

**Spezifische Genexpression
in der Ektomykorrhizabildung
durch den Pilz *Tricholoma terreum***

Dissertation

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

**dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn
vorgelegt von**

**Angela Mankel
aus Marburg/Lahn**

Marburg/Lahn 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 1996 bis Juni 2000 im Laboratorium für Molekulargenetik des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn unter der Leitung von Professor Dr. Erika Kothe durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am:

Tag der mündlichen Prüfung:

Erstgutachter: Prof. Dr. Erika Kothe, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für
Mikrobiologie-Mikrobielle Phytopathologie, Jena

Zweitgutachter: Prof. Dr. M. Bölker

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Marburg, den 08.11. 2000

Die Ergebnisse der Dissertation sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

Mankel, A., Kost, G. and Kothe E. (1998)

Re-evaluation of the phylogenetic relationship among species of the genus *Tricholoma*.
Microbiol. Res., **153**, 377-388.

Mankel, A., Krause, K., Genenger, M., Kost, G. and Kothe, E. (2000)

A hydrophobin accumulated in the hartig'net of ectomycorrhiza formed between *Tricholoma terreum* and its compatible host tree is missing in an incompatible association.
J. Appl. Bot. **74**, 95-99

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verwendete Abkürzungen	1
I. Zusammenfassung	2
II. Einleitung	4
III. Material und Methoden	12
1. Chemikalien und Materialien	12
2. Verwendete Organismen	12
3. Medien und Anzucht der Organismen	14
3.1 Medien	14
3.2 Anzucht der Organismen	15
4. Molekularbiologische Methoden	16
4.1 Plasmide	16
4.2 Präparation von Plasmid-DNA	17
4.3 Präparation genomischer DNA aus <i>Tricholoma</i>	17
4.4 Restriktion von DNA	18
4.5 DNA-Isolierung aus Agarose	18
4.6 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	18
4.7 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	18
4.8 Isolierung von RNA	20
4.9 cDNA-Synthese und 3'-RACE-Technik	20
4.10 Kompetitive RT-PCR	21
4.11 Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten	21
4.12 DNA-Sequenzierung	21
4.13 Phylogenetische Analyse	22
4.14 Transfektion von <i>E. coli</i>	22
4.15 Protoplastierung von <i>Tricholoma</i>	22
4.16 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot-Analyse)	23
4.17 Kolonihybridisierung	23
4.18 DNA-RNA-Hybridisierung (Northern Blot-Analyse)	24
5. Biochemische Methoden	24
5.1 Reinigung von Hydrophobinen	24
5.2 Proteinbestimmung	25
5.3 Proteingelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	25
5.4 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	26
5.5 Immunodetektion von Proteinen (Western Blot-Analyse) und N-terminale Sequenzierung	26
6. Mikroskopische Methoden	27
6.1 Färbung von <i>Tricholoma</i> mit DAPI	27
6.2 Präparation von Mykorrhizen für die Hellfeld- bzw. Fluoreszenzmikroskopie	27
6.3 Präparation von Mykorrhizen für die Immunfluoreszenzmarkierung von Proteinen	28

IV. Ergebnisse

1. Systematik und phylogenetische Beziehungen innerhalb von <i>Tricholoma</i>	29
1.1 Amplifikation von ITS-rRNA	29
1.2 Amplifikation von IGS-rRNA	30
1.3 Sequenzvariabilität der ITS-Region innerhalb mehrerer Isolate von <i>Tricholoma terreum</i>	31
1.4 Phylogenetische Analyse von ITS1, der 5.8S rRNA und ITS2	33
2. <i>In vitro</i> Synthese der Mykorrhiza	41
2.1 Isolieren eines Monokaryons durch Protoplastierung von <i>T. terreum</i>	43
3. Isolierung und Analyse von Hydrophobinen	45
3.1 Hydrophobine formen SDS-unlösliche Komplexe an der Wasser/Luft-Grenzschicht	45
3.2 Isolierung von T.t.hyd1-Hydrophobin aus <i>T. terreum</i>	46
3.3 Klonierung von <i>T.t.hyd1</i>	47
3.4 Ermittlung der genomischen und cDNA-Sequenz von <i>T.t.hyd1</i>	49
3.5 Charakterisierung des T.t.hyd1-Proteins	51
3.6 Expression von <i>T.t.hyd1</i>	54
3.7 Quantifizierung des <i>T.t.hyd1</i> -Transkripts in der Mykorrhiza mittels kompetitiver RT-PCR	55
3.8 Immunlokalisierung von T.t.hyd1 in <i>T. terreum</i>	58
3.9 T.t.hyd1-Akkumulation im Hartig'schen Netz der kompatiblen Ektomykorrhiza	58

V. Diskussion	60
----------------------	----

VI. Literaturverzeichnis	72
---------------------------------	----

Lebenslauf

Verwendete Abkürzungen

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani-Medium
MMN	modifiziertes Merlin-Norkrans-Medium
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
ORF	Offener Leserahmen („open reading frame“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-Ethan-Sulfonsäure)
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
XGal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid

I. Zusammenfassung

Die Sequenzen des "internal transcribed spacer"-Bereichs, die im Genom die Region zwischen 17S und 25S rRNA inklusive der kompletten Sequenz der 5.8S rRNA umfassen, wurden für phylogenetische Untersuchungen innerhalb der Gattung *Tricholoma* benutzt. Dazu wurden zunächst Verwandtschaftsstrukturen innerhalb verschiedener *T. terreum*-Isolate gezeigt. Anschließend wurde die Untersuchung auf solche Arten ausgedehnt, für die die Morphologie von in der Natur identifizierten Fruchtkörpern zu den taxonomischen Analysen herangezogen werden konnten. Die eindeutige Zuordnung erlaubte dann die Anwendung auch auf Isolate, für die keine morphologischen Kriterien vorliegen. Insgesamt konnte die Methode auf 13 verschiedenen Spezies von *Tricholoma* angewendet werden. Drei distinkte Gruppierungen innerhalb der Gattung *Tricholoma* korrelieren dabei mit einer Einteilung anhand der Hutfarbe. Es wurden auch einige Abweichungen deutlich, die eine falsche Klassifizierung der ausschließlich aus vegetativen Myzelien bestehende Isolate erkennen lassen. Die molekulare Analyse zweier *Cortinarius*-Stämme bestätigte die Abtrennung der eigenständigen Gattung *Cortinarius* gegenüber der Gattung *Tricholoma*.

Tricholoma terreum bildet mit dem Nadelbaum *Pinus sylvestris* eine Symbiose, die als Ektomykorrhiza bezeichnet wird. Diese symbiotische Struktur konnte in axenischer Dualkultur gezeigt werden. Sie ist durch einen Hyphenmantel und interzelluläre Hyphen zwischen Epidermis- und Rindenzellen der Wurzeln gekennzeichnet. Neben der Kultivierung dieser "kompatiblen" Assoziation, wurde auch die "inkompatible" Interaktion mit dem Wirt *Picea abies* untersucht. Die *T. terreum/Picea abies*-Interaktion zeigte eine Ausbildung der Mykorrhiza nach 3-4 Monaten Dualkultur, während die Entwicklung der "kompatiblen" Mykorrhiza in nur etwa 6 Wochen gelang. Die Isolierung eines Monokaryons, das aus den Protoplasten des dikaryotischen *T. terreum* regeneriert wurde, erlaubte den Vergleich von Dikaryon und Monokaryon bezüglich der Fähigkeit zur Ausbildung einer vollständigen Mykorrhiza. Der monokaryotische Stamm bildete die symbiotische Struktur nur unvollständig aus und führte zur Einlagerung von Tanninen in Rindenzellen des Wirtes, wie sie sonst vorwiegend bei inkompatiblen Interaktionen zu finden sind.

Ausgehend von der Möglichkeit, Mykorrhiza *in vitro* unter definierten Bedingungen zu erzeugen, konnte ein spezifisches, an der Bildung oder zur Funktion der Symbiose notwendiges Protein identifiziert werden. Dieses Hydrophobin gehört zu einer Klasse kleiner amphipatischer Proteine der Hydrophobine, die in der pilzlichen Zellwand lokalisiert sind. Ein solches wurde aus Kulturen von *T. terreum* angereinigt und die N-terminale Aminosäuresequenzbestimmung ermöglichte die Ableitung von degenerierten Oligonukleotiden zur RT-PCR. Anschließende Koloniehybridisierung

fürte zur Identifizierung des korrespondierenden Gens *T.t.hyd1*, das für ein 108 Aminosäure großes Hydrophobin der Klasse I kodierte. Die *T.t.hyd1*-Gensequenz ermöglichte den Nachweis des Transkripts in verschiedenen Geweben von *T. terreum*. Für die Lokalisierung des Proteins waren Antiseren hilfreich, die gegen das Sc3-Hydrophobin aus dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* gerichtet waren. Mit den Antikörpern konnte das T.t.hyd1-Hydrophobin in Zellwänden von Lufthyphen lokalisiert werden. In Immunlokalisierungen von Ektomykorrhizaschnitten der kompatiblen Assoziation von *T. terreum* mit dem natürlichen Wirt *Pinus sylvestris* zeigte sich im Hartig'schen Netz Hydrophobinakkumulation. In der inkompatiblen *T. terreum*-*Picea abies* Interaktion fehlte dagegen diese Anreicherung im Hartig'schen Netz. Der Hyphenmantel war in beiden Fällen stark gefärbt. Daraus wird auf eine Funktion des amphipatischen Hydrophobins in der Herstellung einer Verbindung zur hydrophoben Pflanzenzellwand abgeleitet. Die mögliche Funktion von T.t.hyd1 speziell beim Aufbau und in der Funktion des Hartig'schen Netzes wäre somit von struktureller Natur, so daß die Entwicklung des pseudoparenchymatischen Gewebes um die corticalen Wurzelzellen im Hartig'schen Netz erleichtert wird.

II. Einleitung

Die Blätterpilze der Gattung *Tricholoma* gehören zur Familie der *Tricholomataceen* oder Ritterlingsartigen. Diese Familie zählt zur Klasse der Basidiomyceten oder Ständerpilze die sich durch die Bildung von Sporen an Basidien auszeichnet. Diese Pilzklasse umfaßt gänzlich verschiedene Formen, wie Pilze mit gallertartigem Fruchtkörper, Konsolen- und Hutpilze, sowie Keulenpilze und Boviste, um nur einige zu nennen. Damit gehören den Basidiomyceten der größte Teil jener Pilze an, deren Fruchtkörper landläufig als Pilz bezeichnet und gern gesammelt und gegessen werden. Viele Arten der Basidiomyceten ernähren sich saprophytisch auf Holz, Stroh oder Dung, so daß auch gefährliche holzzeretzende Weißfäulepilze hier eingeordnet werden. Andere Basidiomyceten leben in enger Gemeinschaft, in einer mutualistischen Symbiose, mit Wurzeln höherer Pflanzen, indem sie eine sogenannte Mykorrhiza bilden.

Eine Symbiose bedeutet nach de Bary (1879) ein Zusammenleben verschiedener Arten und beinhaltet parasitistische sowie mutualistische, wechselseitige Beziehungen. Die Definition einer echten mutualistischen Symbiose besteht im Nutzen für beide Partner, die in einem engen morphologischen Kontakt stehen. Den Begriff Mykorrhiza prägte Frank (1885), der das mutualistische Zusammenleben zwischen Pilzen und Wurzeln höherer Pflanzen als „Pilzwurzel“ beschreibt. In einem terrestrischen Ökosystem kommt dieser Form der Symbiose eine wichtige Bedeutung zu. So sind über 80% aller Pflanzengattungen mit Pilzen vergesellschaftet. Durch die Beteiligung unterschiedlicher Pilzpartner und Wirtspflanzen entstehen verschiedene Mykorrhizaformen, die Unterschiede in der Hyphenanordnung, der Art der Kontaktstellen zwischen Wurzel und Pilzhyphen sowie im Stoffaustausch zeigen (Harley and Smith, 1983).

Die Endomykorrhiza zeichnet sich durch ein Wachstum von inter- und intrazellulären Hyphen in parenchymatischen Rindenzellen der meist krautigen Wirtspflanzen aus. Verschiedene Wirtspflanzen der Endomykorrhiza bedingen morphologische Unterschiede, die eine Unterteilung in ericoide, orchideoide und einer vesikulär-arbuskuläre (VA-)-Mykorrhiza erfordern. Dem steht die Ektomykorrhiza gegenüber, die durch einen Hyphenmantel und interzellulären Hyphen zwischen Epidermis- und Rindenzellen der Wurzel gekennzeichnet ist (Peyronel *et al.*, 1969; Harley and Smith, 1983). Die ektotrophe Mykorrhiza tritt vorwiegend bei Laub- und Nadelbäumen der temperenten Zonen auf. Damit bilden nur etwa 3% aller Samenpflanzen eine ektotrophe Mykorrhiza aus, im Unterschied zur VA-Mykorrhiza, die viel häufiger angetroffen wird. Die Entwicklung der ektotrophen Mykorrhiza an Bäumen findet bevorzugt an den Kurzwurzeln der Verzweigungen zweiter und dritter Ordnung statt. Die Mykorrhiza vergrößert durch den Kontakt die physiologisch aktive Wurzeloberfläche um ein Vielfaches und erreicht über das Myzel, das einen sehr großen Wachstumsradius haben kann, gleichzeitig eine Vernetzung von mehreren Wirten gleicher oder verschiedener Art. Diese Vernetzung kann zu einem stofflichen Austausch

verschiedener Bäume untereinander führen (Kottke and Oberwinkler, 1989; Read, 1991). Das äußerlich sichtbare Charakteristikum einer Ektomykorrhiza ist das Vorhandensein eines Hyphenmantels, der auf den Kurzwurzeln des Wirtes zu finden ist. Diese pseudoparenchymatische Schicht von Hyphen kann je nach Pilzart charakteristische Formen und Farben aufweisen. Der Pilz dringt mit seinen Hyphen mechanisch und unter Beteiligung von Pektinasen zwischen den Zellen in die Wurzelrinde ein (Warrington *et al.*, 1981). Die äußeren Zellen werden vollständig mit einer im Längsschnitt leiterförmigen Struktur umhüllt. Es entsteht der Eindruck eines netzartigen Aussehens, das zum Namen Hartig'sches Netz beitrug (Abb. 1). Die Hyphen des Pilzes dringen aber in der Regel nicht bis zum Zellinnenraum vor, so daß ein Stoffaustausch über die Membranen und Zellwände erfolgt. Als Folge der Pilzinfektion unterbleibt die Bildung von Wurzelhaaren, statt dessen übernehmen dicke, mehrhyphige Stränge deren Funktionen im Boden. Ektotrophe Mykorrhizen haben individuell nur eine begrenzte Lebensdauer von 9 bis 12 Monaten. Während des Wachstums der Wurzel und des Mantels ist eine ausgeglichene Ausdehnung gegeben. Eine Kolonisierung durch weitere Ektomykorrhizapilze könnte ebenfalls stattfinden. Ein Baum kann so mehrere verschiedene pilzliche Partner an seinem Wurzelsystem besitzen.

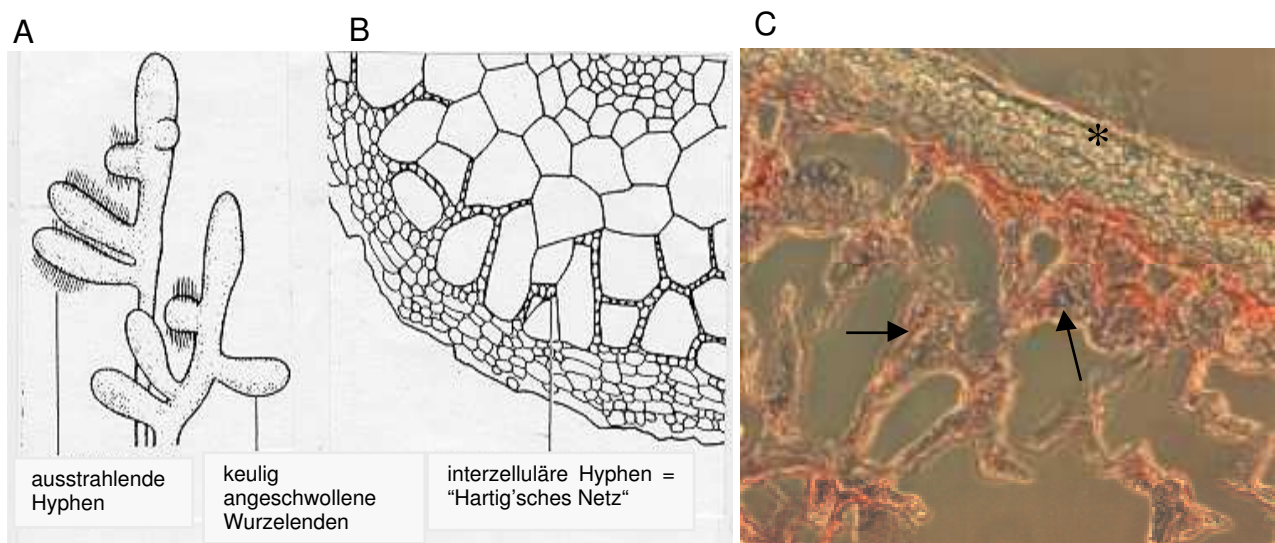


Abb. 1: Ektomykorrhiza. (A) Schematische Darstellung keulig angeschwollener Wurzelenden mit ausstrahlenden Hyphen und (B) ein Wurzelquerschnitt mit interzellulären Hyphen des Hartig'schen Netzes einer Mykorrhiza (Werner, 1992). (C) Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts einer Freiland-Ektomykorrhiza von *Tricholoma terreum* und *Pinus sylvestris* (Freiland-Material gesammelt von A. Mankel, Treisbach, Hessen), Hyphenmantel (*), Hartig'schesNetz (→).

