, sodass man davon ausgehen kann, dass bei Anwendung dieser Doppelinfektionsmethode mindestens ein Drittel aller Versuchsansätze zur Auswertung genutzt werden kann. Interessanterweise lagen die Infektionsraten bei Einzelinfektionen auf nur einer Seite des Hypokotylstückes mit 13 % bzw. 27 % deutlich unter denen der Doppelinfektionen. Bei den Einzelinfektionen war die Sporulation am nicht-inokulierten Ende des Hypokotyl-Stückes frühestens elf Tage nach Inokulation zu detektieren.

2.4.2 Mikroskopischer Nachweis von Anastomosen

Es ist bisher nur wenig zur Anastomosenbildung bei biotrophen Oomyceten bekannt. Bei *Pl. halstedii* konnten im Vorfeld der homothallischen Gametangiogamie (SPRING 2000) und später auch beim vegetativen Wachstum im Wirtsgewebe (HAMMER 2005) Anastomosen gezeigt werden. Bei *Pl. angustiterminalis* sind solche Hyphenbrücken bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde bei Anwendung des oben vorgestellten Doppelinfektionssystems gezielt nach Anastomosen bei Einzelinfektionen mit *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* sowie bei Doppelinfektionen mit beiden Spezies gesucht, da ein Austausch von genetischem Material über fusionierte Hyphen die wahrscheinlichste Erklärung für die gezeigten Austauschvorgänge von Zellkernen und Mitochondrien zwischen den beiden *Plasmopara*-Spezies darstellt.

Die Ausbildung von Anastomosen konnte für die beiden *Plasmopara*-Spezies unabhängig voneinander (A/-; B/-) sowie in Doppelinfektions-Ansätzen (A/B) gezeigt werden. Abbildung 2.12 zeigt repräsentative Aufnahmen von Anastomosen bei Einzelinfektionen mit *Pl. halstedii*, *Pl. angustiterminalis* sowie bei Doppelinfektionsansätzen mit beiden Spezies.

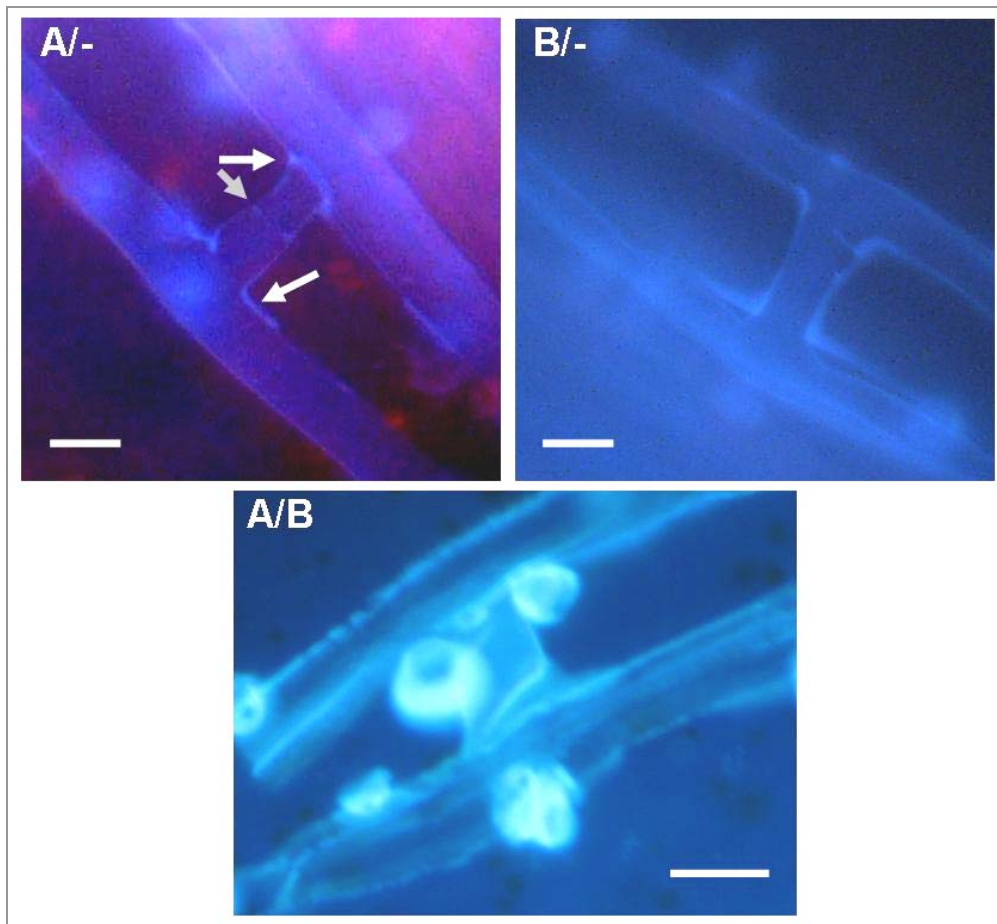


Abb. 2.12: Anastomosen bei *Pl. halstedii* (A/-), *Pl. angustiterminalis* (B/-) und bei Doppelinfection mit beiden Spezies (A/B)

Färbung mit Anilinblau; Fluoreszenzfiltersatz I

Die weißen Pfeile markieren jeweils Stellen verstärkter Kallose-Bildung an den Ansatzstellen der Anastomosen. Der graue Pfeil in A/- weist auf Kallose-Akkumulation in der Mitte der Anastomose hin. Maßstab = 15 µm.

Bei allen Anastomosen fiel durch das starke Anilinblau-Signal die Kallose-Akkumulation an den Ansatzstellen zu den beteiligten Nachbar-Hyphen auf. Es ist anzunehmen, dass dadurch eine Verstärkung der Hyphen-Übergänge bewirkt wird. Auch in der Mitte der Anastomosen konnten teilweise Bereiche mit Kallose-Akkumulation gefunden werden (s. Abb. 2.12, A/-). Ob es sich bei den beteiligten Hyphen im Ansatz A/B um Myzel der beiden verschiedenen *Plasmopara*-Arten oder nur einer Art handelt, kann mit dieser Methode nicht festgestellt werden, da sich die beiden Hyphen-Typen optisch nicht unterscheiden lassen. Hierfür wäre die optische Markierung der beteiligten Pathogene erforderlich. Sie könnte zum Beispiel durch Transformation mit Genen, die fluoreszierende Proteine codieren, erreicht werden. Experimente zur Erlangung eines Transformationssystems für *Pl. halstedii*, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, werden im Abschnitt 2.6 beschrieben.

2.4.3 Übertritt von genetischem Material durch Anastomosen

Die Voraussetzung für einen Merkmals-Austausch zwischen *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* über Anastomosen ist der Übertritt von Zellkernen und Mitochondrien über die Hyphenbrücken. Es wurde daher beispielhaft an *Pl. halstedii* mikroskopisch untersucht, ob ein Übertritt von Zellkernen, die um ein Vielfaches größer sind als Mitochondrien, durch Anastomosen möglich ist. Die Zellkern-Färbung wurde mit DAPI vorgenommen.

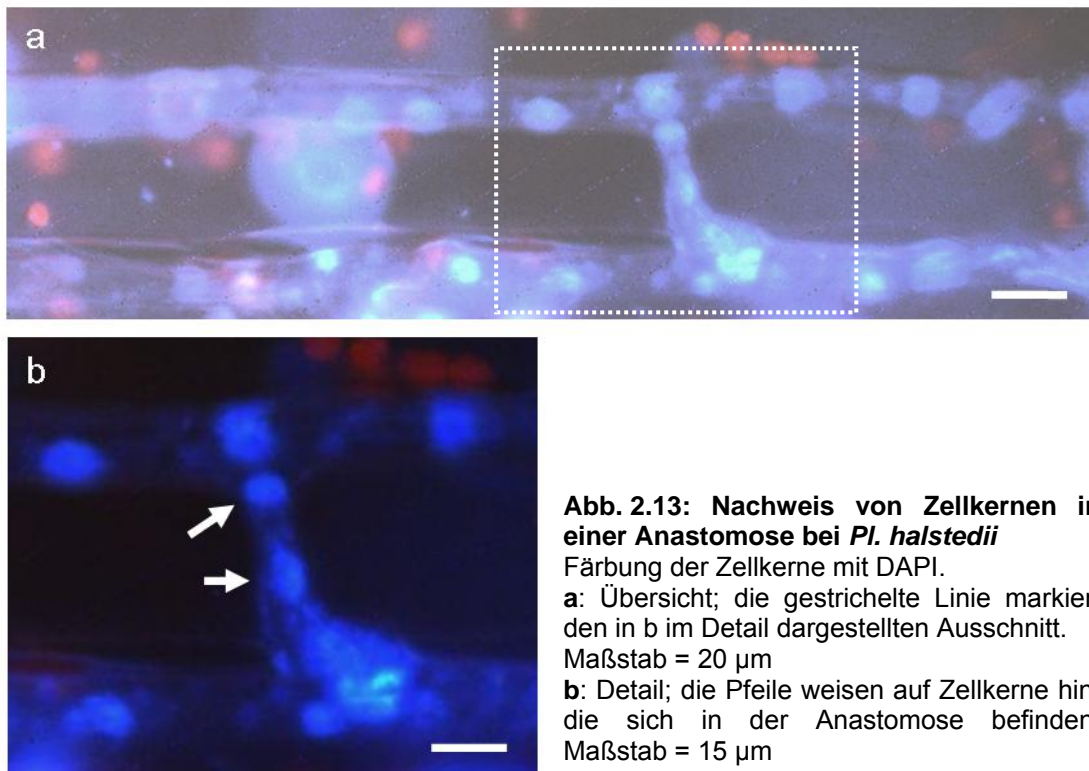


Abb. 2.13: Nachweis von Zellkernen in einer Anastomose bei *Pl. halstedii*

Färbung der Zellkerne mit DAPI.

a: Übersicht; die gestrichelte Linie markiert den in **b** im Detail dargestellten Ausschnitt.

Maßstab = 20 µm

b: Detail; die Pfeile weisen auf Zellkerne hin, die sich in der Anastomose befinden.

Maßstab = 15 µm

Abbildung 2.13 zeigt zwei Zellkerne in einer Anastomose zwischen zwei benachbarten Hyphen von *Pl. halstedii*. Es fiel auf, dass die Zellkerne in den jeweiligen Hyphen in nahezu regelmäßigen Abständen von ca. 30 µm vorlagen, im Bereich des Übertritts durch die Anastomose aber einen geringeren Abstand aufwiesen. Es ist davon auszugehen, dass Mitochondrien, die wesentlich kleiner sind als die Zellkerne, ebenfalls über Anastomosen ausgetauscht werden können.

2.5 Weitergabe von genetischem Material an asexuell gebildete Nachkommen

Ein wichtiger Aspekt bei der Frage der Rekombination von Merkmalen und der Erhaltung heterokaryontischer Zustände im asexuellen Lebenszyklus biotropher Oomyceten ist die Weitergabe der neu kombinierten genetischen Information an die asexuell gebildeten Nachkommen. Im Mittelpunkt stehen dabei die Sporulation der Pathogene und die Verteilung von Zellkernen während dieses Prozesses. Daher wurden in der vorliegenden Studie mikroskopisch der zeitliche Ablauf der Sporulation, die Bildung von Septen und die Verteilung von Zellkernen am Beispiel *Pl. halstedii* untersucht.

2.5.1 Zeitlicher Ablauf der Sporulation

Mit dem Pathogen infizierte Sonnenblumen-Kotyledonen wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach Induktion der Sporulation (durch Dunkelheit und 100 % Luftfeuchte bei 16 °C) schockgefroren und für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet (s. 4.2.3.3). Abbildung 2.14 zeigt repräsentative Stadien für die einzelnen Zeitabschnitte während der Sporulation. Der gesamte Vorgang lässt sich in drei Phasen unterteilen:

- (i) Streckungsphase: Die Sporangioophoren werden aus den Stomata heraus geschoben und strecken sich.
- (ii) Verzweigungsphase: Die Sporangioophoren bilden Seitenäste und bekommen dadurch ihre baumartige Struktur.
- (iii) Sporangien-Entwicklung: Die Sporangien werden gebildet und wachsen zu ihrer endgültigen Größe heran.

Erste Pathogenstrukturen erschienen bereits eine Stunde nach Induktion der Sporulation an der Oberfläche der Kotyledonen. Damit reagierte das Pathogen sehr schnell auf die optimalen Sporulationsbedingungen. Bei der Streckungsphase konnte mehrfach beobachtet werden, dass mehr als ein Sporangienträger durch eine Spaltöffnung geschoben wurde. An die Streckungsphase schloss sich dann die Verzweigungsphase an, in der an der gestreckten Sporangioophore Seitenäste gebildet wurden. Diese Phase (ii) erstreckte sich über den Zeitraum 3–5 h nach Induktion der Sporulation. Nach ungefähr 6 h begann an den Ast-Enden der baumförmigen Sporangioophoren die Entwicklung der Sporangien, die dann anschließend stetig größer wurden, bis sie nach 8–10 h zu ihrer endgültigen Größe angewachsen waren.

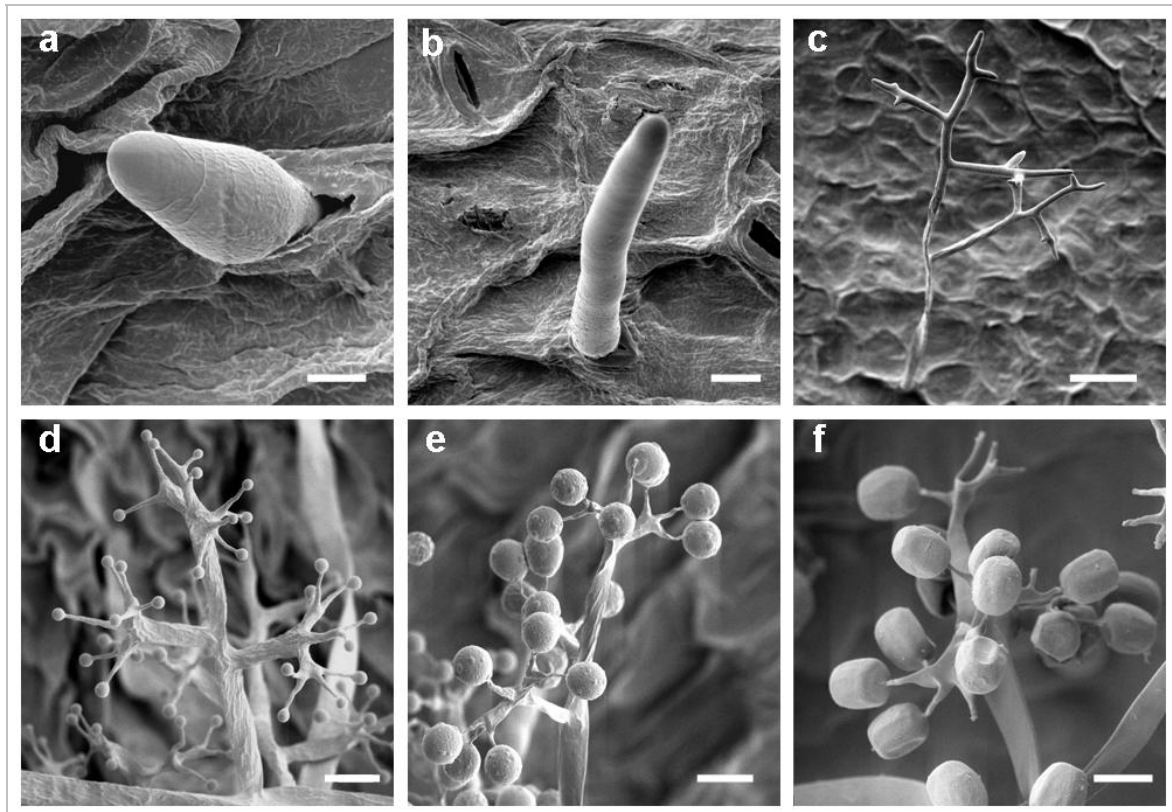


Abb. 2.14: Verlauf der Sporulation bei *Pl. halstedii* (REM)

a, b: Streckungsphase (i); **c:** Verzweigungsphase (ii); **d, e:** Bildung und Schwellung der Sporangien (iii); **f:** fertig entwickelte Sporangien, teilweise schon abgefallen.

a: 1 h nach Induktion der Sporulation; Maßstab = 5 μ m

b: 2 h nach Induktion der Sporulation; Maßstab = 10 μ m

c: 4 h nach Induktion der Sporulation; Maßstab = 50 μ m

d: 6 h nach Induktion der Sporulation; Maßstab = 15 μ m

e: 7 h nach Induktion der Sporulation; Maßstab = 20 μ m

f: 24 h nach Induktion der Sporulation; Maßstab = 15 μ m

Somit konnte der Beginn der Phase (iii) als kritische Periode für die Weitergabe genetischen Materials an die Nachkommen identifiziert werden, da anzunehmen war, dass an dieser Stelle des Sporulationsverlaufs eine Verteilung der Zellkerne und Mitochondrien auf die sich entwickelnden Sporangien stattfindet. Das Auftreten und das Wachstum der Sporangien an einem Sporangienträger verliefen synchron, die verschiedenen Sporangienträger auf einem infizierten Keimblatt variierten hingegen leicht in ihrem Sporulationsfortschritt. Sieben bis acht Stunden nach Induktion der Sporulation hatten die meisten Sporangien ihre finale Größe erreicht, und nach 24 h waren einige bereits von dem Sporangienträger abgefallen. Bei den ausgereiften Sporangien zeigten sich eingefallene Bereiche (vgl. Abb. 2.14 f), die als Präparationsartefakte in Folge von Austrocknung interpretiert werden können. Solche „kollabierten“ Mitosporangien wurden bei ähnlichen Studien an *Peronospora viciae* (FALLOON & SUTHERLAND 1996) und *Plasmopara viticola* (KORTEKAMP *et al.* 1998; RUMBOLZ *et al.* 2002) ebenfalls gefunden

und als natürlicher Prozess interpretiert. Dass die getrockneten Sporangien von *Pl. halstedii* bei Kontakt mit Wasser wieder ihre ursprüngliche Form erlangten und dass bei einem Teil die Keimfähigkeit noch gegeben war (Daten nicht gezeigt), spricht ebenfalls für diese Interpretation.

Für die Weitergabe von genetischem Material von der Ausgangshyphe an die asexuell gebildeten Sporangien sind also vor allem die Sporulationsphasen (ii) und (iii) entscheidend. Dabei ist von Bedeutung, wann und wo im Sporangienträger Septen eingezogen werden, die ein Nachrücken von Hypheninhalt, vor allem aber von Zellkernen, verhindern würden.

2.5.2 Septenbildung während der Sporulation

Um die Septenbildung während der Sporulation bei *Pl. halstedii* mikroskopisch zu untersuchen, wurde die Kallose-spezifische Anfärbung von infiziertem Pflanzenmaterial zu bestimmten Zeitpunkten nach Induktion der Sporulation durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Sporulationsphasen korreliert und sind in Abb. 2.15 dargestellt. Bereits während der Streckungsphase der auswachsenden Sporangienträger waren unregelmäßig verteilte Septen zu erkennen (s. Abb. 2.15 a), die, wenn sie voll ausgebildet waren, ein Dreieck- oder Schnuller-förmiges Erscheinungsbild hatten (s. Abb. 2.15 b). Während der Verzweigungsphase wurden Septen meist an der Basis einer Verzweigungsstelle gebildet (s. Abb. 2.15 c). In der für die Verteilung des genetischen Materials an die Sporangien wichtigen Phase der Sporangien-Bildung und deren Schwellung konnte beobachtet werden, dass sich bereits früh Kallose-Auflagerungen zeigten (leichte Blaufärbung in Abb. 2.15 d), die anschließend ein Septum bildeten. Der Entwicklungsstand des sich entwickelnden Sporangiums, der später noch zu Vergleichs-Zwecken gebraucht wurde, kann durch das Verhältnis von Sporangien-Durchmesser zu Traghyphen-Durchmesser ausgedrückt werden. Dieses Verhältnis betrug im dargestellten Fall 3,2 und war bei allen betrachteten Sporangien, die sich im selben Entwicklungsstand befanden, sehr ähnlich. Das Septum wurde im Abstand von 3 μm zur Basis des schwellenden Sporangiums ausgebildet. Nach anschließender Schwellung des Sporangiums war das Septum an der späteren Trennungsstelle zwischen Traghyphe und Sporangium voll ausgebildet (s. Abb. 2.15 e). Der Abstand des Septums zur Sporangienspitze in Abb. 2.15 d entsprach mit ca. 20 μm der Länge des fertig ausgebildeten Sporangiums in Abb. 2.15 e, so dass angenommen werden kann, dass es sich bei der Kallose-Akkumulation, die in Abb. 2.15 d dargestellt ist, tatsächlich um ein späteres Septum an der Basis des Sporangiums handelt.

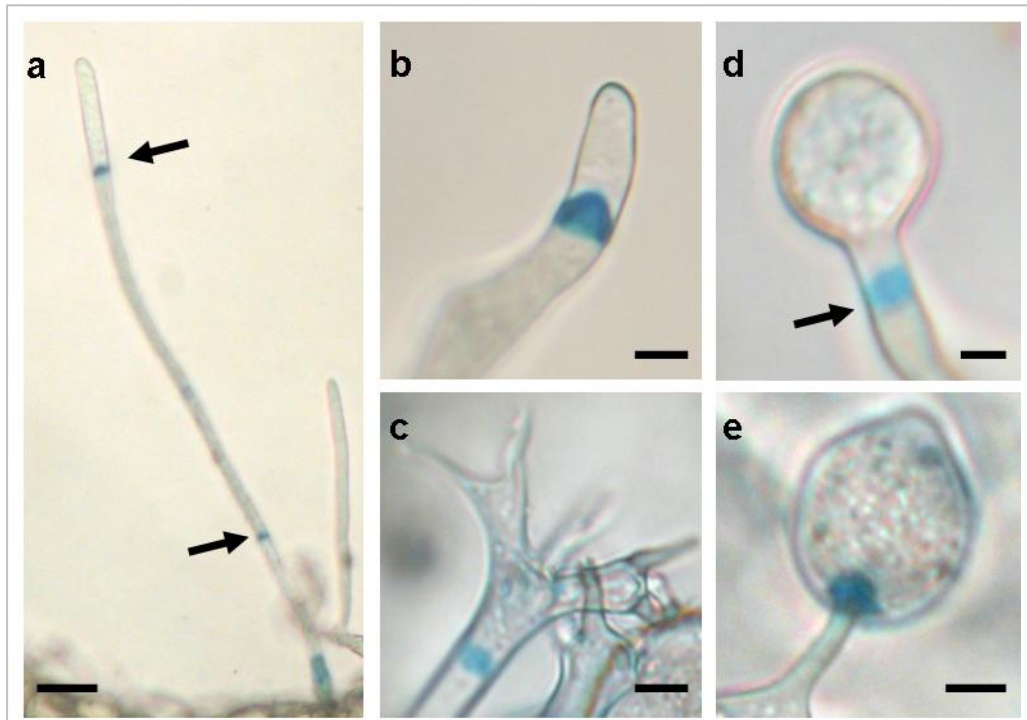


Abb. 2.15: Nachweis von Septen während der verschiedenen Sporulationsphasen von *Pl. halstedii*

a, b: Streckungsphase (i); **c:** Verzweigungsphase (ii); **d, e:** Bildung und Schwellung der Sporangien (iii). Die Pfeile weisen auf die Septen hin, die durch Anilinblau angefärbt wurden. Maßstäbe: a: 20 μm , b: 7 μm , c: 10 μm , d: 3 μm , e: 5 μm

Es ist also davon auszugehen, dass die Verteilung von Zellkernen in der Schwellungsphase kurz nach einem Entwicklungsstand des Sporangiums von Sporangien-Durchmesser zu Traghyphen-Durchmesser = 3,2 abgeschlossen war und dass das bis dahin in das Sporangium eingewanderte Erbgut als Basis aller asexuell gebildeten Nachkommen dieses Sporangiums diente.

2.5.3 Verteilung von Zellkernen während der Sporulation

Neben dem Einzug von Septen ist der optische Nachweis der Zellkerne während der einzelnen Sporulationsphasen ein weiterer entscheidender Punkt zur Aufklärung der Zellkernverteilung auf asexuell gebildete Sporangien. Zur Klärung der Verteilung der Zellkerne während der Sporulation bei *Pl. halstedii* wurden in den verschiedenen Phasen Zellkernfärbungen mit DAPI zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse vorgenommen (s. 4.2.3.2). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 2.16 und 2.17 dargestellt. Während der Streckungsphase (i) der Sporangienogenese akkumulierten die zunächst zerstreuten Zellkerne in der Spitze der auswachsenden Sporangienträgers (s. Abb. 2.16 a, b),

wohingegen sie in der Verzweigungsphase (ii) mehr gleichmäßig verteilt erschienen und in die sich entwickelnden Äste des Sporangienträgers einwanderten (s. Abb. 2.16 c).

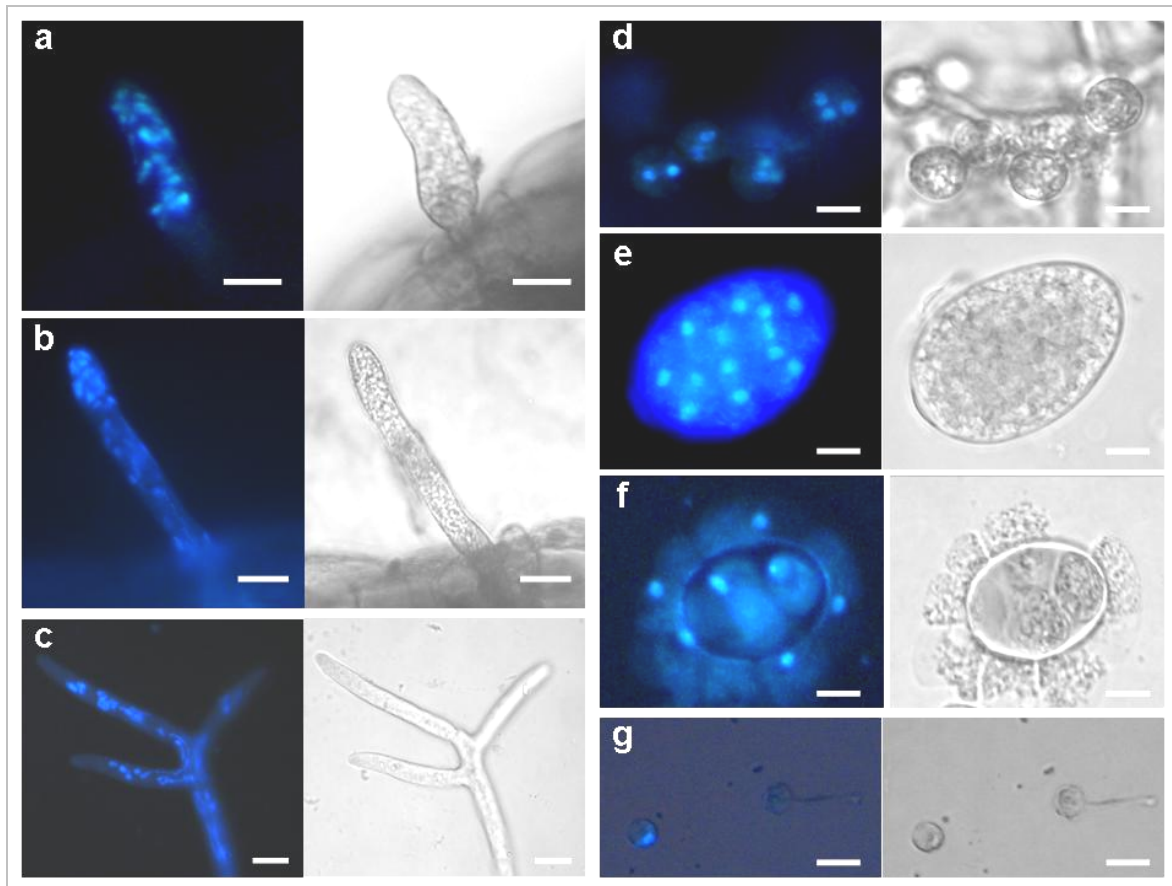


Abb. 2.16: Zellkernverteilung während der Sporulation von *Pl. halstedii*

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei Färbung der Zellkerne mit DAPI (jeweils links) und entsprechende Hellfeldaufnahme (jeweils rechts). **a, b:** Streckungsphase (i) (Maßstab = 10 µm); **c:** Verzweigungsphase (ii) (Maßstab = 15 µm); **d:** Sporangien-Entwicklung (iii) (Maßstab = 5 µm); **e:** reifes Sporangium (Maßstab = 5 µm); **f:** Zoosporen im und außerhalb eines Sporangiums (Maßstab = 7 µm); **g:** encystierte und auskeimende Zoospore (Maßstab = 5 µm)

In der Frühphase der Sporangien-Entwicklung (iii) konnten zwei oder drei Zellkerne pro Sporangium detektiert werden (s. Abb. 2.16 d). Die Anzahl an Zellkernen stieg dann bis zur vollständigen Entwicklung der Sporangien auf 11 oder mehr (s. Abb. 2.16 e) und stimmte im Durchschnitt von $24,9 (\pm 6,3)$ mit der durchschnittlich gezählten Anzahl an freigesetzten Zoosporen von ebenfalls $24,9 (\pm 5,4)$ überein, die anhand von 100 Zoosporen-entlassenden Sporangien festgestellt worden war. Bei den aus einem Sporangium freigesetzten und den noch im Sporangium verbliebenen Zoosporen konnten einzelne Zellkerne detektiert werden (s. Abb. 2.16 f), was zusammen mit einem einzelnen sichtbaren Zellkern in einer encystierten Zoospore (s. Abb. 2.16 g) und mit der Zoosporen-/Zellkern-Anzahl pro Sporangium dafür sprach, dass pro Zoospore ein Zellkern

weitergegeben wurde. Wenn encystierte Zoosporen auskeimten, konnten zunächst keine Zellkerne mehr mit DAPI detektiert werden (s. Abb. 2.16 g), vermutlich, weil die DNA hier nicht kondensiert vorlag. Der für die Weitergabe von genetischem Material wichtige Beginn von Phase (iii) wurde gesondert untersucht.

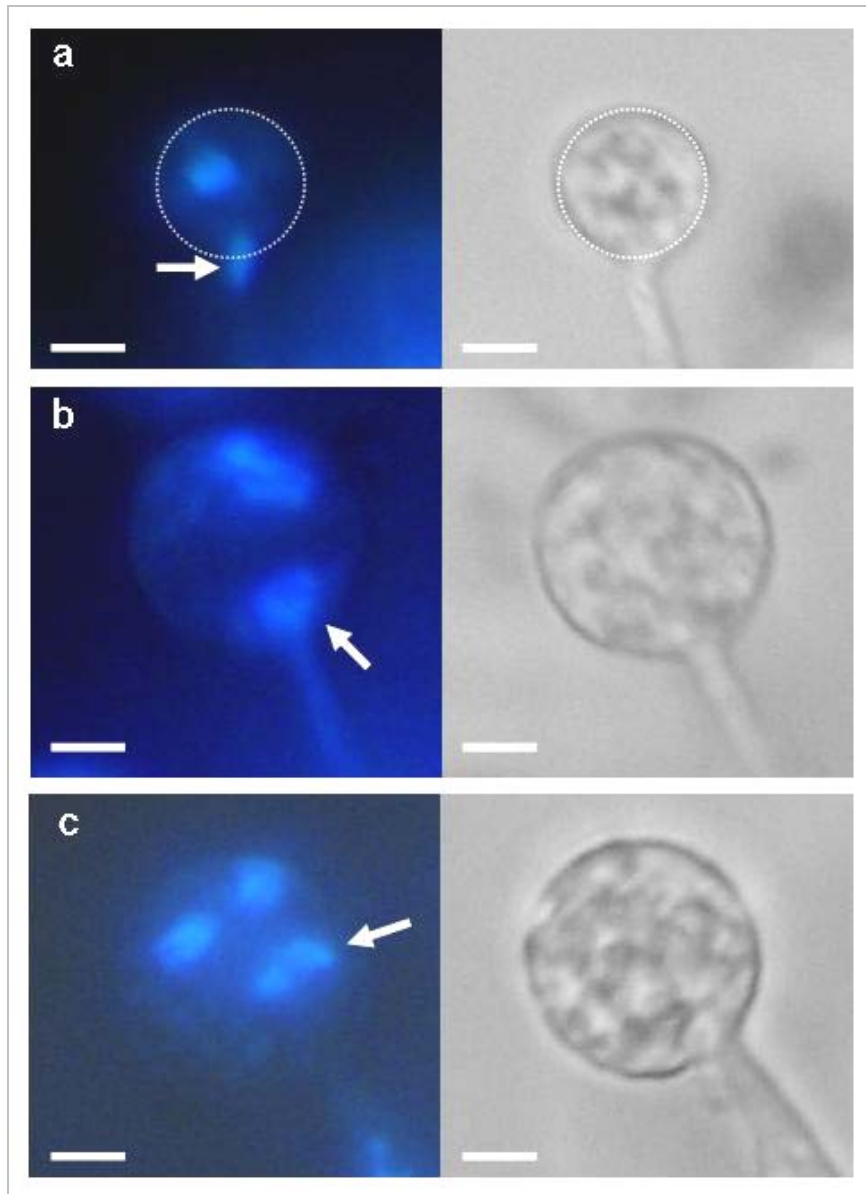


Abb. 2.17: Detail Zellkernverteilung in ein sich entwickelndes Sporangium von *Pl. halstedii*

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei Färbung der Zellkerne mit DAPI (jeweils links) und entsprechende Hellfeldaufnahme (jeweils rechts). **a:** Ein Zellkern (Pfeil) befindet sich an der Basis eines sich entwickelnden Sporangiums, das bereits einen Zellkern enthält. Die gepunktete Linie dient dem Vergleich der beiden Aufnahmen. (Maßstab = 3 μm)

b: Sporangium, das einen basalen Zellkern (Pfeil) und einen periphär gelegenen Zellkern enthält. (Maßstab = 2 μm). **c:** In dem Sporangium befinden sich zwei klar getrennte Zellkerne und zwei weitere Zellkerne, die wahrscheinlich gerade aus einem Zellkern durch Teilung hervorgegangen sind und noch sehr nahe beieinander liegen (Pfeil). (Maßstab = 2 μm)

Es konnte dabei ein Zellkern an der Basis eines Sporangiums gezeigt werden, das bereits einen anderen Zellkern enthielt (s. Abb. 2.17 a). Der festgehaltene Zeitpunkt lag dabei ungefähr bei einem Entwicklungsstand Sporangien-Durchmesser zu Traghyphen-Durchmesser von 3,6, also in einem Stadium, in dem sich das basale Septum unter dem Sporangium bildet (vgl. 2.5.2). Bei Betrachtung eines bereits weiter entwickelten Sporangiums (Sporangien-Durchmesser zu Traghyphen-Durchmesser = 5,0) waren klar zwei Zellkerne in dem Sporangium sichtbar (s. Abb. 2.17 b). Abbildung 2.17 c zeigt ein weiteres Sporangium im Entwicklungsstand Sporangien-Durchmesser zu Traghyphen-Durchmesser = 5,2, in dem neben zwei klar voneinander getrennten Zellkernen zwei sehr nahe beieinander liegende Nuclei zu erkennen sind, die aus durch Teilung eines Zellkerns kurz zuvor entstanden sein könnten. Dieser Befund und die Tatsache, dass in zahlreichen sich entwickelnden Sporangien drei Zellkerne gefunden wurden (vgl. Abb. 2.16 d), unterstützen die Annahme, dass mehr als ein Zellkern in ein Sporangium einwandern, könnten aber auch durch asynchrone Zellkernteilungen erklärt werden.

