5. Zusammenfassung

Der Ascomycet *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorph Gibberella zeae [Schwein.] Petch) ist ein weltweit verbreiteter Erreger von Keimlings-, Halmbasis- und Ährenkrankheiten (Fusariosen) der Süßgräser (Poaceae). Er zählt zu den bedeutendsten Getreidepathogenen. Die Fusariose führt, neben drastischen Ertragseinbußen, zu einer erheblichen Gefährdung des Endverbrauchers, da es zur Akkumulation von Mykotoxinen in den befallenen Getreiden kommt. Weder die Resistenzzüchtung noch verschiedenste Pflanzenschutzverfahren konnten bisher einen Erfolg gegen *F. graminearum* erzielen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die gezielte Disruption möglicher pathogenitätsrelevanter Gene zur Detektion von Faktoren führen, die als Ziele der spezifischen Bekämpfung von F. graminearum dienen könnten. Die hierbei erzeugten K.O.-Mutanten wurden hinsichtlich ihres Phänotyps, ihrer Physiologie *in vitro* sowie ihrer Virulenz *in planta* analysiert.

Zunächst wurde ein System etabliert, welches es erstmals ermöglicht, in *F. graminearum* effizient Gene zu disruptieren. Dieses System, welches auf dem Einsatz eines Insertionsvektors basiert, führt zur Generierung einer großen Zahl an Transformanden sowie einer für Ascomyceten sehr hohen Rate der homologen Rekombination (bis 100 %) im Zielgen.

Im Anschluss an die Identifizierung und Charakterisierung der Gene für ein Aquaporin, eine Alkoholoxidase und eine Polyketidsynthase, wurden diese disruptiert. Mit Ausnahme des Aquaporins sind die Produkte dieser Gene bei anderen Pilzen bereits als Virulenzfaktoren bzw. Mykotoxine beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene zeigten *in vitro* zum Teil einen veränderten Phänotyp bzw. eine veränderte Physiologie, konnten aber nicht als Virulenzfaktoren gegenüber der hier getesteten Weizensorte identifiziert werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Gene bei der Infektion von anderen Weizensorten, anderen Getreiden oder Mais eine wichtige Rolle als Virulenzfaktoren spielen.

Die physiologische Bedeutung des hier untersuchten Aquaporins konnte nicht aufgeklärt werden. Die generierten K.O.-Mutanten zeigten unter allen Versuchsbedingungen, *in vitro* wie *in planta*, das gleiche Verhalten wie der Wildtyp. Es ergab sich kein Einfluss des Aquaporin-Gens auf das Wachstum unter hyperosmolaren Bedingungen. Die Bildung sowie die Keimfähigkeit der infektiösen Dauerstadien (Konidien) des Pilzes blieben unbeeinflusst. Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente konnte weder eine Rolle als Pathogenitätsfaktor noch eine Funktion im Wasser- oder Glycerolflux nachgewiesen werden. Möglicherweise zeigt sich eine solche erst in Korrelation mit weiteren Aquaporin-Genen, welche sich nach Abschluss dieser Arbeit im mittlerweile vollständig sequenzierten Genom von *F. graminearum* auffinden ließen.

In dem Tomatenpathogen *Cladosporium fulvum* konnte eine Alkoholoxidase als Virulenzfaktor identifiziert werden. Ein homologes Gen fand sich auch in *F. graminearum*, weshalb dieses Gen in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer analogen Funktion untersucht

werden sollte. Die Alkoholoxidase zeigte, vergleichbar zur Oxidase von *C. fulvum*, die Fähigkeit, kurzkettige aliphatische Alkohole zu oxidieren. Generierte Alkoholoxidase-K.O.-Mutanten zeichneten sich unter induzierenden Versuchsbedingungen durch einen Verlust der Aktivität gegenüber diesen Alkoholen aus. Das zu untersuchende Gen wurde somit erfolgreich disruptiert, was sich durch molekularbiologische Analysen bestätigen ließ. Eine Aktivität gegenüber dem aromatischen Benzylalkohol, die auch der Wildtyp zeigt, bleibt den Alkoholoxidase-K.O.-Mutanten jedoch erhalten. Diese lässt auf mindestens eine weitere Alkoholoxidase schließen, die der Gruppe der Aryl-Alkoholoxidasen zuzuordnen ist, während die hier untersuchte Alkoholoxidase aus *F. graminearum* und die Alkoholoxidase aus *C. fulvum* den Alkyl-Alkoholoxidasen angehören. Im Gegensatz zu *C. fulvum* zeigen die Alkoholoxidase-K.O.-Mutanten von *F. graminearum in planta* keine verminderte Virulenz. Durchgeführte Expressionsstudien weisen jedoch trotz fehlender Verminderung der Pathogenität auf eine Induktion des Alkoholoxidase-Gens während der Infektion hin. Unter Umständen zeigen sich verschiedene Alkoholoxidase-Gene gemeinsam für die Pathogenität des Pilzes verantwortlich. Dieses wäre denkbar, da im Genom von *F. graminearum*, nach Abschluss der vorliegenden Arbeit, weitere Alkoholoxidase-Gene detektiert werden konnten.

Die Disruption des hier untersuchten PKS-Gens führt zu einem Albino-Phänotyp von *F. graminearum*. Das betreffende Pigment verhilft der Zelle nicht zu einem verbesserten Schutz gegenüber UV-Strahlung oder hoher Temperatur, wie es beispielsweise für das Polyketidderivat Melanin beschrieben ist. Die Produktion des Pigments verringert jedoch die zeitliche Biomasseproduktion des Pilzes, was auf eine Präferierung des PKS-Synthesewegs gegenüber dem Grundmetabolismus schließen lässt. In eigenen Arbeiten konnten, nach Abschluss der vorliegenden Untersuchungen, 14 weitere putative PKS-Gene im Genom von *F. graminearum* identifiziert werden. Da Infektionsversuche zeigten, dass die Disruption des hier untersuchten PKS-Gens nicht zur Verminderung der Pathogenität gegenüber Weizens führt, wäre eine Komplementation durch weitere PKS-Gene vorstellbar. Ferner zeigt das hier charakterisierte PKS-Produkt eine erhöhte Bioaktivität gegenüber prokaryotischen und eukaryotischen Mikroorganismen. Unabhängig von seiner Wirkung gegenüber der Wirtspflanze konnte hiermit ein Stoff identifiziert werden, der auf Bakterien sowie auf human- und phythopathogene Pilze inhibierend wirkt. Diese Substanz spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der Physiologie des pathogenen Pilzes und stellt einen denkbaren Angriffspunkt in der Bekämpfung von *F. graminearum* dar. Der Verlust des PKS-Produktes könnte den Pilz in seiner Fitness gegenüber mikrobiellen Antagonisten schwächen. Ob das PKS-Produkt sich als Leitsubstanz zur Entwicklung neuer Fungizide eignet, wird zur Zeit geprüft.