Es werden insgesamt mehr als 140 Gattungen der Spermatophyten als Wirtspflanzen für eine ektotrophe Mykorrhiza beschrieben. Besonders häufig findet sich diese Mykorrhizaform in den Familien der Pinaceen, Fagaceen und Rosaceen. Bei den Pilzarten sind bisher kaum

Mykorrhizabildner bekannt, die ihren Lebenszyklus ohne einen Pflanzenpartner komplettieren könnten. Allerdings besitzen die Ektomykorrhizapilze eine saprophytische Phase im Boden, wodurch ihre Kultivierung auf Nährböden überhaupt erst möglich wird (Smith and Read, 1997). Die Spezifität zwischen Pilz und Wirtsorganismus ist im allgemeinen eher gering, so daß viele Pilzarten wie z. B. *Hebeloma*, *Paxillus* oder *Pisolithus tinctoris* viele verschiedene Baumpartner haben können. Pilzarten der Gattung *Rhizopogon* und *Tricholoma* kommen hingegen meist in Symbiose mit wenigen bestimmten Wirten vor, meist beschränkt auf Arten einer Gattung (Trappe, 1962). Zudem ist die Wirtsspezifität *in vitro* nicht uneingeschränkt mit der Wirtsspezifität *in vivo* gleichzusetzen. Die Spezifität *in vivo* muß auch daran festgemacht werden, ob der Pilz mit dem jeweiligen Wirt in der Lage ist, Fruchtkörper zu produzieren, was als Sporocarp-Spezifität bezeichnet wird. Spezifitäten innerhalb einer Symbiose zwischen Mykorrhizapilz und Pflanze beinhalten somit mehrere Aspekte wie die Geschwindigkeit der Mykorrhizabildung, Konkurrenzverhalten, aber auch Bodenfaktoren und das Zusammenleben mit anderen Bodenorganismen (Harley and Smith, 1983). Die hier untersuchte Gattung *Tricholoma* beinhaltet Arten, die ausschließlich eine Ektomykorrhiza-Symbiose eingehen können. Innerhalb dieser Gattung gibt es Arten, die eine hohe Wirtsspezifität aufweisen. So wird *T. terreum* in der kompetenten Mykorrhiza nur mit Kiefer (*Pinus sylvestris*) assoziiert gefunden, während andere *Tricholoma*-Arten ein breiteres Wirtsspektrum aufweisen (Trappe, 1962).

Tricholoma terreum (Schaeff.:Fr.) Kumm. ist ein mit Nadelbäumen vergesellschafteter Ektomykorrhizapilz, der aufgrund seiner Wirtsspezifität sich für eine nähere Untersuchung besonders eignet. *T. terreum*, der graue Erdritterling, dessen Fruchtkörper im Herbst auf kalkreichen Böden bei Kiefer gefunden werden kann, entwickelt einen grauen bis fast schwarzen, leicht filzigen Fruchtkörperhut (Moser, 1983; Kost, 1981). Der Fruchtkörper kann bis zu 8 cm im Durchmesser erreichen. Diese *Tricholoma*-Art bildet in der Natur dementsprechend nur Fruchtkörper aus, wenn sie mit ihrem kompetenten Wirt assoziiert sind, so daß *T. terreum* mit der Kiefer gefunden werden kann (Kost, 1981; Kost, 1992; Breitenbach and Kränzlin, 1991). Diese Besonderheit der Kompatibilität eröffnet die Möglichkeit, differenzielle Genexpression der kompetenten und nicht-kompetenten Mykorrhiza zu untersuchen.

Taxonomische Untersuchungen und Einteilungen innerhalb der Gattung *Tricholoma* und damit auch von *T. terreum* (Kost, 1981) basierten bisher auf Merkmalen der Morphologie, insbesondere der Fruchtkörper, der Entwicklung der Sporen und der Wirtspflanzenbeziehung. Innerhalb einer Spezies können Hutfarbe, Charakteristika der Sporen, Größe und Septierung von Hyphen variabel sein oder je nach Kultivierung variieren, so daß sie mit den Bestimmungsmerkmalen einer anderen Art überlappen. Insbesondere erweist eine Identifizierung der pilzlichen Symbionten in der Ektomykorrhiza als sehr schwierig, da ohne Fruchtkörper nur wenige Kriterien bleiben, so daß das morphologische und strukturelle Erscheinungsbild sich oft nicht

unterscheidet. Zugleich ergeben sich Schwierigkeiten, manche Ektomykorrhizapilze in Reinkultur zu erhalten, und allen Spezies fehlt die Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung in axenischer Kultur.

Verwandschaftsbeziehungen innerhalb der *Tricholoma*-Arten konnten somit bisher noch nicht vollständig geklärt werden, obwohl morphologische Kriterien wie Cutisstruktur und Farbgebung distinkte Klassifikationen zeigen (Bon, 1967, 1974a, 1974b, 1975, 1984; Clémenton, 1983; Kost, 1978, 1981; Kühner, 1980; Singer, 1986). Es erfolgte dabei eine Unterteilung in die Sektionen *Tricholoma*, *Atrosquamosa*, *Imbricata* und *Albobrunnea*. Bisher wurden keine molekularen Methoden etabliert, die eine unabhängige phylogenetische Untersuchung innerhalb der Gattung von *Tricholoma* erlauben würden.

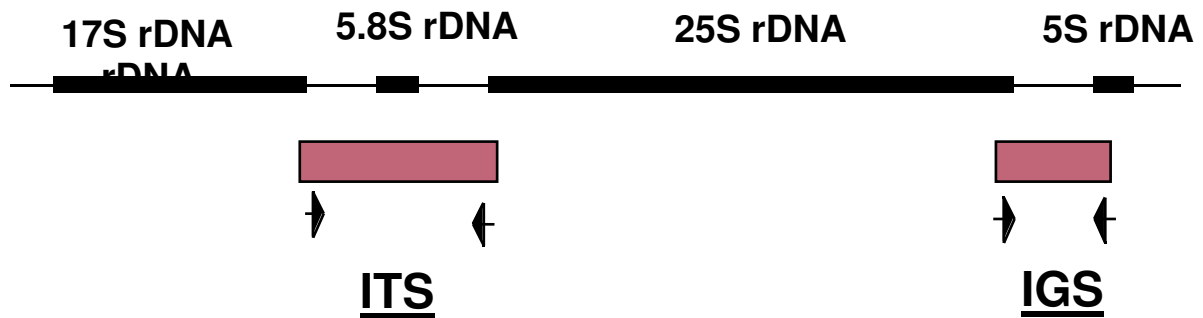


Abb. 2. Molekulare Organisation eines rDNA-Cluster in Tandemanordnung. ITS (internal transcribed spacer) und IGS (intergenic spacer) sind die Bezeichnungen für die DNA-Sequenzen, die sich zwischen 17S, 25S, 5.8S und 5S rDNA befinden.

Die hoch amplifizierte ribosomalen RNA Gene bei Eukaryoten sind allgemein in tandemartigen Wiederholungen angelegt, die variable sowie hoch konservierte Regionen besitzen (Kochel and Kuntzel 1982; Russel *et al.* 1984; Bruckner *et al.* 1988). Daraus wurde bereits vielfach eine variable, nicht kodierende Region für phylogenetische Untersuchungen benutzt, die als ITS (internal transcribed spacer) bezeichnet wird (Baldwin, 1992; Bruns and Gardes, 1993; Henrion, 1992; Le Tacon and Martin, 1992; Hershkovitz and Lewis, 1996; Hillis and Dixon, 1991; O'Donnell and Cigelnik, 1997). Ein weiterer, hoch variabler Bereich, der als IGS (intergenic region) bezeichnet wird, kann ebenfalls zur Untersuchung der Verwandtschaft dienen (Abb. 2). Durch die gegebene Variabilität ist es möglich, die Amplifikate auf Längenpolymorphismen zu untersuchen. Da das Gen, welches für die drei großen rRNA kodiert, im Genom hoch amplifiziert vorkommt, ist eine Amplifikation auch aus kleinen Mengen extrahierter DNA wie Herbarmaterial möglich. Der Bereich, der für die 17S und 25S rRNA-Gene (18S und 28S für Pflanze und Tier) kodiert, ist hoch

konserviert und ermöglicht so die Verwendung eines Primersatzes, der spezifisch pilzliche rRNA Amplifikation erlaubt. Diese universellen Primer ermöglichen somit die rRNA-Amplifikation jeglicher Pilzspezies, auch aus Proben, die zusätzlich Pflanzenmaterial enthalten, wie beispielweise Freilandmykorrhizen. Die Amplifikation dieser Sequenzen und ihre phylogenetische Analyse könnte damit auch für die Gattung *Tricholoma* hilfreich sein, da sowohl Verwandtschaftsbeziehungen erkundet, als auch eine sichere Bestimmung von Myzelien aus Sterilkultur ermöglicht wird.

Neben der Untersuchung der Verwandtschaftsbeziehungen ist für die weitergehende Analyse der Symbiose eine *in vitro* Synthese der Mykorrhiza notwendig. Viele Methoden wurden zur Synthese der Ektomykorrhiza an Wurzelsämlingen in axenischer Kultur entwickelt (Fortin *et al.*, 1983). *In vitro* Synthesen sind nötig für physiologische, molekularbiologische und biochemische Untersuchungen der Pilz-Wurzel-Interaktion, die eine Suche nach Mykorrhiza-spezifischen Proteinen und Genen erlauben (Hilbert and Martin, 1988). Die konventionelle Petrischalenmethode bietet die benötigten sterilen Bedingungen für das Wurzelsystem (Chilvers *et al.*, 1986; Duddridge, 1986). So konnte in dem etablierten *Pisolithus tinctoris-Eucalyptus globulus*-Dualsystem die voll differenzierte *Eucalyptus*-Mykorrhiza in einer Woche gezogen werden. Aufbauend auf dieser Methode sollten auch aus axenischen Kulturen von *T. terreum* mit im Freiland spezifischen Baumpartner Mykorrhizen synthetisiert werden. Als Ergänzung sollte der Versuch einer Synthese mit einer anderen Wirtsbaumart im Petrischalensystem durchgeführt werden, um so Einblicke in die Kompatibilität zu erreichen.

In einem typischen, heterothallischen Basidiomyceten können zwei verschiedene Phasen des Lebenszyklus unterschieden werden. Die Keimung einer Meiospore (Basidiospore) ergibt ein homokaryotisches Myzelium, welches nicht in der Lage ist zu fruktifizieren. Zur Entwicklung eines Fruchtkörpers müssen zwei verschiedene und kompatible, homokaryotische Myzelien fusionieren, um einen neuen Myzeltyp zu etablieren: das Dikaryon, welches ein spezielles Heterokaryon mit zwei kompatiblen Kernen pro Zelle ist. Dieses Dikaryon besitzt eine lange, vegetative Phase und ist die dominierende Form eines Ektomykorrhiza-Pilzmyzels. Ein typischer Lebenszyklus eines Basidiomyceten mit einer monokaryotischen und einer dikaryotischen Phase zeigt sich am Beispiel von *Hebeloma cylindrosporium*. Die Keimung einer zweikernigen Basidiospore ergibt ein monokaryotisches Myzelium mit einem Kern pro Zelle. Kompatible Kreuzungen zwischen zwei Monokaryen resultieren in der Bildung typischer Dikaryen mit Schnallenverbindungen. Beide mono- und dikaryotischen Myzelien sind in der Lage, Mykorrhiza in Kultur zu synthetisieren. Aber nur ein dikaryotisches Myzel entwickelt die Fruchtkörper, welche von *H. cylindrosporium* in axenischer Kultur mit sterilen Substraten und Nährstoffen gezogen werden können (Debaud *et al.*, 1986). Bisher ist nur *H. cylindrosporium* in der Lage, mit dem natürlichen Wirt *Pinus pinaster* in

axenischer Kultur Fruchtkörper zu bilden; anderen obligaten Ektomykorrhizapilzen wie *Tricholoma* fehlt die Fähigkeit, in Kultur Fruchtkörper zu entwickeln.

Generell werden zur *in vitro* Synthese der Mykorrhiza dikaryotische Stämme von *Tricholoma* verwendet. Eine Synthese von Mykorrhiza mit monokaryotischen Stämmen erforderte durch das Fehlen von Fruchtkörpersporen zunächst das Erzeugen monokaryotischer Stämme. Methoden zur Protoplastierung von filamentösen Pilzen sind gut beschrieben und sollten für das System *T. terreum* etabliert werden, um Monokaryen zu erhalten (Peberdy, 1979; Davis, 1985).

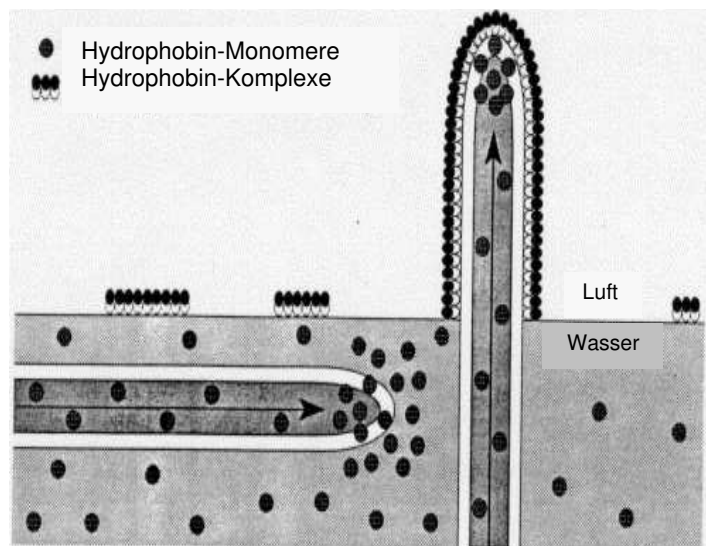
Es konnte gezeigt werden, daß natürliche Populationen der mono- und dikaryotischen Stämme von *Laccaria bicolor*, *H. cylindrosporum* und *P. tinctoris* variabel in ihrer Fähigkeit zur Mykorrhiza-Bildung sein können (Kropp *et al.*, 1987; Debaud *et al.*, 1988; Lamhamedi *et al.*, 1990). Obwohl die Wirtswahl des Pilzes die Fähigkeit zur Kolonisation beeinflussen kann, haben Variationen wie di- oder monokaryotische Stämme für die Entwicklung der Mykorrhiza tiefgreifende Effekte und sollten daher im Vergleich zur Wirtsspezifität untersucht werden (Wong and Fortin, 1990).

Ausgehend von der Möglichkeit, Mykorrhiza *in vitro* unter definierten Bedingungen zu erzeugen, ist es möglich, spezifisch an der Bildung oder zur Funktion der Symbiose notwendige Proteine zu identifizieren. Da es sich um eine Interaktion zwischen zwei Zellwand besitzenden Eukaryonten handelt, sind besonders Proteine der Zellwand interessant. In der Pilzzellwand sind Proteine eingelagert, die spezifische Funktionen erfüllen. Proteine aus der Zellwand können an einer Anheftung an die Wirtsoberfläche involviert sein oder eine Rolle in der Hyphen-Aggregation um eine Wurzel spielen. Solche Polypeptide, die als Hydrophobine bezeichnet werden, sind mittlerweile bei vielen Pilzspezies der Ascomyceten, Basidiomyceten und Zygomyceten gefunden und charakterisiert worden (de Vries *et al.*, 1993; Wessels, 1996). Hydrophobine können wahrscheinlich in allen filamentösen Pilzen gefunden werden und besitzen verschiedene Funktionen, da unterschiedliche Proteine in Lufthyphen, auf der Oberfläche von Pilzsporen und Infektionsstrukturen oder auf Fruchtkörperoberflächen gefunden werden (Wessels, 1997). Hydrophobine konnten durch ihre ungewöhnlichen, biochemischen Fähigkeiten detektiert und die korrespondierenden Gene identifiziert werden. Pilzliche Hydrophobine sind kleine, sekretierte und hydrophobe Proteine, die ein konserviertes Aminosäuremotiv von acht Cystein-Resten in einer bestimmten Abfolge zeigen (Asgeirsdottir *et al.*, 1997; de Groot *et al.*, 1996; Lugones *et al.*, 1996; Lugones *et al.*, 1998; Wessels, 1997). Acht Cystein-Reste bilden dabei vier intramolekulare Disulfidbrücken aus, die in einem Zwei-Domänen Protein mit vier Schleifen resultiert (Yaguchi *et al.*, 1993; Wessels, 1996). Die charakteristische Anordnung der Cystein-Reste definiert die pilzlichen Hydrophobine und unterscheidet sie von anderen cystein-reichen Proteinen wie z.B. den Peptid-Elicitoren, Chitin-bindenden und Lipid-bindenden Proteinen (van den Ackervecken *et al.*, 1992; Templeton *et al.*, 1994; Rohe *et al.*, 1995). Alle Hydrophobine besitzen Signalpeptidsequenzen, die auch durch N-terminale Sequenz-Analysen bestätigt werden

konnten (Templeton *et al.*, 1995; Bidochka *et al.*, 1995). Die verschiedene Anordnung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäurereste innerhalb der Hydrophobin-Familie läßt eine Einteilung der Polypeptide in zwei Klassen zu, die als Klasse I und Klasse II bezeichnet werden. Experimente mit *Schizophyllum commune* zeigten, daß Hydrophobine der Klasse I als SDS-unlösliche, hoch-molekulare, große Komplexe aus Zellwänden isoliert werden können (Wessels *et al.*, 1991). Diese Komplexe dissoziieren bei Behandlung mit oxidierenden Reagenzien zu Monomeren. Als Oxidationsmittel wurde Trifluoressigsäure (TFA) verwendet, das die hydrophoben Wechselwirkungen zerstört, aber die Monomere intakt und biologisch aktiv beläßt. Hydrophobine der Klasse II besitzen viele der Hydrophobin-Charakteristika, die für Klasse I typisch sind. Doch sind die isolierten Aggregate vergleichsweise instabil und in 60% Ethanol oder unter Druck dissozierbar.

Abb. 3: Schematische Darstellung des Aggregationsverhaltens von Hydrophobinen.