2.6 Entwicklung eines Transformationssystems zur optischen Markierung von *Plasmopara halstedii*

Die aussichtsreichste Möglichkeit, den Nachweis der Interaktion zwischen Hyphen von *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* zu erbringen, ist die optische Markierung der beiden Interaktionspartner, da so eine Differenzierung unter dem Mikroskop möglich ist. Dabei sind verschiedene Ansätze denkbar. Eine externe Markierung über Farbstoffzugabe an den Inokulationsstellen des Hypokotyls wurde nicht durchgeführt, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Farbstoffe im Doppelinfections-System so stark diffundieren, dass sie beide Interaktionspartner anfärben würden. Versuche mit einer stabilen internen Markierung über Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit Fluoreszenzsonden, die auf den genotypischen Unterschieden zwischen *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* (s. Abschnitt 2.2.1), basieren, waren nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher versucht, eine stabile optische Markierung der beiden Pathogene über Transformation mit einem Fluoreszenzmarker zu erreichen.

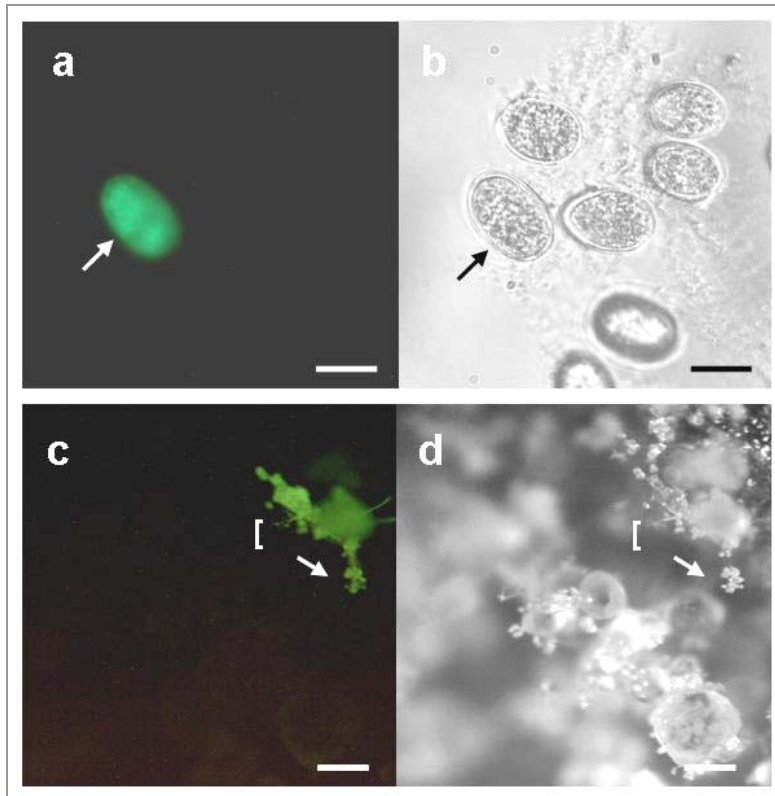


Abb. 2.18: Transiente Expression von *gfp* bei *Pl. halstedii* aus HAMMER (2007)

a + b: Sporangien nach Elektroporation mit p34TRH. Die Pfeile markieren das *gfp*-exprimierende Sporangium. Maßstab = 20 µm

c + d: Sporulation auf einem Sonnenblumen-Keimblatt, in das durch mechanische Perforation (Löchern) der Vektor p34TRH eingebracht wurde. Der *gfp*-exprimierende Sporangienträger ([]) und die Sporangien (→) sind markiert. Maßstab = 350 µm
Links (a + c) sind jeweils fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (488/509 nm), rechts (b + d) die jeweils gleichen Ausschnitte im Hellfeld dargestellt.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte die transiente Expression von *gfp* in Sporangioophoren und Sporangien von *Pl. halstedii* (vgl. Abb. 2.18) erreicht werden (HAMMER *et al.* 2007). Zur Verbesserung dieses Systems sollten nun weitere Transformationsmethoden getestet und Vorbereitungen für die Weiterentwicklung zu einem stabilen Transformationssystem getroffen werden. Dies beinhaltete die Konstruktion neuer Transformationsvektoren und die Entwicklung eines Selektionssystems für erfolgreiche Transformanten.

2.6.1 Herstellung neuer Transformationsvektoren

Der Vektor p34TRH, der für die transiente Expression von *gfp* bei *Pl. halstedii* benutzt worden war, enthielt das *gfp*-Gen, flankiert von einem Oomyceten-spezifischen Promotor und Terminator aus *Bremia lactucae* (HAMMER *et al.* 2007), jedoch keinen Selektionsmarker. Dieser sollte durch die Kombination eines Hemmstoff-Resistenzgens mit dem Fluoreszenzmarker die Selektion der transgenen Pathogene erlauben. Zudem sollten Vektoren mit einem weiteren Fluoreszenzgen hergestellt werden, um später die Möglichkeit zu erhalten, zwei durch Transformation mit unterschiedlichen Farbstoffen markierte Interaktionspartner für Doppelinfektionsstudien nutzen zu können. Da *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation als weitere Methode getestet werden sollte, war die Tauglichkeit der neuen Vektoren für diese Methode bei der Konstruktion ebenfalls zu berücksichtigen. Es wurde daher als Basisplasmid

pGreenII_0000 (HELLENS *et al.* 2000) gewählt, da dieses Plasmid durch eine große Multiple cloning site diverse Konstruktionsmöglichkeiten zulässt und zudem bereits Left-Border- und Right-Border-Abschnitte enthält, die für den Einsatz in *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation gebraucht werden. Als Hemmstoff-Resistenzgene wurden *npII*, das für die Neomycin-Phosphotransferase II codiert (BECK *et al.* 1982), und *hph*, das für die Hygromycin-B-Phosphotransferase codiert (GRITZ & DAVIES 1983), eingesetzt. Als weiterer Fluoreszenzmarker wurde *mCherry* ausgewählt, eine abgewandelte Form von *dsRed*, das für ein rot fluoreszierendes Protein codiert (SHANER *et al.* 2004). Nachdem die Gene *npII*, *hph* und *mCherry* durch PCR aus anderen Plasmiden amplifiziert und dabei mit bestimmten Restriktionsschnittstellen versehen worden waren, wurden sie jeweils einzeln durch Klonierung in das Standardplasmid pBluescriptII KS+ ligiert und durch anschließende Transformation von *Escherichia coli* auf ihre Funktionsfähigkeit hin geprüft (s. 4.2.2.8). Es konnte dabei die volle Funktionsfähigkeit der drei durch PCR gewonnenen Gene nachgewiesen werden (s. Abb. 2.19). Die *gfp*-Kassette wurde hingegen komplett aus dem Plasmid p34TRH (HAMMER *et al.* 2007) herausgeschnitten und verwendet.

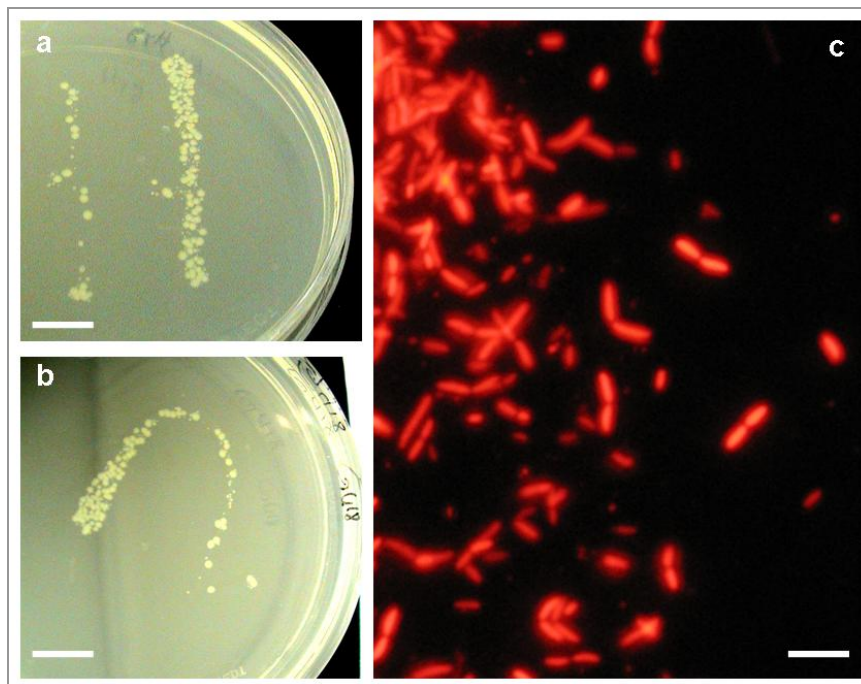


Abb. 2.19: *Escherichia coli* nach Transformation mit pBluescriptII-Plasmiden, in die die Gene *npII* (a), *hph* (b) oder *mCherry* (c) ligiert worden waren

a: *E. coli*-Kolonien auf Bakterien-Agar mit 50 mg/l Hygromycin B;
b: *E. coli*-Kolonien auf Bakterien-Agar mit 50 mg/l G418; c: *E. coli*-Zellen mit *mCherry*-Expression im Fluoreszenzmikroskop, Filtersatz IV.
Maßstab = 1 cm (a, b), bzw. 5 µm (c).

Vor jedes der genannten Gene wurde der *ham34*-Promotor aus *Bremia lactucae* und hinter jedes der Gene der *ham34*-Terminator, ebenfalls aus *Bremia lactucae*, gesetzt, um eine Oomyceten-spezifische Expression zu erreichen (JUDELSON *et al.* 1992). Für die Transformationsversuche wurden diese Plasmide entweder so eingesetzt oder, bei *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation, zunächst in *A. tumefaciens* eingebracht, um dann die transgenen Bakterien als Vektoren mit den Oomyceten gemeinsam zu kultivieren. Die genaue Vorgehensweise der Vektorkonstruktion ist in Abschnitt 4.2.2.8 ausgeführt. Abb. 2.20 zeigt die Plasmidkarten der in dieser Arbeit neu konstruierten Transformations-Plasmide.

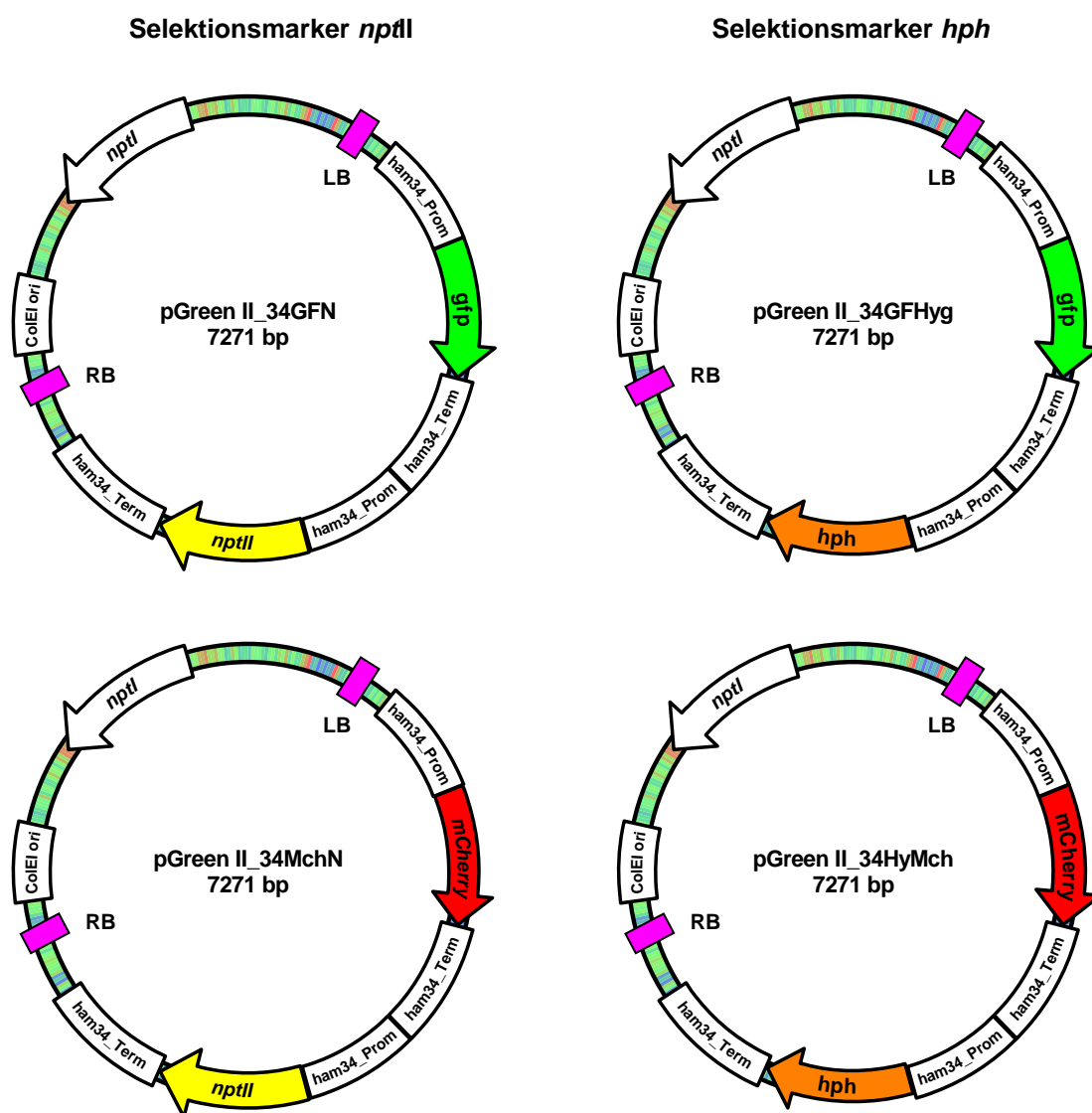


Abb. 2.20: Plasmidkarten der konstruierten Oomyceten-Transformationsplasmide
nptI = Gen für Neomycin-Phosphotransferase I (Ampicillin-Resistenz); ColE1ori = Replikationsursprung *E. coli*; *ham34_Prom* = Ham34-Promotor aus *Bremia lactucae*; *ham34_Term* = Ham34-Promotor aus *Bremia lactucae*; *nptII* = Gen für Neomycin-Phosphotransferase II; *hph* = Gen für Hygromycin-Phosphotransferase; *gfp* = Gen für Green Fluorescent Protein; *mCherry* = Gen für mCherry.

Ein endgültiger Funktionsnachweis der Plasmide, der z. B. durch die Transformation von *Phytophthora infestans* hätte erreicht werden können, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden. Da bei den Transformationsversuchen an *P. infestans* (s. 4.2.2.10) eine etablierte Methode verwendet wurde, aber auch bei Einsatz des aus der Literatur bekannten funktionsfähigen Plasmids p34GF als Positivkontrolle keine Transformanten isoliert werden konnten, bleibt unklar, ob die Nicht-Aufnahme der Plasmide oder die ausbleibende bzw. fehlerhafte Expression der eingebrachten Gene für das Scheitern der Transformation verantwortlich waren. Da die neu konstruierten Plasmide durch Sequenzierung überprüft wurden (s. 4.2.2.8) und dabei keine Unregelmäßigkeiten, wie z. B. Leserahmen-Verschiebungen („frame shift“) zu finden waren, konnte die Funktionsfähigkeit in Oomyceten erwartet werden.

Der beste und einfachste Weg der Selektion transgener Individuen wäre über eine Fungizid-Resistenz zu erreichen, da dann ein massiver Selektionsdruck angelegt werden könnte, ohne dass die Wirtspflanze beeinträchtigt wäre. Gelänge es, die genetischen Hintergründe der Phenylamid-Resistenz aufzuklären, könnte ein Metalaxyl-Resistenzgen dabei als Selektionsmarker dienen. Bis diese genetischen Grundlagen jedoch aufgeklärt sind, muss mit anderen Hemmstoffen und den dazugehörigen Resistenzgenen gearbeitet werden.

2.6.2 Entwicklung eines Selektionssystems

Selektion *in vivo*

Der Einbau von Hemmstoff-Resistenzen als Selektionsmarker erhöht zum einen die Wahrscheinlichkeit der Expression der eingebrachten DNA-Abschnitte und ermöglicht zudem die Selektion der erfolgreich transformierten Individuen durch Kultivierung auf einem Selektions-Medium, auf dem nur die transgenen Individuen überleben können. Da chemische Inhibitoren für Eukaryonten auch die Wirtspflanze schädigen können, ohne die *Plasmopara* nicht kultiviert werden kann, war es nötig, Hemmstoff-Kandidaten für das gesamte Pathosystem und nicht nur einzeln an dem jeweiligen Erreger zu testen. Als Vorbereitung für ein stabiles Transformationssystem für *Pl. halstedii* wurden drei Eukaryonten-Hemmstoffe am Pathosystem *H. annuus/Pl. halstedii in vivo* getestet. Da keine Hemmstoff-resistenten Sonnenblumen als Wirtspflanzen zur Verfügung stehen, wurden neben dem Einfluss der Inhibitoren auf das Wachstum und die Sporulation von *Pl. halstedii* auch die Schäden an den Sonnenblumen-Kotyledonen, auf denen die Versuche durchgeführt wurden, untersucht. Ein Schaden wurde dabei definiert als das Auftreten einer deutlich sichtbaren Veränderung des Pflanzen-Gewebes in Form von Chlorosen und Nekrosen im Vergleich zur Kontrolle ohne Hemmstoff. Die Sporulation von

Pl. halstedii wurde als gehemmt eingestuft, wenn auf den behandelten Blattstücken eine Woche nach Beginn der Sporulation in unbehandelten Kontrollen keine Sporangioophoren zu finden waren. Die Ergebnisse der Hemmstoff-Versuche sind in Tabelle 2.6 aufgetragen.

Tab. 2.6: Anwendung verschiedener Standard-Hemmstoffe auf das Pathosystem Sonnenblume/*Pl. halstedii*

Konz. = Konzentration des Hemmstoffes in H₂O; 0 = Kontrolle H₂O ohne Hemmstoff;

+ = eindeutig sichtbar; – = nicht sichtbar. Grau hinterlegt sind zur Selektion geeignete Ansätze.

Konz. [µg/ml]	G418		Konz. [µg/ml]	Neomycin		Konz. [µg/ml]	Hygromycin B	
	Schaden <i>H. annuus</i>	Sporulation <i>Pl. halstedii</i>		Schaden <i>H. annuus</i>	Sporulation <i>Pl. halstedii</i>		Schaden <i>H. annuus</i>	Sporulation <i>Pl. halstedii</i>
0	–	+	0	–	+	0	–	+
1	–	+	1	–	+	0,5	–	–
1,5	–	+	2	–	+	1	–	–
2	–	+	5	–	+	1,5	–	–
2,5	+	–	10	–	+	2	+	–
3	+	–	20	–	–	5	+	–
3,5	+	–	50	+	–	10	+	–
5	+	–	100	+	–	50	+	–

Bei den getesteten Hemmstoffen G418 (Geneticin) und Neomycin zeigte sich, dass bei niedrigen Konzentrationen das Wachstum und die Sporulation von *Pl. halstedii* nicht gehemmt wurden und dass ab einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Wirkstoffs deutliche Schäden an den Sonnenblumen-Kotyledonen entstanden. Unter dem Einfluss von Hygromycin B war hingegen keine Sporulation von *Pl. halstedii* zu beobachten, und Schäden an der Wirtspflanze traten erst ab einer Konzentration von 2 µg/ml auf. Für einen Einsatz als Selektionsmittel in diesem Pathosystem muss aber das Pathogen-Wachstum gehemmt werden, ohne dass Schäden am Wirtsgewebe entstehen, da der obligat biotrophe Erreger ja immer auf vitales Pflanzensubstrat angewiesen ist. Dies war bei Neomycin in einem Konzentrationsbereich um 20 µg/ml und bei Hygromycin B zwischen 0,5 und 1,5 µg/ml der Fall. G418 eignet sich nicht als Selektionsmittel *in vivo*, da bei Konzentrationen, bei denen das Pathogen-Wachstum gehemmt wird, bereits starke Schäden am Wirtsgewebe entstehen. Somit konnten zwei Hemmstoffe für die Anwendung als Selektionsmittel am Pathosystem *H. annuus/Pl. halstedii* gefunden werden, für die auch jeweils ein Resistenzgen zur Verfügung stehen: Das *nptII*-Gen vermittelt die Resistenz gegen Neomycin, das *hph*-Gen gegen Hygromycin B.

Selektion auf künstlichen Medien

Da die Einsatzmöglichkeiten von Hemmstoffen am Pathosystem *H. annuus/Pl. halstedii* *in vivo* sehr eingeschränkt waren, wurden Versuche zur Selektion auf Agarplatten durchgeführt. Dies würde zum einen erlauben, auch G418 und weitere Hemmstoffe einzusetzen und die Konzentrationen zu erhöhen, um eine schnelle und verlässliche Selektion zu garantieren. Sporangien von *Pl. halstedii* können auf Agarplatten zur Freisetzung der Zoosporen gebracht werden. Die Zoosporen müssen dann jedoch relativ schnell auf die Wirtspflanze überführt werden, um eine erfolgreiche Infektion zu erreichen. Für eine erfolgreiche Selektion potenziell transgener Sporangien in dieser Phase bedarf es aber einer längeren Zeitspanne, damit nicht-transgene Individuen zuverlässig abgetötet werden. In einer Versuchsreihe wurden daher verschiedene Kultur-Medien und Inkubationsparameter verglichen, um eine möglichst lange Kultivierung der Sporangien und Zoosporen auf künstlichen Medien zu erreichen. Es wurden vier unterschiedliche Medien verglichen, die sich in ihrem Salzgehalt unterschieden. Dabei wurde eine „Diluted Salts“-Mischung (DS) (s. 4.2.1.2) in unterschiedlichen Konzentrationen von einem Medium ohne Salze bis hin zur doppelten DS-Konzentration eingesetzt. Alle Medien enthielten 0,8 % Agar-Agar und 10 µg/ml Rifampicin zur Inhibition von Bakterienkontamination. Von infizierten Sonnenblumen-Kotyledonen wurden nach Induktion der Sporulation die Sporangien von *Pl. halstedii* durch Abklatschen auf die verschiedenen Agar-Platten überimpft und diese dann bei 4 °C bzw. 16 °C im Dunkeln inkubiert. Täglich wurde mikroskopisch überprüft, ob vitale, mobile Zoosporen zu finden waren und welcher Anteil der ausgebrachten Sporangien bereits Zoosporen entlassen hatte. Jeder Versuchsansatz wurde in zehn Wiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.21 grafisch dargestellt. Dabei sind zwei Vitalitätsmarker aufgeführt: die maximale Zeitspanne nach Ausbringen der Sporangien, nach der noch mobile Zoosporen auf dem Medium zu finden waren, und die durchschnittliche Keimrate der Sporangien. Zusätzlich wurden alle Versuche auch unter Zugabe von 20 µg/ml G418, 50 µg/ml Neomycin oder 10 µg/ml Hygromycin B ins Medium durchgeführt, was aber ohne Ausnahme immer zur vollständigen Hemmung der Sporangien-Keimung führte (Daten nicht gezeigt).

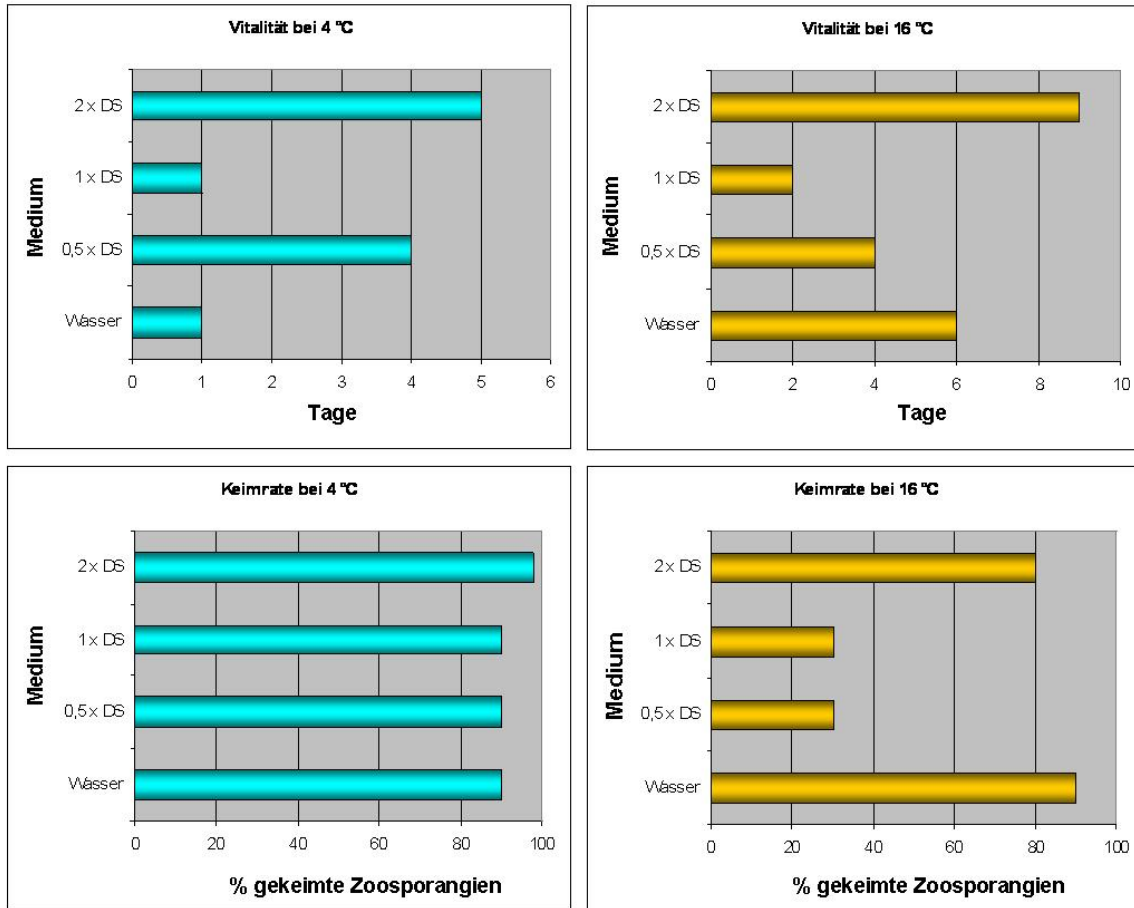


Abb. 2.21: Kultivierung von *Pl. halstedii* auf künstlichen Medien

Überprüft wurden die Vitalität (oben) und die Keimrate (unten) bei 4 °C (links) bzw. 16 °C (rechts). Bei den Vitalitäts-Tests ist aufgetragen, nach wie vielen Tagen maximal noch mobile Zoosporen auf den verschiedenen Medien beobachtet wurden. Bei den Tests zur Keimrate ist der durchschnittliche Anteil an ausgekeimten Sporangien in Prozent auf dem jeweiligen Medium aufgetragen.

Die unterschiedlichen Kultivierungsparameter hatten einen deutlichen Einfluss auf die Vitalität von *Pl. halstedii*. So waren bei 4 °C nur auf 0,5x DS und 2x DS nach vier bzw. fünf Tagen noch vitale Zoosporen zu finden. Auf den anderen beiden Medien waren diese bereits nach spätestens einem Tag geplatzt. Bei Inkubation bei 16 °C hingegen nahm die Vitalität mit steigender Salzkonzentration ab, bei 2x DS aber schlagartig zu, so dass auf diesem Medium und 16 °C Inkubationstemperatur nach neun Tagen noch vitale Zoosporen detektiert werden konnten. Die Keimraten waren bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C unabhängig vom Medium recht hoch und lagen immer zwischen 90 % und 99 %. Die Inkubation bei 16 °C brachte nur auf dem Medium ohne Salze und auf 2x DS Keimraten von 80 % und mehr hervor, auf den beiden anderen Medien keimten lediglich 30 % der Zoosporangien. Um ein effektives Selektionssystem zu erhalten, sollte die Keimrate der Zoosporangien möglichst hoch sein, und freigesetzte

Zoosporen sollten möglichst lange vital sein. Betrachtet man die Ergebnisse in Abb. 2.20, so konnten bei Inkubation bei 4 °C die Medien 0,5× DS und 2× DS, bei Inkubation bei 16 °C die Medien ohne Salze und 2× DS diese Kriterien erfüllen: Die jeweils erzielte Keimrate von mindestens 80 % ist ausreichend, und die Zoosporen überlebten je nach Salzgehalt vier bis neun Tage auf den künstlichen Medien. Damit kommen diese Inkubationsparameter für ein *Pl. halstedii*-Selektionssystem auf Agarplatten in Frage.

2.6.3 Vergleich verschiedener Transformationsmethoden

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Transformationsversuche an *Pl. halstedii* durchgeführt und dabei die Standardmethoden Elektroporation und Goldpartikel-Beschuss („Particle Gun“), sowie eine neue Methode zur mechanischen Einbringung der Plasmide („Löchern“) verglichen (HAMMER 2005). Als Ziele dienten dabei sowohl Zoosporangien (Elektroporation, Goldpartikel-Beschuss) als auch Hyphen („Löchern“). Die transiente Expression von *gfp* konnte bei Einsatz von Elektroporation und dem neuen mechanischen Verfahren erreicht werden (HAMMER 2005; HAMMER *et al.* 2007). Daran anknüpfend wurden in der vorliegenden Arbeit als weitere Transformationsmethoden die Lipofektion nach Protoplastierung von Sporangien sowie die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation untersucht. Da die Funktionsfähigkeit der neu konstruierten Plasmide noch nicht erbracht worden war (s. 2.6.1), wurden zur Kontrolle die Plasmide p34GF (SIAMMOUR *et al.* 2003) und p34TRH (HAMMER *et al.* 2007) eingesetzt, was aber ebenfalls nicht zu einer erfolgreichen Transformation mit den hier erläuterten Methoden führte. Dafür sind unterschiedliche Gründe denkbar. So gelang zwar das Generieren von Protoplasten aus Sporangien von *Pl. halstedii* durch den enzymatischen Verdau der Sporangien-Wand, nahm aber eine relativ lange Zeit in Anspruch (s. 4.2.2.10). Nach anschließender Lipofektion mit Polyethylenglycol (PEG), bei der die Fremd-DNA in die Protoplasten eingeschleust wurde, war es nicht mehr möglich, vitales Pathogen-Material aus den Protoplasten zu regenerieren und zu selektieren. Auch die Elektroporation der Protoplasten brachte nicht den gewünschten Erfolg. Bei *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation (s. 4.2.2.10) war die erforderliche Co-Inkubation von *Pl. halstedii* und transgenen Agrobakterien der limitierende Faktor, da eine lange Co-Inkubationsphase die Transformationswahrscheinlichkeit deutlich erhöhte, gleichzeitig jedoch die Regenerationsfähigkeit von *Pl. halstedii* empfindlich einschränkte. Somit konnte in diesen Vorversuchen zur Schaffung eines stabilen Transformationssystems in keinem Fall ein transformiertes Individuum von *Pl. halstedii* isoliert werden. Bei nicht-biotrophen Oomyceten wurden in früheren Studien erfolgreiche stabile Transformationen berichtet, bei obligat biotrophen Oomyceten jedoch bislang nur die transiente Expression

von *gfp* bei *Plasmopara halstedii* (HAMMER *et al.* 2007) und *Plasmopara viticola* (DUBRESSON *et al.* 2008). Die meisten Transformationsversuche wurden an der Gattung *Phytophthora* durchgeführt. Neben der chemischen Transformation von Protoplasten (BAILEY *et al.* 1991; JUDELSON & MICHELMORE 1991; JUDELSON *et al.* 1991; JUDELSON *et al.* 1992; BOTTIN *et al.* 1999; VAN WEST *et al.* 1999) waren auch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (VIJN & GOVERS 2003) und Partikelbeschuss (CVITANICH & JUDELSON 2002) erfolgreich. Eine weitere Transformationsmethode stellte die Elektroporation dar, mittels derer Protoplasten des Oomyceten *Pythium aphanidermatum* erfolgreich transformiert wurden (WEILAND 2003). Auch andere Transformationsstudien an Oomyceten, z. B. an *Phytophthora parasitica*, zeigen, dass die eingebrachten Sequenzen nicht stabil integriert werden und es bei Einzel-Zoosporenlisolaten zu einem Verlust der transgenen DNA-Abschnitte kommt (GAULIN *et al.* 2007). Die stabile Transformation eines obligat biotrophen Oomyceten ist somit bislang noch nicht gelungen, stellt aber mit Sicherheit einen wichtigen Meilenstein für zukünftige Experimente an biotrophen Oomyceten dar.

2.7 Dualinfektionen mit zwei unterschiedlichen Stämmen von *Peronospora tabacina*

Den in den vorherigen Abschnitten vorgestellten Ergebnissen für die Interaktion zwischen *Pi. halstedii* und *Pi. angustiterminalis* sollte eine zweite Fallstudie an dem genetisch sehr wenig variablen (SUKNO *et al.* 2002b; ZIPPER *et al.* 2009) Blauschimmel-Erreger des Tabaks, *Peronospora tabacina*, gegenübergestellt werden. Da bei diesem Pathogen bisher der Nachweis eines sexuellen Zyklus fehlt (BLANCARD 1998), scheint ein Austausch von genetischem Material zwischen zwei Stämmen von *Per. tabacina* auf dem für *Plasmopara* dargestellten Weg während der vegetativen Phase im Wirtsgewebe denkbar. Aus einem Feldisolat (OS-968) konnte durch Vereinzelung von Sporangien mit einem Mikromanipulator ein Metalaxyl-resistenter (OS-968 S14) und ein Metalaxyl-sensitiver (OS-968 J2) Pathogenstamm gewonnen werden (s. 4.2.1). Der sensitive Stamm, der im Folgenden nur noch als Met^S bezeichnet wird, führte bei Inokulation von Tabak-Blattscheiben ab einer Metalaxyl-Konzentration von 0,1 ppm nicht mehr zur Sporulation, während der tolerante Stamm, im Folgenden Met^R genannt, selbst bei Metalaxyl-Konzentrationen über 10 ppm noch infektiös war, was durch Sporulation sichtbar wurde. Durch die Einzelsporangien-Infektion unter selektiven und nicht-selektiven Bedingungen entstanden zwei durch ihre Metalaxyl-Toleranz unterscheidbare, in sich genetisch homogene Stämme des Erregers, mit denen die im Folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt wurden.

Zur eindeutigen Identifizierung der beiden Pathogen-Typen wurde ein spezifisches PCR-System entwickelt (Details s. 2.9.1), das die Möglichkeit bot, direkt einzelne Sporangienträger mit Sporangien einem der beiden Stämme von *Per. tabacina* zuzuordnen (vgl. Abb. 2.22).

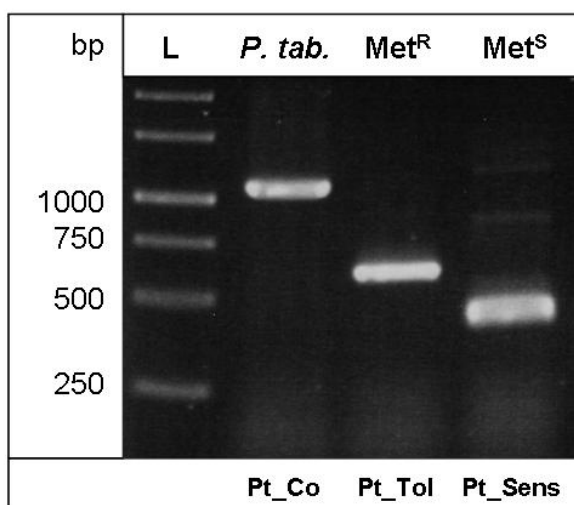


Abb. 2.22: PCR mit spezifischen Primern und einzelnen Sporangienträgern von *Peronospora tabacina*

L = 1-kb-DNA-Leiter; *P. tab.* = Einzelsporangio-phore vom Gesamt-Isolat *Per. tabacina* OS-968; Met^R = Einzelsporangio-phore von OS-968 S14; Met^S = Einzelsporangio-phore von OS-968 J2. Es wurden die Primer Pt_Co, Pt_Tol und Pt_Sens eingesetzt.

Zunächst wurden mit den beiden *Per. tabacina*-Stämmen Met^R und Met^S Dualinfektionen auf Blättern von *Nicotiana benthamiana* vorgenommen (s. 4.2.1.1) und die nach 6, 7, 10 und 11 Tagen durch Sporulation herausgetretenen asexuell gebildeten Nachkommen (F₀) durch Abklatschen auf ein frisches Blatt überimpft. Dieses frisch inokulierte Blatt wurde anschließend in quadratische Stücke mit ca. 1 cm Kantenlänge geschnitten und diese Blattsscheiben auf H₂O oder einer Metalaxyl-Lösung (1 ppm in H₂O) inkubiert. Die Blattstücke wurden nun täglich auf Sporulation untersucht und gegebenenfalls hervorgetretene Sporangienträger mit Sporangien (F₁) abgenommen und mit Hilfe des PCR-Testsystems überprüft. Hierfür wurden einzelne Sporangienträger mit einer feinen Pinzette abgesammelt und direkt der PCR zugeführt (s. 4.2.2.2). Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 2.23 schematisch die Vorgehensweise bei den Dualinfektionen mit den beiden *Per. tabacina*-Stämmen.

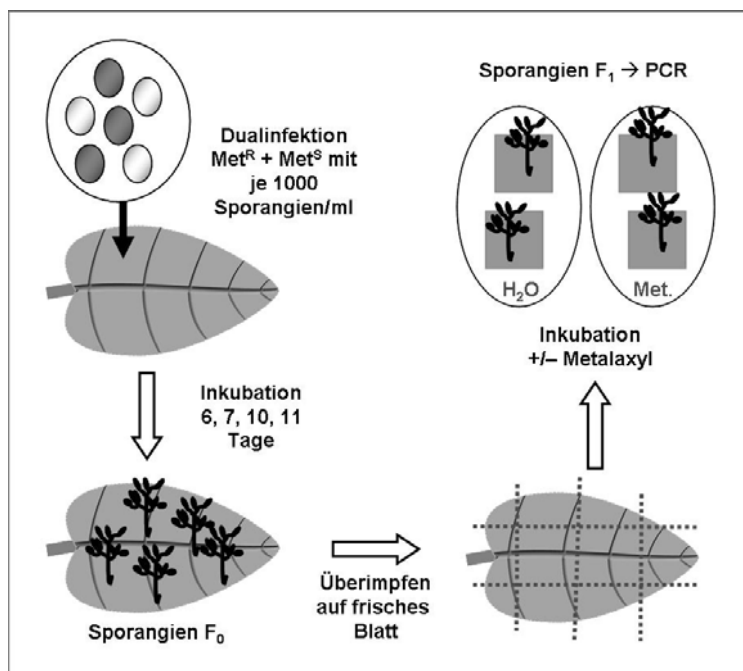


Abb. 2.23: Schematische Darstellung des Metalaxyl-Biotests nach Dualinfektionen von *Nicotiana benthamiana* mit *Peronospora tabacina* Met^R und Met^S. Die asexuell gebildeten Sporangien wurden nach den Blattsscheibentests weiterkultiviert und für phäno- und genotypische Untersuchungen verwendet.

Es wurde also zum einen unterschieden, wie lange die Inkubationszeit nach Dualinfektion bis zum Abklatschen der F₀-Tochter-Sporangien war, und zum anderen, ob die Blattstücke anschließend bei An- oder Abwesenheit von Metalaxyl inkubiert wurden. Bei einer Interaktion der beiden inokulierten Stämme im Wirtsgewebe mit Merkmalsrekombination wie sie im Vorfeld bei *Plasmodium* beschrieben wurde, könnte man, bei einer hypothetischen Übertragung des Merkmals Metalaxyl-Toleranz, die PCR-Detektion des Genotyps Met^S unter den bei Anwesenheit von Metalaxyl kultivierten F₁-Sporangien erwarten. Die Ergebnisse der Dualinfektions-Versuche mit anschließendem PCR-Test sind in Tab. 2.7 dargestellt.

Tab. 2.7: PCR-Test mit einzelnen Sporangienträgern (F₁) von *Per. tabacina* nach Dualinfektion mit den Typen Met^R und Met^S

Bei Inkubation auf Metalaxyl wurde eine Konzentration von 1 ppm verwendet.

k. S. = keine Sporulation

Inkubation nach Dualinfektion	Medium	Anzahl positiver Proben	PCR-Signal Met ^R	PCR-Signal Met ^S
6 Tage	H ₂ O	6	0	6
7 Tage	H ₂ O	3	0	3
10 Tage	H ₂ O	7	0	7
11 Tage	H ₂ O	11	9	2
6 Tage	Metalaxyl	k. S.	--	--
7 Tage	Metalaxyl	k. S.	--	--
10 Tage	Metalaxyl	18	18	0
11 Tage	Metalaxyl	14	14	0

Die Ergebnisse der Dualinfektionen zeigen, dass bei Inkubation der infizierten Blattscheiben unter Anwesenheit von Metalaxyl stets nur der PCR-Genotyp Met^R detektiert werden konnte. Bei Inkubation ohne das Fungizid wurden Sporangienträger beider Typen nachgewiesen, Typ Met^R allerdings frühestens nach elf Tagen Inkubation. In keinem Fall wurden jedoch beide Typ-spezifischen Signale in einem Sporangienträger detektiert.

Zehn infizierte Blattscheiben des Wasser-Ansatzes mit Sporangien beider Stämme wurden für eine zusätzliche Untersuchung weiterverwendet. Die Sporangien wurden zur Inokulation von frischen Blattscheiben benutzt, die dann erneut ohne Selektionsdruck kultiviert wurden. Diese Weiterkultivierung der Mischung der beiden Pathogenstämme ohne Selektionsdruck wurde für vier asexuelle Vermehrungszyklen durchgeführt. Dabei fiel auf, dass in den ersten beiden Generationen noch beide Typen detektiert werden konnten, ab der dritten Generation aber nur noch Typ Met^S, dem somit für dieses Testsystem eine höhere Fitness bescheinigt werden kann.

Mikroskopische Untersuchung von infizierten Blattstielen

Das bei den Untersuchungen zu *Pl. halstedii* vorgestellte Doppel-Infektionssystem (vgl. 2.4.1) wurde auf die *Per. tabacina*-Studie übertragen. 3 cm lange Blattstiele von *Nicotiana benthamiana* wurden an den abgeschragten Enden mit den *Per. tabacina*-Typen Met^R bzw. Met^S inokuliert und anschließend mikroskopisch nach Anastomosen

zwischen benachbarten Hyphen abgesucht (s. 4.2.1.1). Dabei konnten solche Hyphenbrücken weder bei einseitiger Inokulation mit einem Stamm, bei beidseitiger Inokulation mit einem Stamm, noch bei Doppelinfektion mit beiden Stämmen beobachtet werden.

Somit konnten in diesen Dualinfektions-Studien keine Anhaltspunkte für asexuelle Rekombination bei *Peronospora tabacina* gefunden werden. Da aber bekannt ist, dass die beiden Pathogen-Typen auch in der Natur auf derselben Wirtspflanze vorkommen und parasexuelle Interaktionen, wie sie zuvor für die beiden *Plasmopara*-Spezies gezeigt wurden, zu erwarten gewesen wären, wurden die beiden Phänotypen näher charakterisiert.

2.8 Phänotypische Differenzierung bei *Peronospora tabacina*

Da es bei *Peronospora tabacina* keine sortenspezifischen Rassen wie z. B. bei *Plasmopara halstedii* gibt, war bislang nur die Toleranz gegenüber Metalaxyl als phänotypisches Unterscheidungsmerkmal der beiden Typen Met^R und Met^S vorhanden.

2.8.1 Sporulationsschnelligkeit

Allgemein fiel auf, dass bei Kultivierung des Typs Met^R die Sporulation deutlich später einsetzte als bei dem unter den gleichen Bedingungen kultivierten Typ Met^S. Infolgedessen wurden ebenfalls mit dem beiden Stämmen OS-968 S14 (Met^R) und OS-968 J2 (Met^S) Dualinfektionen auf Tabak-Blättern durchgeführt, die den im vorherigen Abschnitt vorgestellten entsprachen (s. Abb. 2.23), außer, dass die Sporangien der F₀-Generation 7, 9, 11, 13 und 15 Tage nach der Dualinfektion durch Abklatschen auf frische Blätter überimpft wurden. Anschließend wurde, wie in Abb. 2.23 dargestellt, ein Metalaxyl-Biotest durchgeführt. Dieser war für Sporangien negativ, die 7, 9 und 11 Tage nach Beginn der Dualinfektion übertragen worden waren. Dies bedeutet, dass in den ersten 11 Tagen ausschließlich Sporangien des Typs Met^S überimpft worden waren. Bei allen Sporangien, die 13 Tage nach Dualinfektion und später übertragen wurden, war der Metalaxyl-Test positiv, es waren also Sporangien des Typs Met^R bzw. beider Typen überimpft worden. Dies ließ den Schluss zu, dass der Pathogen-Typ Met^R unter gleichen Kulturbedingungen frühestens 5 Tage nach dem Typ Met^S sporulierte und damit eine deutlich geringere Sporulationsschnelligkeit zeigt.

2.8.2 Sporangienmorphologie

Bei den Untersuchungen zu den beiden Phänotypen von *Per. tabacina* fielen Unterschiede in der Sporangienmorphologie auf, die dann im Hinblick auf die Variabilität des Tabak-Blauschimmels näher betrachtet wurden. Dafür wurden jeweils 100 Sporangien in ihrer Länge und Breite vermessen (s. 4.2.3.1) sowie das Verhältnis Länge zu Breite berechnet (s. Tab. 2.8).

Die Ergebnisse der Sporangien-Vermessung zeigten deutliche Unterschiede zwischen den beiden hier untersuchten Stämmen von *Per. tabacina*. Typ Met^S besaß insgesamt längere und breitere Sporangien als Typ Met^R und zwar sowohl bezüglich des Mittelwerts als auch der Extremwerte. Met^S bildete also eher ovale, Met^R eher runde Sporangien aus.

Tab. 2.8: Vermessung der Sporangien von *Per. tabacina* Typ Met^R und Typ Met^S (n = 100)

Ø = Mittelwert, Min. = Minimum, Max. = Maximum. Werte mit unterschiedlicher Kennung (a, b) sind signifikant unterschiedlich ($|t| > 1,97$; $p < 0,05$).

Sporangien-Eigenschaft	<i>Per. tabacina</i> 968 S14 (Met ^R)	<i>Per. tabacina</i> 968 J2 (Met ^S)
Länge Ø [µm]	17,2 ± 1,60 a	21,9 ± 2,65 b
Länge Min. [µm]	14,4	17,0
Länge Max. [µm]	20,8	29,9
Breite Ø [µm]	14,2 ± 1,09 a	16,5 ± 1,59 b
Breite Min. [µm]	11,8	12,8
Breite Max. [µm]	16,9	22,9
Länge : Breite Ø	1,22 ± 0,11 a	1,33 ± 0,16 b
Länge : Breite Min.	1,02	1,05
Länge : Breite Max.	1,53	1,89

Außerdem zeigte Met^S eine höhere Variabilität in der Sporangiengröße, was sich in der größeren Standardabweichung bei den drei untersuchten Eigenschaften ausdrückte. Die statistische Absicherung der Messergebnisse mit dem *t*-Test ergab bei ausreichender Stichprobengröße einen signifikanten Unterschied der beiden untersuchten Typen in den drei gemessenen Merkmalen Länge, Breite und Länge zu Breite. Somit stellt die Morphologie der Sporangien ein bislang nicht beschriebenes weiteres phänotypisches Unterscheidungsmerkmal der beiden bisher bekannten Phänotypen von *Per. tabacina* dar.

2.8.3 Isozym-/Allozym-Muster

Die Variabilität zwischen einzelnen Individuen einer Population lässt sich anhand der Isozym-/Allozym-Muster untersuchen (zur genauen Vorgehensweise s. 4.2.2.11). Zum Vergleich der beiden *Per. tabacina*-Stämme wurden die Enzym-Muster der Malat-Dehydrogenase (MDH) und der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) verglichen. Die Ergebnisse der Cellulose-Acetat-Elektrophorese und der anschließenden Enzym-spezifischen Färbung sind in Abb. 2.24 dargestellt.

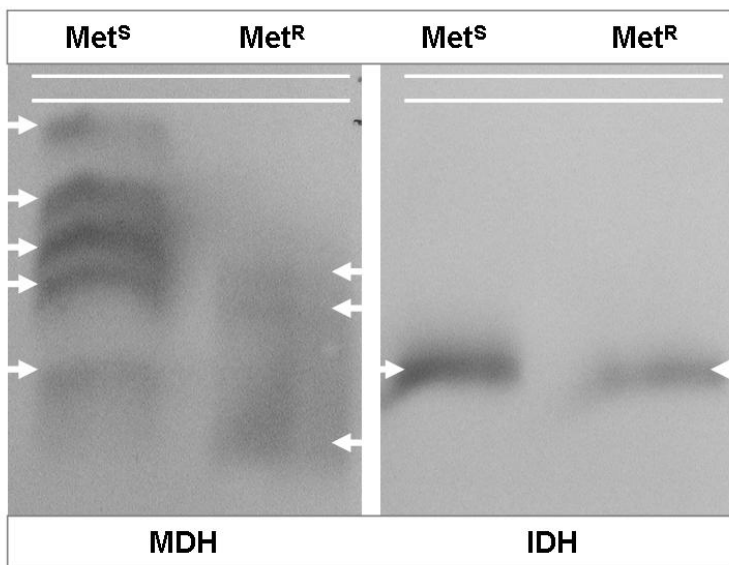


Abb. 2.24:
Cellulose-Acetat-Elektrophorese und Isozym-/Allozym-Trennung bei *Per. tabacina* *Met^R* und *Met^S*
 Nachweis von Malat-Dehydrogenase (MDH) links und Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) rechts. Die weißen Linien markieren den Bereich, in dem der Protein-Extrakt aufgetragen wurde (Start). Die Pfeile zeigen die Lage der Banden an.

Die Cellulose-Acetat-Elektrophorese zeigte, dass sich die beiden Isolate hinsichtlich ihres Enzymmusters der Malat-Dehydrogenase deutlich unterscheiden, was auf Unterschiede im Genotyp hindeutet. Die Muster beim Nachweis der Isocitrat-Dehydrogenase waren hingegen identisch und lassen für dieses Merkmal denselben Genotyp vermuten.

2.9 Genotypische Differenzierung bei *Peronospora tabacina*

2.9.1 PCR

Neben der phänotypischen Unterscheidung der beiden einander gegenüber gestellten Pathogen-Typen über die Metalaxyl-Sensitivität, die Sporangienmorphologie und die Isozym-/Allozym-Analyse sollte ein molekularbiologisches Unterscheidungssystem geschaffen werden, das es erlaubt, die beiden Typen auf DNA-Ebene zu differenzieren. Hierfür wurden zunächst durch PCR mit Simple-sequence-repeat (SSR)- und Minisatelliten-Primern Fingerprint-Muster an zwei verschiedenen *Per. tabacina*-Feldisolaten vom Typ *Met^R* (OS-483) und *Met^S* (OS-801) erstellt, um nach Unterschieden

zu suchen. Bei Einsatz der Primer T₃B bzw. (GACA)₄ konnten dabei Unterschiede im Bandenmuster gezeigt werden (vgl. Abb. 2.25). So zeigte der T₃B-Fingerprint beim Typ Met^S eine zusätzliche Bande mit einer Größe von 805 bp (s. Abb. 2.25 a) und der (GACA)₄-Fingerprint eine zusätzliche Bande mit einer Größe von 830 bp beim Typ Met^R (s. Abb. 2.25 b). Da in der Vergangenheit von Kontaminations-Problemen mit an der Oberfläche der Sporangien haftenden Bakterien berichtet wurde, die das Ergebnis von RFLP-Experimenten verfälschen können (SUKNO *et al.* 2002a), wurde der Einfluss einer solchen bakteriellen Oberflächen-Kontamination auf die hier dargestellten PCR-Fingerprint-Muster im Vorfeld untersucht und experimentell ausgeschlossen (O. Spring, Universität Hohenheim, pers. Mitteilung).

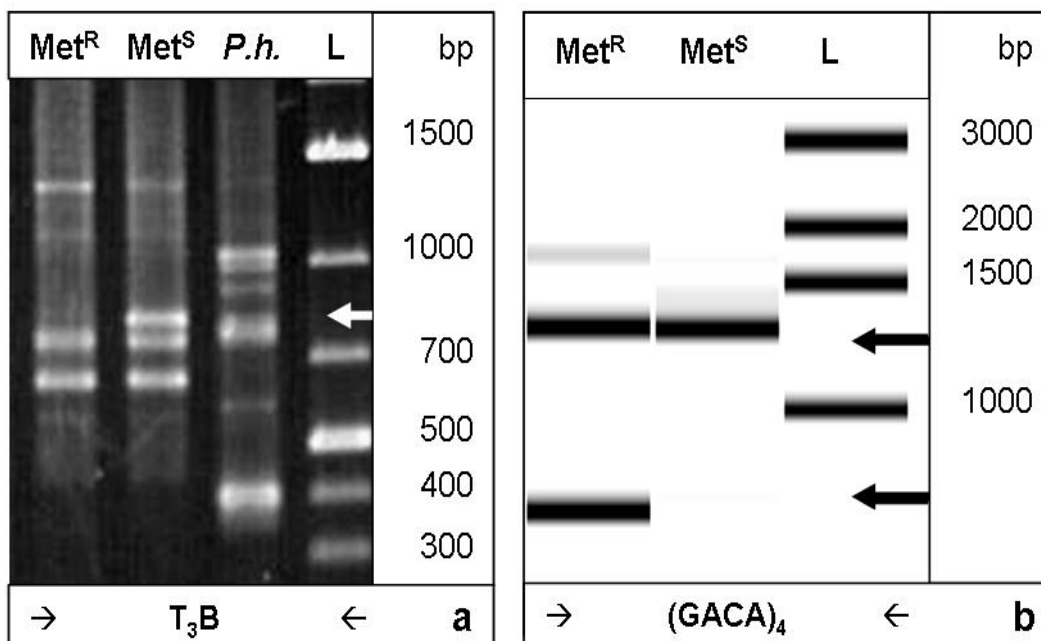


Abb. 2.25: PCR-Fingerprint-Muster von *Per. tabacina* Met^R und Met^S

a: PCR mit Primer T₃B; Auftrennung über Agarose-Gelelektrophorese; *P.h.* = Kontrolle mit DNA von *Plasmopara halstedii*; L = 1-kb-DNA-Leiter. Der Pfeil markiert die zusätzliche Bande bei Met^S.

b: PCR mit Primer (GACA)₄; Auftrennung mit Kapillar-Gelelektrophorese; L = 1-kb-DNA-Leiter. Der obere Pfeil markiert ein in beiden Typen vorkommendes Amplifikat, der untere Pfeil zeigt eine zusätzliche Bande bei Typ Met^R.

Die beiden spezifischen PCR-Amplikons und das bei beiden gemeinsam Stämmen amplifizierte Fragment wurden nach der Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und nach Aufreinigung sequenziert (s. 4.2.2.4). Die Sequenzdaten wurden mit DNA-Datenbankdaten (BLAST) verglichen und sind bei GenBank allgemein zugänglich (GenBank-Zugangsnummern EU721730, EU 721731 und EU721732). Dabei konnte keine signifikante Ähnlichkeit zu bereits veröffentlichten Sequenzdaten festgestellt werden. Ein

Zusammenhang der untersuchten DNA-Fragmente mit der genetischen Basis der Metalaxyl-Resistenz ist nicht belegt und eher unwahrscheinlich.

Auf Basis der Sequenzen der extrahierten Fragmente wurden neue PCR-Primer entwickelt, die nun neben der Detektion von *Per. tabacina* an sich (Kontrollprimerpaar Pt_Co) eine eindeutige Unterscheidung von Met^R und Met^S mittels PCR erlauben. Diese Primer wurden auch für die in Abschnitt 2.7 beschriebene Differenzierung der beiden Pathogen-Typen nach Dualinfektionen verwendet (vgl. Abb. 2.23). So konnte bei PCR mit dem Primerpaar Pt_Tol nur mit DNA von Metalaxyl-resistenten Phänotypen von *Per. tabacina* ein Amplifikat von 598 bp Größe detektiert werden, bei PCR mit dem Primerpaar Pt_Sens ein Amplifikat von 434 bp ausschließlich bei den Metalaxyl-sensitiven Phänotypen. Als Positivkontrolle wurde das Primerpaar Pt_Co in der PCR eingesetzt, das bei allen *Per. tabacina*-Isolaten zu einem PCR-Amplifikat von 1083 bp Größe führte. Negativkontrollen ohne DNA zeigten jeweils keine Amplifikation (Daten nicht gezeigt). Die Spezifität der entwickelten Primer wurde in PCRs mit DNA von *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana* sowie von drei anderen phytopathogenen Oomyceten (*Peronospora parasitica*, *Peronospora chenopodii* und *Plasmopara halstedii*) bestätigt, da bei keinem der getesteten Organismen ein Amplifikat auftrat (Daten nicht gezeigt). Die Verlässlichkeit des Primer-basierten Testsystems wurde an über 50 *Per. tabacina*-Isolaten überprüft und ergab eine 100-prozentige Übereinstimmung von Metalaxyl-Phänotyp (getestet im Fungizid-Biotest) und PCR-Testergebnis. Die Sensitivität des PCR-Systems konnte außerdem auf die Detektion eines einzeln abgenommenen Sporangienträgers mit den daran hängenden Sporangien erhöht werden. Dies erlaubt einen deutlich schnelleren Test bei frischem Pathogen-Material ohne vorhergehende DNA-Aufreinigung.

Monitoring von europäischen Feldisolaten von *Per. tabacina*

Um einen ersten Überblick über die Verteilung der beiden nun per PCR differenzierbaren Pathogen-Typen in Europa zu bekommen, wurden über 50 Feldisolate aus verschiedenen europäischen Ländern dem PCR-Test unterzogen. Abb. 2.26 zeigt beispielhaft das PCR-Testergebnis der *Per. tabacina*-Feldisolate von 2007. Insgesamt konnten in der Studie zur Variabilität europäischer Feldisolate 51 Isolate aus den Jahren 2002 bis 2008 untersucht und über den Metalaxyl-Biotest und den PCR-Test einem der beiden Typen zugeordnet werden (s. Tab. 2.9). Dabei wurden 38 Isolate (75 %) dem Typ Met^R und 11 Isolate (22 %) dem Typ Met^S zugeordnet. Bei zwei Feldisolaten ergab der Fungizid-Biotest zwar Metalaxyl-Resistenz, der PCR-Test erbrachte jedoch den Nachweis beider Genotypen. Es handelte sich jeweils um ein Misch-Isolat beider Phänotypen, die anschließend durch Einzelsporangien-Überimpfung getrennt werden konnten.

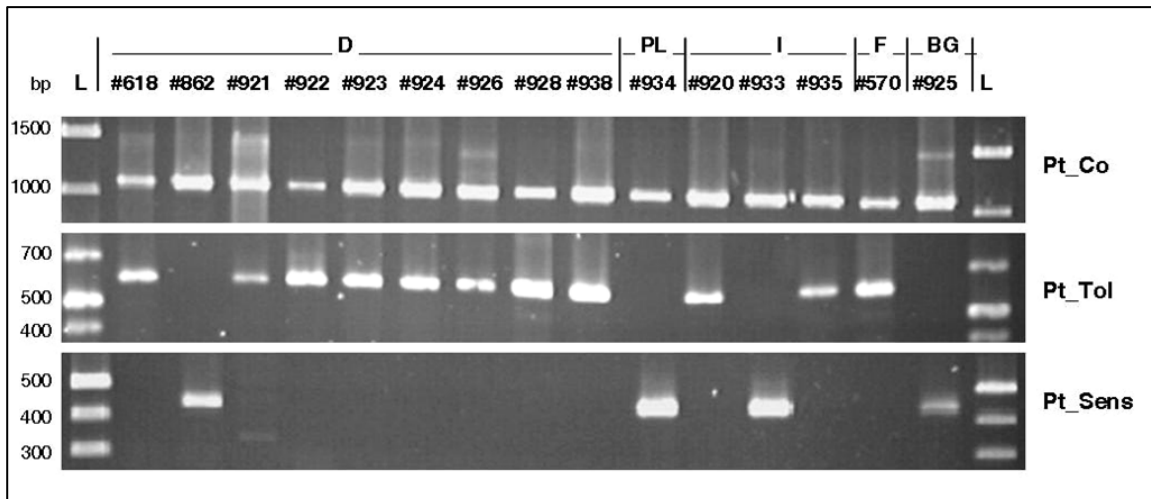


Abb. 2.26: PCR-Test an europäischen Feldisolaten von *Per. tabacina* aus dem Jahr 2007
 Jedes Isolat wurde mit den Primern Pt_Co (allgemeiner Nachweis von *Per. tabacina*), Pt_Tol (Nachweis des Phänotyps Met^R) und Pt_Sens (Nachweis des Phänotyps Met^S) getestet. Oben sind die Herkunftsländer der Feldisolate aufgetragen: D = Deutschland, PL = Polen, I = Italien, F = Frankreich, BG = Bulgarien. Die Nummern beziehen sich auf die interne Bezeichnung der Isolate. L = 1-kb-DNA-Leiter

Der Test zeigt, dass beide Genotypen von *Per. tabacina* in Europa vertreten waren und dass zumindest in Deutschland, Italien und Frankreich der Metalaxyl-resistente Typ bislang dominiert.

Tab. 2.9: *Peronospora tabacina*-Monitoring 2002 – 2008
 Aufgetragen ist jeweils die Anzahl der dem jeweiligen Phänotypen zugeordneten europäischen Feldisolate. n = Probenumfang

Jahr	Met ^S	Met ^R	Met ^S + Met ^R	n
2002	0	3	0	3
2003	0	9	0	9
2004	0	6	0	6
2005	1	1	1	3
2006	1	3	0	4
2007	3	9	1	13
2008	6	7	0	13
gesamt	11	38	2	51

Zusätzlich wurde Herbarmaterial von mit *Per. tabacina* befallenen Tabakblättern aus dem Jahr 1960, also 18 Jahre vor der Einführung von Metalaxyl, dem PCR-Test unterzogen. Da das Pathogen-Material nicht mehr lebensfähig war, konnte kein Fungizid-Biotest durchgeführt werden. Der PCR-Test zeigte eindeutig, dass es sich bei dem herbarisierten Material um den Typ Met^S handelte (s. Abb. 2.27).

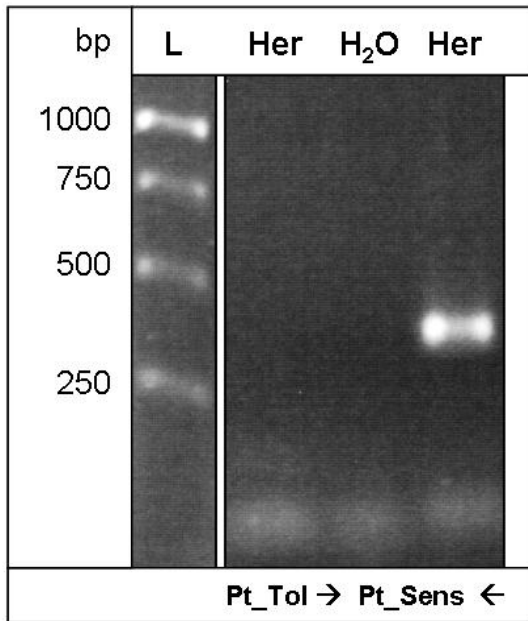


Abb. 2.27: PCR-Test mit DNA von einem herbarisierten *Per. tabacina*-Isolat von 1960
 L = 1-kb DNA-Leiter; Her = herbarisierte Probe von 1960; H₂O = Negativkontrolle mit Primer Pt_Sens

2.9.2 DNA-DNA-Hybridisierung mittels Dot-Blot

Die Phänotyp-spezifischen Primer wurden benutzt, um mittels PCR Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonden herzustellen (s. 4.2.2.7), die für DNA-DNA-Hybridisierungsversuche in Dot-Blot-Ansätzen verwendet werden konnten. Diese Methode sollte zur Einschätzung der Sequenz-Ähnlichkeit zwischen der Typ-spezifischen DNA-Sonde und DNAs der beiden *Per. tabacina*-Typen Met^R und Met^S eingesetzt werden.

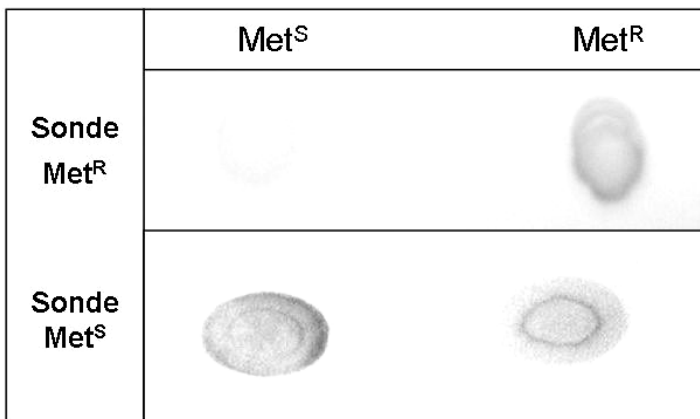


Abb. 2.28: DNA-DNA-Hybridisierung bei *Per. tabacina* mittels Dot-Blot

Von beiden Stämmen wurde die gleiche Menge DNA aufgetragen. Hybridisiert wurde bei 50 °C auf zwei unabhängigen Membranen mit in PCR mit Typ-spezifischen Primern gewonnene DIG-markierten DNA-Sonden.

Abbildung 2.28 zeigt, dass die mit dem Primerpaar Pt_Tol hergestellte DIG-Sonde bei der gewählten Hybridisierungstemperatur sehr gut an DNA von *Per. tabacina* Met^R band und dass bei Hybridisierung mit DNA von Met^S kein Signal zu erkennen war. Dies sprach zum einen für eine hohe Sequenz-Ähnlichkeit der Met^R-spezifischen Sonde mit einem

Abschnitt auf der DNA von *Per. tabacina* Met^R, aber gegen eine hinreichend hohe Sequenz-Ähnlichkeit mit DNA von *Per. tabacina* Met^S. Die mit dem Primerpaar Pt_Sens hergestellte DIG-Sonde zeigte hingegen eine weniger spezifische Bindung; die Reaktion erfolgte mit DNA beider Stämme, war jedoch deutlich stärker mit DNA des Stammes Met^R. Die mit Hilfe der artspezifischen Primer detektierten genotypischen Unterschiede beruhen somit nicht nur auf Sequenz-Unterschieden im Bindungsbereich der Primer, sondern es handelt sich bei den beiden untersuchten *Per. tabacina*-Stämmen tatsächlich um zwei relativ verschiedene Genotypen.

2.9.3 Vergleich von *Per. tabacina* Met^R und Met^S mittels AFLP

Die AFLP-Methode, die in Abschnitt 2.3 für die Untersuchungen an *Plasmopara* beschrieben wurde, wurde auch für den genotypischen Vergleich der beiden Typen von *Per. tabacina* OS-968 S14 (Met^R) und OS-968 J2 (Met^S) benutzt. Es wurden hierbei im zweiten PCR-Schritt 16 unterschiedliche Primer-Kombinationen zur Generierung der PCR-Bandenmuster eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.29 dargestellt. Mit allen eingesetzten Primern zeigten sich deutliche Unterschiede im AFLP-Muster der beiden Typen von *Per. tabacina*. Diese zahlreichen Polymorphismen bestätigen, dass es sich bei den beiden getesteten Isolaten um komplett unterschiedliche Genotypen handelt. Eine Beeinträchtigung des AFLP-Musters durch Probenkontamination mit Mikroorganismen, die sich aufgrund der biotrophen Lebensweise von *Per. tabacina* kaum vermeiden lässt, ist unwahrscheinlich, da beide Stämme aus einem gemeinsamen Feldisolat stammten und unter denselben Bedingungen weiterkultiviert wurden. Im Falle einer Kontamination sollte diese also bei beiden Stämmen identisch sein.