Am Beispiel des gereinigten Sc3 Hydrophobins aus dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* sollen die verschiedenen Funktionen der Hydrophobine während der Hyphen-Morphogenese gezeigt werden. Monomere dieses Sc3 werden von der Hyphenspitze des wachsenden Pilzes in das flüssige Medium sekretiert. Wenn die Hyphe die Luftoberfläche erreicht, aggregieren die Sc3 Monomere zu unlöslichen Hydrophobin-Lagen und verursachen die Hydrophobizität der Hyphenoberfläche. Die Fähigkeit der Anlagerung rührt von der amphipatischen Struktur des Sc3 her und befähigt die Orientierung an hydrophobe und hydrophile Oberflächen (aus Wessels *et al.*, 1996)



Die spontane Aggregation der Monomere an einer Luft-Wasser Grenzschicht oder Wasser und einer festen Oberfläche beschreibt ein wichtiges Charakteristikum der Hydrophobine. Die Polypeptide besitzen die Fähigkeit, zu amphipatischen Schichten an einer hydrophoben-hydrophilen Grenzschicht zu aggregieren. Die Reinigung und Charakterisierung von Sc3 aus *S. commune* führte zu Entdeckung der Selbst-Aggregation der Hydrophobin-Monomere, die durch hydrophobe Wechselwirkungen ausgelöst werden (Wösten *et al.*, 1993). Die Aggregate sind in heißen Detergenzien unlöslich und nur in TFA oder Performsäure zu solubilisieren (de Vries *et al.*, 1993). Die Fähigkeit zur Selbst-Aggregation führte zur Formulierung eines Modells, das die Entwicklung der (Luft)-Hyphen-Morphogenese beschreibt (Abb. 3). Hydrophobin-Monomere werden von der Hyphenspitze in das flüssige Medium abgegeben und bei Erreichen der Grenzschicht Wasser-Luft findet die Aggregation statt. Die aggregierten Komplexe lösen eine

Verringerung der Oberflächenspannung aus und ermöglichen es der Hyphe, aus dem Medium in die Luft zu wachsen.

Hydrophobine sind an vielfältigen, morphogenetischen Prozessen beteiligt und können als morphogenetische Ziel-Gene bezeichnet werden, die in die regulatorischen Abläufe der pilzlichen Zelldifferenzierung involviert sind. So werden die Hydrophobine Sc1, Sc4 und Sc6 von *S. commune* von Kreuzungstyp-abhängigen Genen reguliert, so daß sich ihre Expression auf die dikaryotische Phase beschränkt. Expression von Sc3 bedingt dagegen monokaryotische Zellmorphologie, so daß Sc3 als Luftmyzel-abhängig und Sc1, Sc4 und Sc6 als fruchtkörper-spezifische Hydrophobine exprimiert werden. Diese Hydrophobine treten bei der Entwicklung von Fruchtkörpern und der Bildung von Lufthyphen auf. Desweiteren können Hydrophobine in der Pathogenität von Pilzen eine wichtige Rolle spielen. Das Klasse II-Protein Cerato-Ulmin von *Ophiostoma ulmi*, der ein Ulmensterben verursachen kann, konnte in der Zellwand als Oberflächen-aktives Polypeptid lokalisiert werden und wird von pathogenen Stämmen in verstärktem Maße exprimiert (Stickler and Bolyard, 1994). Der pflanzenpathogene Pilz *Magnaporthe grisea* verursacht das massive Absterben von Reispflanzen, so daß er als Reisbranderreger bezeichnet wird. Um eine Pflanze zu infizieren, bildet der Pilz spezielle Infektionszellen, die Appressorien, aus. Das Mpg1-Hydrophobin von *M. grisea* wird während der Entwicklung der Appressorien dabei hoch exprimiert (Talbot *et al.*, 1993).

Die amphipatische Natur der Hydrophobine läßt eine Funktion zu, die für jegliche Art von Interaktion zwischen den Hyphen gebraucht wird, wie die Hydrophobine Sc1 und Sc4 in Fruchtkörpern von *S. commune*, wo eine „Verklebung“ der einzelnen, unabhängigen Hyphen zu einer pseudoparenchymatischen Struktur des Fruchtkörpers stattfindet (Rayner *et al.*, 1991; Talbot *et al.*, 1996; Wösten and Wessels, 1997). Die Ausbildung des Hartig'schen Netzes in der kompatiblen *T. terreum*/Kiefer-Assoziation bietet die Möglichkeit der Untersuchung der Rolle der Hydrophobine in dieser Interaktion. Die inkompatible *T. terreum*/Fichte-Interaktion soll als Kontrolle für die Mykorrhiza-spezifische Genexpression und Protein-Akkumulation der Hydrophobine dienen. Frühere Studien konnten bisher speziell nur eine Expression von Hydrophobinen im extraradicalen Mantel von Mykorrhizapilzen zeigen (Martin *et al.*, 1995; Tagu *et al.*, 1996). Mit Hilfe eines Antiserums, das gegen das Hydrophobin Sc3 aus dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* gerichtet ist, soll in zielgerichteten Ansätzen eine Detektion der Hydrophobin-Verteilung untersucht werden. Es soll die Rolle des Proteins in der Bildung des feinen, strukturierten pseudoparenchymatischen Gewebes des Hartig'schen Netzes in der Interaktion analysiert werden. Um diese mögliche Funktion des detektierten Hydrophobins von *T. terreum* speziell beim Aufbau und in der Funktion des Hartig'schen Netzes besser zu verstehen, wurde desweiteren die Isolierung und die molekulare Charakterisierung des korrespondierenden Gens durchgeführt.

Stamm	Beschreibung
<i>Tricholoma</i>	
<i>T. argyraceum</i> (Bull.) Gill.	CBS 361.47
<i>T. batschii</i> Gulden	GK 2628
<i>T. equestre</i> 1 (Fr.) Quél.	ATCC 366.48
<i>T. equestre</i> 2 (L.) Kumm.	K 2486
<i>T. imbricatum</i> (Fr.: Fr.) Kumm.	^b
<i>T. nictitans</i> (Fr.) Gill.	GK 784
<i>T. orirubens</i> 1 Quél.	KR 6913 ^a
<i>T. orirubens</i> 2 Quél.	GK 1175
<i>T. portentosum</i> 1 (Fr.: Fr.) Quél.	CBS 367.47
<i>T. portentosum</i> 2 (Fr.: Fr.) Quél.	GK 541
<i>T. pseudonictitans</i> M. Bon	KR 6915
<i>T. robustum</i> (Alb. & Schw.: Fr.) Ricken	CBS 494.48
<i>T. sculpturatum</i> (Fr.) Quél.	^b
<i>T. sejunctum</i> 1 (Sow.: Fr.) Quél.	CBS 368.47
<i>T. sejunctum</i> 2 (Sow.: Fr.) Quél.	GK 735
<i>T. terreum</i> 1 (Schaeff.) Kumm.	CBS 370.47
<i>T. terreum</i> 2(Schaeff.: Fr.) Kumm.	GK 740
<i>T. terreum</i> 3 (Schaeff.: Fr.) Kumm.	KR 7216 ^{c1}
<i>T. terreum</i> 4 (Schaeff.: Fr.) Kumm.	KR 7217 ^{c2} (unter Lärche)
<i>T. terreum</i> 5 (Schaeff.: Fr.) Kumm.	KR 7219 ^{c3}
<i>T. terreum</i> 6 (Schaeff.: Fr.) Kumm.	^b
<i>T. vaccinum</i> 1 (Schaeff. : Fr.) Kumm.	CBS 181.42
<i>T. vaccinum</i> 2 (Schaeff.: Fr.) Kumm.	CBS 555.50
<i>T. vaccinum</i> 3 (Pers.: Fr.) Staude	GK 2593
<i>T. vaccinum</i> 4(Pers.: Fr.) Staude	GK 6514 ^{c4}

^a ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, (USA); CBS: Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, (Niederlande), GK: G. Kost, Philipps-Universität, Marburg; KR: K.H. Rexer; ^b gesammelter Fruchtkörper leg./det.: G. Kost; ^{c1}Fruchtkörper gesammelt von K.H. Rexer, Treisbach, Hessen; ^{c2} Fruchtkörper gesammelt von K.H. Rexer, Marburg, Hessen, ^{c3} Fruchtkörper gesammelt von H. Haas, Hornberg, Baden-Württemberg; ^{c4} Fruchtkörper gesammelt von G. Kost, Nassereit (Österreich).

3. Medien und Anzucht der Organismen

3.1 Medien

Medien bzw. ihre Bestandteile wurden, soweit nicht anders angegeben, durch Autoklavieren sterilisiert. Nicht autoklavierbare Bestandteile wurden als Stammlösungen mit einem Filter von 0,2 µm Porengröße (FP 030/3, Schleicher&Schuell, Dassel) sterilfiltriert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden den Medien, soweit nicht anders angegeben, 15 g/l Agar zugesetzt.

Medium für *Escherichia coli*

LB (Sambrook *et al.*, 1989) 10 g Trypticase-Pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl ad 1 l H₂O; pH 7,0

Medien für *Tricholoma*

MMN (Kottke *et al.*, 1987) 0,05 g CaCl₂; 0,025 g NaCl; 0,5 g KH₂PO₄; 0,25 g (NH₄)₂PO₄; 0,15 g MgSO₄×7H₂O; 1 mg FeCl₃; 100 µg Thiamin; 5 g Malzextrakt; 1 g Trypton; 10 g Glucose; 10 ml Spurenelementlösung; ad 1 l H₂O

Spurenelementlösung: (Fortin and Piche, 1979) 3,7g KCl; H₃BO₃; 0,85g MnSO₄; 0,58g ZnSO₄; 0,15g CuSO₄; ad 1 l H₂O

Dualkulturmedium SF (Wong and Fortin, 1989) 0,25 g CaCl₂; 0,125 g (NH₄)₂HPO₄; 0,75 g MgSO₄×7H₂O, 1,5 ml 1%ige FeCl₃-Lösung in 1% Citronensäure; 0,5ml Spurenelementlösung; 4,8 g MES; pH 5,8; ad 1 l H₂O

Spurenelementlösung: 25 mM H₃BO₃; 5 mM MnSO₄; 5 mM KCl; 2 mM ZnSO₄; 0,5 g CuSO₄; 15 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄; ad 1 l H₂O

Medium zur Pflanzenanzucht

Keimmedium 0,1 g KH₂PO₄; 0,2 g NH₄NO₃; 0,1 g MgSO₄×7 H₂O; 0,1 g CaCl₂×2 H₂O; 100 µg FeCl₃; 2 g PIPES; ad 1 l H₂O mit

NaOH auf pH 7; 10 ml Spurenelementlösung nach Fortin

Medium für *Schizophyllum commune*

CYM (Schwalb und Miles, 1967) 0,5 g MgSO₄; 0,46 g KH₂PO₄; ; 1 g K₂HPO₄; 2 g Pepton; 20 g Glucose; 2 g Hefeextrakt; pH 6,3; ad 1 l H₂O

3.2 Anzucht der Organismen

Sofern nicht anders angegeben, wurde *E. coli* aerob in LB-Medium bei 37°C angezogen. Je nach Versuchsansatz wurde das Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) oder XGal (40 µg/ml) komplementiert.

Tricholoma-Kulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, aerob bei 20 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben ohne Schütteln gezüchtet. Um Ansätze von *Schizophyllum commune*-Kulturen zu erhalten, wurden Erlenmeyerkolben aerob ohne Schütteln bei 30°C inkubiert.

Dualkulturen von *Tricholoma* und *Picea abies* oder *Pinus sylvestris*. Die Anzucht der Dualkultur erfolgte modifiziert nach Chilvers *et al.* (1986) und Duddridge (1986). Für eine Keimung der Baumsamen wurden die Kiefer- und Fichtensamen (Staatsklänge Nagold, Baden-Württemberg) zunächst 1 h in Leitungswasser gelegt und anschließend 30 min zur Oberflächensterilisation in 30 % iges H₂O₂ inkubiert. Es wurde dann mit sterilem H₂O gespült. Schließlich wurden die Samen auf Keimmedium-Platten bei 60 % Luftfeuchte und 20°C kultiviert. Nach 2 Wochen hatten die Keimlinge Primärblätter ausgebildet und konnten in die Versuchsgefäße umgesetzt werden.

Zur Synthese der axenischen Mykorrhiza wurde ein sogenanntes Petrischalensystem (Abb. 10) verwendet. Dafür wurde der Kiefer- oder Fichtenkeimling auf die mit SF-Mediumagar-Schicht so aufgebracht, daß sich der Sproß zwischen zwei Lagen Cellophanfolie (Einmachhaut) befindet. Die Primärblätter des Keimlings selbst befanden sich außerhalb der Petrischale. Schließlich wurde die Versuchsanordnung mit Parafilm sorgfältig verschlossen und die Petrischale mit Alufolie bedeckt, um ein Ergrünen der Wurzeln zu verhindern. Die Petrischalen mit den Keimlingen wurden so bei 60% Luftfeuchte im Tag-Nacht-Rhythmus bei 20°C/hell und 14°C/dunkel für 4 Wochen inkubiert bis sich erste Verzweigungen des Wurzelsystems zeigte. Eine Inokulation erfolgte durch die Zugabe kleiner Agarstücke des Pilzes und anschließende

Inkubation. Die Wahl dieser Versuchsanordnung ermöglicht es nach weiteren 4 Wochen erste Mykorrhizierungen am Wurzelsystem an Kiefer oder Fichte zu erkennen.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 Plasmide

In dieser Arbeit wurde mit den folgenden Plasmiden gearbeitet (Tab. 2).

Tabelle 2: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBluescript KS-	Klonierungs- und Expressionvektor mit hoher Kopienzahl, Amp ^R	Stratagene, Heidelberg
pGEM-T-Vektor	Klonierungsvektor mit 3'T-Überhang zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Madison, USA
pHyd2-2	3,6 kb <i>EcoRI</i> -Fragment in pBluescript KS-	diese Arbeit
pHyd7cd	0,32 kb <i>EcoRV</i> -Fragment in pBluescript KS-	diese Arbeit
pHydES095	0,95 kb <i>EcoRI-SalI</i> -Fragment in pBluescript KS-	diese Arbeit
pHydS17	1,7 kb <i>SalI</i> -Fragment in pBluescript KS-	diese Arbeit
pHydS085	0,85 kb <i>SalI</i> -Fragment in pBluescript KS-	diese Arbeit
pHydEP055	0,55 kb <i>EcoRI-PstI</i> -Fragment in pBluescript KS	diese Arbeit
pHydES0,98	0,98 kb <i>EcoRV-SalI</i> -Fragment in pBluescript KS	diese Arbeit

4.2 Präparation von Plasmid-DNA

Für analytische Zwecke wurde die Standardpräparation angewandt. Für die Präparation von größeren Mengen oder RNA-freier Plasmid-DNA wurde ein Säulenverfahren verwendet. (Plasmid-Midi-Präparation).

Standard-Plasmid-Präparation. Die Standard-Plasmidpräparation wurde nach Birnboim und Doly (1997), modifiziert nach Ausubel *et al.* (1995) durchgeführt. 1,5 ml Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, die Zellen in 200 μ l Sol A (50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM EDTA) resuspendiert und bei RT 5 min inkubiert. Zur Zellyse erfolgte die Zugabe von 200 μ l 0,2 N NaOH; 1 % SDS mit anschließender 5 minütiger Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 180 μ l 3 M Natriumacetat; pH 5,3 und weiteren 5 min Inkubation auf Eis wurden Zelltrümmer und Proteine durch Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm) abgetrennt. Abschließend erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol, 5 min Inkubation bei RT und 10 min Zentrifugation (13.000 rpm). Das erhaltene DNA-Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen.

Plasmid-Midi-Präparation. Die Durchführung erfolgte mit QIAGEN-tip 100-Säulen (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der Plasmid-DNA Konzentration erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm in einem Photometer mit Quarzküvetten. Eine A_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 μ g pro ml (Sambrook *et al.*, 1989).

4.3 Präparation genomischer DNA aus *Tricholoma*

Zur DNA-Isolierung wurde eine 100 ml Flüssigkultur angeimpft und stehend für 4-6 Wochen bei 20°C inkubiert (Wendland *et al.*, 1996). Das gewachsene Myzel wurde mit bidest. H₂O gewaschen und in flüssigem Stickstoff zermörsert. Anschließend wurde das pulverisierte Myzel in 20 ml TES-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM EDTA; 1 % SDS) aufgenommen und 1 h bei 60 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer (12000 rpm für 10 min) wurde 1 Volumenanteil 5 M Ammoniumacetat zum Überstand hinzugegeben, 30 min auf Eis inkubiert und erneut für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden aus dem Überstand durch Zugabe von 0,7 Volumenanteilen Isopropanol ausgefällt und abzentrifugiert (12000 rpm für 30 min). Nach Waschen des Sediments mit Ethanol (70 %) und anschließendem Trocknen wurden die Nukleinsäuren in 1 ml TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen, mit 20 μ l RNase (10 mg/ml) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Reinigung der DNA wurde einmal mit Phenol sowie zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA wurde dann nach Zugabe von 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumenanteilen Ethanol (96 %) präzipitiert und abzentrifugiert (12000 rpm für 30 min). Nach Waschen des Sediments in Ethanol (70 %) und anschließendem Trocknen wurde die DNA in TE resuspendiert.

4.3 Restriktion von DNA

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Ansätze mit 20 μ l Gesamtvolumen angesetzt, die 1 μ l Restriktionsenzym (1-15 U/ μ l) enthielten. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde in den entsprechenden Restriktionspuffern nach Angaben des Herstellers. Bei Verdau von genomischer

DNA wurden Ansätze von 300 μ l Gesamtvolumen angesetzt, die für 20 Stunden inkubiert wurden. Anschließend erfolgte Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen gemäß den Herstellerangaben.