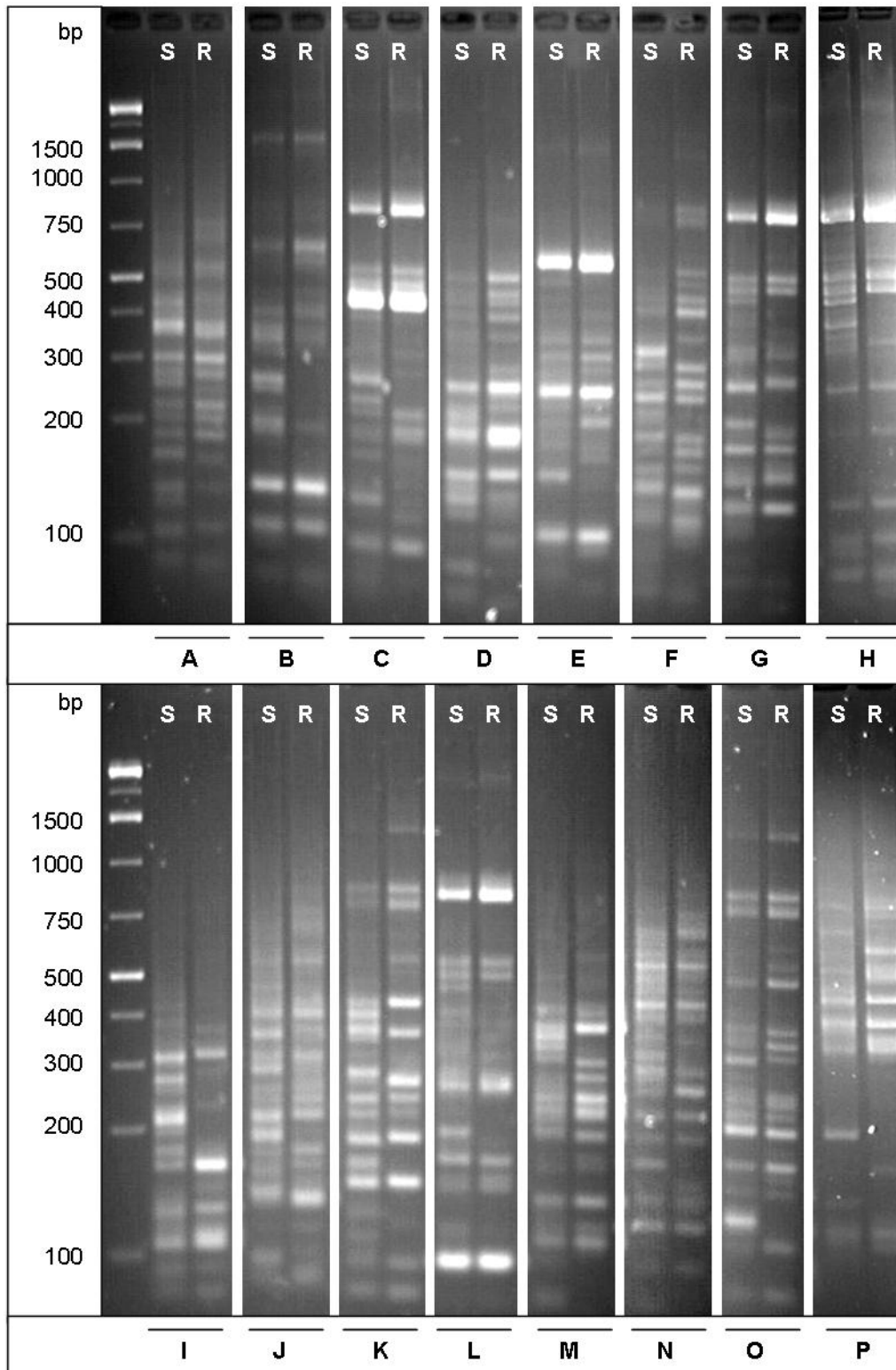


Abb. 2.29: AFLP-Vergleich zwischen *Per. tabacina* Met^S und Met^R

Die Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem 3%-Gel aufgetrennt. Es wurden 16 verschiedene Primerkombinationen benutzt:

A: E-AC/M-AT; B: E-AC/M-TC; C: E-AC/M-TA; D: E-AC/M-AG; E: E-GA/M-AT; F: E-GA/M-TC; G: E-GA/M-TA; H: E-TC/M-TA; I: E-GA/M-AG; J: E-GT/M-AT; K: E-GT/M-TC; L: E-GT/M-TA; M: E-GT/M-AG; N: E-TC/M-AT; O: E-TC/M-TC; P: E-TC/M-AG. Die linke Spur (S) zeigt jeweils das Muster von Typ Met^S, die rechte Spur (R) das von Typ Met^R.

3 Diskussion

Die Frage nach alternativen Rekombinationsmöglichkeiten bei Oomyceten stellte sich schon früh, z. B. bei *Phytophthora infestans*, wo unklar war, wie es zur Entstehung unterschiedlicher physiologischer Rassen kommen konnte, bevor der zweite Paarungstyp aufgetreten ist. Als eine Möglichkeit wurde die parasexuelle Rekombination während der vegetativen Phase und die dadurch entstehende Neu-Kombination der Wirtsspezifität aufgezeigt (MALCOLMSON 1970). Parasexuelle Vorgänge stellen also eine mögliche Erklärung für die Variabilität bei Oomyceten dar (vgl. Abschnitt 1.4). Untersuchungen zu einem Merkmalsaustausch zwischen zwei unterschiedlichen Spezies beschränkten sich innerhalb der Oomyceten bisher auf die Gattung *Phytophthora*, nicht zuletzt wegen der experimentellen Schwierigkeiten, die das Arbeiten mit anderen, obligat biotrophen Oomyceten mit sich bringt. Untersucht wurden dabei sowohl künstlich erzeugte Hybrid-Spezies, als auch natürlich vorkommende Hybride von *Phytophthora*; einen Überblick über diese Studien geben ÉRSEK und NAGY (2008). Die im Labor erzeugten *Phytophthora*-Hybriden entstanden bei diesen Studien durch sexuelle Kreuzungen (BOCCAS 1981; GOODWIN & FRY 1994; MAY *et al.* 2003) oder durch somatische Fusionen (ÉRSEK *et al.* 1995; ÉRSEK *et al.* 1997; BAKONYI *et al.* 2002). Intraspezifische Hybride von *Phytophthora parasitica* mit rekombinierten Fungizid-Resistenzen (Metalaxyl und Chloroneb) konnten durch Zellkern-Transplantation erzeugt werden (GU & KO 1998). Umfassende vergleichende Untersuchungen zum asexuellen Gentransfer bei biotrophen Oomyceten sind ungleich schwieriger durchzuführen. Erste Hinweise auf asexuelle genetische Rekombination wurden von *Plasmopara halstedii* berichtet (SCHEYHING 2001; SPRING & ZIPPER 2006; TSCHESCHNER 2006). Darüber hinaus wurden interspezifische Kreuzungsexperimente mit *Plasmopara halstedii* und *Plasmopara angustiterminalis* durchgeführt (TSCHESCHNER 2006) und stellen die Basis für einen Teil dieser Arbeit dar. Ziel der vorliegenden Studie war es, die interspezifische Rekombination von phäno- und genotypischen Merkmalen der beiden *Plasmopara*-Spezies experimentell zu belegen und vergleichend nach ähnlichen Vorgängen bei *Peronospora tabacina* zu suchen. Zudem sollten mögliche Mechanismen eines asexuellen Gentransfers bei Oomyceten analysiert werden.

3.1 Vergleich der beiden Modellsysteme

Für die vorliegende Arbeit sollten Modellorganismen innerhalb der Peronosporaceae ausgewählt werden, die aufgrund ihres Lebenszyklus keine oder nur eingeschränkte Möglichkeiten zur Rekombination auf sexuellem Wege besitzen und die durch Unterschiede hinsichtlich ihrer Variabilität gegenübergestellt werden können (vgl. Abschnitt 1.6). So gilt *Plasmopara halstedii* als phäno- und genotypisch sehr variabel (BOROVKOVA *et al.* 1992; ALBOURIE *et al.* 1998; ROZYNEK & SPRING 2000; RUIZ *et al.* 2000; TOURVIELLE *et al.* 2000a; TOURVIELLE *et al.* 2000b; VIRÁNYI & WALCZ 2000; INTELMANN & SPRING 2002; KOMJÁTI *et al.* 2004; SPRING *et al.* 2006; GULYA 2007), während von *Peronospora tabacina* bislang nur zwei Phänotypen beschrieben wurden, die jeweils genotypisch homogen sind (SUKNO *et al.* 2002b; ZIPPER *et al.* 2009).

Sowohl bei *Plasmopara halstedii* als auch bei *Peronospora tabacina* sind nach heutigem Wissensstand Möglichkeiten zur Rekombination und Neu-Kombination von Merkmalen im sexuellen Zyklus aufgrund nachgewiesener Homothallie (SPRING 2000) oder des Fehlens von Sexualstadien (BLANCARD 1998) eingeschränkt. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Modellorganismen besteht darin, dass ein Sporangium von *Pl. halstedii* zahlreiche mobile Zoosporen generiert (SPRING *et al.* 1998), bislang jedoch nicht bekannt war, ob die dafür erforderlichen Zellkerne auf die Einwanderung eines oder mehrerer Zellkerne während der Sporangienogenese zurückgehen. Bei *Per. tabacina* erfolgt die Keimung der Sporangien direkt mit einem Keimschlauch und alle Zellkerne eines Sporangiums gehen auf einen gemeinsamen Ursprungs-Zellkern zurück (TRIGIANO & SPURR JR. 1987). In der vorliegenden Arbeit sollte anhand von Dualinfektionen und Selektion der daraus hervorgehenden F₁-Generation nach asexuellen Nachkommen mit neu-kombinierten Eltern-Eigenschaften gesucht werden, um die Hypothese eines asexuellen Gentransfers überprüfen zu können. Hierfür mussten Pathogenstämme benutzt werden, die sich phänotypisch unterscheiden und auch selektieren lassen.

3.1.1 Differenzierende Eigenschaften der Elternstämme und Interaktionsstudien

Peronospora tabacina

Im Falle von *Per. tabacina* kam als Differenzierungsmerkmal nur die Metalaxyl-Toleranz in Frage, da sich die verschiedenen Feldisolate außer in dieser Eigenschaft bislang nicht unterscheiden ließen. Um genetisch möglichst homogene Versuchsobjekte für die Studie zu gewinnen, wurden aus einem gemischten Feldisolat zwei Einzelsporangien-Isolate hergestellt, wobei ein Stamm Metalaxyl-tolerant (Typ Met^R), der andere Metalaxyl-sensitiv (Typ Met^S) war. Ohne mindestens ein weiteres Unterscheidungsmerkmal wäre eine

Interaktionsstudie mit diesen beiden Stämmen dennoch nicht möglich gewesen, sodass eine PCR-gestützte Differenzierung der beiden Typen des Erregers auf Genotyp-Ebene entwickelt wurde (s. 2.9.1). Diese erlaubte die eindeutige Zuordnung zu einem der beiden bekannten Typen von *Per. tabacina* sowie die Untersuchung von Nachkommen der Dualinfektions-Experimente auf rekombinante Eigenschaften. Im Verlauf der Studie konnten weitere Differenzierungsmerkmale der beiden verwendeten *Per. tabacina*-Stämme erarbeitet werden. Neben signifikanten Unterschieden in der Sporangienmorphologie (s. 2.8.2) und im Isozym-Allozym-Muster (s. 2.8.3), zeigte der AFLP-Vergleich (s. 2.9.3), dass es sich um zwei relativ verschiedene Genotypen handelt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Typ Met^S bei einer Kultivierung ohne Metalaxyl dem Typ Met^R überlegen ist (s. 2.8.1). Die Zeitspanne zwischen Inokulation des Gewebes und Sporulation des Pathogens bei dem Metalaxyl-sensitiven Phänotyp war um mindestens fünf Tage kürzer, als bei dem resistenten Phänotyp. Neben diesem evolutiven Vorteil erwies sich Typ Met^S auch als fitter und setzte sich in Dualinfektions-Experimenten stets gegen Typ Met^R durch (s. 2.7). Eine positive Selektion des Fungizid-resistenten Individuums erfolgte nur bei Metalaxyl-Anwendung, was auch die Dominanz des Metalaxyl-resistenten Typs unter den europäischen Feldisolaten (s. Abb. 2.26 und ZIPPER *et al.* (2009)) erklärt. Das Phänomen einer reduzierten Fitness von Fungizid-resistenten Individuen wurde bereits für Isolate von *Plasmopara viticola* beschrieben, die gegen Fungizide der Gruppe der „Quinone-outside-Inhibitoren“ resistent waren, (HEANEY *et al.* 2000; GENET *et al.* 2006) und konnte durch Beobachtungen an *Pl. viticola* in Italien (TOFFOLATTI *et al.* 2006) und *Pseudoperonospora cubensis* in Japan (GISI & SIEROTZKI 2008) bestätigt werden.

Obwohl die Möglichkeit einer asexuellen Interaktion bei *Per. tabacina* bei den verwendeten Stämmen durch die Besiedlung desselben Wirtsgewebes natürlicherweise gegeben war, konnte in keinem Fall ein intermediärer Genotyp gefunden werden. Dies galt sowohl für die Nachkommen der artifiziellen Dualinfektionen (s. 2.7), als auch für das europaweit durchgeführte Monitoring an weiteren Feldisolaten (s. 2.9.1). Die phäno- und genotypischen Unterschiede zwischen den beiden Typen von *Per. tabacina* blieben erhalten und waren sowohl bei Dualinfektions-Experimenten als auch bei getrennter Kultivierung der Stämme konserviert. Die genetische Distanz der beiden bisher bekannten Genotypen und die dadurch vorliegende Inkompatibilität sprechen gegen eine asexuelle Interaktion der beiden *Per. tabacina*-Typen. So konnten auch im Gegensatz zu den Versuchen an *Plasmopara* keine Anastomosen gefunden werden, über die genetisches Material ausgetauscht werden könnte. Diese Befunde erklären zusammen mit dem Fehlen eines sexuellen Zyklus die geringe Variabilität von *Per. tabacina* und dass es trotz der parallelen Besiedlung eines gemeinsamen Wirtes nicht zu Interaktionen und

Rekombination kommt. Eine große Diversität und das regelmäßige Auftreten neuer Phänotypen, wie es seit Jahren bei *Pl. halstedii* berichtet wird, sind aufgrund der hier erarbeiteten Befunde bei *Per. tabacina* somit nicht zu erwarten. Die relativ große Variabilität zwischen verschiedenen Isolaten des Erregers, die bei Einsatz von RAPD-Techniken festgestellt wurde (WIGLESWORTH 1994), stellte sich im Nachhinein hingegen als zweifelhaft heraus, da selbst innerhalb von Einzelsporangien-Linien Unterschiede gefunden wurden, die höchstwahrscheinlich auf Kontaminationen mit Mikroorganismen zurückzuführen waren (SUKNO *et al.* 2002a; SUKNO *et al.* 2002b).

Plasmopara halstedii

Bei *Pl. halstedii* wurde aufbauend auf eine Arbeit von TSCHESCHNER (2006) ein Pathogenstamm („R“) eingesetzt, der aus Dualinfektions-Experimenten mit *Pl. halstedii* (Stamm Jü-B18z) und *Pl. angustiterninalis* (Stamm X03-A1) und doppelter Selektion der Nachkommen hervorgegangen war. Zur Selektion waren dabei Eigenschaften verwendet worden, die für jeweils einen der Interaktionspartner charakteristisch sind: Metalaxyl-Toleranz bei *Pl. halstedii* und die Möglichkeit der Infektion der Sonnenblumenlinie QHP-1 bei *Pl. angustiterninalis*. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zur Differenzierung herangezogenen und bei R neu kombinierten Eigenschaften über 30 Generationen stabil waren und auch die Einzelsporangien-Vermehrung nach R_{F8} (s. 1.5.1) nicht zu einem Wegfall eines Selektionsmerkmals führte. Neben den oben erwähnten Eigenschaften wurden weitere phäno- und genotypischen Merkmale herausgearbeitet, die zu Vergleichszwecken genutzt werden konnten. Dabei zeigte R eine von den Elternstämmen abweichende Sporangienmorphologie (s. 2.1.2) und eine intermediäre Anzahl an freigesetzten Zoosporen (s. 2.1.3) auf Phänotyp-Ebene sowie rekombinierte PCR-Marker auf Genotyp-Ebene (s. 2.2.1). Mögliche Erklärungen für den gezeigten asexuellen Merkmalsaustausch werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

3.1.2 Prinzipielle Überlegungen zum asexuellen Genaustausch bei *Plasmopara*

Um Rekombinationen im asexuellen Lebenszyklus nachweisen zu können, mussten bei den durchgeführten Dualinfektions-Experimenten sexuelle Interaktionen zwischen den Kreuzungspartnern ausgeschlossen werden. Für *Plasmopara* wurde dies durch den Zeitpunkt der Sporangienengewinnung erreicht, da der sexuelle Zyklus bei *Pl. halstedii* frühestens 10–12 Tage nach Inokulation von Keimlingen im Spross und Wurzelbereich abläuft, während er in Blättern kaum beobachtet wurde (VIRÁNYI 1988; SPRING & ZIPPER 2000). Oosporen sind daher erst nach 15–20 Tagen im Spross- und Wurzelbereich zu

erwarten. Die Mitosporangien, die die asexuelle Verbreitungseinheit des Pathogens darstellen, wurden hingegen bereits 10 Tage nach Infektion des Wirtsgewebes von Keimblättern abgenommen und weiterkultiviert bzw. den Versuchen zugeführt.

Nimmt man einen Austausch von genetischem Material im vegetativen Lebenszyklus der Versuchsobjekte an, so kommen dafür verschiedene Möglichkeiten in Frage (s. Abb. 3.1):

Zoosporenfusion

Die Fusion von Zoosporen konnte bei unterschiedlichen Vertretern der Gattung *Phytophthora* zwar im Labor zwischen zwei Spezies (ÉRSEK *et al.* 1995; BAKONYI *et al.* 2002) und sogar zwischen drei Spezies (ÉRSEK *et al.* 1997) erreicht werden, es ist jedoch nicht bekannt, ob dieses Phänomen bei Oomyceten in der Natur auftritt. Die Fusion von Zoosporen bei obligat biotrophen Oomyceten wurde bislang nicht untersucht und war auch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Hyphenfusion – Anastomosen

Die Fusion von Keimschläuchen stellt ebenfalls eine potenzielle Möglichkeit der Interaktion dar, wurde aber bislang an Oomyceten nicht untersucht. Die Fusion von benachbarten Hyphen im Wirtsgewebe und die Ausbildung von Anastomosen konnte hingegen sowohl bei Vertretern der Eumycota als auch bei Oomyceten gezeigt werden (vgl. 1.4). Vor allem bei Erregern, denen die Möglichkeit zur sexuellen Rekombination fehlt, garantiert die Anastomose ein großes Maß an genetischer Flexibilität (SCHLÖSSER 1997). Diese durch parasexuelle Ereignisse entstehende genetische Variabilität könnte bei Pilzen, deren Hyphen im Wirtsgewebe benachbart wachsen, ebenso häufig oder sogar häufiger sein, als die durch sexuelle Reproduktion entstehende Variabilität (AGRIOS 2005). Durch den Austausch von genetischem Material können aus zwei homokaryontischen Individuen heterokaryontische Organismen entstehen, die dadurch eine größere genetische Flexibilität erhalten. Die Ausbildung von Anastomosen und die Entstehung von Heterokarya sind jedoch nicht zwischen beliebigen Individuen möglich. Besteht eine Heterokaryon-Inkompatibilität oder vegetative Inkompatibilität, so kann es nicht zu einem Austausch von genetischem Material kommen (CATEN & JINKS 1966). Nach Entstehung eines Heterokaryons durch einen Zellkern-Übertritt über eine Anastomose, kann es durch unterschiedliche Teilungsraten der ursprünglichen und neuen Zellkerne und die anschließende Verteilung in der Hyphe dazu kommen, dass Bereiche im Myzel entstehen, die homokaryontisch und andere, die heterokaryontisch sind.

Abbildung 3.1 zeigt schematisch die hypothetischen Möglichkeiten der asexuellen Rekombination bei *Plasmopara*.

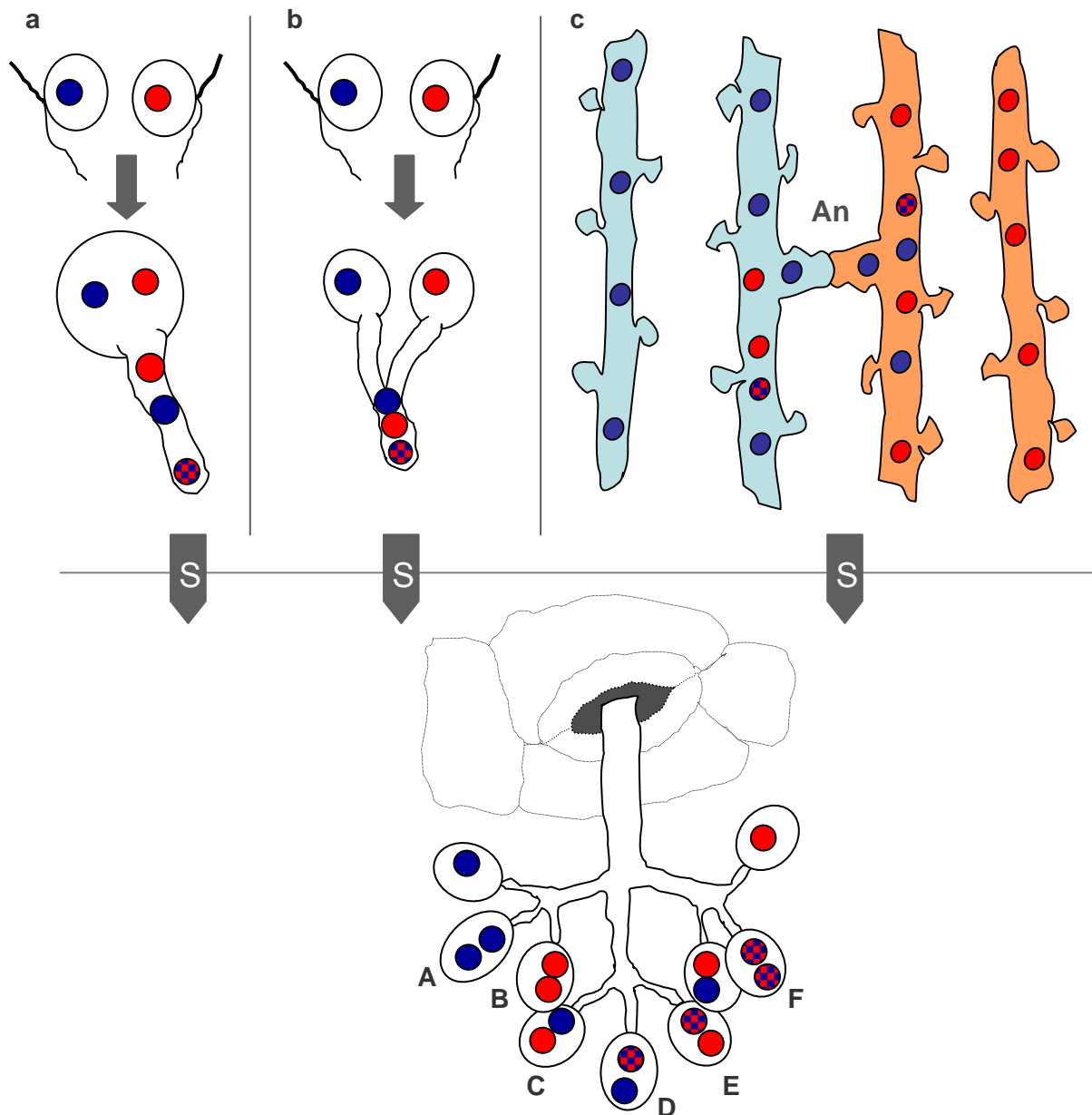


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der hypothetischen asexuellen Rekombination bei *Plasmopara* und anschließende Sporulation unter Selektionsbedingungen

roter Kreis = Zellkern von Stamm A; blauer Kreis = Zellkern von Stamm B; kariierter Kreis = rekombinanter Zellkern mit genetischer Information beider Interaktionspartner; S = Sporulation
a: Zoosporenfusion; es entsteht eine heterokaryontische große Zoospore, die Zellkerne beider Interaktionspartner enthält. Bei Keimhyphenentwicklung sind heterokaryontisches Myzel oder rekombinante Zellkerne möglich.

b: Keimschlauchfusion; es entsteht heterokaryontisches Myzel, das Zellkerne beider Interaktionspartner oder rekombinante Zellkerne enthält.

c: Hyphenfusion; durch den Übertritt von Zellkernen über eine Anastomose (An) entsteht heterokaryontisches Myzel, das Zellkerne beider Interaktionspartner enthält. Rekombinante Zellkerne sind ebenfalls möglich.

Bei der Sporulation sind nur die Möglichkeiten dargestellt, die sich bei einer Sporangiophore ergeben, die aus heterokaryontischem Myzel hervorgebracht wird. Bei einem Versuchsansatz ohne Selektionsdruck wären zusätzlich Sporangiophoren denkbar, die nur Sporangien mit der genetischen Information eines Stammes hervorbringen.

A–F: Sporangien mit unterschiedlich kombinierten Zellkernen. Auf die verschiedenen Sporangien-Typen wird im Text Bezug genommen.

Die Fusion von Zoosporen (Abb. 3.1. a) und von Keimschläuchen (Abb. 3.1 b) sind prinzipiell vorstellbar, waren aber nicht Bestandteil dieser Studie. In dieser Arbeit konnte die prinzipielle Möglichkeit des in Abb. 3.1 c dargestellten Übertritts von Zellkernen und somit auch von kleineren Einheiten wie Mitochondrien oder Minichromosomen über Anastomosen bei *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* mikroskopisch nachgewiesen werden (s. 2.4.2). Anastomosen wurden dabei sowohl bei Einzelinfektionen mit jeder der Eltern-Spezies, als auch bei Doppelinfektion mit beiden *Plasmopara*-Arten detektiert. Es konnte bisher allerdings nicht gezeigt werden, dass die an Anastomosen beteiligten Hyphen zu beiden Arten gehörten. Für den endgültigen Nachweis der Fusion zweier artfremder Hyphen wäre die optische Markierung mindestens eines Interaktionspartners z. B. durch Transformation erforderlich. Obwohl bereits die transiente Expression eines Fluoreszenzmarkers bei der Gattung *Plasmopara* gelang (HAMMER *et al.* 2007; DUBRESON *et al.* 2008), blieben alle Bemühungen zur Schaffung eines stabilen Transformationssystems für biotrophe Oomyceten bisher ohne Erfolg. Für ein stabiles Transformationssystem bei Oomyceten ist ein robustes Selektionssystem notwendig, wofür sich die Resistenz gegenüber Metalaxyl hervorragend eignen würde. Solange die genetische Basis dieser Resistenz jedoch nicht aufgeklärt ist und sich somit in Transformationsvektoren nicht nutzen lässt, muss auf andere Hemmstoffe und die entsprechenden Resistenzgene zurückgegriffen werden. Wie in Abschnitt 2.6.2 gezeigt, eignen sich für das Pathosystem *Plasmopara halstedii*/Sonnenblume sowohl Neomycin als auch Hygromycin B in bestimmten Konzentrationsbereichen als Selektionsmittel. Neben der Transformation wäre auch eine immunologische spezifische Detektion von einem der Interaktionspartner denkbar, wenn auf Basis der in dieser Arbeit herausgearbeiteten genotypischen Differenzierungsmöglichkeiten zwischen *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* (s. 2.2.1) ein Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungssystem (FISH) entwickelt werden könnte.

Zellkernsituation während der Sporangio-genese

Eine Grundvoraussetzung für das in Abb. 3.1 dargestellte Sporulationsmodell ist das Einwandern von mehr als einem Zellkern in das sich entwickelnde Sporangium. Nur so wäre zudem gewährleistet, dass trotz Einzelsporangien-Ver-mehrung nach R_{F8} noch beide Zoosporentypen vorhanden sein konnten. Die Duplex-PCR an Einzelsporangien von R_{F7} zeigte, dass neben Sporangien, in denen nur Signale der einen oder der anderen *Plasmopara*-Art detektiert werden konnten, auch Sporangien zu finden waren, die genetische Information beider Ausgangsstämme enthielten (s. 2.2.1). In Abschnitt 2.5.3 wurde zudem dargelegt, dass die Einwanderung von mehr als einem Zellkern in ein Sporangium während der Sporangio-genese möglich ist. Die Vorgänge der

Zellkernverteilung während der Sporangienogenese bei Oomyceten sind abgesehen von dieser Studie auch von allgemeinem Interesse. Da die Falschen Mehltau-Erreger coenocytisches Myzel bilden und damit zahlreiche Zellkerne in einer Zelle vorhanden sind, ist es für die Weitergabe genetischer Information entscheidend, wie die Verteilung der Zellkerne auf die sich entwickelnden Sporangien abläuft. Im Falle einer Heterokaryon-Situation, wie sie hier diskutiert wird, würden bei Weitergabe eines Zellkerns pro Sporangium wieder homokaryontische Nachkommen entstehen, die dann aber jeweils unterschiedliche Erbinformation enthalten könnten. Bei der Weitergabe mehrerer Zellkerne pro Sporangium wären heterokaryontische Nachkommen denkbar. Die Aufklärung dieser Vorgänge ist von grundsätzlichem Interesse, da sie nicht nur zum Verständnis der Variabilität der Oomyceten beitragen kann, sondern auch in der Labor-Praxis von Bedeutung ist, wo für bestimmte Experimente genetisch homogene Pathogen-Stämme benötigt werden. Die Frage, ob sich entwickelnde Sporangien mit einem Zellkern, der sich anschließend teilt, oder mit mehreren Zellkernen bestückt werden, muss für jeden Organismus separat geklärt werden, da beide Situationen bei Erregern des Falschen Mehltaus bereits gezeigt werden konnten. DAVISON (1968) berichtete von 20 bis 30 Zellkernen pro Sporangiospore von *Hyaloperonospora cheiranthi*, die alle aus dem Sporangienträger einwanderten und nicht aus Teilungen eines Ausgangskernes entstanden. In diesem Falle wäre somit genetische Heterogenität unter den asexuell gebildeten Nachkommen denkbar. Bei *Bremia lactucae* hingegen wandert ein Zellkern in das junge Sporangium ein; anschließend folgen drei bis vier synchrone Kernteilungen (TOMMERUP 1981). Bei *Peronospora tabacina* konnte nachgewiesen werden, dass ebenfalls ein einzelner Zellkern in das junge Sporangium einwanderte und sich dann synchrone Kernteilungen anschlossen. In den sich entwickelnden Sporangien, die jeweils einen, zwei, vier oder acht Zellkerne enthielten, liefen dann asynchrone Kernteilungen ab, was bei den reifen Sporangien zu einer durchschnittlichen Zellkern-Anzahl von 14 bis 15 führte (TRIGIANO & SPURR JR. 1987). Betrachtet man die zu diesem Thema in der vorliegenden Arbeit gezeigten Resultate, wird deutlich, dass die Zeitspanne, in der ein zweiter Zellkern in ein sich entwickelndes Sporangium einwandern konnte, sehr kurz war und anzunehmen ist, dass es bei *Pl. halstedii* sowohl Sporangien gibt, deren genetisches Material auf einen Zellkern zurückgeht, als auch solche, in die während ihrer Entwicklung zwei oder mehr Zellkerne einwanderten. Letzteres eröffnet die Möglichkeit asexuell gebildeter heterokaryontischer Nachkommen. Im Falle der Mitochondrien muss davon ausgegangen werden, dass aufgrund der geringeren Größe und des vorherrschenden Energiebedarfs zahlreiche in ein sich entwickelndes Sporangium einwandern.

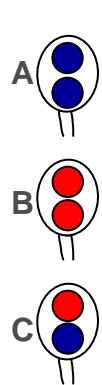
3.2 Diskussion der *Plasmopara*-Studie anhand des Modells

Die Kombination der elterlichen Eigenschaften bei R und die Fähigkeit, den doppelten Selektionsdruck zu überleben, lassen sich entweder durch eine Art „Schlitteneffekt“ oder durch eine Neu-Kombination des genetischen Materials der Elternstämme erklären. Ein „Schlitteneffekt“ läge vor, wenn die Besiedlung der Wirtspflanze durch ein Pathogen das Eindringen und Überleben des zweiten, eigentlich nicht kompatiblen Pathogens ermöglichen würde. Beide Myzelien lägen dann unabhängig im Wirt vor. Bei R handelte es sich ab der achten Generation um einen Einzelsporangien-Stamm (s. 1.5.1), der dennoch die doppelte Selektion durch Metalaxyl und die Wirtspflanze *H. annuus* QHP-1 überlebte. Dies setzt ein Sporangium mit Zellkernen beider Eltern oder rekombinanten Zellkernen voraus und schließt damit einen Schlitteneffekt ab diesem Zeitpunkt aus. Dass es sich aber schon vor diesem Klonierungsschritt bei R um eine Rekombinante handelte, konnte mittels PCR an einzelnen Sporangien von R_{F7} nachgewiesen werden (s. Abb. 2.2). Der Versuch zeigte, dass in einzelnen Sporangien von R genetisches Material von *Pl. halstedii*, *Pl. angustiterninalis* oder beiden *Plasmopara*-Arten detektierbar war. Damit sind die hypothetischen Möglichkeiten der Kombination genetischer Information eines aus heterokaryontischem Myzel hervorgegangenen Sporangiums, die in Abb. 3.1 dargestellt sind, erstmals experimentell belegt.

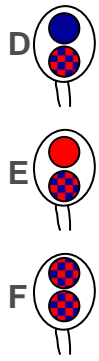
Betrachtet man die Vorgehensweise bei der Dualinfektion mit *Plasmopara* (vgl. Abb. 1.4) und die in dieser Studie erarbeiteten Resultate, so sind je nach Phase des Experiments nicht alle in Abb. 3.1 dargestellten Rekombinationsmöglichkeiten denkbar. Daher werden die einzelnen Phasen des Experiments im Folgenden separat betrachtet. Die Darstellung der Sporangientypen A–F ist dabei aus Abb. 3.1 entnommen.