4.5 DNA-Isolierung aus Agarose.

Verwendet wurde das Jetsorb-System (Genomed, Bad Oeynhausen). Das Verfahren beruht auf dem Schmelzen der Agarose, der Bindung der DNA an eine Silica-Matrix während der folgenden Waschschriffe und schließlich der Elution der DNA von der Silica-Matrix. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.6 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 0,8-2 %igen Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989) in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetate pH 8,0; 1 mM EDTA). Die DNA-Proben wurden in Ladepuffer (2% Ficoll 400; 0,01% Bromphenolblau; 0,01% Orange G; 0,01% Xylencyanol) aufgetragen. Es wurde als Größenstandard *Pst* I geschnittene λ -DNA verwendet. Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurden die Gele 10 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 μ g/ml) gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

4.7 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem Standardprotokoll von Innis und Gelfand (1990). Die DNA wurde in einem Personal-Cycler der Firma Biometra (Göttingen) amplifiziert. Es wurden *Taq*-Polymerasen der Firmen Qiagen (Hilden) und Gibco (Eggenstein) nach Angaben der Hersteller verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen und mit einer Konzentration von 50-100 pmol pro Ansatz (25 bzw. 50 μ l) verwendet (Tab. 3). Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 0,5-10 ng DNA; 5 μ l 10 \times *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer (500 mM KCl; 100 mM Tris/HCl pH 8,3), 3 μ l MgCl₂ (50 mM), 10 μ l Nukleotidmix (je 2 mM dNTP) und 2,5 U *Taq*-Polymerase. Es wurde auf 50 μ l Gesamtvolumen mit H₂O aufgefüllt. Der Gesamtansatz wurde mit Paraffinöl überschichtet. Die PCR-Programme wurden je nach Anwendung in Polymerisationsdauer (1 min/1 kb) und Annealingtemperatur variiert. Die Denaturierungstemperatur betrug 95°C, die der Polymerisation 72°C.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide; 5' \rightarrow 3'-Richtung

Bezeichnung	Sequenz
-------------	---------

Standardprimer:

Universal (Fw)	GTAAAACGACGGCCAGT
Reverse (Rpk)	AACAGCTATGACCATG

spezifische Primer:

ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
CNL12	CTGAACGCCTCTAAGTCAG
5SA	CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT
NS1	GTAGTCATATGCTTGCTC
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA
dAdapt.	GACTCGAGTCGACATCGA(T) ₁₇
Adapt.	GACTCGAGTCGACATCG
Hyddeg3	CCICTICC(A/C/G/T)GG(A/C/G/T) GGITCIAG(T/C)TA I = Inosin
Hyd7for	CAGCAACCCGTTTGCTC
Hyd7rev	GGCTGACCAAGAAAGCTCC
Hydstart1	ATGTTCTCTAAAGTCGCTCTC
Hydstopp1	CAAGTTGATGGGAGAGCAGCC

4.8 Isolierung von RNA

Zur RNA Gewinnung wurden 2-6 Wochen alte Flüssigkulturen, Myzelien von Agarplatten, sowie frische Fruchtkörper verwendet (Wendland *et al.*, 1996). Das Myzel oder der Fruchtkörper wurde mehrmals mit bidest. H₂O gewaschen und in flüssigem Stickstoff zermörsert. Anschließend wurde das pulverisierte Material in RNA-Extraktionspuffer (1 Volumenteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 49:48:1 und 1 Volumenanteil 4 % SDS; 0,15 M Natriumacetat; pH 5) aufgenommen, kurz durchmischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (13000 rpm für 10 min) wurde die wässrige Phase dreimal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI; 24:1:1) extrahiert. Die RNA wurde dann durch Zugabe von 2,5 Volumenanteilen Ethanol (96 %) präzipitiert und abzentrifugiert (13000 rpm für 15 min). Nach Waschen mit Ethanol (70 %) wurde die RNA getrocknet und zu 1 bis 5 g/l in DEPC-behandeltes H₂O resuspendiert.

Um RNA hoher Qualität für die cDNA-Synthese zu erhalten wurde, der High Pure RNA Isolation Kit der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Dabei wurde das Pilzmyzel zunächst wie oben beschrieben aufgebrochen und in dem sauren Phenol-Chloroform-Gemisch inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden jeweils 200 µl der wässrigen Phase mit 400 µl des mitgelieferten Lyse-/Bindpuffer vermischt. Anschließend wurde nach dem Protokoll des Herstellers zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Kulturzellen weiterverfahren.

Zur Isolierung von RNA aus Mykorrhizen wurde das Rneasy Kit von Qiagen (Hilden) verwendet und laut Angaben des Herstellers vorgegangen

4.9 cDNA-Synthese und 3'-RACE-Technik

Es wurde die Reverse Transkriptase Omniscript der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und der Reaktionsansatz setzte sich nach Angaben des Hersteller aus 2 µl 10×RT-Puffer; 10 U RNAsin; 2 µl Nukleotidmix (je 5 mM dNTP), 100 pmol Hexanukleotide (Roche, Mannheim), 100 ng - 2 µg RNA und 1 µl Reverser Transkriptase zusammen. Der Ansatz wurde auf 20 µl Endvolumen mit DEPC-behandeltes H₂O aufgefüllt. Die RNA wurde zuvor 5 min bei 55°C denaturiert und auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde anschließend für 1-2 h bei 37°C inkubiert.

Die 3'-RACE-Technik (schnelle Amplifizierung von 3' cDNA-Enden) entspricht einer RT-PCR, wobei spezielle Oligonukleotide zur Amplifizierung des 3'-Endes der cDNA eingesetzt werden. Dabei wurde zur cDNA-Synthese ein oligodT-Adapterprimer verwendet (Tab. 3). Bei der anschließenden PCR wurde dementsprechend der zugehörige Adapter sowie ein genspezifischer Primer eingesetzt. Der Adapter selbst ermöglichte bei der PCR die Verwendung einer höheren Hybridisierungstemperatur.

4.10 Kompetitive RT-PCR

Für die quantitative Bestimmung der *T.t.hyd1*-Transkriptmengen in Mykorrhizen von *T. terreum*-Kiefer und *T. terreum*-Fichte wurden jeweils 100 ng Gesamt-RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die Transkripte von *T.t.hyd1* wurden detektiert, indem mit den spezifischen Primern Hydstart1 und Hydstop1 in PCR-Ansätzen das 324 bp große Fragment mit cDNA als Template amplifiziert wurde. Als Kompetitor-DNA wurde das aus genomischer DNA von *T.terreum* mit den vorher genannten Primer (Tab. 3) amplifizierte 480 bp große Fragment, das zwei Introns beinhaltet, verwendet. Die Kompetitor-DNA wurde in der kompetitiven RT-PCR in verschiedenen Konzentrationen von 0,01 pg -100 pg zugesetzt.

Die präparierte Gesamt-RNA aus Mykorrhiza enthielt die RNA beider Symbiose-Partner, so daß über eine vorherige PCR mit speziellen Primern und der cDNA als Template die Gesamt-Menge an cDNA von *T. terreum* für die folgenden kompetitiven PCR-Reaktionen bestimmt wurde, um einen Mengenausgleich an cDNA zu gewährleisten. Es wurden hierfür die konservierten Primer

NS1 und NS8 (Tab. 3) in Kontroll-PCR's verwendet, die die Amplifikation der ribosomalen 18S Untereinheit der jeweiligen Spezies gewährleistet. Es folgte ein Restriktionsverdau mit *Mbol* und ermöglicht eine Mengenbestimmung der einzusetzenden *T. terreum*-cDNA in den kompetitiven Reaktionsansätzen der PCR.

4.11 Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten

Zur Klonierung wurden 1-2 μ g Vektor- bzw. Insert-DNA geschnitten. Anschließend wurde der Vektor mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) dephosphoryliert. Eine Reinigung erfolgte durch Auftrennung in Agarosegelen und Elution aus dem Gel. Zur Bestimmung der Konzentrationen der Vektor- und Insert-DNA wurden 5-10 μ l auf einem Agarosegel aufgetragen und die Konzentrationen im Vergleich zur Bandenstärke des Markers abgeschätzt. Die Ligation wurde bei 14°C in einem Volumen von 10 μ l durchgeführt.

4.12 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde die zyklische Sequenzierung mittels PCR unter Verwendung fluoreszenz-markierter Primer durchgeführt (MWG-Biotech, Ebersberg). Es wurde der Thermosequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP der Firma Amersham (Braunschweig) eingesetzt. Pro Reaktion wurden 0,5 μ g/kb DNA eingesetzt. Die Analyse der Sequenzreaktion erfolgte mit einem automatischen Sequenziergerät (LI-COR, DNA Sequencer Model 4000, MWG-Biotech, Ebersberg).

4.13 Phylogenetische Analyse

Zur Ermittlung von Sequenzhomologien wurden die erhaltenen Sequenzen mit CLUSTAL V (Higgins and Sharp, 1988) einem Alignment unterzogen. Das Alignment aller Sequenzinformationen wurde überprüft und optimal angeglichen. Bootstrap-Analysen und die Aufstellung und Konstruktion phylogenetischer Stammbäume wurde mit dem Computer-Programm PHYLIP 3.5c durchgeführt (Joseph Felsenstein, University of Washington, U.S.A). Die Nukleotidvariation der Sequenzen wurde mit der „maximum parsimony“- Methode analysiert.

4.14 Transfektion von *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompeter Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit einer über Nacht gewachsenen Kultur 1:10 angeimpft (Ausubel *et al.*, 1995). Die Kultur wurde bei 37°C unter Schütteln aerob bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0,5-0,6$ inkubiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 4°C) und mit 1 Volumen sterilem H₂O resuspendiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation wurden die Zellen mit 0,5 Volumen H₂O aufgenommen. Es folgte dann ein Waschschrift mit 10 % Glycerin, um dann

anschließend das Zellsediment mit 3-4 ml 10 % Glycerin zu resuspendieren. Es wurden Aliquots zu je 50 μ l in Eppendorfcups in einem Ethanol/Trockeneis-Bad bei -70°C schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80° gelagert. Für die Transformation wurden die auf Eis aufgetauten Zellen mit der vorher auf Dialyse-Membran entsalzten DNA vermischt und in Elektroporationsküvetten mit Hilfe eines Gene Pulser (BioRad) bei 2,5 kV; 25 μ s und 200 μ l elektroporiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert und dann auf vorgetrockneten Selektiv-Agarplatten ausplattiert.

4.15 Protoplastierung von *Tricholoma*

Für die Protoplastierung nach Kropp und Fortin (1986) wurden 4 Wochen alte Kulturen von *Tricholoma* verwendet und in einem Labormixer (waring blender 8011, neoLab, Heidelberg) bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zerkleinert. Es wurden Erlenmeyerkolben mit 40 ml MMN-Medium und 10 ml Myzelsuspension angeimpft und für 4 Tage auf einem Schüttler bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde das Myzel zentrifugiert und zweimal mit osmotisch stabilisierter Lösung (0,6 M Mannitol pH 5,8 mit 0,05 M Maleinsäure-NaOH) gewaschen. Nach Zugabe von Novozymlösung (10 mg/ml lytisches Enzym aus *Trichoderma harzianum*; SIGMA) in 0,6 M Mannitol erfolgte eine Inkubation für 6 h bei 30°C unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde die lytische Lösung durch ein 45 μm - und dann durch ein 30 μm Nylongewebe gegeben. Die filtrierte Lösung wurde für 20 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das resultierende Protoplasten-Sediment wurde zweimal in der osmotisch stabilisierten Lösung gewaschen und zentrifugiert. Die Protoplasten wurden in flüssigem MMN (stabilisiert mit 0,6 M Mannitol) überführt und nach einer Woche Regeneration bei 20°C auf MMN-Agarplatten ausplattiert. Zur Isolierung von monokaryotischen Kulturen wurden nach 1-2 Wochen erste erkennbare Myzelien auf frische MMN-Agarplatten überimpft.

4.16 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot-Analyse)

Nach einer Agarosegelelektrophorese wurde die DNA zur Herstellung von Einzelsträngen zunächst denaturiert und anschließend neutralisiert, indem das Agarosegel 20 min in 0,25 M HCl, 30 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH), und 20 min in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris/HCl pH 8,0) geschüttelt wurde. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte durch Kapillarkräfte nach dem Prinzip von Southern (1975), die Durchführung wie in Ausubel *et al.* (1995) beschrieben. Die Fixierung der DNA an das Membranmaterial erfolgte durch UV-Quervernetzung.

Die Herstellung radioaktiv markierter Sonden erfolgte durch Anbinden von Hexanukleotiden an durch Hitze denaturierte DNA (50-100 ng) und von dort ausgehende Neusynthese des Gegenstrangs unter Verwendung eines radioaktiv markierten Triphosphats (Feinberg und Vogelstein, 1984). Der Markierungsansatz setzte sich zusammen aus 12,5 μ l DNA-Lösung;

4,0 µl 5×Klenowpuffer; 0,8 µl BSA; 1,0 µl Klenow-Fragment und 2 µl α [³²P]-dATP (10 mCi/ml). Die Markierungsreaktion wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Die freien Nukleotide wurden mit Hilfe von S-200 Anionenaustauschersäulen der Firma MoBiTec (Göttingen) nach Angaben der Herstellers entfernt.

Zur Hybridisierung wurde die Membran zunächst mit der Hybridisierungslösung ohne Sonde (7 % SDS; 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0) 30 min prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit der durch 10 minütiges Kochen denaturierten Sonde für 12 h bei der jeweiligen Temperatur. Es folgten 2 Waschschrte bei der Hybridisierungstemperatur mit dem Waschpuffer (0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0; 1 % SDS). Die Detektion erfolgte durch das Auflegen eines Röntgenfilmes für mindestens 24 h und der Entwicklung des Films.

4.17 Koloniehybridisierung

Für die Koloniehybridisierung wurden LB-Platten verwendet, die 100-200 *E. coli*-Kolonien aufwiesen. Die Kolonien wurden auf Nylonmembranen übertragen und die Membran nach Anleitung des Herstellers behandelt. Die DNA wurde durch UV-Quervernetzung auf die Membranen fixiert. Die Prähybridisierung bzw. die Hybridisierung erfolgte wie in 4.16 beschrieben (Southern-Hybridisierung). Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie auf Röntgenfilmen. Positive Kolonien wurden wiederholt vereinzelt, wobei nach jeder Vereinzellung eine erneute Detektion mittels Hybridisierung erfolgte.

4.18 DNA-RNA-Hybridisierung (Northern Blot-Analyse)

Zur Auftrennung der RNA wurden denaturierende Agarosegele (1,2 % in 1× MOPS; 3 % Formaldehyd) verwendet, die die Auflösung von Sekundärstrukturen gewährleisten (Sambrook *et al.*, 1989). Je 4,5 µl RNA wurden mit 3,5 µl Formaldehyd, 2 µl 10× MOPS (0,4 M MOPS; 0,1 M Natriumacetat; 0,01 EDTA; pH 7) sowie 10 µl Formamid vermischt und für 15 min bei 60°C erhitzt. Nach dem Abschrecken auf Eis wurden den Proben 1/10 Formamid-Laufpuffer (10 mg Xylencyanol FF; 10 mg Bromphenolblau; 200 ml 0,5 M EDTA; pH 7,0; 10 ml Formamid) zugesetzt. Die Auftrennung der RNA erfolgte für etwa 2-3 h bei 100 V. Der Transfer der RNA auf Nylonmembran erfolgte für 2 h mittels eines abwärts gerichteten Kapillarblots mit 20×SSC (0,3M Natriumcitrat; 3 M NaCl). Eine Fixierung erfolgt durch eine UV-Quervernetzung. Der Transfer der RNA kann durch eine Methylenblaufärbung überprüft werden. Hierzu wurde die Membran für 10 min in 50 mM NaOH gelegt und anschließend für 60 sec in 0,3 M Natriumacetat pH 5,2/0,03% Methylenblau inkubiert. Die Entfärbung der Membran wurde durch mehrmaliges Waschen mit dest. Wasser erreicht. Die Hybridisierung der Membran mit einer denaturierten, radioaktiven Sonde in Hybridisierungspuffer (50 mM PIPES pH 6,5; 100 mM NaCl; 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0; 1 mM EDTA; 5% SDS) erfolgte über Nacht bei 65°C. Anschließend wurde die Membran zweimal mit Northern-Waschlösung (5% SDS; 0,015 M

Natriumcitrat; 0,15 M NaCl) gewaschen. Es folgte eine Autoradiographie der Membran für 1-2 Tage und die Entwicklung der Filme.

5. Biochemische Methoden

5.1 Reinigung von Hydrophobinen

Es wurde der Überstand einer 2 Monate stehenden *Tricholoma*-Kultur vom Pilzmyzel durch eine Zentrifugation (10000 rpm, 30 min) geklärt. Der Überstand wurde anschließend für mindestens 5 min in einem Labormixer (waring blender 8011, neoLab, Heidelberg) bei maximaler Geschwindigkeit mit Luft durchmischt. Das durch eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 30 min gewonnene Sediment wurde mit H₂O zweimal gewaschen und getrocknet. Es erfolgte eine Extraktion mit eiskalter Trifluoressigsäure für 2 h bei 4°C. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die Lösung mittels eines Preßluftstrom getrocknet. Das getrocknete Material wurde in 0,1M Tris/HCl pH 8,0; 60% Ethanol resuspendiert und anschließend von nicht löslichen Bestandteilen durch Zentrifugation gereinigt. Zur Reinigung von Hydrophobinen aus Zellwandmaterial wurde das Myzel mit flüssigem Stickstoff aufgebrochen und in einem Extraktionspuffer (2% SDS; 0,05 M Tris/HCl pH 6,8) aufgenommen. Die Suspension wurde anschließend für 10 min gekocht. Das nach Zentrifugation gewonnene Sediment wurde viermal mit H₂O gewaschen und getrocknet. Das weitere Vorgehen entspricht dem vorher genannten Ablauf.

5.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Die Analyse wurde mit dem Bradford-Reagenz (SIGMA, Deisenhoffen) durchgeführt. Die Proteinprobe oder Standardprobe (0,5-5 µg Protein/µl) wurde mit 1 ml des Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion der Lösung bei 595 nm bestimmt. Zur Aufstellung einer Eichgeraden diente Rinderserumalbumin als Standard.

5.3 Proteingelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Zur Detektion der Hydrophobin-Proteine und zur Bestimmung der apparenten molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte mit einer BIO-RAD-

Tabelle 4: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Lösung

Acrylamid-Endkonzentration

	Trenngel (12 %)	Trenngel (15%)	Sammelgel (4%)
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	6,0 ml	7,5 ml	0,65 ml
4× Tris/HCl/SDS	3,75 ml; pH 8,8	3,75 ml; pH 8,8	1,25 ml; pH 6,8
dest. Wasser	5,25 ml	3,75 ml	3,05 ml
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl
10 % Ammonium- persulfat	50 µl	50 µl	25 µl

Elektrophorese-Apparatur (Mini-Protean II). Die Zusammensetzung der Gele (8,3×5×0,05 cm) ist in Tabelle 4 aufgeführt. Die Proteinprobe wurde mit Probenpuffer (0,05 M Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 5% Mercaptoethanol, 10 % Glycerin; 0,01% Bromphenolblau) versetzt und je nach Probe 10 min bei 95 °C oder bei RT inkubiert. Diese Probenlösungen (je 20 µl) wurden auf die Spuren aufgetragen. Es wurde zunächst eine Spannung von 80 Volt für 15 min, dann 140 Volt für ca. 60 min angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald der Bromphenolblaumarker das untere Ende des Gels erreicht hatte. Der Elektrodenpuffer bestand aus 25 mM Tris/HCl pH 8,8; 192 mM Glycin und 0,1% SDS. Als Proteingrößenstandard wurde „High Molecular Weight Standard Mixture for SDS Gel Electrophoresis“ der Firma SIGMA (Deisenhofen) gelöst in Probenpuffer verwendet.

5.4 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Blum *et al.* (1987) durchgeführt. Zunächst wurden dafür die Gele über Nacht fixiert. Die verwendete Fixier-Lösung bestand aus 50 % Ethanol, 12 % Eisessig und 0,2 % Formaldehyd. Nach dem Fixieren wurden die Gele dreimal 20 min in 50 %igem Ethanol gewaschen, anschließend maximal 60 s in 0,01%iger Natriumthiosulfatlösung gespült. Es folgte 20 min Inkubation in einer Färbelösung (0,1% Silbernitrat und 0,03 % Formaldehyd), worauf die Gele dreimal 20 s mit Wasser gewaschen wurden. Die Gele wurden anschließend in Entwickler (0,28 M Na₂CO₃, 12 µM Na₂S₂O₃ und 0,01 % Formaldehyd) inkubiert. Die Reaktion wurde bei Erreichen der gewünschten Farbtintensität durch Waschen mit Wasser und Inkubation in 10 mM EDTA gestoppt.

5.5 Immunodetektion von Proteinen (Western Blot-Analyse) und N-terminale Sequenzierung

Für die Immunodetektion der Hydrophobin-Proteine wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden dafür zuerst einer SDS-PAGE unterzogen. Anschließend wurde Filterpapier und Nitrocellulose für den Transfer auf eine Membran auf Gelgröße zugeschnitten. Das Gel und die zugeschnittenen Materialien wurden zuerst in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20 % Methanol) gelegt. Der Aufbau erfolgte, indem zuerst das in Blotpuffer getränkte Filterpapier in 6 Lagen auf die Apparatur gelegt wurde, anschließend die Membran, das Gel und zum Abschluß 6 Lagen Filterpapier. Die Materialien mußten sorgsam mit Puffer getränkt werden, um einen optimalen Stromfluß zu gewährleisten. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² mit einer Semi-Dry Blotapparatur (Transblot SD, BioRad, München) für 1-2 h durchgeführt.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS (10 mM Na₂PO₄; 150 mM NaCl pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurde die Membran 30 min in Blockierungslösung (2% BSA in PBS) inkubiert. Nach dem Entfernen der Blockierungslösung wurde die Membran in dem mit 1 % BSA in PBS verdünnten anti-Kaninchen Sc3- oder Sc4-Antikörper (1:1000) über Nacht inkubiert. Diese Seren waren gegen die Hydrophobine Sc3 oder Sc4 aus *Schizophyllum commune* gerichtet und wurden uns freundlicherweise von Prof. J. G. H. Wessels, (Groningen, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Nicht gebundener Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS, das 0,1% Triton X-100 enthielt, entfernt. Als Sekundärantikörper wurde mit Peroxidase konjugierte anti-Kaninchen-Immunglobuline (SIGMA, Deisenhofen) verwendet. Die Membran wurde 1 h mit in 1% Milchpulver in PBS verdünnten Sekundärantikörper (1:1000) inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrte mit 0,1% Triton X-100 in PBS. Die Detektion erfolgte mit dem ECL Kit (Amersham, Braunschweig) laut Angaben des Herstellers.

Für eine N-terminale Aminosäure-Sequenzierung des Hydrophobin-Proteins wurde nach SDS-PAGE die Proteine auf eine PVDF-Membran bei 0,8 mA/cm² für 2 h mit Blotpuffer geblotet. Anschließend wurde der Blot mit 0,1 % Coomassie brilliant blue R 250 in 50 % Methanol gefärbt. Zur Entfärbung wurde 40 % Methanol verwendet. Die blau angefärbte proteinhaltige Bande des Blots wurde nach mehrmaligen Waschen mit bidest. H₂O in einem PTH Analysator (Applied Biosystems) zur Analyse der Aminosäuresequenz ausgewertet.

6. Mikroskopische Methoden

6.1 Färbung von *Tricholoma* mit DAPI

Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Es wurden Myzelstücke in PME (50 mM PIPES pH 6,7; 25 mM EGTA pH 8,0; 5 mM MgSO₄) mit 8 % Formaldehyd für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei Waschschrten mit PME und der Zugabe von 5 µg/ml DAPI in 1% Triton x 100 wurden die

Objekte mit 50 % Glycerin in 0,1 M Tris pH 8,0 beschichtet (Fischer and Timberlake, 1995). Die Analysen der Objekte erfolgten an einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Jena).

6.2 Präparation von Mykorrhizen für die Hellfeld-bzw. Fluoreszenzmikroskopie

Die frisch geernteten Mykorrhizen wurden aus den Petrischalensystemen entnommen und auf vorbereitete Metallscheiben gelegt. Die Mykorrhizen wurden anschließend in wasserlöslichen Tissue-Tec (Sakura Finetek, USA) bei einer Boxtemperatur von -24°C für 1 h eingefroren. Die Herstellung von Schnitten erfolgte dann in einem Gefriermikrotom (2800 Frigocut-E, Leica) bei -22°C mit 10-40 μm Schnittdickevarianz. Die hergestellten Schnitte wurden auf mit Poly-L-Lysin vorbereitete Objektträger aufgebracht und angetrocknet. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte eine Lagerung bei -70°C .

6.3 Präparation von Mykorrhizen für die Immunfluoreszenzmarkierung von Proteinen

Für die Lokalisierung von Proteinen in Mykorrhiza-Schnitten wurde im wesentlichen dem Protokoll von Fischer und Timberlake (1995) gefolgt. Schnitte wurden zuerst mit PME-Puffer (50 mM PIPES pH 6,7; 25 mM EGTA pH 8,0; 5 mM MgSO_4) gewaschen und anschließend für 15 min bei RT in Fixierlösung (PME mit 4% Formaldehyd) fixiert. Dann erfolgten mehrere Waschschrte mit PME. Durch einen Verdau mit Novozymlösung (plus 50% Eiweiß) wurde die Zellwand permeabel gemacht. Es folgten wieder Waschschrte und Inkubation mit Extraktions-Lösung (100 mM PIPES; 25 mM EGTA; 0,1% Nonidet P-40) und Behandlung mit Methanol bei -20°C . Nach Inkubation mit Blocking-Lösung (TBS + 3% BSA) für 30 min wurde über Nacht mit den jeweiligen Erstantikörper in einer 1:1000-Verdünnung behandelt. Nach verschiedenen Waschschrten mit TBS (60 mM Tris/HCl pH 7,4; 200 mM NaCl) + 0,1% Tween 20 folgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (Cy3-markiert, 1:100; SIGMA; Deisenhofen). Zum Mikroskopieren wurden den Proben anschließend Mounting-Medium (0,1 M Tris/HCl pH 8,0; 50% Glycerin) aufgetropft und mit Deckelgläschen versehen. Die Analysen der Objekte erfolgten an einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Jena).

IV. Ergebnisse

1. Systematik und phylogenetische Beziehungen innerhalb von *Tricholoma*

Die Bereiche der ITS-Sequenzen, die im Genom die Region zwischen 17S und 25S rRNA inklusive der kompletten Sequenz der 5.8S rRNA umfassen, wurden zu phylogenetischen Analysen herangezogen. Dieser molekularbiologische Ansatz sollte zwischen 13 verschiedenen Spezies von *Tricholoma* zur Klärung verwandtschaftlicher Beziehungen dienen. Als phylogenetisch verwandte, distinkte Gattung der *Tricholomataceen* wurden zwei *Cortinarius*-Stämme, sowie der zu den Schizophyllales gehörende Basidiomycet *Schizophyllum commune* für die molekulare Analyse ausgewählt. Um Variabilität innerhalb einer Spezies zeigen zu können, wurden mehrere Isolate verschiedener Stämme von *T. terreum* zur Untersuchung herangezogen. Außerdem sollte der Bereich des IGS (intergenic spacer), der die Region zwischen der 25S und der 5S rRNA einschließt und größere Variabilität besitzen kann, zur weiteren Aufklärung der Taxonomie innerhalb einiger *Tricholoma*-Arten dienen.

1.1 Amplifikation von ITS-rRNA

Zur Amplifikation des ITS (internal transcribed spacer) wurden die Primer ITS1 und ITS4 (Tab. 3), die aus konservierten Bereichen der rRNA-Gene abgeleitet wurden, in PCR-Reaktionen verwendet. Es wurden Stämme von *Tricholoma argyraceum*, *T. batschii* (*syn. T. fraticum*), *T. equestre* (*sensu strictu*), *T. imbricatum*, *T. nictitans*, *T. orirubens*, *T. portentosum*, *T. pseudonictitans*, *T. robustum*, *T. sculpturatum*, *T. sejunctum*, *T. terreum* und *T. vaccinum* zur Amplifizierung der rRNA-Sequenzen verwendet. Dafür wurde genomische DNA von verschiedenen Stämmen der 13 *Tricholoma*-Arten, von *Cortinarius hercynicus* und *Cortinarius atrovirens*, sowie von *Schizophyllum commune* aus frischen Fruchtkörpern, Herbarmaterial oder Myzelien präpariert.

Die PCR-Amplifikationen des ITS-Bereichs (ITS1, 5.8S und ITS2) der insgesamt 20 Isolate von *Tricholoma*, *Cortinarius* und *S. commune* ergab jeweils eine einzelne DNA-Bande, die in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurde (Abb. 4). Fast alle amplifizierten ITS-Produkte von *Tricholoma* besaßen die Größe von 680 bp, die Größe der korrespondierenden Fragmente der *Cortinarius*-Stämme betrug 700 bp, die von *S. commune* 580 bp. Durch die Größen-Uniformität der *Tricholoma*-Fragmente konnten zunächst keine weitere Aussage

getroffen werden. Ein Längenpolymorphismus war innerhalb der Gattung *Tricholoma* nur für die Isolate *T. robustum* und *T. portentosum* erkennbar, die beide auf langjährig kultivierte Isolate aus Stammsammlungen zurückgehen. Eine direkte Sequenzierung der ITS-Produkte von insgesamt 28 Isolaten wurde durchgeführt, um genauere Angaben zu ermöglichen.

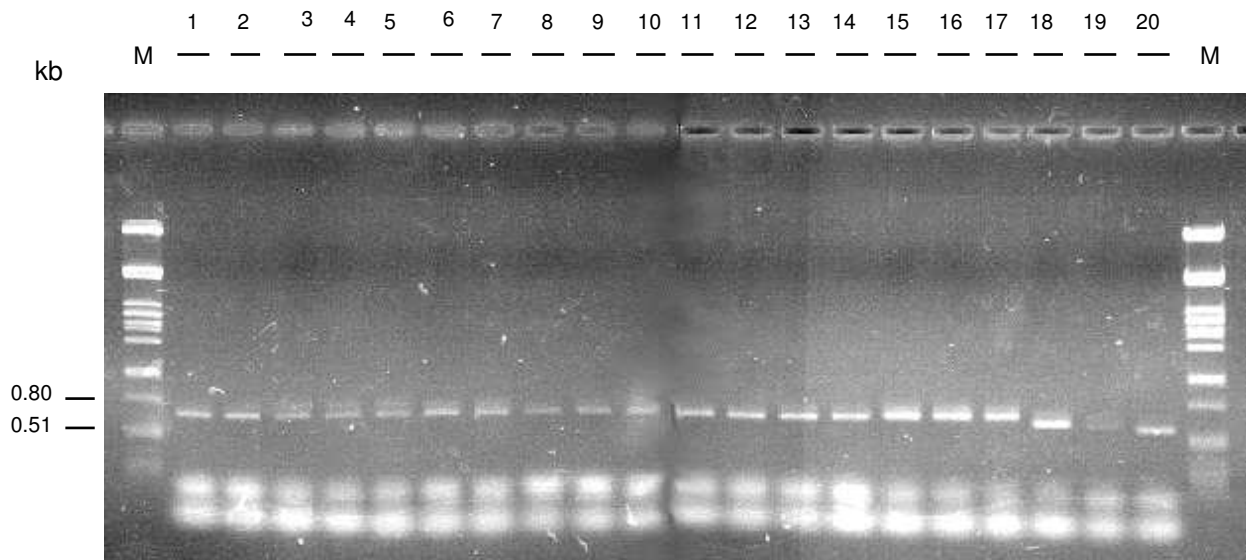


Abb. 4: Gelelektrophorese amplifizierter ITS-Regionen verschiedener Isolate von *Tricholoma*, *Cortinarius* und *Schizophyllum*. Spur M: Marker (*Pst*I geschnittene λ -DNA), Spur 1: *T. orirubens*, Spur 2: *T. nictitans*, Spur 3: *T. pseudonictitans*, Spur 4: *T. vaccinum* GK 6514, Spur 5: *T. batschii*, Spur 6: *T. equestre* ATCC 366.48, Spur 7: *T. vaccinum* GK 2593, Spur 8: *T. imbricatum*, , Spur 9: *T. vaccinum* CBS 181.42, Spur 10: *T. terreum* KR 7216, Spur 11: *T. argyraceum*, Spur 12: *T. scalpturatum*, Spur 13: *T. portentosum* GK 541, Spur 14: *T. sejunctum* GK 735, Spur 15: *T. sejunctum* CBS 368.47, Spur 16: *Cortinarius hercynicus*, Spur 17: *Cortinarius atrovirens*, Spur 18: *Schizophyllum commune*, Spur 19: *T. robustum*, Spur 20: *T. portentosum* CBS 367.47.

1.2 Amplifikation von IGS-rRNA

Der Bereich der IGS (intergenic region), der sich zwischen der 25S rRNA und der kleinen 5S rRNA befindet, kann sich durch größere Variabilität als der des ITS-Bereiches im Genom hervorheben. Es sollte überprüft werden, ob innerhalb der *Tricholoma*-Spezies ein Längenpolymorphismus des IGS-Bereichs existiert. Dafür wurden acht Stämme ausgewählt, die u. a. als vegetative Myzelien im Labor vorlagen (*Tricholoma argyraceum*, *T. equestre*, *T. orirubens*, *T. vaccinum*, *T. terreum*, *T. sejunctum*, *T. portentosum* und *T. robustum*). Die Amplifizierung der IGS wurde mit dem Primerpaar CNL12 und 5SA (Tab. 3) durchgeführt und ergab für jede Spezies eine einzelne Bande. Die Größe der IGS variierte mit 480 bp, 520 bp und 1,0 kb (Abb. 5). Bei den fünf *Tricholoma*-Arten, bei denen eine Uniformität der ITS-Region

auftritt, zeigten auch eine Größenuniformität des IGS. Ein Längenpolymorphismus der IGS-Regionen innerhalb *Tricholoma* war also nicht vorhanden. Die Größenunterschiede der IGS-Bereiche zweier weiterer Stämme (*T. portentosum* und *T. robustum*) deckt sich mit dem Ergebnis aus der Untersuchung des ITS, ein weiteres Isolat (*T. sejunctum*) erscheint hier ebenfalls mit abweichender IGS-Länge.

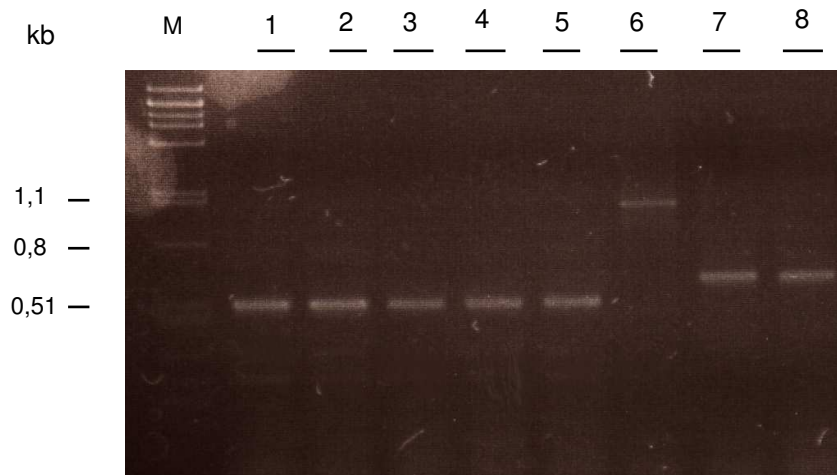


Abb. 5: Gelelektrophorese amplifizierter IGS-Bereiche von *Tricholoma*-Spezies. Spur M: Marker (*Pst*I-geschnittene λ -DNA, Spur 1: *T. argyraceum*, Spur 2: *T. equestre* ATCC 366.48, Spur 3: *T. orirubens* GK 1175, Spur 4: *T. terreum* KR 7216, Spur 5: *T. vaccinum* GK 6514, Spur 6: "*T. sejunctum*" CBS 368.47, Spur 7: "*T. portentosum*" CBS 367.47, Spur 8: "*T. robustum*".