R_{F1} – R_{F8}

Die doppelten Selektionsbedingungen setzen das Vorhandensein genetischer Information beider Elternspezies für eine erfolgreiche Infektion des Wirtsgewebes voraus. Da die

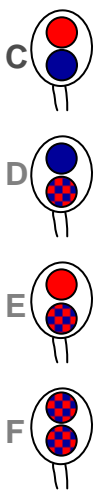


Infektion über Zoosporen erfolgt, die jeweils nur einen Zellkern enthalten (s. o.), muss die Fusion von Zoosporen (s. Abb. 3.1 a) oder Keimschläuchen (s. Abb. 3.1 b) vor der Infektion stattgefunden haben (bei Sporangien der Typen A–C), oder bereits rekombinante Zellkerne (bei Sporangien der Typen D–F) vorhanden gewesen sein. Da bei der Differenzierung mittels PCR in R_{F7} an einzelnen Sporangien sowohl die beiden Eltern-Signale einzeln als auch in Kombination gezeigt wurden (s. 2.2.1), sind nur die Sporangientypen A, B und C sicher nachgewiesen.



Dennoch sind auch die Typen D–F, die einen oder mehrere rekombinante Zellkerne enthalten, zu dieser Phase der Studie denkbar, da ein rekombinanter Zellkern in PCR mit Eltern-spezifischen Primern mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls ein Signal liefert. Bis zu R_{F8} handelte es sich in jeder Infektionsrunde stets um Mischinokulationen mit zahlreichen Sporangien. Es sind daher alle möglichen Kombinationen von genetischem Material und ein Austausch von Zellkernen über Anastomosen im Wirtsgewebe denkbar.

R_{F9}



Ein einzelnes Sporangium von R_{F8} wurde zur Inokulation unter doppeltem Selektionsdruck benutzt. Es kann sich dabei nicht um ein homokaryontisches Sporangium des Typs A oder B gehandelt haben, da Zoosporen dieser Sporangientypen den doppelten Selektionsdruck nicht überlebt hätten. Am wahrscheinlichsten scheint, dass es sich bei dem zur Inokulation eingesetzten Sporangium um den Typ C, der Zellkerne beider Elternspezies enthielt, handelte und vor der folgenden Infektion eine Zoosporen- oder Keimschlauchfusion stattfand. Es wäre zwar auch die Infektion mit einem Sporangium möglich gewesen, das einen oder mehrere rekombinante Zellkerne enthielt (Typ D–F), da die PCR-Experimente aber bei R_{F9} immer noch beide elterlichen Genotypen zeigten, ist dies eher unwahrscheinlich.

R_{F10} – R_{F31}

Alle PCR-Versuche machten deutlich, dass die *Pl. angustiterminalis*-spezifische Signale in allen Generationen von R detektiert wurden, während die *Pl. halstedii*-spezifische Signale nur bis einschließlich zur F_9 gefunden wurden. Dieser Befund wurde durch DNA-DNA-Hybridisierungen im Dot-Blot und durch *Real-time* quantitative PCR bestätigt, wo in R_{F2} , R_{F8} und R_{F9} noch Signale beider Eltern in schwankendem Verhältnis zueinander



gefunden wurden, während in R_{F10} und in R_{F20} nur noch das *Pl. angustiterminalis*-spezifische Signal detektiert wurde. Es konnte also der Nachweis erbracht werden, dass der durch asexuelle Vermehrung entstandene Tochterstamm R bis zur neunten Generation zumindest in Teilen sowohl Zellkerne, als auch Mitochondrien von *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* enthielt, und R ab der zehnten Generation zwar das *Pl. halstedii*-spezifische Merkmal Metalaxyl-Resistenz aufwies, sich ansonsten jedoch wie *Pl. angustiterminalis* verhielt. Dies spricht für eine Infektion mit Zoosporen, die aus den Sporangientypen D–F hervorgegangen waren und eine positive Selektion der

rekombinanten Zellkerne. Die Heterokaryonphase war ab R_{F10} somit beendet und es handelte sich in den darauffolgenden Generationen von R um ein Homokaryon mit rekombinanten Zellkernen.

Eine alternative Erklärung für dieses Phänomen könnte eine Mutation im *Pl. angustiterninalis*-spezifischen Teil des Genoms von R sein, die zur Metalaxyl-Resistenz führte und damit den *Pl. halstedii*-spezifischen Teil des Genoms „überflüssig“ machte. Das Resistenzrisiko für Phenylamid-Fungizide wie Metalaxyl wird bei Oomyceten allgemein als hoch eingestuft (GISI & SIEROTZKI 2008), da die genetische Basis der Resistenz-Vererbung wahrscheinlich auf monogenischen Mechanismen basiert, an denen ein oder zwei semidominante Gene beteiligt sind, die von untergeordneten Genen beeinflusst werden (JUDELSON & ROBERTS 1999; GISI *et al.* 2007). Die spontane Entstehung der Metalaxyl-Resistenz durch Mutation ist jedoch als sehr unwahrscheinlich zu betrachten, da eine solche Entwicklung selbst bei jahrelanger Kultivierung von *Pl. halstedii* nie beobachtet wurde (R. Zipper, Universität Hohenheim, pers. Mitteilung). So ist die plausibelste Erklärung für die Veränderung von R ab der zehnten Generation die Aufnahme des Selektionsmerkmals Metalaxyl-Resistenz in das Genom von *Pl. angustiterninalis* und der damit verbundene Verlust des Selektionsdrucks für den Erhalt des *Pl. halstedii*-Genoms.

3.3 Mögliche Mechanismen der genetischen Rekombination

Im Verlauf dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei *Pl. halstedii* pro Zoospore nur ein Zellkern vorliegt und somit die Infektion von Wirtsgewebe nicht durch eine Zoospore erfolgen kann, die die einzelnen Zellkerne beider *Plasmopara*-Arten enthält. Dennoch kann dies nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da bei *Plasmopara viticola* bereits, in seltenen Fällen und in Abhängigkeit von der Jahreszeit, Zoosporen beobachtet wurden, die zwei Zellkerne enthielten (P. Nick, KIT, Karlsruhe, pers. Mitteilung). Zoosporenfusionen konnten bei Oomyceten in der Vergangenheit nachgewiesen werden (s. o.) und auch Keimschlauchfusionen sind nicht ausgeschlossen. Bei Experimenten an *Phytophthora parasitica* wurde gezeigt, dass die Übertragung der Metalaxyl-Resistenz auf einen Metalaxyl-sensitiven Stamm des Erregers durch die Transplantation isolierter Zellkerne möglich ist (GU & KO 1998). In den Zoosporen der Tochter-Individuen wurden anschließend sowohl normal große Zellkerne gefunden, die DNA-Abschnitte beider Kreuzungspartner enthielten, also durch echte Rekombination entstanden waren, als auch

doppelt so große Zellkerne, die durch Karyogamie der beiden unterschiedlichen ursprünglichen Zellkerne generiert wurden und tetraploid waren. Die artifizielle Übertragung von Zellkernen führte also zu einer Neukombination der elterlichen Merkmale. Der Arbeitsgruppe um GU und KO (2000) gelang zwei Jahre später die Erzeugung von interspezifischen Hybriden durch die Übertragung isolierter Zellkerne einer *Phytophthora*-Spezies auf eine andere Art und in der Folge der Nachweis, dass der parasexuelle Zyklus nach dieser künstlichen Übertragung genetischen Materials vollends abgeschlossen wurde. Dabei wurden die Merkmale Metalaxyl-Resistenz und Chloroneb-Resistenz in den Hybriden kombiniert. Die in der Studie als Elternstämme verwendeten heterozygoten Mutanten stammten aus einer Versuchsreihe, die zehn Jahre zuvor durchgeführt worden war. Ihre Fungizid-Resistenzen wurden jeweils von einem einzelnen dominanten Gen verliehen, wohingegen sich Metalaxyl- und Chloroneb-sensitive Isolate als homozygot rezessiv herausstellten (CHANG & KO 1990). Die Übertragung von Fungizid-Resistenz von einer Oomyceten-Spezies auf eine andere über einen Zellkern-Transfer konnte demnach gezeigt werden. Neben den künstlich im Labor erzeugten Hybrid-Spezies wurden auch natürlich vorkommende interspezifische *Phytophthora*-Hybriden mit neu-kombinierten Pathogen-Eigenschaften beschrieben (ÉRSEK & NAGY 2008).

Geht man von solchen Fusionsereignissen im Vorfeld der Infektion des Wirtsgewebes aus, so müssen diese in den hier vorgestellten Versuchen bei jeder Infektionsrunde erneut aufgetreten sein, um ein rekombinantes Myzel zu erzeugen, das den doppelten Selektionsdruck überleben konnte. Ein solch regelmäßiges Auftreten von Zoosporen- oder Keimschlauchfusionen zwischen zwei verschiedenen Arten wäre eine enorme Triebfeder für die Diversität bei *Plasmopara*. Bei den hier durchgeführten Versuchen ging der rekombinante *Plasmopara*-Stamm ab R_{F10} mit großer Wahrscheinlichkeit auf rekombinante Zoosporen mit genetischer Information beider *Plasmopara*-Spezies in Kombination zurück. Während bis zur F_9 stets Signale beider Eltern-Spezies detektiert werden konnten, zeigten die späteren Generationen in den genotypischen Untersuchungen ein rein *Pl. angustiterninalis*-spezifisches Verhalten. Gleichzeitig mit den Zellkern-spezifischen Signalen verschwanden auch die mitochondrialen Signale von *Pl. halstedii* nach der neunten Generation von R. Es ist unklar, ob es sich dabei um einen Zufall handelte, oder ob eine Abhängigkeit der beiden Organellen-Genome besteht und der Verlust der *Pl. halstedii*-Zellkerne das Verschwinden der *Pl. halstedii*-Mitochondrien auslöste. Die Metalaxyl-Resistenz, die in den Versuchen als *Pl. halstedii*-typisches Merkmal herangezogen wurde, blieb auch mindestens bis zur 31. Generation von R erhalten. Die molekularen Hintergründe der Resistenz gegen Phenylamid-Fungizide wie Metalaxyl sind zwar noch nicht vollständig aufgeklärt, man geht jedoch davon aus, dass

diese Eigenschaft von einem oder zwei semidominanten Genen im Zellkern codiert wird (GISI & SIEROTZKI 2008). Die Virulenz gegenüber der Wirtspflanze ist bei Phytopathogenen hingegen meist komplexer und wird nicht unwesentlich von einem Zusammenspiel der genetischen Information der unterschiedlichen Organellen beeinflusst (OLSON & STENLID 2001). So konnte zum Beispiel bei künstlich erzeugten homo- und heterokaryontischen Hybriden des Nadelbaum-Schädling *Heterobasidion annosum* gezeigt werden, dass die Virulenz gegenüber Kiefern von dem Vorhandensein der Mitochondrien des einen Elternteils abhängig und unabhängig von der Herkunft der Zellkerne war (OLSON & STENLID 2001). Im Falle der Oomyceten konnte bei natürlich vorkommenden Hybriden aus *Phytophthora nicotianae* und *Phytophthora cactorum* ebenfalls gezeigt werden, dass das mitochondriale Genom eine entscheidende Rolle für die Wirts-Spezialisierung der rekombinanten Spezies spielte (MAN IN 'T VELD *et al.* 1998). In der vorliegenden Studie scheint der komplexere Selektionsdruck „Wirtspflanze“ über die Zeit einen nachhaltigeren Einfluss gehabt zu haben, als der Selektionsdruck „Fungizid-Resistenz“. Dies würde die Verschiebung des Genotyps hin zur Ähnlichkeit zu *Pl. angustiterminalis* erklären. Insgesamt blieb unklar, ob die Metalaxyl-Resistenz tatsächlich vom *Pl. halstedii*-Genom auf das *Pl. angustiterminalis*-Genom durch Rekombination übertragen wurde, oder ob auch in den jüngeren Generationen von R immer noch Zellkerne von *Pl. halstedii* vorhanden waren, die aber aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht detektiert werden konnten. Bei der Lösung dieser Fragestellung sollten die durchgeführten AFLP-Experimente (s. 2.2.6) helfen. Die AFLP-Fingerprints von *Pl. angustiterminalis* und R_{F21} waren zwar relativ ähnlich, dennoch konnten durch die gezeigten Polymorphismen deutliche Unterschiede festgestellt werden. Dies zeigt, dass es sich, obwohl sich R – mit Ausnahme der Metalaxyl-Resistenz – ab der zehnten Generation wie *Pl. angustiterminalis* verhielt, nicht um den gleichen Genotyp handelte, der z. B. durch eine Mutation die Metalaxyl-Toleranz entwickelt hatte.

Zahlreiche Studien an den unterschiedlichsten Pathogenen zeigen den Austausch von genetischem Material durch parasexuelle Rekombination zur Bildung von Rekombinanten als Alternative zur meiotischen Rekombination (ZEIGLER *et al.* 1997; BECKER & ALVES DE CASTRO-PRADO 2006; NOGUCHI *et al.* 2006; FORGAN *et al.* 2007; FORCHE *et al.* 2008). Bei Rekombination von DNA-Abschnitten außerhalb der Reduktionsteilung spricht man dann von mitotischer Rekombination, die erstmals von STERN (1936) an *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde und für deren Ablauf verschiedene Szenarien diskutiert werden (LAFAVE & SEKELSKY 2009). So gelten DNA-Doppelstrang-Brüche und deren anschließende Reparatur als mögliche Ursache von spontanen reziproken Crossover-Ereignissen, sowohl während der Meiose (SZOSTAK *et al.* 1983) als auch bei mitotischer

Rekombination (LEE *et al.* 2009). Da es zusätzlich Hinweise darauf gibt, dass Einzelstrang-Brücken und -Lücken ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von mitotischer Rekombination spielen (LETTIER *et al.* 2006), ist es wahrscheinlich, dass zahlreiche Typen von DNA-Läsionen wichtig für spontane mitotische Rekombination sind (LAFAVE & SEKELSKY 2009). Während die meiotische Rekombination tatsächlich während der Meiose stattfindet, tritt die mitotische Rekombination nicht direkt während der Mitose auf, sondern in der Interphase des Zellzyklus.

Bezogen auf das hier diskutierte Modell für die parasexuelle Rekombination zwischen den beiden *Plasmopara*-Arten, wäre eine solche genetische Rekombination also beim Vorhandensein unterschiedlicher Zellkerne in einer coenocytischen Hyphe auch interspezifisch denkbar, wenn die Zellkern-Strukturen für die DNA-Verdopplung aufgelöst werden. Auf diese Weise könnten dann rekombinante Zellkerne entstanden sein (vgl. karierte Kreise in Abb. 3.1). SCHOUSTRA *et al.* (2007) zeigten, dass mitotische Rekombination die Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen erhöhen kann, was im Falle von Pflanzenpathogenen im Hinblick auf Fungizid-Resistenz und Wirtsspezifität von großer Bedeutung wäre.

3.4 Ausblick

Das auf Basis der genotypischen Unterschiede entwickelte PCR-Nachweissystem für *Per. tabacina* kann in Zukunft genutzt werden, um ein zeitsparendes, kostengünstiges Monitoring durchzuführen, bei dem auch nicht mehr kultivierbares Pathogen-Material herangezogen werden kann, um die Verteilung der beiden bekannten Pathogen-Stämme rund um den Globus zu überprüfen und gegebenenfalls neue Stämme identifizieren zu können. Außerdem sollten die AFLP-Experimente auf Isolate von verschiedenen Regionen und idealerweise von verschiedenen Kontinenten ausgedehnt werden. Da gezeigt werden konnte, dass sich der Metalaxyl-sensitive Erregertyp bei einem Wegfall des Fungizid-Selektionsdrucks gegen den Metalaxyl-toleranten Phänotyp durchsetzt, sollte in Zukunft zudem ein bewusstes Resistenz-Management bezüglich der Applikation von Phenlamid-Fungiziden im Tabakanbau betrieben werden, um den Fungizid-resistenten Phänotyp zurückzudrängen und so eventuell größere wirtschaftliche Schäden vermeiden zu können.

Für den endgültigen Nachweis von Anastomosen zwischen unterschiedlichen *Plasmopara*-Spezies muss eine optische Markierung, idealerweise durch Transformation

mit einem Fluoreszenzmarker, vorgenommen werden. Hierfür müssen Transformationsplasmide eingesetzt werden, deren Funktionsfähigkeit vorher klar z. B. durch die Transformation von *P. infestans* sichergestellt wurde. Dabei ist der Einsatz eines wirkungsvollen Selektionssystems, das sich für obligat biotrophe Pathogene eignet, unerlässlich. Einen Meilenstein würde hierbei die Aufklärung der genetischen Grundlage der Metalaxyl-Resistenz darstellen. Alternativ zu der Transformation ist auch ein optischer Nachweis artspezifischer DNA-Abschnitte z. B. über Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) denkbar. Dualinfektionsexperimente mit Zoosporen von *Plasmopara* unter Selektionsbedingungen könnten die Frage klären, ob es im Vorfeld der Infektion des Wirtsgewebes zu Zoosporenfusionen kommt, oder ob nur rekombinante Zoosporen eine Infektion unter doppeltem Selektionsdruck erreichen können. Aufschlussreich wäre zudem der Nachweis von Keimschlauchfusionen, von „Riesen-Zoosporen“ nach Fusion oder von Zoosporen, die mehr als einen Zellkern enthalten. Die Abhängigkeit des Kerngenoms und des Mitochondrioms voneinander und der Bezug zur Wirtsspezifität und Fungizid-Toleranz wären ebenfalls von Bedeutung.

Die wirtschaftlichen Schäden durch die Anpassung pflanzenpathogener Oomyceten ist enorm. Die Tatsache, dass durch die hier vorgestellten Rekombinationsmöglichkeiten außerhalb der sexuellen Vermehrung die Wahrscheinlichkeit für die Anpassungsfähigkeit biotropher Oomyceten und die Neu-Kombination praxisrelevanter Eigenschaften steigt, lässt in Zukunft neue Varianten dieser Erreger erwarten. Die Hintergründe der Variabilität müssen für jedes Pathogen separat betrachtet werden, da sich die komplizierten Lebenszyklen der einzelnen Organismen zum Teil deutlich unterscheiden (DICK 1995; GOODWIN 1997; WONG *et al.* 2001; KAMOUN 2003) und auch bei den hier gegenübergestellten Fallstudien deutlich wurde, dass von dem jeweiligen Lebenszyklus nicht auf den Einfluss von asexuellem Gentransfer auf die Variabilität der Erreger geschlossen werden kann. Bei vielen Organismen ist schlicht noch nicht bekannt, ob es bei ihnen zu natürlichen parasexuellen Interaktionen kommen kann. Es bleibt daher abzuwarten, ob diese Form der genetischen Rekombination für weitere wichtige Pflanzenpathogene nachgewiesen werden kann.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verwendete Chemikalien

Alle hier verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe), der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) oder der Merck KGaA (Darmstadt) bezogen und stets im höchsten Reinheitsgrad (*reinst* oder *pro analysi*) benutzt. Der Begriff „H₂O“ bezeichnet immer deionisiertes Wasser. Für alle molekularbiologischen Methoden wurde DEPC-behandeltes Wasser (Carl Roth, Karlsruhe) verwendet.

4.1.2 Verwendete Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen und ihre Herkunft sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tab. 4.1: In dieser Arbeit verwendete Organismen mit Herkunft bzw. Literaturnachweis
 Angegeben sind ggf. die internen Bezeichnungen der Stammsammlung von O. Spring, Universität Hohenheim.

Organismus	Herkunft/Literaturnachweis
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101::pMMP90, pSoup	Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Universität Hohenheim
<i>Bremia lactucae</i> OS-429	Gartenbauschule Hohenheim
<i>Escherichia coli</i> DH10B	GRANT <i>et al.</i> (1990)
<i>Helianthus annuus</i> cv. Giganteus	Ernst Benary Samenzucht (Hann. Münden)
<i>Helianthus annuus</i> cv. QHP-1	V. Hahn, Landessaatzuchtanstalt, Universität Hohenheim
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	The Sainsbury Lab, Norwich, UK
<i>Peronospora tabacina</i> OS-968 J2 OS-968 S14 OS-483 OS-801	Landesanstalt für Pflanzenbau, Forchheim Landesanstalt für Pflanzenbau, Forchheim W. Schwär, Neuried-Altenheim Landesanstalt für Pflanzenbau, Forchheim
<i>Phytophthora infestans</i> Feldisolat (A1)	S. Keil, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
<i>Pl. halstedii</i> x <i>Pl. angustiterminalis</i> VIII-B („R“)	TSCHECHNER (2006)
<i>Plasmopara angustiterminalis</i> X03-A1	Ph1-04, Bicsérd, Ungarn
<i>Plasmopara halstedii</i> JüB18z	Ph5-05, Jülich, Deutschland; Klonierung: R. Zipper, Institut für Botanik, Universität Hohenheim

4.1.3 Primer

In Tabelle 4.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer in alphabetischer Reihenfolge sowie ihre Sequenzen und die jeweils im Vorfeld durch Gradienten-PCR bestimmte, optimale Annealingtemperatur aufgeführt.

Tab. 4.2: In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer, ihre Sequenz und die jeweils optimale Annealingtemperatur (A)

Alphabetische Reihenfolge. Die unterstrichenen Abschnitte sind Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die mittels PCR in die amplifizierten DNA-Abschnitte eingebaut wurden.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Annealingtemp. (A)
coxII_F	GGCAAATGGGTTTTCAAGATCC	52 °C
coxII_P.a._F	CTATTGAAATTATTGGACTTCC	65 °C
coxII_P.a._R	CTGAAAATTCTAAGTTATCGG	65 °C
coxII_P.h._F	AACTATTGAAATATGGACCAC	65 °C
coxII_P.h._R	GTTTCATCTGAAAATTCTAAATT	65 °C
coxII_R	CCATGATTAATACCACAAATTTCACTAC	52 °C
(GACA) ₄	GACAGACAGACAGACA	51 °C
(GTC) ₅	GTCGTCGTCGTCGTC	51 °C
hyg_F_EcoR1	CATGAATTCGAATGAAAAGCCTGAACTCACC	63 °C
hyg_R_Hind3	CGCAAGCTTCATCCCGCACCAGCCGAGC	63 °C
ITS_F	AATGCTAGACGAGTCCTG	51 °C
ITS_R	ACTTTCATAGCAATCAATCAAACC	51 °C
M13_F	GTA AACGACGGCCAGT	60 °C
M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC	60 °C
mCherry_F_EcoR1	CATGAATTCGAATGGTGAGCAAGG	61 °C
mCherry_R_Hind3	CGCAAGCTTGGTTACTTGTACAGCTC	61 °C
npt2_F_EcoR1	CATGAATTCGAATG ATT GAA CAA GATGGA	60 °C
npt2_R_Hind3	CGCAAGCTTCA TCA GAA GAA CTC GTC AAG	60 °C
Pang_F	GTC AAAGCATGGGAACCTCG	61 °C
Pang_R	CCG TCA ACT CTG CAG AAT CTG	61 °C
Pang2_F	CGTACCTCAAGAACTGGCTCG	61 °C
Pang2_R	CGA TGA CTG GGT ACT AAG AGC	61 °C
Phal_F	CGTCGTCGTCGGGCATATGG	61 °C
Phal_R	CACGCAACGTTTCGCAGCATG	61 °C
pJET1_F	GCCTGAACACCATATCCATCC	56 °C
pJET1_R	GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC	56 °C
Prom34_F_Not1	CTGCGGCCGCATCCTCTGATGGACAAAG	62 °C
Prom34_R_Pst1	GCCTGCAGGGTT GTC GGT GAG AGT GAA G	62 °C
Pt_Co_F	CGACCCACATGGACACATGC	65 °C
Pt_Co_R	CGTAGCTTGGCCACAGTGCC	65 °C
Pt_Sens_F	GGTGGTTGGCAGCAACCTG	65 °C
Pt_Sens_R	GCAGAATATCGGTCGTGCAGAG	65 °C
Pt_Tol_F	CGTTAAGCTCTGGGACGTCG	65 °C
Pt_Tol_R	GGTACACACTCTGCGCAC	65 °C
T3B	AGGTCGCGGGTTCGAATCC	54 °C
Term34_F_Cla1	GAATCGATGGGTGCCTACTTCTTGTAAGCC	64 °C
Term34_R_Apa1	ACGGGCCCGCACAAAGCCCTCAATAGAGG	64 °C

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden mit H₂O auf 100 pmol/μl eingestellt und für die PCR-Versuche auf 25 μM verdünnt. Die für die AFLP-Versuche eingesetzten Primer werden gesondert in Abschnitt 4.2.2.6 beschrieben.

4.1.4 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten oder neu konstruierten Plasmide sind in Tabelle 4.3 aufgelistet.

Tab. 4.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide mit der jeweiligen Bezugsquelle bzw. dem Literaturnachweis

Plasmidkarten der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in Abb. 2.20 dargestellt.

Plasmid	Herkunft/Literaturnachweis
Stratagene Cloning Vector pSC-A	StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, USA)
pJET	CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, St. Leon-Rot)
pBluescriptII KS(+)	Stratagene, La Jolla, USA
p34GF	SI-AMMOUR <i>et al.</i> (2003)
p34TRH	HAMMER <i>et al.</i> (2007)
pGreen II_0000	HELLENS <i>et al.</i> (2000)
pMCherry-Actin	B. Thaa, Universitätsklinikum Magdeburg
pGreen_0029	www.pgreen.ac.uk; Mark Smedley, JIC, Norwich, UK
pGreen_0179	www.pgreen.ac.uk; Mark Smedley, JIC, Norwich, UK
pGreen_34GFN	diese Arbeit
pGreen_34GFHyg	diese Arbeit
pGreen_34MchN	diese Arbeit
pGreen_34HygMch	diese Arbeit
pOom_blank	diese Arbeit

4.2 Methoden

4.2.1 Pathogene und Wirtspflanzen

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Pflanzen in einem Klimaschrank (RUMED 1200, Rubarth Apparate, Laatzten) bei 16 °C, 80 % relativer Luftfeuchtigkeit und 14 h Beleuchtungsdauer pro Tag kultiviert.

Einzelsporangien-Isolation

Zur Generierung von Einzelsporangien-Stämmen der Pathogene wurden frische Sporangien eines Stammes auf Petrischalen mit 1 % Wasseragar verteilt und mittels eines Mikromanipulators (MP 1, Brinkmann, Mannheim) am Umkehrmikroskop (Wilovert S, Hund, Wetzlar) einzelne Sporangien isoliert. Diese wurden dann zur Inokulation von Blattscheiben der jeweiligen Wirtspflanze verwendet. Auf diese Art und Weise erfolgte die Isolation des Stammes *Pl. angustiterminalis* X03-A1, der in Abschnitt 1.5.1 beschriebene Klonierungsschritt zwischen R_{F8} und R_{F9}, sowie die Gewinnung der Einzelsporangienstämme *Per. tabacina* OS-968 J2 und OS-968 S14. Der Stamm *Pl. halstedii* JüB18z, der für die Kreuzungsversuche verwendet wurde, war aus einer einzelnen Zoospore gezogen worden, die ebenfalls auf die eben beschriebene Weise mit einem Mikromanipulator isoliert worden war.

4.2.1.1 *Nicotiana benthamiana* und *Peronospora tabacina*

Als Wirtspflanzen zur Kultivierung von *Peronospora tabacina* wurde der in Nord-Australien beheimatete Tabak *Nicotiana benthamiana* DOMIN verwendet. Zur Standard-Kultivierung des Pathogens wurde *N. benthamiana* als Wirt eingesetzt, da hier verglichen mit der Kultivierung auf *N. tabacum* eine schnellere Infektion des Wirtsgewebes und eine deutlich stärkere Sporulation des Pathogens erreicht werden konnten. *N. benthamiana* wurde im Klimaschrank kultiviert. Zur Inokulation mit *Per. tabacina* wurden einzelne Blätter abgenommen und mit der Blattunterseite auf ein bereits befallenes Blatt, an dem das Pathogen sporulierte, gelegt und leicht angedrückt. Das neu inokulierte Blatt wurde dann mit der Blattunterseite nach oben in eine feuchte Kunststoffkammer mit Deckel gelegt und so bei 100 % Luftfeuchtigkeit im Klimaschrank inkubiert.

Nach fünf bis sieben Tagen traten bei erfolgreicher Infektion Sporangienträger an die Oberfläche, mit denen dann je nach Versuchsansatz wie folgt weiter verfahren wurde:

Dualinfektion von Blattstielen

Für Dualinfektions-Experimente mit *Per. tabacina* an Blattstielen wurde dasselbe System verwendet, das im folgenden Abschnitt detailliert für *Plasmopara* beschrieben wird, wobei als Substrat die Blattstiele von großen *Nicotiana benthamiana*-Blättern eingesetzt wurden und die Infektion der angeschnittenen Enden über einen Abklatsch von Sporangien von bereits befallenem Blattmaterial erfolgte.

Dualinfektion von Blättern und Metalaxyl-Biotest

Sporangiophoren und Sporangien der Stämme OS-968 S14 (Met^R) und OS-968 J2 (Met^S) wurden von befallenen Blättern mit H₂O abgewaschen und jeweils auf 1000 Sporangien/ml verdünnt. Von den beiden Sporangien-Suspensionen wurden anschließend je 50 µl vermischt und zusammen auf ein Blatt von *N. benthamiana* aufgetropft. Der Versuchsansatz wurde dann unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Aus diesem Ansatz resultierende Sporangien (F₀) wurden durch Abklatschen auf ein frisches Blatt überimpft. Die Metalaxyl-Biotests, die sowohl mit der F₁-Generation bei den verschiedenen Dualinfektions-Experimenten, als auch zur Feststellung des Fungizid-Phänotyps verschiedener Feldisolate von *Per. tabacina* durchgeführt wurden, erfolgten stets durch Kultivierung der Pathogenstämme auf 1 cm × 1 cm großen Blattscheiben von *N. benthamiana* schwimmend auf einer Lösung von 1 ppm Metalaxyl in H₂O.

PCR-Experimente

Für PCR-Experimente an Sporangienträgern wurden einzelne Träger mit einer Pinzette abgenommen und direkt dem PCR-Ansatz zugeführt (s. 4.2.2.2). Sollten die Sporangien zur Konservierung eingefroren oder zur DNA-Gewinnung aufbereitet werden, wurden von einem Blatt mit starker Pathogen-Sporulation die Sporangienträger samt Sporangien mit einer Unterdruck-Saugvorrichtung (MILTNER 1993) direkt in ein Reaktionsgefäß abgesaugt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren oder direkt der DNA-Extraktion (s. 4.2.2.1) zugeführt.

4.2.1.2 *Helianthus annuus*, *Plasmopara halstedii* und *Plasmopara angustiterminalis*

Achänen von *Helianthus annuus* cv. Giganteus bzw. *H. annuus* cv. QHP-1 wurden für 30 h auf mit H₂O befeuchtetem Filterpapier in einer Petrischale mit Deckel bei 30 °C inkubiert. Nach Entfernung der Frucht- und Samenschale wurden die Keimlinge mit H₂O abgespült, in sterile Erde eingepflanzt und festgedrückt. Nach zwei Wochen im

Klimaschrank wurden die Pflanzen abgeschnitten und in nachfolgenden Versuchen verwendet.

Für die Vermehrung von *Pl. halstedii* wurde *H. annuus* cv. Giganteus als Wirtspflanze verwendet, für *Pl. angustiterminalis* die Sonnenblumensorte *H. annuus* cv. QHP-1. Zur Inokulation von Sonnenblumen-Keimlingen mit den Oomyceten wurde das Verfahren der Blattscheiben-Inokulation nach SPRING et al. (1997) adaptiert. Aus den Kotyledonen von zwei Wochen alten Pflanzen von *H. annuus* wurden quadratische Stücke mit einer Fläche von ca. 0,8 x 0,8 cm mit einer Rasierklinge ausgeschnitten. In eine Replikaschale mit 25 Kammern (Multimed, Kirchheim/T.) wurden in jede Vertiefung 1 ml H₂O pipettiert und je Kammer eine Blattscheibe auf das Wasser gegeben. Für die Revitalisierung der Pathogene von bei -70 °C eingefrorenem Sporangienmaterial wurde eine halbe Spatelspitze der jeweiligen Pathogenisolate in 500 µl H₂O suspendiert und geschüttelt. Mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde unter dem Mikroskop die Anzahl der Sporangien pro Milliliter bestimmt und anschließend mit H₂O auf 10⁵/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden zu jeder Blattscheibe 50 µl pipettiert, was einem Inokulum von 5000 Sporangien entsprach.

Die Replikaschalen wurden mit einem passenden Deckel versehen, für 3 h im Dunkeln bei 16 °C belassen und anschließend im Klimaschrank so lange inkubiert, bis Sporulation stattfand, was nach sieben bis zehn Tagen der Fall war. Für die weitere Vermehrung der Pathogene wurden für 30 h vorgekeimte Achänen von *H. annuus* entschalt, gespült und in ein kleines Becherglas mit 15 ml H₂O gelegt. In dieses Becherglas wurden eine infizierte Blattscheibe oder bei der Weitervermehrung auch einzelne befallene Kotyledonen, die deutliche Pathogen-Sporulation zeigten, gegeben und für 3 h im Dunkeln bei 16 °C inkubiert. Danach wurden die nun infizierten Keimlinge in sterile Erde eingepflanzt, mit der restlichen Sporangien-Suspension übergossen und für zwei Wochen im Klimaschrank inkubiert. Diese Vorgehensweise vereint die „whole seedling inoculation“-Methode (COHEN & SACKSTON 1973) und die „soil drenching“-Methode (GOOSSEN & SACKSTON 1968; COHEN & SACKSTON 1973).

Um die Sporulation der Pathogene bei infizierten Sonnenblumen zu induzieren, wurden die Pflanzen mit Wasser abgespült, und das gesamte Pflanzgefäß wurde bei 100 % Luftfeuchtigkeit in einer befeuchteten Box aus Polystyrol bei Raumtemperatur über Nacht im Dunkeln inkubiert. Die dabei hervortretenden Sporangien wurden mit der in Abschnitt 4.2.1.1 beschriebenen Vorrichtung abgesaugt und direkt weiterverwendet oder bei -70 °C eingefroren.

Alle verwendeten Werkzeuge (Pinzetten, Schalen) wurden nach jeder Anwendung mit Methanol desinfiziert und ausgiebig mit H₂O gewaschen, um eine Vermischung oder Verunreinigung der verschiedenen Pathogene zu verhindern.

Differentiallinien-Test und Fungizid-Test

Um die Pathotyp-Einordnung der verwendeten Stämme zu überprüfen, wurden Differentiallinien-Tests durchgeführt. Diese basieren auf dem Mitte der 90er Jahre entwickelten Triplett-Code-System (LIMPERT & MÜLLER 1994; GULYA 1995), das im Jahre 2000 modifiziert wurde (TOURVIEILLE DE LABROUHE *et al.* 2000). Hierfür wurden mehrere definierte Sonnenblumenlinien mit *Pl. halstedii* bzw. *Pl. angustiterminalis* inokuliert und eingepflanzt, und nach zweiwöchiger Anzucht wurde die Sporulation des jeweiligen Pathogens wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben induziert. Je nachdem, welche Linien befallen wurden, konnte dem jeweiligen Pathogen-Stamm eine Pathotyp-Charakterisierung zugewiesen werden. Dabei galt eine Linie bei deutlich sichtbarer Pathogen-Sporulation auf dem Hypokotyl, den Kotyledonen und den Primärblättern als suszeptibel, bei ausbleibender Sporulation als resistent. Blieb die Sporulation auf die Kotyledonen beschränkt, handelte es sich um eine „Cotyledon-limited infection“ (CLI), die üblicherweise als Resistenz gewertet wird (GULYA *et al.* 1991; SACKSTON 1992).

Darüber hinaus wurde für jeden Stamm die Metalaxyl-Toleranz bestimmt, indem Blattscheibeninfektionen wie oben beschrieben vorgenommen wurden, wobei zur Hälfte der Blattscheiben Metalaxyl (0,1 µg/ml) gegeben wurde. Die andere Hälfte der Blattstückchen diente als Kontrolle. Traten sowohl im Metalaxyl-Ansatz als auch in der Kontrolle Infektionen auf, wurde der Stamm als Metalaxyl-tolerant eingestuft. Waren in dem Metalaxyl-Ansatz keine Infektionen aufgetreten, in der Kontrolle hingegen schon, wurde der Stamm als Metalaxyl-suszeptibel betrachtet.

Dualinfektionssystem

Das in einer vorausgegangenen Arbeit (HAMMER 2005) beschriebene Dualinfektionssystem für *Pl. halstedii* wurde leicht modifiziert. In Petrischalen (Ø 5 cm) wurde Agar-Agar Kobe I (0,8 % in H₂O) bis zu einer Höhe von 3 mm eingegossen. Nach dem Auskühlen wurde in den 5-cm-Schalen mittig ein 1 cm breiter Streifen des Agars mit einem Skalpell und einem Spatel entfernt. Von zwei Wochen alten Pflanzen von *H. annuus* wurden 3 cm lange Hypokotyl-Stücke abgeschnitten und mit H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Schnittflächen abgeschragt, um ein Auftragen der Pathogene zu erleichtern. Die Hypokotyl-Stücke wurden dann mit den abgeschragten Schnittflächen nach oben über den Spalt auf den Agar in die 5-cm-Petrischalen gelegt (s. Abb. 2.8). In den Versuchsansätzen wurden verschiedene Pathogen-Stämme auf die gegenüberliegenden Seiten der Hypokotylstücke appliziert. Dafür wurden von befallenen Sonnenblumen-Kotyledonen, die nach Induktion eine starke Pathogen-Sporulation zeigten, die Zoosporangien mit H₂O in ein Kunststoffgefäß abgewaschen, die Sporangien-Dichte wurde anschließend mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mikroskopisch

bestimmt und mit H₂O auf 10⁴/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden jeweils 20 µl (ca. 200 Sporangien) auf ein abgeschrägtes Ende des Hypokotyl-Stücks aufgetragen, daraufhin wurde die Petrischale mit einem Deckel verschlossen. Nach 3 h Inkubation bei 16 °C im Dunkeln wurden die Versuchsansätze im Klimaschrank inkubiert. Die erfolgreiche Infektion der Hypokotylstücke wurde anhand der Sporulation des Pathogens nach 7–9 Tagen überprüft.

Kultivierung von *Pl. halstedii* auf künstlichen Medien

Zur Schaffung eines Wirtspflanzen-unabhängigen Selektionssystems für Oomyceten wurden vier Medien unterschiedlicher Osmolarität als Substrat für *Pl. halstedii* getestet. Alle Medien enthielten 0,8 % Agar-Agar, Kobe I und eine „Diluted Salts“-Lösung (DS) (ROZYNEK 2000) in unterschiedlicher Konzentration. Dafür wurde die DS-Stammlösung mit H₂O auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Die DS-Stammlösung (2×) hatte folgende Zusammensetzung:

2× DS: 1 mM KH₂PO₄, 1 mM K₂HPO₄, 1 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂

Die Lösungen wurden unter Rühren aufgekocht und nach Abkühlen in Petrischalen (5 cm Durchmesser) gegossen. Auf Autoklavieren wurde bewusst verzichtet, da die später aufgebrachten Sporangien nicht steril waren. Kurz vor dem Gießen wurden daher noch 10 µg/ml Rifampicin zugesetzt, um Bakterien-Wachstum zu vermeiden.

Folgende Medien wurden hergestellt:

- Medium 1: 0,8 % Agar; H₂O, 10 µg/ml Rifampicin
- Medium 2: 0,8 % Agar; ½× DS, 10 µg/ml Rifampicin
- Medium 3: 0,8 % Agar; 1× DS, 10 µg/ml Rifampicin
- Medium 4: 0,8 % Agar; 2× DS, 10 µg/ml Rifampicin

Die Zoosporangien von *Pl. halstedii* wurden durch Abklatschen von einem infizierten Sonnenblumen-Keimblatt, bei dem 16 h zuvor die Sporulation des Pathogens induziert worden war, auf die künstlichen Medien übertragen und die Versuchsansätze anschließend bei 4 °C bzw. 16 °C im Dunkeln inkubiert. Alle 24 h wurde mikroskopisch untersucht, ob vitale Zoosporen auf dem jeweiligen Medium zu sehen waren und welcher Anteil der ausgebrachten Zoosporangien bereits Zoosporen entlassen hatte. Parallel wurden zudem dieselben Experimente bei Anwesenheit eines Hemmstoffes durchgeführt. Hierfür wurde zu den jeweiligen Medien nach dem Abkühlen 20 µg/ml G418, 50 µg/ml

Neomycin bzw. 10 µg/ml Hygromycin B gegeben. Jeder Versuch wurde in zehn Wiederholungen durchgeführt.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion aus Sporangien der verschiedenen Oomyceten wurden 5 mg Sporangienträger mit Sporangien wie oben beschrieben von der Blattoberfläche abgesaugt und nach Zugabe zweier steriler Metallkugeln (Sarstedt, Nümbrecht) in einer Schüttelmühle (Retsch, Haan) für 5 min bei 60 Hz aufgeschlossen. Bei der DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial wurde dieses in flüssigem Stickstoff schockgefroren und durch Mörsern zu feinem Staub zerkleinert. Aus dem zerkleinerten Ausgangsmaterial wurde die DNA dann jeweils mittels des Genomic DNA Purification Kits (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers extrahiert und das getrocknete DNA-Pellet am Ende in 100 µl H₂O gelöst. Zur Extraktion von DNA aus Herbarmaterial von *Peronospora tabacina* wurde das innuPREP Plant DNA Kit (Analytik Jena, Jena) verwendet. Die Vorgehensweise erfolgte nach Angaben des Herstellers, jedoch wurden der Lysis Solution 10 mM PTB (N-Phenacylthiazoliumbromid, Prime Organics, Woburn, USA) zugesetzt, und die Elution am Ende erfolgte mit 70 °C warmem H₂O in drei Elutionsschritten zu 60 µl, 70 µl und 70 µl. Die DNA-Konzentration der extrahierten Proben wurde jeweils photometrisch an einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Die Proben wurden anschließend je nach Verwendungshäufigkeit bei –20 °C oder –70 °C gelagert.

4.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR (Polymerase Chain Reaction) werden bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigt. Hierfür wird der PCR-Ansatz in zyklischer Wiederholung verschiedenen Temperaturen ausgesetzt, die die Denaturierung der Matrizen-DNA („Template“), die Anlagerung der Primer (Startabschnitte für die DNA-Polymerase) und den Einbau von Nukleotiden durch eine thermostabile DNA-Polymerase bewirken. Dieses Enzym synthetisiert einen Gegenstrang zu der denaturierten einzelsträngigen DNA, sodass theoretisch in jedem Zyklus des PCR-Programmes eine Verdopplung der DNA-Abschnitte, die durch die Primer definiert sind, stattfindet. Die PCR-Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl hatten die in Tabelle 4.4 dargestellte Zusammensetzung, und die PCR-Reaktion wurde in 0,2-ml-Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) durchgeführt.

Tab. 4.4: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von 20 µl


Komponente	(Bezugsquelle)	Volumen
H ₂ O, DEPC-behandelt	(Roth, Karlsruhe)	9,5 µl
10× PCR-Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	(Fermentas, St-Leon-Rot)	2 µl
MgCl ₂ , 25 mM	(Fermentas, St-Leon-Rot)	1,5 µl
dNTP-Mix, 2 mM je dNTP	(Fermentas, St-Leon-Rot)	2 µl
Primer A, 25 µM	(Sigma-Aldrich, München)	1 µl
Primer B, 25 µM	(Sigma-Aldrich, München)	1 µl
Taq-DNA-Polymerase, 1 U/µl	(Fermentas, St-Leon-Rot)	1 µl
Template-DNA, 70 ng/µl		2 µl
gesamt:		20 µl

Bei PCR mit einzelnen Sporangienträgern wurden diese zunächst für 1,5 h in 11,5 µl H₂O bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, für 3 min auf 95 °C erhitzt und dann mit den restlichen PCR-Bestandteilen außer H₂O und Template-DNA versetzt. Bei PCR mit einzelnen Sporangien wurden diese wie oben beschrieben mit einem Mikromanipulator vereinzelt und zusammen mit 11,5 µl H₂O in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgten die Inkubation für 2 h bei 16 °C im Dunkeln, dann das Einfrieren bei –20 °C für 30 min und die Inkubation bei 65 °C für 15 min. Nach dem Abkühlen wurden die restlichen PCR-Bestandteile außer H₂O und Template-DNA zugegeben und die PCR-Reaktion gestartet. Alle PCR-Ansätze wurden in einem Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg) den jeweiligen Temperaturprogrammen unterzogen. Ein allgemeines PCR-Programm ist in Tabelle 4.5 gegeben.

Tab. 4.5: Allgemeines Standard-PCR-Programm

A = Annealingtemperatur; E = Elongationszeit

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	1:00 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	A °C	40 s
Elongation	72 °C	E min
Finale Elongation	72 °C	4:00 min
Kühlen	7 °C	bis Entnahme der Proben



Die Annealingtemperatur **A** wurde dabei stets 5 °C unter der für die Primer angegebenen Schmelztemperatur gewählt. Bei nicht zufrieden stellenden Ergebnissen wurde mittels

einer Gradienten-PCR, bei der verschiedene Annealingtemperaturen parallel angewandt werden, die optimale Annealingtemperatur für die jeweiligen Primerpaare und Templates bestimmt. Die Primersequenzen und die jeweils angewandte Annealingtemperatur sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Die Elongationszeit **E** ergab sich aus der Größe des zu amplifizierenden Fragments. Dabei wurde 1 min pro 1 kb erwartetes Fragment gewählt. Nach der PCR wurden die Ansätze entweder direkt der Gelelektrophorese zugeführt oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

4.2.2.3 Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die DNA-Abschnitte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurden Agarosegele (SeaKem LE Agarose, BMA, Rockland, USA), 1 % (w/v) in $1\times$ TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0), verwendet. Nach Abkühlen und Aushärten des hergestellten Agarose-Gels wurde die gesamte Gelkammer in die Elektrophoresevorrichtung (Techne, Jahnsdorf) gelegt und mit $1\times$ TBE-Puffer überschichtet. Die PCR-Proben wurden mit $4\text{ }\mu\text{l}$ $6\times$ -Ladepuffer (31 % (v/v) Glycerin, 65 % (v/v) H_2O , 4 % Bromphenolblau/Xylencyanol) versetzt und anschließend kurz geschüttelt. Von diesem Ansatz wurden 10–12 μl in die Geltaschen pipettiert. Als Standard wurden 5 μl der GeneRuler-1kb-DNA-Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstant gehaltenen Spannung von 145 V durchgeführt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 30 min bei Raumtemperatur in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 μg Ethidiumbromid/ml H_2O) gefärbt und anschließend für 1 min in H_2O gewaschen. Die Dokumentation der von Ethidiumbromid, das in DNA interkaliert, abgestrahlten Fluoreszenz erfolgte auf einem Transilluminator (Dual white light/UV 302 nm, Quantum Appligene, Heidelberg). Aufnahmen wurden mit einer Videodokumentationsanlage (intas Duo-Store, intas, Göppingen) gemacht und mit einem Thermodrucker (UP-890CE, Sony, Köln) ausgedruckt bzw. als digitale Bilddatei gespeichert.

Gelextraktion

Um ein bestimmtes DNA-Fragment nach der Elektrophorese aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurde die Bande mit einem sterilen Skalpell so exakt wie möglich ausgeschnitten und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, München) nach Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA von den Säulen wurde mit 30 μl H_2O durchgeführt und die DNA nach der Konzentrationsbestimmung im BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Kapillar-Elektrophorese

Die Kapillar-Elektrophorese wurde in einem 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn) auf einem DNA-Chip (DNA 1000 Kit, Agilent, Waldbronn) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde ein Probenvolumen von 1 µl eingesetzt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Es wurden 10-prozentige Polyacrylamid-Gele verwendet, die durch Mischung der folgenden Komponenten in der dargestellten Reihenfolge hergestellt wurden:

Acrylamid 30 %:	4,0 ml
TBE-Puffer 4×:	3,0 ml
H ₂ O:	4,8 ml
APS (Ammoniumperoxodisulfat) 10 %:	140 µl
TEMED:	13 µl

Für das Gießen der Gele und die anschließende Elektrophorese wurde das Mini Protean Tetra Cell-System (BioRad, München) verwendet. Jede DNA-Probe wurde mit 6×-Ladepuffer (s. o.) versetzt, es wurden jeweils 3 µl aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für 75 min durchgeführt und die Gele anschließend analog zu den Agarose-Gelen mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert (s. o.).

4.2.2.4 Sequenzierung, Sequenzvergleich und Primerkonstruktion

Alle Sequenzier-Arbeiten wurden von GATC Biotech, Konstanz, durchgeführt. Die Probenvorbereitung wurde dabei nach Angaben der Firma durchgeführt. Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Software-Pakets Lasergene (DNASTAR, Madison, USA). Datenbankvergleiche erfolgten durch Einstellen der Sequenzen in die Suchdatenbank BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Je nach Fragmentgröße und Qualität der DNA wurden die Proben nach PCR direkt der Sequenzierung zugeführt oder zuvor in ein Sequenzier-Plasmid ligiert und durch Transformation von *E. coli* kloniert.

Direkte Sequenzierung von PCR-Proben

Die zu sequenzierenden DNA-Proben wurden nach Amplifikation durch PCR über Agarose-Gelelektrophorese von den restlichen PCR-Bestandteilen getrennt. Nach Extraktion aus dem Agarose-Gel (s. o.) wurden die DNA-Fragmente in 30 µl H₂O aufgenommen und direkt der Sequenzierung zugeführt.

Sequenzierung nach Klonierung in ein Sequenzier-Plasmid

Die Klonierung von DNA-Fragmenten wurde entweder mit dem CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) oder mit dem StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, USA) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Bei dem CloneJET PCR Cloning Kit wird das DNA-Fragment dabei zunächst mit glatten Enden versehen („Blunting“) und dann in das Sequenzier-Plasmid ligiert. Bei dem StrataClone PCR Cloning Kit wird der bei der PCR mit Taq-Polymerase entstehende A-Überhang genutzt, um das DNA-Fragment an ein Ende des Sequenzier-Plasmids zu ligieren. Mit den so hergestellten Plasmiden wurde mittels Elektroporation *E. coli* transformiert (s. 4.2.2.9). Anschließend wurde durch Kolonie-PCR (s. 4.2.2.9) ein passender Klon bestimmt und vermehrt, schließlich wurden die Plasmide durch eine Plasmid-Präparation isoliert (s. 4.2.2.9). Zur Sequenzierung wurden die Primer pJET bzw. M13 verwendet.

Primerkonstruktion

Die Konstruktion spezieller Primer (z. B. Phal_F/R, Pang_F/R, Pt_Tol, Pt_Sens) erfolgte stets auf Basis bekannter Sequenzinformation nach Sequenzierung eines DNA-Abschnitts. Dabei wurde manuell nach Sequenz-Bereichen gesucht, die sich aufgrund ihres G/C-Gehalts, ihrer Lage im Fragment und ihrer Länge für den Einsatz als Primer eigneten. Die Sequenzen der Vorwärts-Primer entsprachen jeweils der aus der Sequenzierung gewonnenen Basenpaar-Abfolge, für die Rückwärts-Primer wurde die revers-komplementäre Basenabfolge gewählt.

4.2.2.5 Real-time quantitative PCR

Die im Moment gängigste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren ist die quantitative Echtzeit-PCR oder *Real-time* quantitative PCR. Dabei findet während des PCR-Vorgangs die Messung der Menge der Amplifikate über Fluoreszenz-Detektion statt. Anfang der 1990er Jahre wurde diese Methode entwickelt, wobei der PCR-Reaktion Ethidiumbromid, das in doppelsträngige DNA interkaliert, zugesetzt wurde und damit die Möglichkeit bestand, über die Stärke der Fluoreszenz auf die Menge an amplifizierter doppelsträngiger DNA zu schließen (HIGUCHI *et al.* 1992; HIGUCHI *et al.* 1993). Das Ethidiumbromid wird heute weitestgehend durch andere Fluoreszenzfarbstoffe, allen voran SYBR Green I (Molecular Probes), ersetzt, die ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis liefern (MÜLHARDT 2003). Da allerdings bei dieser Methode neben dem korrekten Produkt auch Artefakte detektiert werden, muss die Quantifizierung immer in Relation zu einem Referenz-Amplifikat gesetzt werden. In dieser Arbeit wurden die *Real-time* quantitativen PCR-Experimente in einem LightCycler (Roche, Mannheim)

durchgeführt. Bei diesem System findet die PCR-Reaktion in feinen Glaskapillaren statt, was die PCR-Zeiten deutlich verkürzt (WITTEW *et al.* 1997). Die Experimente mit *Real-time* quantitativer PCR wurden mit dem LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I-System (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR-Ansätze hatten demnach folgende Zusammensetzung (Tab. 4.6):

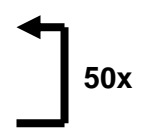
Tab. 4.6: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für *Real-time* quantitative PCR mit einem Gesamtvolumen von 20 µl

Komponente	(Bezugsquelle)	Volumen
H ₂ O, PCR-grade	(Roche, Mannheim)	13,5 µl
RT-Master-Mix 5×	(Roche, Mannheim)	4 µl
Primer A, 5 µM	(Sigma-Aldrich, München)	1 µl
Primer B, 5 µM	(Sigma-Aldrich, München)	1 µl
Template-DNA, 70 ng/µl		0,5 µl
gesamt:		20 µl

Die einzelnen Komponenten wurden direkt in die zu dem System gehörenden Glaskapillaren eingefüllt und durch kurzes Zentrifugieren am Ende der Glaskapillaren gesammelt, danach wurden die Gefäße mit einem Deckel verschlossen. Die Proben wurden anschließend in einem LightCycler 1.5 (Roche, Mannheim) dem PCR-Programm, das in Tab. 4.7 dargestellt ist, unterzogen.

Tab. 4.7: Allgemeines Standard-Programm für *Real-time* quantitative PCR
 A = Annealingtemperatur, die zuvor durch eine Temperaturreihe bestimmt worden war.

Schritt	Temperatur	Zeit
Vor-Inkubation	95 °C	10 min
Denaturierung	94 °C	10 s
Annealing	A °C	10 s
Elongation	72 °C	20 s



Nach Beendigung des jeweiligen Programmes wurde durch kontinuierlich steigende Temperatur noch eine Schmelzkurve zur Identifikation von PCR-Produkten erstellt. Die anschließende Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der zugehörigen Software LightCycler 3 Front Screen (Roche, Mannheim). Um sicherzustellen, dass es sich bei den detektierten Produkten tatsächlich um PCR-Amplifikate und nicht z. B. um Primer-Dimere

handelte, wurden die Proben am Ende durch Zentrifugation aus den Glaskapillaren in Reaktionsgefäße überführt, durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend dokumentiert (s. 4.2.2.3).

Im Idealfall kommt es in der PCR bei jedem Zyklus zu einer Verdopplung der Menge des durch die Primer definierten DNA-Abschnitts. Dies entspräche einer optimalen Amplifikations-Effizienz von $E_A = 2$. Da die Effizienz der PCR-Reaktion aber insbesondere von der Sequenz, Fragmentlänge und Reinheit der Nukleinsäure abhängig ist, muss sie in die Kalkulation miteinbezogen werden. Sie lässt sich mit folgender Formel für jeden Amplifikations-Ansatz aus der Steigung m der *Real-time*-PCR-Kurve berechnen:

$$E_A = 10^{(-1/m)}$$

Für die Berechnung der relativen Amplifikat-Mengen wurde die Effizienz der Amplifikation des Referenz-Abschnitts (*coxII*) als Standard eingesetzt. Über die Formel

$$N = N_0 \times E_A^{Cp}$$

lässt sich im Prinzip aus einer anfänglichen Anzahl an Molekülen N_0 und dem Cp -Wert die Anzahl der Moleküle N zu einem bestimmten Zeitpunkt berechnen. Als Cp -Wert wird die Anzahl der PCR-Zyklen, nach der die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert übersteigt, bezeichnet (vgl. Abb. 2.6). In der vorliegenden Studie ergab sich aus der Steigung der Fluoreszenzkurven der Amplifikation des *coxII*-Referenz-Abschnitts eine Standard-Effizienz von $E_A = 1,74$, und es konnte für jede Probe ein Referenz- Cp -Wert festgestellt werden. Ausgehend von einem anfänglichen Molekül $N_0 = 1$ ergibt sich nach Amplifikation des jeweiligen Referenz-Abschnitts zu einem nun definierten Zeitpunkt eine Molekül-Anzahl N . Die Festlegung $N_0 = 1$ ist dabei möglich, da später alle für die einzelnen Proben ermittelten Werte mit dem jeweiligen *coxII*-Referenzwert in Relation gesetzt werden und das Verhältnis von Probe zu Referenz daher nicht vom tatsächlichen Wert von N_0 abhängt; der Wert $N_0 = 1$ erleichtert jedoch die Rechnung. Somit sind als Referenzgrößen zu einem definierten Zeitpunkt für jede DNA-Probe eine Molekül-Anzahl von N_{Ref} und die Amplifikations-Effizienz $E_A = 1,74$ festgelegt. Formt man nun obige Formel um, ergibt sich:

$$N_0 = N_{Ref} / E_A^{Cp}$$

Mit Hilfe dieser Formel ließ sich nun ausgehend von der Referenz-Molekül-Anzahl N_{Ref} die jeweilige Anfangs-Molekül-Anzahl der einzelnen Proben ermitteln. Da diese dann in Relation zur angenommenen Anfangs-Molekül-Anzahl des Referenzabschnitts *coxII* ($N_0 = 1$) gesetzt wurden, konnte mit dieser Methode für jede Probe das Verhältnis des Ziel-Abschnitts der jeweiligen Primer zur Referenz *coxII* ermittelt werden.

4.2.2.6 AFLP (Amplified fragment-length polymorphism)

Zum genotypischen Vergleich verschiedener Individuen wird häufig die AFLP-Methode eingesetzt, die auf eine enzymatische Fragmentierung der Gesamt-DNA und anschließende Amplifikationsschritte basiert. Die Vorgehensweise entsprach weitestgehend der von VOS *et al.* (1995) und MUNDA *et al.* (2009). Zu Beginn wurden 500 ng DNA pro Probe mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *MspI* (FastDigest-Enzyme, Fermentas, St. Leon-Rot) für 30 min bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden zu jedem Restriktionsansatz 1,5 µl ATP (10 mM), 1,5 µl T4-DNA-Ligase (15 U), 1 µl *EcoRI*-Adapter (5 mM) und 1 µl *MspI*-Adapter (50 mM) zugegeben und die Proben bei 37 °C für 3 h inkubiert. Zur Herstellung der doppelsträngigen Adapter wurden im Vorfeld äquimolare Mengen des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsstranges vereinigt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die DNA-Sequenzen der eingesetzten Adapter sind in Tab. 4.8 aufgeführt.

Nach dem Anligieren der Adapter wurden die gesamten Ansätze jeweils 1:10 mit H₂O verdünnt, von dieser Verdünnung wurden 2 µl für den ersten Amplifikationsschritt als Template eingesetzt. Die sonstige Zusammensetzung der PCR-Ansätze entsprach der der Standard-PCRs (s. Tab. 4.5). Für den ersten PCR-Schritt wurden die wenig-selektiven Primer *EcoRI*-0 und *MspI*-0 bei einer Annealingtemperatur **A** = 56 °C und einer Elongationszeit **E** = 60 s für 20 PCR-Zyklen benutzt. Die PCR-Ansätze wurden anschließend 1:10 mit H₂O verdünnt, davon wurden 2 µl als Template für den zweiten Amplifikationsschritt mit den selektiven Primern aus MUNDA (2009) eingesetzt.

Alle AFLP-Primer-Sequenzen sind in Tab. 4.8 aufgeführt.

Tab. 4.8: AFLP-Adapter und -Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden
In der rechten Spalte ist der jeweilige Arbeitsschritt der AFLP-Methode angegeben.

Primer/Adapter	Sequenz 5' → 3'	Arbeitsschritt
Ada_ <i>EcoRI</i> _for	CTCGTAGACTGCGTACC	Prä-PCR
Ada_ <i>EcoRI</i> _rev	AATTGGTACGTCAGTCTAC	Prä-PCR
Ada_ <i>MspI</i> _for	GACGATGAGTCCTGAG	Prä-PCR
Ada_ <i>MspI</i> _rev	CGCTCAGGACTCTA	Prä-PCR
<i>EcoRI</i> -0	GACTGCGTACCAATTC	1. PCR-Schritt
<i>MspI</i> -0	GATGAGTCCTGAGCGG	1. PCR-Schritt
E-AC	GACTGCGTACCAATTCAC	2. PCR-Schritt
E-GA	GACTGCGTACCAATTCGA	2. PCR-Schritt
E-GT	GACTGCGTACCAATTCGT	2. PCR-Schritt
E-TC	GACTGCGTACCAATTCTC	2. PCR-Schritt
M-AT	GATGAGTCCTGAGCGGAT	2. PCR-Schritt
M-TC	GATGAGTCCTGAGCGGTC	2. PCR-Schritt
M-TA	GATGAGTCCTGAGCGGTA	2. PCR-Schritt
M-AG	GATGAGTCCTGAGCGGAG	2. PCR-Schritt

Im zweiten PCR-Schritt wurden 14 verschiedene Primer-Kombinationen für die Generierung von AFLP-Mustern mit folgendem PCR-Programm benutzt:

1 min 95 °C → [30 s 94 °C → 30 s 65 °C (minus 0,7 °C pro Zyklus) → 1 min 72 °C]_{13x}
→ [30 s 94 °C → 30 s 56 °C → 1 min 72 °C]_{23x} → 4 min 72 °C

Die Proben wurden anschließend mittels Agarose- oder PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt und die resultierenden Bandenmuster manuell analysiert. Bei den Experimenten mit *Plasmopara* wurden polymorphe Banden extrahiert und der Sequenzierung zugeführt.

4.2.2.7 DNA-Hybridisierung mittels Dot-Blot

Sowohl mit DNA der beiden *Plasmopara*-Spezies als auch mit DNA von *Per. tabacina* wurden DNA-Hybridisierungs-Versuche mittels Dot-Blot durchgeführt. Hierfür wurden pro DNA-Spot 5 µl DNA (70 ng/µl) des jeweiligen Organismus bei 95 °C für 3 min denaturiert und anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Von den einzelnen DNA-Proben wurden dann jeweils 4 µl auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) aufgetropft, diese wurde anschließend für 1,5 h bei 65 °C inkubiert. Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten DNA-Sonde erfolgte in DIG Easy Hyb-Puffer (Roche, Mannheim) bei 50 °C (*Per. tabacina*) bzw. 45 °C (*Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis*) über Nacht.

Die anschließende Antikörper-basierte Detektion des DIG-Signals wurde mit Hilfe des DIG Nucleic Acid Detection Kits (Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Vorgehensweise richtete sich dabei jeweils nach den Angaben des Herstellers. Die DIG-markierten DNA-Sonden waren zuvor mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) durch PCR mit DIG-markierten Nukleotiden hergestellt und anschließend durch Gelelektrophorese und Gelextraktion (s. 4.2.2.3) isoliert worden. Die dafür verwendeten Primer und PCR-Bedingungen sind in Tabelle 4.9 dargestellt. Es wurden jeweils 30 PCR-Zyklen in einem Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg) durchlaufen.

Die Ergebnisse der Dot-Blot-Experimente wurden nach Abschluss der Farbreaktion mit einer Digitalkamera (Canon PowerShot A640) festgehalten.

Tab. 4.9: PCR-Bedingungen bei der Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden
 A = Annealingtemperatur, E = Elongationszeit

DIG-Sonde spezifisch für	Primer	PCR-Bedingungen
<i>Pl. halstedii</i>	Phal_F + Phal_R	A: 58 °C; E: 40 s
<i>Pl. angustiterminalis</i>	Pang2_F + Pang2_R	A: 58 °C; E: 40 s
<i>Per. tabacina</i> S14	Pt_Tol_F + Pt_Tol_R	A: 65 °C; E: 45 s
<i>Per. tabacina</i> J2	Pt_Sens_F + Pt_Sens_R	A: 65 °C; E: 45 s

4.2.2.8 Plasmidkonstruktion und -überprüfung

Zur Konstruktion der Plasmide wurden Gel-aufgereinigte PCR-Fragmente, die bei der PCR mit bestimmten Restriktions-Schnittstellen versehen worden waren, oder DNA-Abschnitte aus anderen Plasmiden durch Restriktionsverdau geschnitten und anschließend durch Ligation miteinander verbunden. Zur Vervielfältigung der Konstrukte wurde dann *E. coli* mit diesen Plasmiden transformiert (s. 4.2.2.9).

Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde in einem Endvolumen von 20 µl mit 1 U von jedem Restriktionsenzym vorgenommen. Es wurden dabei ausschließlich Restriktionsenzyme von Fermentas (St. Leon-Rot) mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern verwendet. Bei Einsatz von FastDigest-Enzymen wurde für 30 min, bei herkömmlichen Enzymen 2 h bei 37 °C verdaut und die Reaktion anschließend durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min gestoppt. Die so geschnittenen DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt (s. 4.2.2.3) und nach der Konzentrationsbestimmung am BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) für die Ligation verwendet. Um bei Plasmiden, die nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten worden waren, eine Religation ohne Insert zu verhindern, wurden die Reaktionsansätze vor der Gelelektrophorese mit 1 µl (1 U) Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP, Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Dadurch werden die 5'-Enden des geschnittenen Plasmids dephosphoryliert und können ohne Insert nicht religiert werden. Am Ende wurde die Reaktion durch Inkubation für 10 min bei 85 °C gestoppt.

Ligation

Die Ligation von geschnittenen DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot). Es wurden pro 20 µl Ligationsreaktion 1 µl (10 U) des Enzyms eingesetzt, der Ligations-Ansatz wurde anschließend für 2 h bei Raumtemperatur bzw.

über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es wurde dabei stets ein molares Verhältnis von Plasmid-Rückgrat zu Insert von 1:5 eingestellt. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Aufheizen auf 65 °C für 10 min gestoppt. Die Ligationsansätze wurden dann direkt zur Transformation von *E. coli* benutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Eine Aufreinigung des Ligationsansatzes mit Hilfe des illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare Life Sciences, München) erfolgte nur, wenn es bei der anschließenden Elektroporation von *E. coli* zu Problemen durch zu hohe Salzkonzentrationen kam.

Konstruierte Plasmide

Zur Herstellung einzelner Gen-Kassetten (Promotor-Gen-Terminator) wurde zunächst das Plasmid pOom_blank konstruiert. Hierfür wurden der Ham34-Promotor und der Ham34-Terminator mittels PCR mit den Primern Prom34_F_Not1 und Prom34_R_Pst1 bzw. Term34_F_Cla1 und Term34_R_Apa1 (Sequenzen s. Tab 4.2) aus DNA von *Bremia lactucae* amplifiziert und durch die eingesetzten Primer mit Restriktionsschnittstellen versehen, an denen die Fragmente anschließend geschnitten wurden. Die Primer waren zuvor auf Basis bekannter DNA-Sequenzen (JUDELSON *et al.* 1992) konstruiert worden (s. 4.2.2.4). So wurden der Ham34-Promotor als *NotI/PstI*-Fragment und der Ham34-Terminator als *ClaI/ApaI*-Fragment in das Plasmid pBluescript II KS(+) (Stratagene, La Jolla, USA) ligiert. Die Schnittstellen wurden hierbei so gewählt, dass zwischen die Oomyceten-spezifischen Regulatoren ein beliebiges Gen, das mit einer *EcoRI*- (vor dem open reading frame) und einer *HindIII*-Schnittstelle (nach dem open reading frame) versehen wurde, ligiert werden kann. Auf diesem Wege konnten die Gene *hph*, *nptII* und *mCherry*, die jeweils ebenfalls durch PCR amplifiziert und mit der *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstelle versehen worden waren (Primer *hyg_F_EcoR1* und *hyg_R_Hind3*, *npt2_F_EcoR1* und *npt2_R_Hind3* bzw. *mCherry_F_EcoR1* und *mCherry_R_Hind3*, Sequenzen s. Tab 4.2), zwischen die Regulatoren ligiert und damit drei Oomyceten-spezifische Gen-Kassetten geschaffen werden. Das Gen *hph* war aus pGreen0179, *nptII* aus pGreen0029 und *mCherry* aus pMCherry-Actin amplifiziert worden. Als Kontrolle, ob die Gene korrekt amplifiziert worden waren, wurden sie außerdem einzeln in pBluescript II KS(+) ligiert und auf Expression in *E. coli* überprüft. Im Falle der beiden Resistenzgene *hph* und *nptII* wurden dann die gesamten DNA-Abschnitte bestehend aus Promotor, Gen und Terminator jeweils als *SacI/ApaI*-Fragment in pGreenII_0000 ligiert, um Plasmide zu erhalten, die für *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation geeignet sind. Das Konstrukt Promotor-*mCherry*-Terminator wurde anschließend als Fragment mit glatten Enden über die *KpnI*-Stelle in jedes der hergestellten Resistenz-Plasmide integriert, um so die Plasmide pGreenII_34MchN

(enthält die Konstrukte mit *nptII* und *mCherry*) und pGreenII_34HyMch (enthält die Konstrukte mit *hph* und *mCherry*) zu generieren (vgl. Abb. 2.20). Da für die Konstrukte mit *gfp* bereits das Plasmid p34GF (Si-AMMOUR *et al.* 2003) zur Verfügung stand, das die Gen-Kassette Promotor-*gfp*-Terminator enthält, wurde dieser Abschnitt als *EcoRI/HindIII*-Fragment aus p34GF ausgeschnitten, in pBluescript II KS(+) ligiert und als *NotI/ApaI*-Fragment in pGreenII_0000 eingebracht. Die Konstrukte Promotor-*hph*-Terminator bzw. Promotor-*nptII*-Terminator wurden dann als *BamHI/SacI*-Fragment hinzugefügt, um so die Plasmide pGreenII_34GFN und pGreenII_34GFHyg zu erhalten (vgl. Abb. 2.20).