1.3 Sequenzvariabilität der ITS-Region innerhalb mehrerer Isolate von *Tricholoma terreum*

Nachdem die Aufrennung der Amplifikate für IST und IGS keine Unterscheidung erlaubte, wurde die Variabilität innerhalb einer Spezies überprüft, indem sechs Isolate von *T. terreum* aus verschiedenen Herkunftsbereichen untersucht wurden. Die analysierten Fruchtkörper wurden aus verschiedenen Regionen gesammelt (*T. terreum* 2-6), oder als Myzelien von Kultursammlungen bezogen (*T. terreum* 1). Die Sequenzen der ITS-Produkte wurden zunächst einem Alignment unterzogen (Abb. 6). Das Alignment zeigte hohe Sequenzidentitäten innerhalb der 5.8S rRNA mit Ausnahme von 2 variablen Stellen am 3'-Ende der rRNA-Sequenz. Der Vergleich von jeweils zwei Stämmen zeigte 2 bis 32 Divergenzen in den insgesamt 604 Nukleotiden, so daß prozentuale Unterschiede von 0,3 - 5,3 % innerhalb des ITS1-5.8S rRNA-

	1	11	21	31	41	51	61
<i>T. terreum</i> ³	AACCTGTCTG	GGTTGTTGCT	GGCTCTCAGG	AGCATGTGCA	CGCCTAACAC	CAAACITTTT-	-TTACCACCT
<i>T. terreum</i> ⁴
<i>T. terreum</i> ¹T	T.....
<i>T. terreum</i> ²
<i>T. terreum</i> ⁵A..
<i>T. terreum</i> ⁶A.....
	71	81	91	101	111	121	131
<i>T. terreum</i> ³	GTGCACCTTC	TGTAGACCTG	AATAAACTCT	CGAGGAAACT	CGGTTTGAGG	ACTGCTGTGC	CGCAAAGCCA
<i>T. terreum</i> ⁴
<i>T. terreum</i> ¹T..
<i>T. terreum</i> ²-
<i>T. terreum</i> ⁵-T.A.T.
<i>T. terreum</i> ⁶
	141	151	161	171	181	191	201
<i>T. terreum</i> ³	GCTTTCCTTG	GACCTCCGGT	CTATGCTTAT	ATACACCCCT	ATAGTATGTC	TCAGAAGTTT	GTGTTGGCT
<i>T. terreum</i> ⁴
<i>T. terreum</i> ¹T..
<i>T. terreum</i> ²T..
<i>T. terreum</i> ⁵T..
<i>T. terreum</i> ⁶T..
	211	221	231	241	251	261	271
<i>T. terreum</i> ³	TTGAATCCTT	TAAAACTTTA	<u>AATACA</u> ACTT	<u>TCAACA</u> ACGG	<u>ATCTCT</u> TGGC	<u>TCTCGC</u> ATCG	<u>ATGAAGA</u> ACG
<i>T. terreum</i> ⁴
<i>T. terreum</i> ¹
<i>T. terreum</i> ²
<i>T. terreum</i> ⁵
<i>T. terreum</i> ⁶
	281	291	301	311	321	331	341
<i>T. terreum</i> ³	<u>CAGCGAA</u> ATG	<u>CGATAA</u> GTAA	<u>TGTGAAT</u> TGC	<u>AGAATTC</u> AGT	<u>GAATCAT</u> CGA	<u>ATCTTTG</u> AAC	<u>GCACCTT</u> GCG
<i>T. terreum</i> ⁴
<i>T. terreum</i> ¹
<i>T. terreum</i> ²
<i>T. terreum</i> ⁵
<i>T. terreum</i> ⁶
	351	361	371	381	391	401	411
<i>T. terreum</i> ³	<u>CTCCTTG</u> GTA	<u>TTCCGAG</u> GAG	<u>CATGCCT</u> -GT	<u>TTGAGTG</u> TCA	<u>TGAAATT</u> TCTC	AACCTTTTCA	GCTTTTTCTG
<i>T. terreum</i> ⁴-
<i>T. terreum</i> ¹-	G.....
<i>T. terreum</i> ²T..
<i>T. terreum</i> ⁵-
<i>T. terreum</i> ⁶-
	421	431	441	451	461	471	481
<i>T. terreum</i> ³	TTGATCAGGC	TTGGATGTGG	GAGTATG-CG	GGCTTCTCAT	CTCAGAGGTC	GG-CTCTCCT	GAAATGCATT
<i>T. terreum</i> ⁴-	-.....
<i>T. terreum</i> ¹-	G.....G..G..
<i>T. terreum</i> ²G..CTCTC..
<i>T. terreum</i> ⁵-	-.....
<i>T. terreum</i> ⁶-	-.....
	491	501	511	521	531	541	551
<i>T. terreum</i> ³	AGCGGG-ACA	-TTTGTGCC	TGGCTTTGGT	GTGATAAATT	ATTCTATGCC	CATCGTGAAA	GAGCAGCTTT
<i>T. terreum</i> ⁴-	-.....
<i>T. terreum</i> ¹G..C	-.....T	G.....	C..T.....G..
<i>T. terreum</i> ²G..C	C.....GTG.T..	-A.T.....G..
<i>T. terreum</i> ⁵-	-.....G..
<i>T. terreum</i> ⁶-.-T	G.....G..
	561	571	581	591	601		
<i>T. terreum</i> ³	ATAAATGGGG	TTCAGCTTCT	AAAATGGGTC	CCCCTCCTC	AATT		
<i>T. terreum</i> ⁴		
<i>T. terreum</i> ¹		
<i>T. terreum</i> ²		
<i>T. terreum</i> ⁵	G.....-...TCT	..TTTG..		
<i>T. terreum</i> ⁶		

Abb. 6: Alignment von ITS1, 5.8S rRNA und ITS2 von sechs *T. terreum*-Isolaten. Die 5.8S rRNA Sequenz ist unterstrichen.

ITS2 -Bereichs der Stämme von *T. terreum* auftraten (Tab. 4). Es konnte damit gezeigt werden, daß alle Stämme zu einer Art gehören, obwohl sie entweder von Kultursammlungen stammten, oder aus Fruchtkörpern isoliert worden waren, die in unterschiedlichen Regionen Österreichs oder Deutschlands gesammelt wurden. Diese geringe Divergenz zeigte sich auch bei zwei *T. terreum*-Isolaten, die mit Kiefer und Lärche assoziiert gefunden wurden (*T. terreum* 4/Lärche und *T. terreum* 3/Kiefer).

Aufgrund der bestehenden Homogenität aller Isolate erfolgte die Auswahl eines *T. terreum*-Stammes, um erste Kulturversuche zur Kultivierung der Ektomykorrhiza unter axenischen Bedingungen durchführen zu können. Dafür wurde *T. terreum* 3 ausgewählt, der aus frischen Fruchtkörpermaterial isoliert wurde und als vegetatives Myzel vorlag.

Tabelle 4: Vergleichsmatrix von sechs *Tricholoma terreum*-Isolaten (Abb. 6). Insgesamte vorgegebene Differenz in % (links), sowie Abweichungen der Nukleotidsequenzen (rechts).

	<i>T. terreum</i> ³	<i>T. terreum</i> ⁴	<i>T. terreum</i> ¹	<i>T. terreum</i> ²	<i>T. terreum</i> ⁵	<i>T. terreum</i> ⁶
<i>T. terreum</i> ³	–	2	16	16	14	9
<i>T. terreum</i> ⁴	0,3%	–	14	23	12	6
<i>T. terreum</i> ¹	2,6%	2,3%	–	26	22	13
<i>T. terreum</i> ²	2,6%	3,8%	4,3%	–	32	22
<i>T. terreum</i> ⁵	2,3%	2%	3,6%	5,3%	–	15
<i>T. terreum</i> ⁶	1,5%	1%	2,1%	3,6%	2,5%	–

1.4 Phylogenetische Analyse von ITS1, der 5.8S rRNA und ITS2

Das Alignment sechs verschiedener ITS-Fragmente von *T. terreum* veranschaulichte die bestehende enge Verwandtschaft innerhalb dieser Spezies aus *Tricholoma*. Um aber einen Überblick der Verwandtschaftsbeziehungen mehrerer Spezies von *Tricholoma* zu erhalten, wurden noch weitere ITS-Sequenzen aus 13 Spezies einem Homologievergleich unterzogen. *S. commune* und *Cortinarius* wurden in diese Homologieanalyse als divergent verwandte Basidiomyceten mit einbezogen. Es zeigte sich, wie erwartet, daß die Variabilität der ITS1- und ITS2- Bereiche innerhalb der verschiedenen Spezies deutlich zunimmt, die Homologie aber innerhalb der 5.8S rRNA (Abb. 7) erhalten bleibt.

	20	40	60	80	100
1	-----AACCTGAT-GGA	-T--TG-TTGC--TGGC-TC	T--CAGGA--GCATG-TG-	CACGCC---TAACAC---AA	ACTT-TTT-----ACCACC-
2	-----AACCTTCT-GGG	-T--TG-TTGC--TGGC-TC	T--CAGGA--GCATG-TG-	CACGCC---TAACAC---CAA	ACTT-TTT-----ACCACC-
3	-----AACCTTCT-GGG	-T--TG-TTGC--TGGC-TC	T--CAGGA--GCATG-TG-	CACGCC---TAACAC---CAA	ACTT-TTT-----ACCACC-
4	-----AACCTGAT-GGG	-T--TG-TTGC--TGGC-TC	T--CAGGA--GCATG-TG-	CACGCC---TAACAC---CAA	ACTT-TTT-----ACCACC-
5	-----AACCTGAT-GGG	-T--TG-TTGC--TGGC-TC	T--CAGGA--GCATG-TG-	CACGCC---TAACAC---CAA	ACTT-TTT-----ACCACC-
6	-----AACCTGAT-GGG	-T--TGGTTGC--TGGC-TC	T--CAGGA--GCATG-TG-	CACGCC---TAACAC---CAA	ACTT-TTT-----ACCACC-
7	-----TAAACCTGAT-GGG	-T--TG-TTGT-TGGG-TC	T--CCGGG--GTATG-TG-	TACACC---TGACAA--CTA	TCTT-TTTT-----ACCACC-
8	-----AACCTGT-----	-----GGC-TC	T--CCGGG--GCTTG-TG-	CTCTCC---TGTCAC--CAT	TCTT-TTT-----CCTCC-
9	-----AACCTGAT-GGG	----TTGTTGC--TGGC-TT	T--TCGGA--GCATG-TG-	CACGCC---TAATAC--TTA	CCTT-TTT-----ACCACC-
10	-----ACCTGAT-GGG	GTGATG-TTGC--TGGC-TC	T--TCGGA--GCATG-TG-	CACGC---TCACACC---G	ACTT-TTT-----ACCACC-
11	-----AACCTGAT-GGC	---TTG-TTGTACCGC-TC	---TCGG--GCATG-CG-	CA--CC--TTCACA--TGA	TCTC-TTT-----ACCACC-
12	-----AACCTGAT-GGG	---TTG-TTGT-TGG--TC	G--TCGGA--GCATG-TG-	GATGAC---TAACAC---CAA	TCTT-TTT-----ACCACG-
13	-----AACCTGAT-GGG	---TTG-TTGCAGTGG--TC	G--TCGGA--TCATG-TG-	GATGAC---TAACAC---CAA	TCTT-TTT-----ACCACG-
14	-----AACCTGGG-CAA	G--GTGGAGG--GGCC-TC	GG-CGCTG--GCATG-TG-	CACACC---TGACAC---CAA	-CTT-TTCTT---ACCACC-
15	-----AACCTGAG-TGG	---TTG-TAGC--TGGC-TC	T--CGAGA--GCATG-TA-	CACGCC---AGACAC---CAA	-CTT-TTCTT---ACAACC-
16	TTGAATAAAGCTTGGTTAGG	---TTG-TCGC--TGGC-TC	TC-CG-GG--GCATG-TG-	CACGCC---TGACGC---CAA	TCTT-TTC-----ACCACC-
17	-----AACCT-AT-G--	---TTG-TTGGG-CGGC-TG	G---CGGA--GCCGA-G-	CGCCGC---CCAACACG-CTG	GCTC-TT-----CCGACA-
18	-----AAACCT-AT-GGG	---TTG-TTGC--GGCC-TG	G---CGGAG--GCATG-TG-	CACGCC---TAACAC---TAA	ACTT-TT-----ACCACC-
19	-----AAACCTGAT-GAG	---TTG-TTGC--TGGC-TC	T--TCGGA--GTATG-TA-	GCGGCC---TAACA--TTG	CCTT-TT-----ACCACC-
20	-----AACCTGA--GG-	---G--GCATGTGC-AC	G--CC-----CTA-C-	CAGG---TAACACC---A	TCTTCTT-----ACCACC
21	-----AAACCTGAT-GAG	---GGCTTG----TGC-AC	G--CG-----TG-G-	CCTAA---TATCATGCC--	-CTTA-----ACCACCC
22	-----AACCT-AT--GT	---TGTGGC--GGCC-TG	G---CGGA--GCATG-TG-	CA---C-----ACTC-----	-CTT-TT-----ACC-CCC
23	-----TAAACCTGTAGTGG	---TTG-TAGC--TGGC-TC	TCTCGAGA--GCATG-TG-	CACACC---CCGCCAT--CTT	TCTTCTTT-----CCACC-
24	-----AACCTGAT-GGG	T--ATG-TTGC--TGCC-TC	T--TCGGA--GCATG-TG-	CACGCC---TAACAC---CAA	CCTT-TT-----ACCACC-
25	-----TAAACCTGAT-GG-	---TTG-TTGC--TGGC-TC	TCCTAGGGA--GCATG-TG-	CACACT--TTGTCA-----	TCTTAT-----ACCT---
26	-----TAAACCTGAT-GGG	---TTG-TTGC--TGGC-TC	--CTAGGGA--GCATGGT-	CACACTT--GTCA-----	TCTTTGTATCT---TCACC-
27	---AATAAACCTGATGGAG	---TTG-TAGC--TGGC-CT	T--CC-GAG--GCATG-TG-	CACGCTC-TGCTCATC-CAC	TCTA-----CC-CC-
28	---AATAAACCTGATGCGG	---TTG-TTGC--TGGCCTC	T--C-GAGCGCATG-TA-	TACGCTCT--CTCAT--CCA	-CT--TT-----CCA---
29	---ATAAACCTGA-----G	---TTG-TAGC--TGGCCTT	---CC-GAG--GCATG-TA-	TAC-CC-----CATCCGTG	TCTA-TATA-----CTCTT

	120	140	160	180	200
1	-----TG-TGCACC	--TTCTGT-AGACC-TGG-A	TAAA----CT-CT---CGA	GG--AAA---CT-CGGTTT-	-G-AGG-A----CT-GCTGT
2	-----TG-TGCACC	--TTCTGT-AGACC-TGG-A	TAAA----CT-CT---CGA	GG--AAA---CT-CGGTTT-	-G-AGG-A----CT-GCTGT
3	-----TG-TGCACC	--TTCTGT-AGACC-TGG-A	TAAA----CT-CT---CGA	GG--AAA---CT-CGGTTT-	-G-AGG-A----CT-GCTGT
4	-----TG-TGCACC	--TTCTGT-AGACC-TGG-A	TAAA----CT-CT---CGA	GG--AAA---CT-CGGTTT-	-G-AGG-A----CT-GCTGT
5	-----TG-TGCACC	--TTCTGT-AGACC-TGG-A	TAAA----CT-CT---CGA	GG--AAA---CT-CGGTTT-	-G-AGG-A----CT-GCTGT
6	-----TG-TGCACC	--TTCTGT-AGACC-TGG-A	TATA----CT-CT---CGA	GG--AAA---CT-CGGTTT-	-G-AGG-A----CT-GCTG-
7	-----TG-TGCACC	--TTTTGT-AGACC-TGG-A	TAAA----CT-CT---CGA	GG--AAA---CT-CGGTTT-	-G-AGGGA----CT-GCTGT
8	-----TG-TGCACC	--TTTTGT-AGACC-TGG-A	TAAA----CT-CT---CGA	GG--AAA---CT-CGGTTT-	-G-AGGGA----CT-GCTGT
9	-----TG-TGCACC	--TTTTGT-AGACC-TGG-A	TAT-----CT-CT---CGA	GG--AAA---CT-CGGTAT-	-G-AGG-A----CT-GCTGT
10	-----TG-TGCACC	--TTTTGT-AGACC-TGG-A	TAT-----CT-CT---CGA	GG--AAA---CT-CGGTAT-	-G-AGG-A----CT-GCTGT
11	-----TG-TGCACC	--TTTTGT-AGACC-TGG-A	TAT-----CT-CT---CGC	GG--AAA---CTCGGGATT-	-G-AGG-G----CC-GCCGC
12	-----TG-TGCACC	--TTTTGT-AGACC-TGG-A	TAT-----CT-CT---CGA	GG--AAA---GTGGGAAT-	-G-AGG-G----GT-GCTGT
13	-----TG-TGCACC	--TTTTGT-AGACC-TGG-A	TAT-----CT-CT---CGA	GG--AAA---TTGGGAAT-	-G-AGG-G----GT-GCTGT
14	-----TG-TGCACT	--TTTTGT-AGACT-TTG-G	AATA---CCT-CT---CGA	GG--AAA---CTCGGTTT-	-G-AGGA----CT-GCTGT
15	-----AG-TGCACT	--TTTTGT-AGACT-TGG-G	AATTTACCCT-CA---CGA	GG--AAA---CT-CGGTTT-	-G-AGGA----T-ACTGT
16	-----TG-TGCACA	--TTTTGT-AGGCT-TGG-A	TAAATA-TGT-CT---CGA	GG--AAG---CT-CGGTTT-	-G-AGGA----CT-GCCGT
17	-----TG--GCG--	-----AGACA-GCA-A	CAG-----CA---CGG	GG--AA-----CGGTGA-	-----AGGGCG--C--GCTGT
18	-----CG-GGCACC	T-TCTTGG-AGACC-TTG-G	GAT-----CT-CA-----	GG--AAATACCT-CGGTTT-	-G-AGGAC---AC--GTCGT
19	-----TG-TGCACC	G-TTTTGT-AGACC-TGG-A	TAT-----CT-CT---C--	-G--AAATAACT-CGGTAT-	-G-AGGAC----T-GCTGT
20	TT----CTT--TG-TGCCCC	--TTTTGTAAGACT-TGG-A	TA-----TCTCCT---CCGA	-G--AAA---CTCCGGTAAG	TG-AGGA----CT-GCTGT
21	TT-----CTTGCTGCCCC	CCTTTTGAAGACC-CGG-A	TAA----ATCTCCT---CCG-	GG--AAA---CT-CGGGGAA	GT-AAGAA---CG-GCTGT
22	TG-----TGCCCC	CCTTTTGAAGACCCCTCGG-A	TA-----TCCCC---CGGA	GG--AAA---CC-CGGTAT-	-G-AGGGACT-TCT-GGGGC
23	-----TG-TGCACT	--TCTTGT-AGACTTTGGGA	TTTGAACACTTAT---CCGG	GG--CAA---CT-CGGTCGG	-G-AGGAG---CT-GCTGT
24	-----TG-T-CACC	--TTTTGT-AGACC-TGG-A	TAT-----CT-CT---CGA	GG--AAA---CTTCGGTAT-	-G-AAG-A----CT-GCTGT
25	-----TCACATG-TGCACC	--TCTTGT-AGACT-TTGA-	TAT---CITTCT---GGA	TG--TAA---TTCACGTTTT	TG-AG-----GAT-T
26	-----TG-TGCATC	--TTTTGT-AGACCTTGG-G	TAT---CTCT-CT---GA	TTGCTTAGCACTCAGGATT-	-G-AG-----GAT-T
27	-----TG-TGCACT	--TACTGT---AGGTTGG--	-----CTCT---CGT	GGG-----CTCCTAACG	GG-AG-----GAT-T
28	-----TGTTG--	-----GT--GCGCTTT--	-----CTCT---CGT	GGT-AGA---GT-CTTCATG	GGCAG-----GAT-T
29	GT-----TG-C---	---TTTGGCAGGC-----	-----CTCT---CGT	GG--T-----CTTC-CACT-	-GTGGG-----GAT-T