Überprüfung der Konstrukte durch Sequenzierung

Um die korrekte Zusammensetzung der konstruierten Plasmide zu überprüfen und eventuelle Fehler in der DNA-Sequenz, die zu „frame shifts“ und einem Verlust der Funktionsfähigkeit der Plasmide führen könnten, ausschließen zu können, wurden die einzelnen Abschnitte sequenziert. Hierfür wurden PCR-Amplifikationen der eingebauten Genkassetten mithilfe der an den Promotor bzw. Terminator bindenden Primer vorgenommen. Die Amplifikate wurden nach Gelelektrophorese extrahiert und wie im Vorfeld beschrieben der Sequenzierung zugeführt. Die Sequenzen wurden anschließend mit den bekannten Gensequenzen und den Sequenzen des Promotor- und Terminatorbereichs verglichen.

4.2.2.9 Kultivierung und Transformation von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C entweder auf Agarplatten oder in Flüssigkultur in einem Schüttelinkubator (Excella E24, New Brunswick Scientific, Edison, USA). Es wurden folgende Kulturmedien verwendet:

Bakterien-Flüssigmedium: 25 g Luria-Bertani Medium; 1 l H₂O

Bakterien-Agar: 25 g Luria-Bertani Medium; 20 g Agar Kobe I; 1 l H₂O

SOB-Medium: 20 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt (Difco, Franklin Lakes, USA); 0,5 g NaCl; 1 l H₂O. Nach Autoklavieren Zugabe von 10 ml steril filtriertem MgCl₂ und 10 ml steril filtriertem MgSO₄ (Merck, Darmstadt).

SOC-Medium: 98 ml SOB-Medium; 2 ml steril filtrierte 20 % (w/v) Glukose

Zur Selektion von transformierten Bakterien wurden den Kulturmedien je nach eingebrachtem Plasmid die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) und pro Agarplatte 40 µl X-Gal (2 % (w/v) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid in Dimethylformamid) zur Blau-Weiß-Selektion zugesetzt.

Um elektrokompente Bakterien zu erhalten, wurden Zellen von *E. coli* DH10B bei 37 °C über Nacht in 500 ml Bakterien-Flüssigmedium angezogen und die Bakterien anschließend nach MÜLHARDT (2003) durch mehrere Waschschriffe in eiskaltem H₂O elektrokompent gemacht. Die Zellen wurden dann in Aliquots zu 40 µl bei –70 °C bis zu ihrer Verwendung eingefroren. Für die Transformation wurden 40 µl der Bakteriensuspension und 1 µl des Ligationsansatzes auf Eis in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite (Biozym, Hessisch Oldendorf) gegeben und bei 1,8 kV Spannung in einem Elektroporator (MicroPulser, Bio-Rad Laboratories, München) einem Elektroschock ausgesetzt. Sofort danach wurden 960 µl kaltes SOC-Medium zugegeben, das Gemisch in ein 13-ml-Kunststoffröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Suspension auf einer Bakterien-Agarplatte mit Selektions-Zusatz ausplattiert. Die restliche Suspension wurde durch Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes auf 50 µl eingengt und auf eine zweite Selektions-Agarplatte gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Aufbewahrung der über Nacht herangewachsenen Bakterienkolonien wurden die Agarplatten mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Kolonie-PCR

Neben der Selektion über Antibiotika-Zusatz (nur Plasmid-tragende Bakterien überleben) oder Blau-Weiß-Reaktion (blau gefärbte Bakterien tragen Plasmid ohne Insert) wurde zur Verifizierung der erfolgreichen Transformation und zur Selektion des „richtigen“ Bakterienklons noch eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die nach der Elektroporation auf Selektionsplatten herangewachsenen Kolonien von *E. coli* wurden jeweils mit einem sterilen Zahnstocher beprobt und durch mehrmaliges Drehen des Zahnstochers direkt in den PCR-Ansatz, der statt Template-DNA 2 µl mehr H₂O enthielt, überführt. Der Rest des Reaktionsansatzes entsprach dem in Tab. 4.4 dargestellten allgemeinen Reaktionsansatz. Das PCR-Programm entsprach ebenfalls dem in Tab. 4.5 gezeigten allgemeinen Programm, außer dass eine initiale Denaturierung von 5 min durchgeführt wurde. Für die Kolonie-PCR wurden Primer verwendet, die am Plasmid-Rückgrat binden. Daher konnte in der anschließenden Gelelektrophorese und Bilddokumentation (s. 4.2.2.3) die Größe des Plasmid-Inserts bestimmt werden. Die ausgewählten Kolonien wurden dann mit

einem sterilen Zahnstocher in 5 ml Bakterien-Flüssigmedium mit Antibiotika-Zusatz überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Glycerinkultur und Plasmidpräparation

Um das gewünschte Plasmid aus den transformierten Bakterien zu isolieren, wurden 4 ml der Übernachtskultur für die Plasmid-Präparation verwendet. Zur Sicherung der Bakterienstämme wurden zudem 500 µl der Übernachtskultur mit 500 µl Dauerkultur-Lösung (65 % (v/v) steril filtriertes Glycerin; 0,1 M MgSO₄; 25 mM Tris; pH 8,0) gemischt und bei -70 °C eingefroren. Die Plasmidpräparation wurde mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, die Plasmide wurden nach Konzentrationsbestimmung am BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bei -20 °C eingefroren.

4.2.2.10 Transformation von *Phytophthora infestans* und *Plasmopara halstedii*

Transformation von *Phytophthora infestans*

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der konstruierten Plasmide sollte die Transformation von *P. infestans* vorgenommen werden. Hierfür wurde ein etabliertes „Particle Gun“-Protokoll von CVITANICH und JUDELSON (2002) übernommen, wobei die Kultivierung von *P. infestans* nicht wie in dem Protokoll beschrieben auf Roggen-Agar, sondern auf Gemüsesaft-Agar (8,1 g Agar-Agar, 1 g Calciumcarbonat, 125 ml Bio-Gemüsesaft [Ammecke, Edeka], 375 ml H₂O) bei 16 °C im Dunkeln erfolgte. Sporangien von *P. infestans* wurden auf ein steriles Filterpapier aufgetropft und das Filterpapier für 4 h auf Gemüseagar + 0,8 M Mannitol inkubiert. Das Bombardement erfolgte bei Einsatz von Rupture Disks mit 1350 psi (BioRad, München) und 9 cm Probenabstand zum Goldpartikel-Carrier in einer Beschussvorrichtung (Particle Gun PDS-1000/He Biolistic Delivery System, BioRad, München). Weitere 4 h nach dem Beschuss mit den Plasmid-behafteten Goldpartikeln wurde das Filterpapier samt Sporangien auf Gemüseagar ohne Mannitol überführt und 24 h bei 16 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das Filterpapier in 5 mm breite Streifen geschnitten und auf Gemüseagar mit dem jeweiligen Selektionsmittel (10 µg/ml G418 oder 10 µg/ml Hygromycin B) bei 16 °C im Dunkeln inkubiert. Die Agarplatten wurden täglich visuell auf *P. infestans*-Kolonien überprüft.

Protoplastierung, Lipofektion und Elektroporation an *Pl. halstedii*

Es sollte ein Transformationssystem für *Pl. halstedii* entwickelt werden, das die optische Markierung des Oomyceten erlaubt. Dabei wurden verschiedene Methoden angewandt. Die Vorgehensweise bei der Protoplastierung und Lipofektion orientierte sich an HAMADA

et al. (1994). Eine Spatelspitze abgesaugte Sporangien von *Pl. halstedii* wurden in 1 ml Stabilisierungspuffer (0,6 M KCl; 50 mM CaCl₂) suspendiert und dann mit 1 mg Enzym (Lysing Enzymes from *Trichoderma*, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt. Der Protoplastierungs-Ansatz wurde dann für 4 h bei 20 °C im Dunkeln inkubiert und alle 30 min vorsichtig invertiert. Nach der Inkubation wurden die Protoplasten zweimal in frischem Stabilisierungspuffer gewaschen und jeweils bei 3000× g für 10 min abzentrifugiert. Die Protoplasten wurden dann in 100 µl frischem Stabilisierungspuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Für die Lipofektion wurde der Protoplasten-Suspension die DNA-Lösung bestehend aus 40 µl (10 µg) Plasmid-DNA, 5 µl (50 mM) Spermin und 100 µl PEG4000, zugesetzt. Das Gemisch wurde für 20 min auf Eis inkubiert, dann wurden 500 µl PEG4000 zugegeben, gefolgt von 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 250 µl Stabilisierungspuffer zugegeben, die Protoplasten auf frische Sonnenblumen-Blattscheiben überführt (auf H₂O in einer Replika-Schale) und für 48 h bei 16 °C im Dunkeln inkubiert.

Bei der Elektroporation der Protoplasten wurde nach dem Protokoll von DUBRESSON *et al.* (2008) vorgegangen, wobei statt Zoosporen die gewaschenen Protoplasten in einer 0,2-cm-Elektroporations-Küvette (Biozym, Hessisch Oldendorf) zusammen mit 15 µg Plasmid bei 2,75 kV und 4 ms Pulsdauer in einem Elektroporator (MicroPulserTM, Bio-Rad Laboratories, München) dem Elektroschock ausgesetzt und sofort danach in 500 µl Stabilisierungspuffer resuspendiert wurden. Die elektroporierten Protoplasten wurden wie oben beschrieben auf frische Sonnenblumen-Blattscheiben überführt. Alle Ansätze wurden dann im Klimaschrank den für die sonstige Kultivierung des Pathogens angewandten Bedingungen (vgl. 4.2.1.2) unterzogen.

Agrobacterium tumefaciens-vermittelte Transformation von *Pl. halstedii*

Elektrokompetente Zellen von *A. tumefaciens* GV3101::pMP90 wurden wie in Abschnitt 4.2.2.9 für *E. coli* beschrieben durch Elektroporation mit den konstruierten pGreen-Plasmiden (vgl. Abb. 2.20) transformiert. Die Inkubation erfolgte nach der Transformation allerdings stets bei 30 °C und einer Selektion mit Gentamycin (50 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml). Nach der Kolonie-PCR (s. o.) wurden passende Klone ausgewählt und in 2 ml Bakterien-Flüssigmedium unter Selektionsbedingungen bei 30 °C für 48 h angezogen. 1 ml der Bakterien-Suspension wurde bei 3000× g für 5 min abzentrifugiert und zweimal mit 1 ml Induktionsmedium (10 mM K₂HPO₄; 10 mM KH₂PO₄; 2,5 mM NaCl; 2 mM MgSO₄; 0,7 mM CaCl₂; 9 µM FeSO₄; 4 mM NH₄SO₄; 10 mM Glukose, 40 mM MES (2-[N-morpholino] ethanesulfonsäure); pH 5,3; 0,5 % (w/v) Glycerin; 100 µM Acetosyringon) (VIJN & GOVERS 2003) gewaschen. Die Zellen wurden dann in 5 ml Induktionsmedium

aufgenommen und für 5 h bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Das Induktionsmedium wurde eingesetzt, um die Transformationsrate zu steigern. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal mit H₂O gewaschen.

Für die Transformation des Oomyceten wurde die *A. tumefaciens*-Suspension direkt nach dem Waschen 1:1 mit einer *Pl. halstedii*-Sporangiensuspension (frisch abgesaugt; 2 × 10⁶ pro ml in H₂O) vermischt und

- a) 24 h bei 16 °C in H₂O im Dunkeln inkubiert, dann auf frische Sonnenblumen-Blattscheiben überimpft;
- b) 24 h auf Induktionsmedium-Agarplatten (0,8 % Agar) bei 16 °C im Dunkeln inkubiert, dann wurden die Sporangien abgewaschen und auf frische Sonnenblumen-Blattscheiben überimpft;
- c) tropfenweise auf mit einer feinen Nadel verletzte Sonnenblumen-Blattscheiben aufgebracht und 10 Tage im Klimaschrank inkubiert, danach wurde die Sporulation des Pathogens induziert.

Bei dem anschließenden Überimpfen auf frische Blattscheiben wurden 30 µg/ml Chloramphenicol zugegeben, um noch lebende *A. tumefaciens* abzutöten. Nach 10-tägiger Inkubation im Klimaschrank und Induktion der Sporulation wurden die F₁-Sporangien auf transgene Eigenschaften (Fluoreszenz, Resistenz) untersucht.

4.2.2.11 Proteinextraktion und Isozym-/Allozym-Auftrennung

Als Isozyme (oder Isoenzyme) bezeichnet man verschiedene Formen eines Enzyms, die zwar alle die gleiche Reaktion katalysieren, sich aber in ihrer Aminosäure-Sequenz unterscheiden. Sie werden von Genen codiert, die jeweils unterschiedliche Loci besitzen, also an unterschiedlichen Stellen auf der DNA codiert sind. Allozyme sind ebenfalls Varianten eines Enzyms, die im Gegensatz zu den Isozymen auf dem gleichen Genlocus, aber von unterschiedlichen Allelen codiert werden. Da sich durch die Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz unterschiedliche Laufeigenschaften im elektrischen Feld ergeben, können Isozyme und Allozyme aus einem Protein-Rohextrakt über Elektrophorese voneinander getrennt werden. Es können dafür als Matrix Stärke-Platten verwendet werden, wobei man heute eher Cellulose-Acetat-Platten einsetzt (HEBERT & BEATON 1993). Um die getrennten Enzyme sichtbar zu machen, werden auf das jeweilige Enzym

abgestimmte Färbe-Reagenzien verwendet, die auf der individuell von dem Enzym katalysierten Reaktion basieren. Diese Methode setzt voraus, dass die Enzyme nach der Auftrennung noch funktionsfähig sind, was aber bei sorgfältiger Handhabung kein Problem darstellt. Isozym-/Allozym-Analyse mit Hilfe von Cellulose-Acetat-Elektrophorese wird seit Mitte der 1980er Jahre zur Lösung verschiedenster Fragestellungen angewandt (HEBERT & BEATON 1993). So wurden mit dieser Technik u. a. taxonomische Unklarheiten beseitigt, unbekannte Isolate identifiziert, die geographische Herkunft von Organismen geklärt, diagnostische Analysen durchgeführt und die genetische Variabilität innerhalb von Populationen untersucht (BRASIER 1987; ANDREWS *et al.* 1988; BONDE *et al.* 1991; OUDEMANS & COFFEY 1991; CHEN *et al.* 1992; MICALES *et al.* 1992; FORBES *et al.* 1998; LADAY *et al.* 2000; MAN IN 'T VELD *et al.* 2002). Ebendiese Anwendung zur Untersuchung der Variabilität machte diese Methode auch für die vorliegende Arbeit interessant. Die Technik benötigt nur sehr geringe Mengen an Ausgangsmaterial (HEBERT & BEATON 1993) und ist empfindlich genug, um verschiedene Genotypen innerhalb von Populationen zu identifizieren (MOSA *et al.* 1993). Dass die Isozym-/Allozym-Analyse über Cellulose-Acetat-Elektrophorese auch für Populationsstudien an Oomyceten einsetzbar ist, konnte bereits mehrfach gezeigt werden, so zum Beispiel an *Phytophthora nicotianae* und *Phytophthora cactorum* (MAN IN 'T VELD *et al.* 1998), an *Phytophthora infestans* (GOODWIN *et al.* 1995; COOKE & LEES 2004), *Phytophthora cinnamomi* (OLD *et al.* 1988) und *Plasmopara halstedii* (KOMJÁTI *et al.* 2008).

Die Protein-Extraktion erfolgte aus 15 mg abgesaugten Sporangien. Die Vorgehensweise orientierte sich dabei an der Methode von KOMJÁTI *et al.* (2008): 15 mg Sporangien wurden in ein 2-ml-Reaktionsgefäß eingewogen und mit drei Metallkugeln (Sarstedt, Nümbrecht) in einer Schüttelmühle (Retsch, Haan) für 2 min bei 60 Hz aufgeschlossen. Es wurden dann sofort 200 µl eiskalter Protein-Extraktionspuffer (100 mM Tris; 1 mM EDTA; 10 mM KCl; 6,5 mM DTT; 1,4 % PVP40000) zugegeben und die Proben nach mehrmaligem Schütteln für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 12000×g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die oberste Schicht des Überstandes nicht mit überführt wurde. Dieser Reinigungsschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt und der geklärte Protein-Extrakt dann bei –20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Die Isozym-/Allozym-Auftrennung und die anschließende Enzym-spezifische Färbung erfolgten nach der Anleitung von HEBERT & BEATON (1993). Es wurden Cellulose-Acetat-Folien (Sigma-Aldrich, München) verwendet und pro Probe 1,5 µl des jeweiligen Proteinextrakts in einem dünnen Strich mit einer Pipette aufgetragen. Der Bereich des aufgetragenen Materials wurde auf der Platte mit einem Bleistift markiert, um den

Startpunkt der Elektrophorese festzuhalten. Die Folien wurden nach Trocknen der Proben mit den Proben nach unten in eine Elektrophorese-Kammer (Biometra, Göttingen) gelegt und hatten dabei außen über zwei Streifen Filterpapier (Macherey-Nagel, Düren) Kontakt mit dem jeweiligen in der Kammer befindlichen Puffer. Zur Stabilisierung der Cellulose-Acetat-Platten wurden sie beidseits mit jeweils drei Standard-Mikroskop-Objektträgern (Carl Roth, Karlsruhe) beschwert. Die Elektrophorese wurde bei 160 V für 50 min durchgeführt, die Platten wurden anschließend nach der Anleitung von HEBERT & BEATON (1993) mit dem jeweils enzyspezifischen Reaktionsgemisch gefärbt. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera (Canon PowerShot A640).

4.2.3 Mikroskopische Methoden

4.2.3.1 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopie und Fotodokumentation

Zur Untersuchung im Hellfeld wurden die Proben zusammen mit einem Tropfen H₂O auf einem Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Im Falle von Pflanzengewebe wurde dieses mit einer Rasierklinge dünn geschnitten, Sporangien wurden direkt mit dem Wasser auf den Objektträger gegeben. Die Mikroskopie erfolgte an einem Lichtmikroskop (BIOMED, Leitz, Stuttgart). Bei der Beobachtung von Sporangien auf Agar wurde ein Umkehrmikroskop (Wilovert S, Hund, Wetzlar) eingesetzt. In beiden Fällen wurden Fotos der Präparate durch Aufsetzen einer Digitalkamera (Canon PowerShot A640) gemacht.

Sporangien-Vermessung und Zoosporen-Zählung

Die Vermessung von Sporangien erfolgte mit Hilfe einer Analyse-Software (Zeiss AxioVision 4.7) an digitalen Bildern, die zuvor am Lichtmikroskop (s. o.) aufgenommen worden waren. Zur Zählung von Zoosporen wurden Sporangien auf Petrischalen mit 0,8 % Wasseragar überführt und 1–3 h bei 16 °C im Dunkeln inkubiert. Dabei wurde halbstündlich die Zoosporen-Freisetzung aus den Sporangien visuell am Umkehrmikroskop überprüft und freigesetzte Zoosporen, die sich in der Umgebung eines Sporangiums befanden, gezählt. Aus den Rohdaten wurden anschließend die Mittelwerte, die Minima, die Maxima und die Standardabweichungen mithilfe der Software Microsoft Excel berechnet.

Statistische Auswertung der Daten

Zur statistischen Auswertung der Vermessungs- bzw. Zählergebnisse wurde jeweils ein t -Test zweier unabhängiger Stichproben durchgeführt, da dieser für annähernd normalverteilte Werte mit ausreichender Stichprobenzahl n angewandt werden darf, sofern die Varianzen der Werte gleich sind (LOZÁN & KAUSCH 2007). Die Robustheit des t -Tests für die hier untersuchten Werte wurde überprüft und der t -Test dabei stets für anwendbar befunden, da die gemessenen Werte annähernd normalverteilt waren, die Stichprobengröße jeweils ausreichend war und die Gleichheit der Varianzen mittels des PFANZAGL-Tests (LOZÁN & KAUSCH 2007) überprüft wurde. Die Eigenschaften zweier zu vergleichender unabhängiger Proben wurden beim t -Test dann als signifikant unterschiedlich gewertet, wenn $|t|$ größer als die Signifikanzschranke 1,97 und die Stichprobengröße gleichzeitig ausreichend war, also das Wahrscheinlichkeitsmaß $p < 0,05$ betrug.

4.2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan, Carl Zeiss, Oberkochen) mit Fluoreszenzeinsatz und die Bilddokumentation mittels einer angeschlossenen Digitalkamera (Canon PowerShot A640). Je nach Präparat wurden die in Tabelle 4.10 aufgeführten Fluoreszenzfiltersätze eingesetzt.

Tab. 4.10: Fluoreszenzfiltersätze und ihre Anwendung
Die zweite Spalte zeigt die Anregungswellenlänge in nm.

Filtersatz	Anregung	Betrachtung von
I	365 nm	DAPI, Anilinblau
II	395–440 nm	Anilinblau
III	450–490 nm	GFP
IV	546 nm	mCherry

Pflanzengewebe wurde wie bei der Hellfeld-Mikroskopie mit einer Rasierklinge dünn geschnitten, Sporangien und andere freie Pathogen-Strukturen wurden direkt eingesetzt. Die Proben wurden zusammen mit H₂O oder nach Inkubation mit einem Fluoreszenz-Farbstoff auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas bedeckt.

Die Präparate wurden dabei direkt in einen Tropfen des jeweiligen Farbstoffes auf den Objektträger gegeben und anschließend bis zum Mikroskopieren, mindestens jedoch für 30 min, bei 4 °C im Dunkeln in einer Kunststoffbox mit feuchtem Filterpapier aufbewahrt. Für die Färbung von Kallose-haltigen Bereichen wie Hyphen und Septen wurde Anilinblau

(0,2 % Anilinblau [Serva, Heidelberg] in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer [0,2 M Na₂HPO₄ + 0,2 M NaH₂PO₄, pH 7,2]) eingesetzt. Zellkerne wurden mit DAPI (1 µg/ml in H₂O), das in DNA interkaliert, gefärbt.

4.2.3.3 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Es wurde eine Verlaufsstudie der Sporulation von *Pl. halstedii* durchgeführt, wobei Keimblattstücke von befallenen Sonnenblumen als Proben dienten, die in stündlichen Abständen nach Induktion der Sporulation eingefroren worden waren. Pro Zeiteinheit wurden fünf Keimblattstücke untersucht, um repräsentative Aussagen über das jeweilige Stadium treffen zu können. Die Keimblattstücke (ca. 0,8 x 0,8 cm) der befallenen Sonnenblumenpflanzen wurden bei -20 °C eingefroren und anschließend im Exsikkator für zwei Tage im Vakuum über Kieselgel getrocknet. Die trockenen Proben wurden mit Leitfolie (Durchmesser 12 mm, Plano, Wetzlar) auf Aluminium-Objekttischen (Durchmesser 15 mm, Höhe 10 mm) aufgeklebt und anschließend für 8 min „besputtert“. Dabei wurde eine 40–50 nm dicke Gold-Palladium-Schicht (80:20) mit einem Sputter-Gerät (SCD 040, Balzers Union, Trübbach, Schweiz) aufgebracht. Die fertigen Proben wurden am Rasterelektronenmikroskop (DSM 940, Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer Kathodenspannung von 5 kV und einem Arbeitsabstand von 10 mm untersucht. Die Übertragung auf einen Computer für die fotografische Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit der Software „Orion“.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte nach Hinweisen für genetischen Austausch im asexuellen Lebenszyklus bei ausgewählten Vertretern obligat biotropher Oomyceten gesucht werden, um den Einfluss solcher Rekombinationsmöglichkeiten auf die Variabilität dieser wichtigen Gruppe der Pflanzenpathogene einschätzen zu können. Es wurden dabei zwei Fallstudien am Falschen Mehltau der Sonnenblume, *Plasmopara halstedii*, und dem Erreger des Tabak-Blauschimmels, *Peronospora tabacina* einander gegenübergestellt. Die beiden Pathogene weisen in ihrem Lebenszyklus keine bekannten Rekombinationsmöglichkeiten auf, unterscheiden sich aber deutlich hinsichtlich ihrer Variabilität. Mit molekularbiologischen Methoden konnten zahlreiche Hinweise auf eine interspezifische parasexuelle Rekombination zwischen den nah verwandten *Plasmopara*-Spezies *Pl. halstedii* und *Pl. angustiterminalis* gefunden werden, die die überraschende Variabilität dieser Erreger erklären könnten. Ein unter Ausschluss sexueller Vermehrung aus einem Dualinfektionsansatz nach doppelter Selektion gebildeter Tochterstamm wies phäno- und genotypische Eigenschaften der beiden Kreuzungspartner in neuer Kombination auf. Der rekombinante Tochterstamm wurde über mehr als 30 Generationen beobachtet und zeigte zunächst ein additives Verhalten von Zellkern- und mitochondrialen Merkmalen, was auf ein Heterokaryon mit Zellkernen beider Elternstämme schließen ließ. Ab der zehnten Generation waren nur noch *Pl. angustiterminalis*-spezifische Signale detektierbar, obwohl die Fungizid-Resistenz als *Pl. halstedii*-spezifisches Merkmal immer noch vorhanden war. Dies ließ echte genetische Rekombination vermuten. Es wurden zudem bei *Pl. halstedii* der Übertritt von Zellkernen durch Anastomosen in benachbarte Hyphen sowie die Weitergabe von mehr als einem Zellkern an mitotisch gebildete Sporangien gezeigt. Beide Erkenntnisse legen die Möglichkeit der postulierten heterokaryontischen Nachkommen dar, die genetisches Material beider Interaktionspartner besitzen. Für den endgültigen Nachweis von Anastomosen zwischen unterschiedlichen *Plasmopara*-Spezies muss eine spezifische optische Markierung der beteiligten Hyphen erfolgen. Zu diesem Zweck wurden Versuche für ein stabiles Transformationssystem durchgeführt, das über die bisher erreichte transiente Expression der eingebrachten Marker hinaus eine stabile Veränderung obligat biotropher Oomyceten ermöglichen könnte. Eine erfolgreiche Transformation wurde jedoch nicht erreicht.

Bei *Peronospora tabacina*, dem Erreger des Tabak-Blauschimmels, konnten im Gegensatz zu der *Plasmopara*-Studie keine Hinweise auf Rekombination im asexuellen Lebenszyklus gefunden werden. Auch Anastomosen als mögliche Strukturen zum Austausch genetischen Materials zwischen zwei Pathogen-Stämmen wurden nicht nachgewiesen. Diese Resultate stützen den Befund, dass *Per. tabacina* nur wenig

variabel ist, werfen aber die Frage auf, warum es zwischen den beiden bisher bekannten Typen des Erregers trotz paralleler Infektion desselben Wirts nicht zu Interaktionen kommt. Daher wurden die beiden Phänotypen, die sich in ihrer Fungizid-Resistenz unterscheiden, näher charakterisiert, und es konnten neue phäno- und genotypische Unterscheidungsmerkmale gefunden werden, die die Distanz zwischen den beiden Erreger-Typen verdeutlichen und nahe legen, dass es sich bei den beiden Typen eventuell um verschiedene Pathogene handelt. Es wurde zudem ein einfaches Nachweissystem geschaffen, mit dem in einem europäischen Monitoring alle verfügbaren Isolate eindeutig einem der beiden Typen von *Per. tabacina* zugeordnet werden können.

Summary

Evidence for gene transfer during the asexual life cycle of certain biotrophic oomycetes was searched for in this study in order to evaluate the potential impact of such parasexual recombination on the variability of these important plant pathogens. Therefore, two case studies with *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew, and with the tobacco blue mould pathogen, *Peronospora tabacina*, were conducted. Although the life cycles of both pathogens lack the possibility of genetic recombination, the organisms differ significantly in their variability. Using molecular methods, several indications for interspecific parasexual recombination between the near relatives *Plasmopara halstedii* and *Plasmopara angustiterminalis* were found, giving a possible explanation for the unexpected variability of these pathogens. Asexually formed offspring from dual infection experiments with the two *Plasmopara* species showed pheno- and genotypic parental traits in new combination and could be cultivated under double selective pressure. The recombinant strain 'R' was studied over 30 generations. Up to the 9th generation and after single sporangium infection, nuclear and mitochondrial traits of both parents were detected in 'R', indicating a heterokaryon with nuclei and mitochondria of both parental strains. Starting with the 10th generation only fungicide-resistance remained as *Pl. halstedii*-specific trait, whereas all other detected signals were *Pl. angustiterminalis*-specific, which indicated true genetic recombination. As one possible mechanism for the genetic exchange it was shown that nuclei can be exchanged between neighbored hyphae via anastomoses and that more than one nucleus can be distributed into one developing sporangium. To prove anastomoses between the different *Plasmopara* species, specific optical labelling of the participating hyphae is a prerequisite. However, only transient expression of an optical marker gene was achieved, yet. Additional

experiments for establishing a stable transformation system were conducted, but were not yet successful in selecting transgenic strains.

In contrast to the study on *Plasmopara*, there was no evidence for recombination in *Peronospora tabacina*. Neither anastomoses nor heterokaryotic sporangia were found throughout the study. The results are concordant with the findings that tobacco blue mould shows very low variability and that only two phenotypes are known so far from studies in Europe. As the two types of the pathogen, which differ in fungicide sensitivity, did not interact during parallel infection of the same host tissue, they were characterized in detail. Several new pheno- and genotypic differences could be revealed, showing the genetic distance between the two types of the pathogen. A simple PCR detection system to differentiate the two genotypes was created and more than 50 European isolates of tobacco blue mould were monitored.

6 Literatur

- Agrios, G. N.** (2005): *Plant Pathology*. (Burlington, USA: Elsevier Academic Press).
- Aimi, T., Yotsutani, Y. & Morinaga, T.** (2002): Cytological Analysis of Anastomoses and Vegetative Incompatibility Reactions in *Helicobasidium monpa*. *Current Microbiology* **44** (2), 148-152.
- Albourie, J. M., Tourvieille, J. & Tourvieille De Labrouhe, D.** (1998): Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology* **104** (3), 235-242.
- Andrews, R., Kirby, G. C. & Adams, M.** (1988): The population biology of a smut fungus, *Ustilago spinificis* Ludw. II. Isozyme polymorphism and geographic differentiation. *Australian Journal of Botany* **36** (3), 347-352.
- Bailey, M., Mena, G. L. & Herrera-Estrella, L.** (1991): Genetic transformation of the plant pathogens *Phytophthora capsici* and *Phytophthora parasitica*. *Nucleic Acids Research* **19** (15), 4273-4278.
- Bakerspigel, A.** (1965): Cytological Investigations of the Parasexual Cycle in Fungi. *Mycopathologia et mycologia applicata* **26** (2), 233-240.
- Bakonyi, J., Ládai, M. & Ersek, T.** (2002): Characterization of parental traits in somatic fusion progeny of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora nicotianae*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **37** (1-3), 33-46.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B. & Schaller, H.** (1982): Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from Transposon Tn5. *Gene* **19** (3), 327-336.
- Becker, T. C. A. & Alves De Castro-Prado, M. A.** (2006): Parasexuality in asexual development mutants of *Aspergillus nidulans*. *Biological Research* **39** (2), 297-305.
- Blancard, D.** (1998): *Maladies du tabac*. (Paris: INRA).
- Boccas, B. R.** (1981): Interspecific crosses between closely related heterothallic *Phytophthora* species. *Phytopathology* **71** (1), 60-65.
- Bonde, M. R., Peterson, G. L., Emmett, R. W. & Menge, J. A.** (1991): Isozyme comparisons of *Septoria* isolates associated with citrus in Australia and United States. *Phytopathology* **81** (5), 517-521.
- Borovkova, I. G., Borovkov, A. Y., McClean, P. E., Gulya, T. J. & Vick, B. A.** (1992): Restriction fragment length polymorphisms and RAPD markers in DNA of *Plasmopara halstedii*, the downy mildew fungus of sunflower. *Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Pisa (Italy)*, 1420-1425.
- Bos, C. J. & Swart, K.** (1995): Genetics of *Aspergillus*. In: *The Mycota II*. Hrsg.: Kück, U., Springer, Berlin: 19-33.
- Bottin, A., Larche, L., Villalba, F., Gaulin, E., Esquerre-Tugaye, M.-T. & Rickauer, M.** (1999): Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *FEMS Microbiology Letters* **176**, 51-56.
- Brasier, C. M.** (1987): The dynamics of fungal speciation. In: *Evolutionary Biology of the Fungi*. Hrsg.: Rayner, A. D. M., Brasier, C. M. and Moore, D., Cambridge University Press, Cambridge, UK: 231-260.

- Brasier, C. M.** (1995): Episodic selection as a force in fungal microevolution, with special reference to clonal speciation and hybrid introgression. *Canadian Journal of Botany* **73** (S1), 1213-1221.
- Brasier, C. M., Cooke, D. E. & Duncan, J. M.** (1999): Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5878-5883.
- Caten, C. E.** (1981): Parasexual processes in fungi. In: *The Fungal Nucleus*. Hrsg.: Gull, K. and Oliver, S. G., Cambridge University Press, Cambridge, UK: 191-214.
- Caten, C. E. & Jinks, J. E.** (1966): Heterokaryosis: its significance in wild homothallic ascomycetes and Fungi Imperfecti. *Transactions of the British Mycological Society* **49**, 81-93.
- Chang, T. T. & Ko, W. H.** (1990): Resistance to fungicides and antibiotics in *Phytophthora parasitica*: Genetic nature and use in hybrid determination. *Phytopathology* **80** (12), 1414-1421.
- Chen, W., Schneider, R. W. & Hoy, J. W.** (1992): Taxonomic and phylogenetic analyses of ten *Pythium* species using isozyme polymorphisms. *Phytopathology* **82** (10), 1234-1244.
- Choi, Y.-J., Shin, H.-D., Hong, S.-B. & Thines, M.** (2007): Morphological and molecular discrimination among *Albugo candida* materials infecting *Capsella bursa-pastoris* worldwide. *Fungal Diversity* **27**, 11-34.
- Choi, Y.-J., Shin, H.-D., Ploch, S. & Thines, M.** (2008): Evidence for uncharted biodiversity in the *Albugo candida* complex, with the description of a new species. *Mycological Research* **112** (11), 1327-1334.
- Cohen, Y. & Sackston, W. E.** (1973): Factors affecting infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany* **51**, 15-22.
- Constantinescu, O.** (1998): A revision of *Basidiophora* (Chromista, Peronosporales). *Nova Hedwigia* **66** (1-2), 251-265.
- Constantinescu, O. & Fatehi, J.** (2002): *Peronospora*-like fungi (Chromista, Peronosporales) parasitic on Brassicaceae and related hosts. *Nova Hedwigia* **74** (3-4), 291-338.
- Constantinescu, O., Voglmayr, H., Fatehi, J. & Thines, M.** (2005): *Plasmoverna* gen. nov. and the taxonomy and nomenclature of *Plasmopara* (Chromista, Peronosporales). *Taxon* **54** (3), 813-821.
- Cooke, D. E. L. & Lees, A. K.** (2004): Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology* **53** (6), 692-704.
- Cvitanich, C. & Judelson, H. S.** (2002): Stable transformation of the oomycete, *Phytophthora infestans*, using microprojectile bombardment. *Current Genetics* **42**, 228-235.
- Davison, E. M.** (1968): The Distribution of Substances in the Sporangiohores of *Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr. *Annals of Botany* **32**, 633-647.
- de la Providencia, I. E., de Souza, F. A., Fernández, F., Delmas, N. S. & Declerck, S.** (2005): Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytologist* **165**, 261-271.
- Dick, M. W.** (1995): Sexual reproduction in the *Peronosporomycetes* (chromistan fungi). *Canadian Journal of Botany* **73** (S1), 712-724.

- Dick, M. W.** (2001): *Straminipilous Fungi*. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers).
- Drenth, A. & Goodwin, S. B.** (1999): Population structure of the Oomycetes. In: *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. Hrsg.: Worrall, J. J., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 195-224.
- Dubresson, R., Kravchuk, Z., Neuhaus, J. M. & Mauch-Mani, B.** (2008): Optimisation and comparison of transient expression methods to express the green fluorescent protein in the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara viticola*. *Vitis - Journal of Grapevine Research* **47** (4), 235-240.
- Elliott, C. G.** (1977): Sterols in Fungi: Their Functions in Growth and Reproduction. *Advances in Microbial Physiology* **15**, 121-173.
- Emerson, R. & Wilson, C. M.** (1954): Interspecific hybrids and the cytogenetics and cytotaxonomy of *Euallomyces*. *Mycologia* **46**, 393-434.
- Érsek, T., English, J. T. & Schoelz, J. E.** (1995): Creation of Species Hybrids of *Phytophthora* with Modified Host Ranges by Zoospore Fusion. *Phytopathology* **85** (11), 1343-1347.
- Érsek, T., English, J. T. & Schoelz, J. E.** (1997): Triparental species hybrids from fused zoospores of *Phytophthora*. *Czech Mycology* **50**, 13-20.
- Érsek, T. & Nagy, Z. Á.** (2008): Species hybrids in the genus *Phytophthora* with emphasis on the alder pathogen *Phytophthora alni*: a review. *European Journal of Plant Pathology* **122** (1), 31-39.
- Falloon, R. E. & Sutherland, P. W.** (1996): *Peronospora viciae* on *Pisum sativum*: Morphology of asexual and sexual reproductive structures. *Mycologia* **88** (3), 473-483.
- Fleißner, A., Sarkar, S., Jacobson, D. J., Roca, M. G., Read, N. D. & Glass, N. L.** (2005): The so locus is required for vegetative cell fusion and postfertilization events in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **4** (5), 920-930.
- Forbes, G. A., Goodwin, S. B., Drenth, A., Oyarzun, P., Ordonez, M. E. & Fry, W. E.** (1998): A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* **82** (7), 811-818.
- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A. D., Berman, J. & Bennett, R. J.** (2008): The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biology* **6** (5), 1084-1097.
- Forgan, A. H., Knogge, W. & Anderson, P. A.** (2007): Asexual genetic exchange in the barley pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Phytopathology* **97** (5), 650-654.
- Gallengly, M. E. & Galindo, J.** (1958): Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature. *Phytopathology* **48**, 274-277.
- Gaulin, E., Haget, N., Khatib, M., Herbert, C., Rickauer, M. & Bottin, A.** (2007): Transgenic sequences are frequently lost in *Phytophthora parasitica* transformants without reversion of the transgene-induced silenced state. *Canadian Journal of Microbiology* **53** (1), 152-157.
- Geider, K., Auling, G., Du, Z., Jakovljevic, V., Jock, S. & Völksch, B.** (2006): *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-pathogenic bacterium from apple and pear trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 2937-2943.

- Genet, J. L., Jaworska, G. & Deparis, F.** (2006): Effect of dose rate and mixtures of fungicides on selection for QoI resistance in populations of *Plasmopara viticola*. *Pest Management Science* **62** (2), 188-194.
- Giovannetti, M., Azzolini, D. & Citernesi, A. S.** (1999): Anastomosis Formation and Nuclear and Protoplasmic Exchange in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (12), 5571-5575.
- Gisi, U. & Sierotzki, H.** (2008): Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology* **122** (1), 157-167.
- Gisi, U., Waldner, M., Kraus, N., Dubuis, P. H. & Sierotzki, H.** (2007): Inheritance of resistance to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* **56** (2), 199-208.
- Glass, N. L., Jacobson, D. J. & Shiu, P. K. T.** (2000): The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* **34**, 165-186.
- Glass, N. L. & Kuldau, G. A.** (1992): Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 201-224.
- Goeker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A. & Oberwinkler, F.** (2007): How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. *Fungal Genetics and Biology* **44** (2), 105-122.
- Goeker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A., Weiss, M. & Oberwinkler, F.** (2003): Taxonomic aspects of Peronosporaceae inferred from Bayesian molecular phylogenetics. *Canadian Journal of Botany* **81** (7), 672-683.
- Goodwin, S. B.** (1997): The Population Genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* **87** (4), 462-473.
- Goodwin, S. B. & Fry, W. E.** (1994): Genetic Analysis of Interspecific Hybrids between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora mirabilis*. *Experimental Mycology* **18**, 20-32.
- Goodwin, S. B., Schneider, R. E. & Fry, W. E.** (1995): Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* **79** (11), 1181-1185.
- Goossen, P. G. & Sackston, W. E.** (1968): Transmission and biology of sunflower downy mildew. *Canadian Journal of Botany* **46**, 5-10.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D.** (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87** (12), 4645-4649.
- Gritz, L. & Davies, J.** (1983): Plasmid-encoded hygromycin B resistance: The sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25** (2-3), 179-188.
- Gu, Y. H. & Ko, W. H.** (1998): Occurrence of a parasexual cycle following the transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Phytophthora parasitica*. *Current Genetics* **134**, 120-123.
- Gu, Y. H. & Ko, W. H.** (2000): Segregation following interspecific transfer of isolated nuclei between *Phytophthora parasitica* and *P. capsici*. *Canadian Journal of Microbiology* **46**, 410-416.
- Gulya, T. J.** (1995): Proposal for a revised system of classifying races of sunflower downy mildew. *Proceedings of the 17th Sunflower Research Workshop, Fargo (USA)*: 76-78.

- Gulya, T. J.** (2000): Metalaxyl resistance in sunflower downy mildew and control through genetics and alternative fungicides. *Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse (France)*, i61-i66.
- Gulya, T. J.** (2007): Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: *Advances in Downy Mildew Research, Vol. 3*. Hrsg.: Lebeda, A. and Spencer-Phillips, P. T. N., Kostelec na Hané, CZ:
- Gulya, T. J., Miller, J. F., Viranyi, F. & Sackston, W. E.** (1991): Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia* **14** (15), 11-20.
- Hamada, W., Reignault, P., Bompeix, G. & Boccara, M.** (1994): Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, *hph*. *Current Genetics* **26** (3), 251-255.
- Hammer, T. R.** (2005): Untersuchungen zur Pathogen-Pathogen-Interaktion bei multiplen Infektionen der Sonnenblume mit *Plasmopara halstedii*. Diplomarbeit. Universität Konstanz.
- Hammer, T. R., Thines, M. & Spring, O.** (2007): Transient expression of *gfp* in the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* using electroporation and a mechanoperforation method. *Plant Pathology* **56** (1), 177-182.
- Haskins, R. H., Tulloch, A. P. & Micetich, R. G.** (1964): Sterols and the Stimulation of Sexual Reproduction of a Species of *Pythium*. *Canadian Journal of Microbiology* **10** (2), 187-195.
- Heaney, S. P., Hall, A. A., Davies, S. A. & Olaya, G.** (2000): Resistance to fungicides in the Qol-STAR cross-resistance group: current perspectives. *Brighton Crop Protection Conference* **2**, 755-762.
- Hebert, P. D. N. & Beaton, M. J.** (1993): *Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis. A Practical Handbook*. (Beaumont, TX, USA: Helena Laboratories).
- Heist, E. P., Nesmith, W. C. & Schardl, C. L.** (2002): Interactions of *Peronospora tabacina* with Roots of *Nicotiana* spp. in Gnotobiotic Associations. *Phytopathology* **92** (4), 400-405.
- Hellens, R. P., Anne Edwards, E., Leyland, N. R., Bean, S. & Mullineaux, P. M.** (2000): pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* **42** (6), 819-832.
- Hermansen, A., Hannukkala, A., Hafskjold Naerstad, R. & Brurberg, M. B.** (2000): Variation in Population of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. *Plant Pathology* **49**, 11-22.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R.** (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* **10** (4), 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R.** (1993): Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11** (9), 1026-1030.
- Hudspeth, D. S. S., Nadler, S. A. & Hudspeth, M. E. S.** (2000): A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia* **92** (4), 674-684.
- Intelmann, F. & Spring, O.** (2002): Analysis of total DNA by minisatellite and simple-sequence repeat primers for the use of population studies in *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Microbiology* **48** (6), 555-559.

- Judelson, H. S. & Michelmore, R. W.** (1991): Transient expression of genes in the oomycete *Phytophthora infestans* using *Bremia lactucae* regulatory sequences. *Current Genetics* **19**, 453-459.
- Judelson, H. S. & Roberts, S.** (1999): Multiple loci determining insensitivity to phenylamide fungicides in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **89** (9), 754-760.
- Judelson, H. S., Tyler, B. M. & Michelmore, R. W.** (1991): Transformation of the Oomycete Pathogen, *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4** (6), 602-607.
- Judelson, H. S., Tyler, B. M. & Michelmore, R. W.** (1992): Regulatory sequences for expressing genes in oomycete fungi. *Molecular Genetics and Genomics* **234**, 138-146.
- Kamoun, S.** (2003): Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell* **2**, 191-199.
- Komjáti, H., Bakonyi, J., Spring, O. & Virányi, F.** (2008): Isozyme analysis of *Plasmopara halstedii* using cellulose-acetate gel electrophoresis. *Plant Pathology* **57** (1), 57-63.
- Komjáti, H., Fekete, C. & Virányi, F.** (2004): Genetic and molecular characterisation of *Plasmopara halstedii* isolates from Hungary. In: *Advances in Downy Mildew Research*. Hrsg.: Jeger, M. J. and Spencer-Phillips, P. T. N., Kluwer Academic Publishers, London, UK: 193-201.
- Komjáti, H., Walcz, I., Virányi, F., Zipper, R., Thines, M. & Spring, O.** (2007): Characteristics of a *Plasmopara angustiterminalis* isolate from *Xanthium strumarium*. *European Journal of Plant Pathology* **119**, 421-428.
- Kortekamp, A., Wind, R. & Zyprian, E.** (1998): Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine cultivars. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **105** (5), 475-488.
- Láday, M., Bagi, F., Mesterházy, Á. & Szécsi, Á.** (2000): Isozyme evidence for two groups of *Fusarium graminearum*. *Mycological Research* **104** (7), 788-793.
- LaFave, M. C. & Sekelsky, J.** (2009): Mitotic Recombination: Why? When? How? Where? *PLoS Genetics* **5** (3), e1000411.
- Lamour, K. H. & Hausbeck, M. K.** (2001): The dynamics of mefenoxam insensitivity in a recombining population of *Phytophthora capsici* characterized with amplified fragment length polymorphism markers. *Phytopathology* **91** (6), 553-557.
- Layton, A. C. & Kuhn, D. N.** (1988): The virulence of interracial heterokaryons of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Phytopathology* **78**, 961-966.
- Layton, A. C. & Kuhn, D. N.** (1990): *In planta* formation of heterokaryons of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Phytopathology* **80**, 602-606.
- Lee, P. S., Greenwell, P. W., Dominska, M., Gawel, M. & Hamilton, M.** (2009): A fine-structure map of spontaneous mitotic crossovers in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics* **5** (3), e1000410.
- Leslie, J. F.** (1993): Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* **31**, 127-151.
- Lettier, G., Feng, Q., De Mayolo, A. A., Erdeniz, N., Reid, R. J. D., Lisby, M., Mortensen, U. H. & Rothstein, R.** (2006): The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S. cerevisiae*. *PLoS Genetics* **2** (11), 1773-1786.
- Limpert, E. & Müller, K.** (1994): Designation of pathotypes of plant pathogens. *Journal of Phytopathology* **140**, 346-358.

- Lozán, J. L. & Kausch, H.** (2007): *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*. (Hamburg: Wissenschaftliche Auswertungen).
- Lucas, J. A., Greer, G., Oudemans, P. V. & Coffey, M. D.** (1990): Fungicide sensitivity in somatic hybrids of *Phytophthora capsici* obtained by protoplast fusion. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **36**, 175-187.
- Malcolmson, J. F.** (1970): Vegetative hybridity in *Phytophthora infestans*. *Nature* **225**, 971-972.
- Man in 't Veld, W. A., De Cock, A. W. A. M., Ilieva, E. & Léverque, C. A.** (2002): Gene flow analysis of *Phytophthora porri* reveals a new species: *Phytophthora brassicae* sp. nov. *Plant Pathology* **108** (1), 51-62.
- Man in 't Veld, W. A., Veenbaas-Rijks, W. J., Ilieva, E., de Cock, A. W. A. M., Bonants, P. J. M. & Pieters, R.** (1998): Natural Hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* Demonstrated by Isozyme Analysis and Random Amplified Polymorphic DNA. *Phytopathology* **88**, 922-929.
- May, K. J., Drenth, A. & Irwin, J. A. G.** (2003): Interspecific hybrids between the homothallic *Phytophthora sojae* and *Phytophthora vignae*. *Australasian Plant Pathology* **32** (3), 353-359.
- Micales, J. A., Bonde, M. R. & Peterson, G. L.** (1992): Isozyme analysis in fungal taxonomy and molecular genetics. In: *Handbook of Applied Mycology Vol. 4, Fungal Biotechnology*. Hrsg.: Aurora, D. K., Elander, R. P. and Mukerji, K. G., Marcel Dekker, New York, USA: 57-79.
- Miller, C. E. & Dylewski, D. P.** (1987): Syngamy and resting body development in *Chytrium hyalinus* (Chytridiales). *American Journal of Botany* **68**, 342-349.
- Miltner, F.** (1993): Untersuchungen zur Primärinfektion von Sonnenblumen durch *Plasmopara halstedii*. Diplomarbeit. Fakultät für Biologie, Universität Tübingen.
- Moore, E. D. & Miller, C. E.** (1973): Resting body formation by rhizoidal fusion in *Chytrium hyalinus*. *Mycologia* **65**, 145-154.
- Mosa, A. A., Kobayashi, K., Ogoshi, A., Kato, M. & Sato, N.** (1993): Isoenzyme polymorphism and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan. *Plant Pathology* **42** (1), 26-34.
- Mülhardt, C.** (2003): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- Munda, A., Radisek, S., Sustar-Vozlic, J. & Javornik, B.** (2009): Genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Slovenia and resistance of local *Phaseolus vulgaris* germplasm. *Journal of Plant Diseases and Protection* **116** (1), 23-29.
- Nishimura, M.** (1922): Studies in *Plasmopara halstedii*. *Journal of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University* **11**, 185-210.
- Noguchi, M. T., Yasuda, N. & Fujita, Y.** (2006): Evidence of Genetic Exchange by Parasexual Recombination and Genetic Analysis of Pathogenicity and Mating Type of Parasexual Recombinants in Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology* **96** (7), 746-750.
- Nultsch, W.** (2001): *Allgemeine Botanik*. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- Old, K. M., Dudzinski, M. J. & Bell, J. C.** (1988): Isozyme Variability in Field Populations of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. *Australian Journal of Botany* **36** (3), 355-360.

- Olson, A. & Stenlid, J.** (2001): Mitochondrial control of fungal hybrid virulence. *Nature* **411**, 438.
- Oudemans, P. & Coffey, M. D.** (1991): A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. *Mycological Research* **95** (9), 1025-1046.
- Papa, K. E.** (1979): Genetics of *Aspergillus flavus*: complementation and mapping of aflatoxin mutants. *Genetical Research* **34**, 1-9.
- Pontecorvo, G.** (1956): The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology* **10**, 393-400.
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Goeker, M., Weiss, M. & Oberwinkler, F.** (2002): Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **94** (5), 834-849.
- Ristaino, J. B., Johnson, A., Blanco-Meneses, M. & Liu, B.** (2007): Identification of the tobacco blue mold pathogen, *Peronospora tabacina*, by polymerase chain reaction. *Plant Disease* **91** (6), 685-691.
- Roca, M. G., Arlt, J., Jeffree, C. E. & Read, N. D.** (2005): Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **4** (5), 911-919.
- Roca, M. G., Davide, L. C., Davide, L. M., Mendes-Costa, M. C., Schwan, R. F. & Wheals, A. E.** (2004): Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. *Mycological Research* **108** (11), 1320-1326.
- Roper, J. A.** (1966): Mechanisms of inheritance. 3. The parasexual cycle. In: *The Fungi. An Advanced Treatise II: The Fungal Organism*. Hrsg.: Ainsworth, G. C. and Sussman, A. S., Academic Press, New York, USA: 589-617.
- Rozynek, B.** (2000): Biologie des Falschen Mehltaus (*Plasmopara halstedii*) der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) und Verbreitung in Süddeutschland. Dissertation. Universität Hohenheim.
- Rozynek, B. & Spring, O.** (2000): Pathotypes of sunflower downy mildew in southern parts of Germany. *Helia* **23**, 27-34.
- Rozynek, B. & Spring, O.** (2001): Leaf disc inoculation, a fast and precise test for the screening of metalaxyl tolerance in sunflower downy mildew. *Phytopathology* **149**, 309-312.
- Ruiz, M., Dominguez, J., Vara, J. & Gulya, T.** (2000): Tolerance to Metalaxyl in Spanish isolates of *Plasmopara halstedii*. *Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Toulouse (France)*: G11-G15.
- Rumbolz, J., Wirtz, S., Kassemeyer, H.-H., Guggenheim, R., Schäfer, E. & Büche, C.** (2002): Sporulation of *Plasmopara viticola*: Differentiation and Light Regulation. *Plant Biology* **4**, 413-422.
- Sackston, W. E.** (1992): Cotyledone limited infection (CLI) and leaf disk immersion (LDI) inoculation of sunflower by downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Pisa (Italy)*: 840-848.
- Sakr, N., Ducher, M., Tourvieille, J., Walser, P., Vear, F. & de Labrouhe, D. T.** (2008): Variation in form and size of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) zoosporangia. *Mycological Progress* **7**, 257-265.
- Schardl, C. L. & Craven, K. D.** (2003): Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology* **12**, 2861-2873.

- Scherer, E. & Gisi, U.** (2006): Characterization of genotype and mating type in European isolates of *Plasmopara viticola*. *Journal of Phytopathology* **154** (7-8), 489-495.
- Scheyhing, S. K.** (2001): Virulenzverhalten, Metalaxyltoleranz und Kreuzungsmethoden bei französischen Isolatens des Falschen Mehltaus der Sonnenblume. Staatsexamensarbeit. Universität Hohenheim.
- Schlösser, E.** (1997): *Allgemeine Phytopathologie*. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- Schoustra, S. E., Debets, A. J. M., Slakhorst, M. & Hoekstra, R. F.** (2007): Mitotic recombination accelerates adaptation in the fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genetics* **3** (4), 0648-0653.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepman, B. N. G., Palmer, A. E. & Tsien, R. Y.** (2004): Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22** (12), 1567-1572.
- Shattock, R. C. & Shaw, D. S.** (1976): Novel phenotypes of *Phytophthora infestans* from mixed culture of antibiotic resistant mutants. *Transactions of the British Mycological Society* **67**, 201-206.
- Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B. & Mauch, F.** (2003): Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: β -aminobutyric acid but not BTH protects potato and *Arabidopsis* from infection. *Molecular Plant Pathology* **4** (4), 237-248.
- Spring, O.** (2000): Homothallic sexual reproduction in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew of sunflower. *Helia* **23**, 19-26.
- Spring, O., Bachofer, M., Thines, M., Goeker, M. & Oberwinkler, F.** (2005a): Intraspecific relationship of *Plasmopara halstedii* isolates differing in pathogenicity and geographic origin based on ITS sequence data. *European Journal of Plant Pathology* **114** (3), 309-315.
- Spring, O., Haas, K., Lamla, I., Thurnhofer, S. & Vetter, W.** (2005b): The composition and taxonomic significance of fatty acid patterns in three white rust species: *Albugo amaranthi*, *A. candida* and *A. tragopogonis* (Peronosporales, Albuginaceae). *Mycological Progress* **4** (3), 179-184.
- Spring, O., Rozynek, B. & Zipper, R.** (1997): Leaf disk inoculation - a useful tool for selecting infections of sunflower downy mildew at low inoculum concentration, but inappropriate to pathotype characterization. *Journal of Phytopathology* **145**, 189-191.
- Spring, O., Rozynek, B. & Zipper, R.** (1998): Single spore infections with sunflower downy mildew. *Journal of Phytopathology* **146**, 577-579.
- Spring, O., Voglmayr, H., Riethmüller, A. & Oberwinkler, F.** (2003): Characterization of a *Plasmopara* isolate from *Helianthus x laetiflorus* based on cross infection, morphological, fatty acids and molecular phylogenetic data. *Mycological Progress* **2**, 163-170.
- Spring, O. & Zipper, R.** (2000): Isolation of oospores of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, and microscopical studies on oospore germination. *Journal of Phytopathology* **148**, 227-231.
- Spring, O. & Zipper, R.** (2006): Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *Mycological Research* **110** (6), 657-663.
- Spring, O., Zipper, R. & Heller-Dohmen, M.** (2006): First report of metalaxyl resistant isolates of *Plasmopara halstedii* on cultivated sunflower in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* **113** (5), 224.

- Spurr, H. W. & Todd, F. A.** (1980): Observations of the extensive 1979 tobacco blue mold epidemic. *Phytopathology* **70** (7), 693.
- Stern, C.** (1936): Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **21**, 625-730.
- Sukno, S. A., Taylor, A. M. & Farman, M.** (2002a): Development of contamination-free restriction fragment length polymorphism probes for the obligate biotroph *Peronospora tabacina*, an oomycete causing blue mold of tobacco. *Phytopathology* **92** (11), 1227-1235.
- Sukno, S. A., Taylor, A. M. & Farman, M. L.** (2002b): Genetic uniformity among isolates of *Peronospora tabacina*, the tobacco blue mold pathogen. *Phytopathology* **92** (11), 1236-1244.
- Szostak, J. W., Orr Weaver, T. L. & Rothstein, R. J.** (1983): The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33** (1), 25-35.
- Thines, M.** (2007a): Characterisation and phylogeny of repetitive elements giving rise to exceptional length of ITS2 in several downy mildew genera (Peronosporaceae). *Fungal Genetics and Biology* **44**, 199-207.
- Thines, M.** (2007b): Repeats in the ITS2 of *Plasmopara* species and their relevance for phylogenetic studies. In: *Advances in Downy Mildew Research*. Hrsg.: Lebeda, A. and Spencer-Phillips, P. T. N., Kostelec na Hane, Czech Republic: 31-35.
- Thines, M., Goeker, M., Oberwinkler, F. & Spring, O.** (2007): A revision of *Plasmopara penniseti*, with implications for the host range of the downy mildews with pyriform haustoria. *Mycological Research* **111** (12), 1377-1385.
- Thines, M., Goeker, M., Spring, O. & Oberwinkler, F.** (2006): A revision of *Bremia graminicola*. *Mycological Research* **110** (6), 646-656.
- Thines, M., Goeker, M., Telle, S., Ryley, M., Mathur, K., Narayana, Y. D., Spring, O. & Thakur, R. P.** (2008): Phylogenetic relationships of graminicolous downy mildews based on *cox2* sequence data. *Mycological Research* **112** (3), 345-351.
- Thines, M., Komjati, H. & Spring, O.** (2005): Exceptional length of ITS in *Plasmopara halstedii* is due to multiple repetitions in the ITS-2 region. *European Journal of Plant Pathology* **112** (4), 395-398.
- Thines, M. & Spring, O.** (2005): A revision of *Albugo* (Chromista, Peronosporomycetes). *Mycotaxon* **92**, 443-458.
- Toffolatti, S., Serrati, L., Sierotzki, H., Gisi, U. & Vercesi, A.** (2006): Assessment of Qol resistance in *Plasmopara viticola* oospores. *Pest Management Science* **63** (2), 194-201.
- Tommerup, I. C.** (1981): Cytology and genetics of downy mildews. In: *The Downy Mildews*. Hrsg.: Spencer, D. M., Academic Press, London (UK): 121-142.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Gulya, T. J., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K. & Viranyi, F.** (2000): New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew). *Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France*: i61-i66.
- Tourvieille, J., Million, J., Roeckel-Drevet, P., Nicolas, P. & Tourvieille de Labrouhe, D.** (2000a): Molecular variability of *Plasmopara halstedii*. *Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France*: i67-72.
- Tourvieille, J., Roeckel-Drevet, P., Nicolas, P. & Tourvieille de Labrouhe, D.** (2000b): Analysis of molecular variability in *Plasmopara halstedii*, causal agent of sunflower downy mildew -

- Use of the characterization of the species and its different races. *Proceedings of the ISA Symposium III, Sunflower Downy Mildew, Fargo, ND, 13-14 Jan. 1998*, 12-20.
- Trigiano, R. N. & Spurr Jr., H. W.** (1987): The development of the multinucleate condition of *Peronospora tabacina* sporangia. *Mycologia* **79** (3), 353-357.
- Tscheschner, H.** (2006): Versuche zur asexuellen genetischen Rekombination bei *Plasmopara halstedii* und *Plasmopara angustiterminalis*. Staatsexamensarbeit. Universität Hohenheim.
- van West, P., Reid, B., Campbell, T. A., Sandrock, R. W., Fry, W. E., Kamoun, S. & Gow, N. A. R.** (1999): Green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*. *FEMS Microbiology Letters* **178**, 71-80.
- Vijn, I. & Govers, F.** (2003): *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* **4** (6), 459-467.
- Virányi, F.** (1988): Factors affecting oospore formation in *Plasmopara halstedii*. *Proceedings of the Proceedings of the 12th International Sunflower Conference, Novi Sad, Yugoslavia*: 32-37.
- Virányi, F. & Gulya, T. J.** (1996): Pathogenic variation in *Plasmopara halstedii*. *Downy Mildews Newsletter* **9**, 5.
- Virányi, F. & Walcz, I.** (2000): Population studies on *Plasmopara halstedii*: host specificity and fungicide tolerance. *Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Toulouse (France)*, i55-i60.
- Voglmayr, H., Riethmüller, A., Göker, M., Weiss, M. & Oberwinkler, F.** (2004): Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildew pathogens with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. *Mycological Research* **108** (9), 1011-1024.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M.** (1995): AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23** (21), 4407-4414.
- Webster, J. & Weber, R. W. S.** (2007): *Introduction to Fungi, 3rd Ed.* (New York: Cambridge University Press).
- Weiland, J. J.** (2003): Transformation of *Pythium aphanidermatum* to geneticin resistance. *Current Genetics* **42**, 344-352.
- Wiglesworth, M. D.** (1994): Differentiation and detection of *Peronospora tabacina* Adam. using the polymerase chain reaction. PhD thesis. University of Kentucky.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. & Rasmussen, R. P.** (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22** (1), 130-138.
- Wolf, F. A.** (1947): Tobacco downy mildew, endemic to Texas and Mexico. *Phytopathology* **37**, 721-729.
- Wong, F. P., Burr, H. N. & Wilcox, W. F.** (2001): Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* **50** (4), 427-432.
- Zeigler, R. S.** (1998): Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 249-275.
- Zeigler, R. S., Scott, R. P., Leung, H., Bordeos, A. A., Kumar, J. & Nelson, R. J.** (1997): Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. *Phytopathology* **87** (3), 284-294.

Zipper, R., Hammer, T. R. & Spring, O. (2009): PCR-based monitoring of recent isolates of tobacco blue mold from Europe reveals the presence of two genetically distinct phenotypes differing in fungicide sensitivity. *European Journal of Plant Pathology* **123** (3), 367-375.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Ilsefeld, 11.06.2009 _____

Dankeschön...

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Otmar Spring für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit, für die immer konstruktive Zusammenarbeit, sein stetes Interesse und seine Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. Hanns-Heinz Kassemeyer von der Abteilung Biologie, Bereich Phytopathologie und Pflanzenschutz am Weinbauinstitut Freiburg für die Begutachtung dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. Andreas Schaller vom Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen an der Universität Hohenheim für die experimentellen Möglichkeiten, die mir in seiner Arbeitsgruppe gewährt wurden. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Klaus Dreßler aus der AG Schaller bedanken, der mir stets beratend zur Seite stand und den Abschluss dieser Arbeit leider nicht mehr erleben konnte.

Des Weiteren danke ich meinen lieben Kollegen vom Institut für Botanik der Universität Hohenheim, wo immer eine schöne, konstruktive Atmosphäre herrschte, die einem das Arbeiten erleichterte. Allen voran danke ich dabei Reinhard Zipper für seinen unermüdlichen Einsatz, seine Hilfe bei der Pathogenkultivierung und dass ich von seiner langjährigen Erfahrung auf dem Gebiet der pflanzenpathogenen Oomyceten profitieren durfte. Dr. Marco Thines, Dr. Jens Göpfert und Dr. Frank Brändle trugen mit ihren hilfreichen Tipps, ihren Erfahrungen und ihrer guten Laune ebenfalls maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei und seien hier dankend erwähnt. Für ihre Unterstützung bei den praktischen Laborarbeiten möchte ich mich zudem bei Sabine Telle, Philipp Selzer und Timo Sauter bedanken. Großer Dank gilt außerdem noch Dr. Annerose Heller und Bärbel Rassow für ihre Hilfe bei den mikroskopischen Untersuchungen sowie Alexander Land für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Vielen Dank auch an meinen guten Freund Bastian Thaa, der durch viele konstruktive Diskussionen und die Durchsicht dieser Arbeit ebenfalls zum Gelingen beigetragen hat.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich stets unterstützten und motivierten sowie bei Ramona für ihre Geduld, ihre Hilfe und ihr Verständnis während der gesamten Zeit.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Timo Robin Hammer
geboren am 20.10.1979 in Heilbronn
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

September 1986 – Juli 1990: Grundschule Untergruppenbach
September 1990 – Juni 1999: Justinus-Kerner-Gymnasium Heilbronn

Zivildienst

Juli 1999 – Juli 2000: Jugendherberge Heilbronn

Studium

Oktober 2000 – September 2005: Biologie (Diplom), Universität Konstanz

Thema der Diplomarbeit: "Untersuchungen zur Pathogen-Pathogen-Interaktion bei multiplen Infektionen der Sonnenblume mit *Plasmopara halstedii*"

Beruflicher Werdegang

Juli 2009 – heute: Wissenschaftlicher Projektleiter am Institut für Hygiene und Biotechnologie, Hohenstein Institute, Bönningheim

November 2005 – Juni 2009: Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Botanik der Universität Hohenheim, Stuttgart

Januar 2007 – Juni 2009: Projektleiter der S1-Genlabore am Institut für Botanik

April 2006 – Februar 2009: Externer Lehrbeauftragter für Botanik, Genetik und Molekularbiologie an den Pädagogischen Hochschulen Ludwigsburg und Schwäbisch Gmünd

Wissenschaftliche Publikationen

➤ International begutachtete Originalarbeiten

- 3] Zipper, R., Hammer, T.R. and Spring, O. (2009):
PCR-based monitoring of recent isolates of tobacco blue mold from Europe reveals the presence of two genetically distinct phenotypes differing in fungicide sensitivity.
European Journal of Plant Pathology 123(3): 367 - 375
- 2] Hammer, T.R., Thines, M. and Spring, O. (2007):
Development of a transformation system for downy mildews.
Advances in Downy Mildew Research, Vol. 3: 87 – 93
- 1] Hammer, T.R., Thines, M. and Spring, O. (2007):
Transient expression of *gfp* in the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* using electroporation and a mechanoperforation method.
Plant Pathology 56(1): 177 – 182

➤ Vorträge und Posterpräsentationen

- 10] Hohn, G., Batz, S., Hammer, T.R. und Höfer, D. (2009):
Entwicklung therapeutisch aktiver Textilien
48. Chemiefasertagung, Dornbirn, A, 2009.
- 9] Hammer, T.R. and Spring, O. (2009):
Nuclear behaviour during the asexual life cycle of *Plasmopara*.
4. Rhein-Wein-Symposium, Karlsruhe, 2009.
- 8] Hammer, T.R. and Spring, O. (2008):
Asexual interspecific recombination in Downy Mildews.
RegioPlantScience Meeting, Tübingen, 2008.
- 7] Hammer, T.R., Zipper, R. und Spring, O. (2008):
PCR-basiertes Monitoring von europäischen Isolaten des Tabak-Blauschimmels, *Peronospora tabacina*.
56. Deutsche Pflanzenschutztagung, Kiel, 2008.
- 6] Hammer, T.R. und Spring, O. (2008):
Untersuchungen zur Sporangien-Entwicklung und zur Zellkernsituation während der Sporulation von *Plasmopara halstedii*.
Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft AK Mykologie Jahrestagung 2008, Bonn, 2008.

-
- 5] Hammer, T.R., Selzer, P. and Spring, O. (2007):
Developmental processes during sporulation of sunflower downy mildew,
Plasmopara halstedii.
Botanikertagung, Hamburg, 2007.
 - 4] Spring, O., Hammer, T.R., Tscheschner, H. and Zipper, R. (2007):
Interspecific recombinants from dual infection of sunflower with *Plasmopara halstedii* and *P. angustiterminalis*.
Botanikertagung, Hamburg, 2007.
 - 3] Hammer, T.R., Thines, M. and Spring, O. (2007):
Development of a transformation system for downy mildews.
The Downy Mildews 2nd International Symposium, Olomouc, CZ, 2007.
 - 2] Hammer, T.R., Spring, O. and Thines, M. (2007):
Expression of GFP in the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* using
electroporation and a newly developed mechanical method (Löchern).
24th Fungal Genetics Conference, Asilomar, USA, 2007.
 - 1] Hammer, T.R. und Spring, O. (2006):
Kernaustauschvorgänge durch Anastomosen bei *Plasmopara halstedii*.
55. Deutsche Pflanzenschutztagung, Göttingen, 2006.