Abb. 7.1

	220	240	260	280	300
1	GC-GCAAAG---CCAGC--T	TTCCTTG--TACT-T--CCG	---GTC-TATGTT--TATAT	A-----CACCC-CTATA--	GTA-----TGT-CTCAGAA-
2	GCCGCAAAG---CCAGC--T	TTCCTTG--GACT-T--CCG	---GTC-TATGCT--TATAT	A-----CACCC-CTATA--	GTA-----TGT-CTCAGAA-
3	GCCGCAAAG---CCAGC--T	TTCCTTG--GACC-T--CCG	---GTC-TATGCT--TATAT	A-----CACCC-CTATA--	GTA-----TGT-CTCAGAA-
4	GC-GCAAAG---CCAGC--T	TTCCTTG--TACC-T--CCG	---GTC-TATGTT--TATAT	A-----CACCC-CTATA--	GTA-----TGT-CTCAGAA-
5	GC-GCAAAG---CCAGC--T	TTCCTTG--TACT-T--CCG	---GTC-TATGTT--TATAT	A-----CACCC-CTATA--	GTA-----TGT-CTCAGAA-
6	GC-GCATAA---CTAGC--T	TTCCTTG--TACT-T--CCG	---GTC-TATGTT--TATAT	A-----CACCC-CTATA--	GTA-----TGT-CTCAGAA-
7	GCGTAAAAG---CCAGC--T	TTCCTTG--TAATCT--CCG	---GTC-TATGTT--TTTAT	ATGTAT-ACCCC-CTATA--	GTA-----TGT-CTAAGAA-
8	GCGTAAAAG---CCAGC--T	TTCCTTG--TAATCT--CTG	---GTC-TATGTT--TTTAT	ATGTAT-ACCCC-CTATA--	GTA-----TGT-CTAAGAA-
9	GCGTCAA-G---CCGGC--T	TTCCTTA--CATT-T--CCG	---CGCATGTTTT--TATAT	A-----TACCC-CTTCA--	GTA-----TGT-CTATGAA-
10	GCGTCAAAG---CCGGC--T	TTCCTTA--CATT-T--CCG	---GGC-TATGTC--TTTAT	A-----TACAC-CATTA--	GTA-----TGT-CTATGAA-
11	GCGTCAAAG---CCGGC--T	TTTCTTA--CATT-T--CCG	---GTC-TATGTC--TTTAT	A-----TACAC-CATTA--	GTA-----TGT-CTA-GTA-
12	GCGGAAAAG---CGCGG--GT	TTCCTA--CATT-G--CCG	---GTC-TATGTC--TTTAT	A-----TACAC-CATTA--	GTA-----TGT-CTATGAA-
13	GCGGAAAAG---CGCGG--GT	TTCCTA--CATT-G--CCG	---GTC-TATGTC--TTTAT	A-----TACAC-CATTA--	GTA-----TGT-CTATGAA-
14	GC-GCAA-----CCGGC--T	TTCCTTA--CATTTT--CCG	---GTC-TATGTT--TTTCT	AT-----ATACC-CTATA--	GTA-----TGT-CACAGAA-
15	GC-GCAA-G---CTGGC--T	TTCCTTG--CAAT-TC-CCA	---GTC-AATGTT--TTA--	AT-----AACCC-CTATA--	GTAATG--TTT-AACAGAA-
16	GCTGCAAAG---CCAGC--T	TTCCTTG--TATTTT--CCA	---GCC-TATGCA--TTT-T	ATT-----ATACA-CTC-G--	GTA-----TGT-CATGGAA-
17	GCGTTAAAAG---CCGGC--T	TTCCTTA--CATT-T--CCG	---GGC-TAGTGC--TTTAT	AT-----TACAC-CATTT--	GTA-----TGT-CTAGGAA-
18	GCGCGAA-G---CCGGC--T	TTCCTTG--CACTTT--CCA	---GTC-TATGTG--TTTAT	A-----TACAC-CTTCA--	GTA-----TGT-CTCAGAA-
19	GCGTCAA-G---CCAGC--T	TTCCTTG--CACTTT--CCG	---GTT-TATGTG--TTTAT	A-----TACAC-CTTCA--	GTA-----TGT-CTATGAA-
20	GCGGIAAAG---CCG--CGT	TTCCTTA--CATT-T--CC-	---GGTC-TATGTC--TTTAT	A-----TACAC-CATTT--	GCA-----TGT-CTACGAA-
21	GCGGIAAAG---CCG--CGT	TTCCTTA--CATT-T--CC-	---GGCCATGTC--TTTAT	A-----TACAC-CTATCC-	GCA-----TGT-CTAGGAA-
22	GCGGGCAGG---CCAGCCTT	TTTCTTA--CATTTT--CCG	---GGCCTAAGTTG--TTTAT	AA-----TACCC-CITTCAA	GTA-----TGTCTTGGAA-
23	A--GCAAT-----ACGGC--T	CTCCTTGACAAGTCTT--CAA	A--GTC-TATGTT--TTTC-	AT-----ATACCC-CAT-A--	GTA-----TGT-AACAGAA-
24	GCGTCAA-G---CCAGC--T	TTTCTTA--CATT-T--CCG	---GTC-TATGTT--TTTAT	A-----TACCC-CTTCA--	GTA-----TGT-CTATGAA-
25	TGTTTGTGTTG---TGGGCT	CTCCTTA--CATT-T--CCA	A-----ATGTTTCTTCAT	-----ATACAC-TTAT---	GT-----T-ATA-GAA-
26	GACTTTATGT--C-----T	CTTCTTA--CATT-T--CCA	G--GTC-TATGTTTCTTTAT	-----ATACCC-TGAT---	GTA-----TGT-TTATAGAA-
27	-----C	ATTCTG-----CC-	---GGCCTATGTA--TAC-T	AC-----AAACA-CTTTA--	AA-----GT-ATCAGAA-
28	-----	CTTCTAG-----CC-	---GTC-----TACCT-	C-----ACAC-CTT----	GTAT-----GT-TAACGAA-
29	-----	CTCTCTG-----CT-	---G-C-----ATGTGCCTGCC-	AG-----AGGA-CCAAAC-	T-----CTGAA-

	320	340	360	380	400
1	TGTTTGTGTTG---TGGGCT	TTG-AATGCCTT--TAAAAC	--TTTA-AAT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
2	TGTTTGTGTTG---TGGGCT	TTG-AATGCCTT--TAAAAC	--TTTA-AAT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
3	TGTTTGTGTTG---TGGGCT	TTG-AATGCCTT--TAAAAC	--TTTA-AAT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
4	TGTTTGTGTTG---TGGGCT	TTG-AATGCCTT--TAAAAC	--TTTA-AAT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
5	TGTTTGTGTTG---TGGGCT	TTG-AATGCCTT--TAAAAC	--TTTA-AAT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
6	TGTTTGTGTTG---TGGGCT	TTG-AATGCCTT--TAAAAC	--TTTA-AAT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
7	TGTTTGTGTTG---TGGGCT	TC--AATGCCTT--CAAAC	--TT--AAT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
8	TGTTTGTGTTG---TGGGCT	TC--AATGCCTT--CAAAC	--TT--AAT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
9	TGTTA-TTAT---TGGGCT	TA--ACTGTCCT--ATAAAC	C-TT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
10	TGTTA-TTAT---CGGACT	TG--ACTGTCCA--ATAAAC	C-TT---AT GCAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
11	TG-TTCTCAT---CGGACT	TG--AATGTCCA--ATAAAC	C-TT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
12	TG-TTATTAT---CGGAT	TTG--ACTGTCCA--ATAAAC	CCTT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGG-T	CTCGCATCGATGAAGAACGC
13	TG-TTATTAT---CGGAT	TTG--ACTGTCCA--ATAAAC	CCTT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGG-T	CTCGCATCGATGAAGAACGC
14	TG-TCATTTTAA--TGGGCT	TA--ATTG-CCT--TTAAAC	C-T-----AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
15	TG-GCATTTTAACTGGGCT	TA--AG-G-CCT--TTAAAC	C-T-----AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
16	TGTTATTG---TTGGCT	TA--ATTG-CCA--GTA AAC	C-TT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
17	TGTTATTAT---AGACT	TTG-TC---CAA--ATAAAC	C-TT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
18	TGTCGTGTTG---TGGGCA	TA--ACTGCCTT--TAATTC	--TT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
19	TGT-TATTAT---TGGGCT	TA--ACTGTCTT--ATAAAC	--TT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CCCGAA--CGTTGAAGAACGC
20	TGT-TATTATC---GGA-C	TTG--ACTGTCCA--ATAAAC	C-TT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
21	TGAGTATTATTT---GGA-C	TTG--AACGTCCC--ATAAAC	C-TT---AT ACAAA CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
22	TGTTTATTATTT---GGGCT	TA--ACTGTCTT--AAAAAC	--TT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
23	TGTATACAAA---TGAGCC	TT--AGTG-CTT--ATAAAA	C-TT---AT ACAA --CTTT	CAACAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
24	TG-TTATTAT---TGGGCT	TA--ACTGTCTT--ATAAAC	--TT---AA ACCA --CTTT	CCACAACGGATCTCTTGGCT	CCCACCTCATTGAAGAACGC
25	TG-TAATAAAA---TAGCCT	TT--TTTGCCTT--ACAAAA	ACCT---AT ACAA --CTTT	CAGCAACGGATCTCTTAGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
26	TGCAATTAAT---GGGCT	TTG-T--GCCT--ATAAAT	C-T-----AT ACAA --CTTT	CAGCAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
27	TG--TATTG---CG	TCT--AACGCA-TCTATA---	-----AT ACAA --CTTT	TAGCAACGGATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
28	TG-TAATCA---TGGCCT	TG--ACAGACCC---TA---	-----GT ACAA --CTT-	-CGC---GATCTCTTGGCT	CTCGCATCGATGAAGAACGC
29	TTTTAGTAATGT---CT	GAGTACTATATA--ATAA--	-----AC AAAA --CTTG	TTTTAATGGATCTCTTGGTT	CTCGCATCGATGAAGAACGC

Abb. 7.2

	420	440	460	480	500
1	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
2	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
3	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
4	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
5	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
6	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
7	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
8	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
9	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
10	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
11	AGCG-AAATCCGATAAGTAA	TGTC-AATTGCAGAATTTAG	TGAATCGCCTGCTCCTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	TGTGTTCCGAGGA-CATGCC
12	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
13	-GCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
14	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
15	AGCG-TAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGGGCGCATGCC
16	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
17	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
18	AGCG-GAATGCGGTAAGTAA	TGTGGAATTGCAGAATTCAG	TGGATCATCGAATCTTTGGA	ACGCGACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
19	AGCG-GAATGCGGTAAGTAA	TGTGGAATTGCAGAATTCAG	TGGATCATCGGATCTTTGGA	ACGCGACCTTGCGCCTCCTT-	GGAAATCCGAGGAGCATGCC
20	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGCGACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
21	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGCGACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCAAGCC
22	AGCGAAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGCGACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGGGCATGCC
23	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
24	AGCG-TAATCCGTTAAGAAT	GGT---ATTGCTGAATCCG	TGAATCCTCGAATCTTTG-A	ACGC-GCCTTGCGCCTCCTT-	GGGATTCGAAGGAGCATGCC
25	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCACCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGTATGCC
26	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAAGAGCATGCC
27	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACCTTGCGCCTCCTT-	GGTATTCCGAGGAGCATGCC
28	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-T	ACGC-ACCTTGCGCCCTTT	GGTATTCCGAGGGGCATGCC
29	AGCG-AAATGCGATAAGTAA	TGTG-AATTGCAGAATTCAG	TGAATCATCGAATCTTTG-A	ACGC-ACATTGCAC-CCGGT	GGTATTCCGCCGGGTATGCC

	520	540	560	580	600
1	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCAGCTTT---TTCT-----	-G----TTGATC-AG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTA-TG-
2	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCAGCTTT---TTCT-----	-G----TTGATC-AG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTA-TG-
3	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCAGCTTT---TTCT-----	-G----TTGATC-AG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTA-TG-
4	T-GTGTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCAGCTTT---TTCT-----	-G----TTGATC-AG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTA-TG-
5	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCAGCTTT---TTCT-----	-G----TTGATC-AG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTA-TG-
6	TTGTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCAGCTTT---TTCT-----	-G----TTGATC-AG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTA-TGG
7	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCAGCTTTG---TTC-----	-G----TTGATC-AG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTA-TG-
8	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCAGCTTTG---TTC-----	-G----TTGATC-AG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTA-TG-
9	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCGGCTTT---TTCT-----	AG---CTGATTTAG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTT-TG-
10	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCGACTTT---TTCT-----	AG---TCGA-CTAG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTT-TG-
11	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ACTC--ACAGCC----TTT	TCGGCTTT---TCTT---A	AG---TCGA-CTAG--GCT	TGGT--TCTGGGAGTT-TG-
12	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCGAATTT---TTCT-----	AG---TCGAAT-AG--GGT	TGGA--TGTGGGAGAT-TG-
13	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCGGCTTG---TTCT---A	AG---TCGATA-AG--GGT	TGGA--TGTGGGAGTT-TG-
14	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTA	TCAGCTTT---TATT----	-GG---CTGATTA-G--GCT	TGGA--TGTGGGAGTT-TTG
15	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAT	--TTC--TCAACC----TTA	TCAGCTTT---ATT-----	TG---TTGATTA-G--GCT	TGGACTTTTGGGGGTT-TTG
16	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCAGCTTT---T-----	TG---TTGAATA-G--GCT	TGGA--TTTTGGGAGTTGTTG
17	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TTGGCTTT---TTCTTA--A	AG---TTGATT-AG--GCT	TGGA--TGTGGGGGTT-TG-
18	T-GTTTGATGTGTCA-TTAA	-ATTC--TCAACCA----TTT	TCATCTT---TTAT-----	TGG---TTGAATTAG--G-T	TGGA--TGTGGGAGTT-TG-
19	T-GTTTGATGTGGCA-TGAA	-ATTC--TCAACCA----CTT	TCAGGCTT---TTCT-----	AG---CTGATTTAG--G-T	TGGA--TGTGGGAGTT-TG-
20	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCGGCTTT---TCCT---A	AG---TTGATC-AG--GCT	-GGA--TGTGGGAGTT-TG-
21	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----TTT	TCAGCTTT---TTCT-----	-AA---CTGGATT-AG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTT-TG-
22	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCAACC----ATT	TCAGCTTT---TTCT-----	AG---CTGATTTAG--GCT	TGGA--TGTGGGAGTT-TG-
23	T-GTTTGA-GTGTCA-TTAA	-ATTC--TCAACC----TTA	TTAGCTTT-----	TG---CTGATAATG--GCT	TGGATTTGGGGGCTTTTG-
24	T-GTTTGA-GTGTCA-TGAA	-ATTC--TCGACC----ATT	TCAGCTTT---TTCA-----	AG---CAGATTTAG--G-	TGGA--TGTGGGAGTT-TG-
25	T-GTTTGA-GTGTCA-TTAA	TAT-A--TCAACCT---CTT	CAAGCTTT---TGCT-----	TG---TCGAGT---GTT	TGGA--TTTGGG-GTTGTGC
26	T-GTTTGA-GTGTCA-TTAA	TATTA--TCAACC----TGT	T-----	-----TG--G-T	TGGA--TGTGGG--TT-TG-
27	T-GTTTGA-GTGTCA-TGGA	-ATTC--TCAAC----TTA	TAAA--TC-C--TTGT-----	-G---ATCTATA-AG--CT	TGGA--CTTGGAGG-CTTG-
28	T-GTTTGA-GTGTCA-TTAA	-ATACCATCAACCCT-TTT	TGTACTTCGG--TCTC----	-G----T-GA---GTGGCT	TGGA--AGTGGAGGCTTG-
29	T-GTTTGA-GTGTCA-TGTA	GAA----CAACAAA--TTA	CCAGGTCT---TGG-----	-G---TTTCGACCAG--GCT	TGAT--TCTGGG---TTG-

Abb. 7.3

	620	640	660	680	700
1	-C-GG-GCTT-CTCAT--CT	CAGAG----GT--CG---G-	CTCTCC-TGAAATG--CATT	A-----GCGGG--ACC--TT	TGTT-----GC--TG--GGC
2	-C-GG-GCTT-CTCAT--CT	CAGAG----GT--CG---G-	CTCTCC-TGAAATG--CATT	A-----GCGGG--ACA--TT	TGTT-----GC-CT---GGC
3	-C-GG-GCTT-CTCAT--CT	CAGAG----GT--CG---G-	CTCTCC-TGAAATG--CATT	A-----GCGGG--ACA--TT	TGTT-----GC-CT---GGC
4	-C-GG-GGTT-CTCAT--CT	CAGAG----GG--CG---GG	CTCTCC-TGAAATG--CATT	A-----GCGGGG--ACC--TT	TGTT-----GC--TG--GGC
5	-C-GG-GCTT-CTCAT--CT	CAGAG----GT--CG---G-	CTCTCC-TGAAATG--CATT	A-----GCGGG--ACC--TT	TGTT-----GC-CT---GGC
6	-C-GG-GCTT-CTCAT--CT	CAGAG----GT--CG---G-	CTCTCC-TGAAATG--CATT	A-----GCGGGG--ACCC--TT	TGTT-----GC-CT---GGC
7	-C-GG-GCTT-CTCA-----	--GAA----GT--CG---G-	CTCTCC-TTAAATG--CATT	A-----GCAGG--ACCC--TT	TGTTT-----GC-CT---GGC
8	-C-GG-GCTT-CTCA-----	--GAA----GT--CG---G-	CTCTCC-TTAAATG--CATT	A-----GCAGG--ACCC--TT	TGTT-----GC-CT---GGC
9	-C-GG-GCTT-CT-----	CTGAA----GT--CG---G-	CCCTCC-TTAAATG--CATT	A-----GTAGG--ACC--TC	TGTT-----GC-CTC--AGC
10	-C-GG-GCTT-CT-----T	CCGAA----GT--CG---G-	CTCTCC-TTAAATTTTATT	A-----GTAGGG--ACC--TC	TGTTT-----GC-CTT--AGC
11	-C-GG-GCCT-CT-----T	CCGAA----GT--CG---G-	CCCTGC-TTAAATTTGGTGT	G-----ATAGGG--ACTA--CT	TTTT-----GC-CTTA--GCC
12	--GG-----TT-----T	CCGAA----GT--CG---G-	GTCTCC-TTAAATG--TATT	A-----GTAGGG--ACC--TC	TGTGT-----GCGCTT--AGT
13	--GG-----CT-----T	CCGAA----GT--CG---G-	CTCTCC-TTAAATG--TATT	A-----GCAGGG--ACC--TT	TGTGT-----GCGCTT--AGC
14	-C-GG-GCTT--TTA-----	--AGAA----GT--CG---G-	CTCTCC-TTAAATG--CATT	A-----GCGGG--ACCT--TT	TGGTT-----GC-CTC--AGC
15	-C-GG-GCTT--TTC-----	CAAAA----GT--CG---G-	CTCTCCTTAAATG--TATT	A-----GCGGG--CCT--TT	TGGTGT-----GCGCCC--CGC
16	-C-AG-GCTG-CTC-----	--AGAA----GT--CT---G-	CTCTCC-TTAAATG--TATT	A-----GCGGGG--CCC--T	TGTTGT-----CT---AGC
17	-C-GG-GCTT--TG-----T	CTGAA----GT--CG---G-	CTCTCC-CTAAATG--CACT	A-----GTAGGG--ACC--TT	TGTT-----GC-CTT--AGC
18	-C-TG-GCTT-CT-----T	GAGAG----GT--CG---G-	CTCTCC-TTAAATG--AT	A-----GTAGGG--CC--TC	TGTTG-----CGC-CTGCTTTG
19	-C-TG-GCTC-CTC-----T	GTAAG----GT--CG---G-	CTCTTC-TTAAATAT--AT	A-----GTAGGG--CC--TC	TGTTG-----C-CTC--AGC
20	-C-GG-GCTT-CT-----T	ACGAA----GT--CG---G-	CTCCC-TTAAATG--CATT	A-----GTAGGG--ACC--TC	TGTTG-----C-CTT--AGC
21	-C-GG-GCTT-CT-----T	AGGAA----GT--CG---G-	CT-TCCCTTAAATG--CATT	A-----GTAGGG--ACC--TC	TGTTG-----C-CTT--AGC
22	-C-GG-GCTT-CT-----CT	--GAA----GT--CG---G-	CTCTCC-TTAAATA--TATT	A-----GTAGGG-ACCTCTC	TGGTG-----GCCCTC--AGC
23	-C-CG-GCTT--TTA-----A	CC-AA----GT--CA---G-	CTCCC-TTAAATG--CATT	A-----GCTGGT--ACCC--TC	TGGT-----G---GAACGTC
24	-C-GG-GCCT-CT-----	CCGGA----GT--CG---G-	CTCTCC-TTAAATAT--ATT	A-----GTAAGG--AAC--TC	TGTT-----GC-CTC--AGC
25	-T-GG-TCTTATTTT-----	CTGAAC--GT--CA---A-	CTCCC-TGAAATG--TATT	T-----GC-AGA-ACAA--TT	TGTT-----GACCA-----
26	-CTGG-GCCT-CTT-----	--GA----GGT--CG--AG-	CTCCC-TTAAATGG--TATT	A-----GCGACA-ACA--T	T-TT-----GC-C--AAACG
27	-CTGG-CC---CTC-----	--GTTG--GT--CG---G-	CTCCTC-TTGAATG--CATT	A-----GCTCGATTCGCTAC	GGAT-----C-----GGC
28	-CTGGAGC---CT-----	--AAC--GGTGCCA--G-	CTCCTC-TTAAATG--CATT	AGC--GGTTTTGTACGGATC	GGCCCTT-TGCGG-GATCGC
29	-C-GG--CATCGT-----	-----CT---G-	CAGCCC--TAAAGTAATGTG	GC-----GGCACCAGATA	AGTTCTA-AGC-GT---AGT

	720	740	760	780	800
1	--T-T-TG--GTG-----TG	ATAAATTCATTTA----TGC	CCA-TCGT----GGA-AGA	GC---AGC-TTTA---TA	AAT-G-----GGGTT---C
2	--T-T-TG--GTG-----TG	ATAAATTTATTCTA---TGC	CCA-TCGT----GAA-AGA	GC---AGC-TTTA---TA	AAT-G-----GGGTT---C
3	--T-T-TG--GTG-----TG	ATAAATTTATTCTA---TGC	CCA-TCGT----GAA-AGA	GC---AGC-TTTA---TA	AAT-G-----GGGTT---C
4	--T-T-TG--GTG-----TG	ATAAATTCATTTA----TGC	CCA-TCGT----GGA-AGA	GC---AGC-TTTA---TA	AAT-G-----GGGTT---C
5	--T-T-TG--GTG-----TG	ATAAATTTATT-TA---TGC	C-A-TCGT----GGA-AGA	GC---AGC-TTTA---TA	AAT-G-----GGGTT---C
6	--T-T-TG--GTG-----GT	GTTAATTTATT-TA---AGC	CCA-TCGT----GGA-AGA	GC---AGC-TTTA---TA	AAT-G-----GGGTT---C
7	--T-T-TG--GTG-----TG	ATAAAT--ATCTA---CGC	C-A-TTGT----GGTCAAA	GC---AGC-TT-A---TA	AAT-GG-----GGGTTA-C
8	--T-T-TG--GTG-----TG	AAAAAT--AACTA---CGC	C-A-TTGT----GGTCAA-	GC---AGC-TT-A---TA	AT--G-----GGGTTT--C
9	--TCT-TG--GTG-----TG	ATAGTTTTCACC----CGC	C-A-T-TT-----GCGAA	GC-----T---TTA---AA	AATGG-----GGCTA--C
10	--TTT-TG--GTGG----TG	ATAATT-ATTCTA---CGC	C-A-TCAT-----GTGAA	GC---AGC-TT-A---AA	ATTGG-----GGTTG--C
11	--T-T-TG--AGGG----CC	GTCITT-ATTCTA---CGC	A-A-TTGG-----GTTAA	GT---TGC-TC-----TA	AATTGG-----GG-TCG-C
12	--TTT-TG--GTG-----TG	ATAATT-ATT-TA---CGC	C-A-TTAT-----GTGAA	GG---AGG-TT-----TA	AATTGG-----GGGT-G--G
13	--TTT-TG--GTG-----TG	ATGATT-ATT-TG---TGC	C-A-TTAT-----GTAAA	GG---AGG-TTCA---TA	A-TGG-----GGGTTA--A
14	--TAC-TG--GTG-----TG	ATAATT--ATCTA---CGC	TTA-TTGC-----TGAAA	GT---GAC-TT-----	-----GGTA---C
15	---CC-TG--GTG-----TG	TTAATT--ATCTA---CGC	TTA-TTGC-----T-AG	GT---GAC-TTGA---TG	CC--GC-----GTT---C
16	--ATT-TG--GTG-----TG	ATAATT--ATCTA---CGC	C-A-TTGT----GAACAA	T-----G---TAA---TA	GGTCCGC-----TT---C
17	--TTT-TG--GTG-----TG	ATAATT--ATCTA---CGC	C-A-TTA-----GTGAA	GC---TGC-TT-----TA	AATGGA-----GGTAA--C
18	--TGT-TG--GTG-----TG	ATAATT--ATCTAA---CGC	T-A-TTCT-----GAGCA	GA-----C-TT-A---TA	AAATG-----GGGTGTCA-
19	--TCTCTG--G-GG----TG	GTTAGAGTATCTA---CGC	CAA-TCT-----GCGGA	CC-----C-TTT-----TA	AAATG-----GGGTGTACT
20	--T-TATG--GTG-----TG	ATAATT--ATCTA---CGC	ACACTCAT-----GTGAA	GC---AGC-TT-----TA	AATTGG-----AGGTTA--C
21	--TCT-TG--GTG-----TG	ATAATT--ATCTA---CGC	ACACTCAT-----GTGAA	GC---AGC-TTTA---A	AATGG-----GGGTTA--C
22	--TCT-TG--GTG-----TG	ATAGTT--ATCTA---CGC	-CATTC-T-----GCGAA	GC---AGC-TTTA---A	AATGG-----GTGT-A--C
23	--TAT-TG--GTG-----TG	ATAATT--ATCTA---CGC	C-G-TGGA-----CATCT	GC-----CC-CTTA---GA	GTAGG-----TGTG--C
24	--TCC-TG--GTG-----TG	ATAGGT-ATTCTA---CGC	C-A-TTCT-----GCGGA	AC-----GC-CTTT---AA	AATGG-----GGGTA--C
25	--TTCATTA-ATG-----TG	ATACT--ATCTA---CAT	T-ATTGAT----GTGTGAG	GCAGT-AG--TTCAG--CTT	CTTAT-----ACAGTCCATT
26	--TTCATTA-GTG-----TG	ATAATT--ATCTA---TGC	C-ATTGAC-----GTG--AA	GCAG--GG--TTCAG--CTT	CTAAC-----A-GGTCCATT
27	--TCTCAG--TTG-----TG	ATAAAT--GTCTA---CGC	T--GTGA-----CCGTGAA	GTGTTTTGGCGAGCT--TTAA	CTCGTCCATTAGACAA-CT
28	-GTCTCCGATGTGA---CCG	TAAAGTGTTCACGT-CGT	TGAC-CATC--TCGGGGCAA	CTGCCTAG---TCAGGTTTC	AAT-----AGGAGGTTT-C
29	AATTTCTC--CTC-----G	CTAACAGAGTCTTTCCGGCC	--ATTGG-----GTACTCA	CTCCCGCCATAAAACCCCC	AATTTTA-----GTTTGC

Abb. 7.4



	820	840	
1	C-AAATTGGGTCC---CCTT	T--GGACA-----AATT---	<i>T. terreum</i> GK 740
2	CTAAAATGGGTCC---CCCT	TGGGACA-----AATT---	<i>T. terreum</i> GK
3	CTAAAATGGGTCC---CCCT	TT--GACATC---AATT---	<i>T. terreum</i> KR 7216
4	CTAAAATGGGTCC---CTTTG	T GGGACA-----AAT----	<i>T. terreum</i> CBS 370.47
5	CTAAATGGTCT---CCTTT-	G GGACA-----A-TT----	<i>T. terreum</i> KR 7217
6	CTAAAATGGGTCC---CTTG	T--GGACC-----AATT----	<i>T. terreum</i> KR 7219
7	TCTAATCGTCTCGG-ACATT	CCTGACA-----AATT----	<i>T. argyraceum</i> CBS 361.47
8	-CTAATCGTCTC-----	TTGAGACA-----ACTT---	<i>T. scalpturatum</i>
9	CCAAACC--GGTCT---CTTT	GTGGGACCTCA-AATT----	<i>T. imbricatum</i>
10	CTTAAC-AGTCT---CTTTG	TGGGACA-----A-TT----	<i>T. nictitans</i> GK 784
11	TTGAACCGAGT-----TCTG	ATAGGACA-----ACC----	<i>T. pseudonictitans</i>
12	CTAAAA-GTTTT---TTTGG	TGGGACA-----A-TT----	<i>T. orirubens</i> KR 6913
13	CTAAAG-GTTTT---TTCGG	TGGGTCA-----AATT----	<i>T. orirubens</i> GK 1175
14	TCTAATC-GTCTT--TTCGGT	GGGTCCATT-TATT-----	<i>T. portentosum</i> GK 541
15	CTCAATCTCGAGACA-ATTT	ATTGCTTATGGC-AATT---	<i>T. sejunctum</i> GK 735
16	CGTAAA-GAGACA---ATCT	CT-GACATTTGACCTC---	<i>T. matsutake</i>
17	CTAACC---GTCT---CTC	ATGGGACA-----ATT---	<i>T. batschii</i>
18	CTAAAA---GTCT---CTT	GTGGGACC-----AATT---	<i>T. equestre</i> ATCC 366.48
19	CTTAATC-GTCT-CTTGTG-	ACA-----AAT-----	<i>T. equestre</i> GK 2628
20	CTAACC---GTCC-----CCT	ATGGGACA-----ATT---	<i>T. vaccinum</i> GK 6514
21	CTAACC-GCTCT---ACCTT	T-GAACC-C---CTT----	<i>T. vaccinum</i> GK 2593
22	CTAACC-GCTCA---ACC--	--GGACA-----ATTT----	<i>T. vaccinum</i> CBS 555.50
23	GTAACC---GTCCTGTTCAT	T-----	<i>T. sejunctum</i> CBS 368.47
24	CCAAAC---G-----TTTG	GTGGGACT----CAATC---	<i>T. vaccinum</i> CBS 181.42
25	CTAATT---TTCA---TCA	ATGTGACCTCA-AAT----	<i>Cortinarius hercynicus</i>
26	CTAATT---TTCA---TCA	ATGTGACCTCA-AAT----	<i>Cortinarius atrovirens</i>
27	CTGACC---TCAA-TCAG	GTAGGACGA----ACTT---	<i>T. robustum</i>
28	CTAAGT---GTCT---TTC	ATGAGTCTTG---AATT---	<i>Schizophyllum commune</i>
29	C-AAGTAGGGGATTACCCCG	CT--GAACTTAAGCAT----	<i>T. portentosum</i> CBS 367.47

Abb. 7.5

Abb. 7: Alignment von ITS1, 5.8S rRNA und ITS2 Sequenzen der 29 Isolate von *Tricholoma*, *S. commune* und *Cortinarius*. Die Spezies sind durch Nummern gekennzeichnet und die Lage der 5.8S rRNA ist fett markiert.

Die Sequenzen der *Tricholomatales* wurden anschließend verwendet, um einen phylogenetischen Stammbaum zu erhalten. Als einzige, nicht direkt verwandte Art wurde der Basidiomycet *S. commune* gewählt. Zur Aufstellung einer ersten, übergreifenden Phylogeniebeziehung innerhalb *Tricholoma* wurden Sequenzen verwendet, die ausschließlich aus morphologisch identifizierten Fruchtkörpern gewonnen worden waren. Das erlaubte Aussagen über den Zusammenhang von morphologischen Kriterien wie der Fruchtkörperfarbe und den molekularen Daten der ITS-Sequenzen. Die elf Spezies bildeten im resultierenden phylogenetischen Stammbaum drei Gruppierungen näher verwandter Arten innerhalb der Gattung *Tricholoma* (Abb. 8). In der Gruppe von *T. terreum* und *T. sculpturatum* besitzen die Fruchtkörperhüte eine graue Färbung, dagegen sind die Fruchtkörper der Gruppe von *T. portentosum*, *T. sejunctum* und *T. imbricatum* gelblich gefärbt. Die Gruppe um *T. equestre*, *T. batschii*, *T. nictitans*, *T. pseudonictitans*, *T. orirubens* und *T. vaccinum* grenzt sich durch eine braune, rötliche oder gelbe Färbung der Hüte ab. Der phylogenetische Stammbaum resultiert aus den molekularen Daten. Daß sich darin eine Einteilung über die Hutfarbe der Fruchtkörper wiederfindet, stützt die Vermutung, daß sich eine taxonomische Bestimmung über Hutfarben mit phylogenetischer Verwandtschaft deckt.

Anschließend wurde ein erweiterter phylogenetischer Stammbaum der ITS-Sequenzen mit 26 *Tricholoma*-Stämmen aufgestellt, die von Fruchtkörpern sowie von aus Stammsammlungen bezogene Isolate abgeleitet wurden (Abb. 9). Es zeigte sich hier, daß Stämme, die als *Tricholoma* bezogen worden waren, außerhalb der übergreifenden *Tricholoma*-Gruppierungen erschienen ("*T. robustum*", "*T. portentosum*", "*T. sejunctum*"). Außerdem traten Sequenzen von "*T. vaccinum*" auf, die nicht in die *T. vaccinum*-Gruppierung paßten, sondern wohl eher einer anderen *Tricholoma*-Spezies zuzuordnen waren. Andere Stämme zeigten die erwarteten Übereinstimmungen wie bei *T. equestre* und *T. terreum*, die sowohl von Fruchtkörpern und aus Stammsammlungen herrührten. Desweiteren sollte untersucht werden, ob die Gattungen *Cortinarius* und *Tricholoma*, welche gleiche, taxonomisch wichtige, chemische Aspekte aufweisen (Gluchoff and Steglich, 1974; Steglich and Töpfer-Petersen, 1972; Steglich *et al.*, 1972), nähere Verwandtschaft besitzen, als es von zwei verschiedenen Gattungen zu erwarten wäre. Die ITS-Sequenzen beider *Cortinarius*-Fruchtkörper bestätigen aber durch die distanzierte Gruppierung zu *Tricholoma* im phylogenetischen Stammbaum die Abtrennung einer eigenständigen Gattung *Cortinarius*.

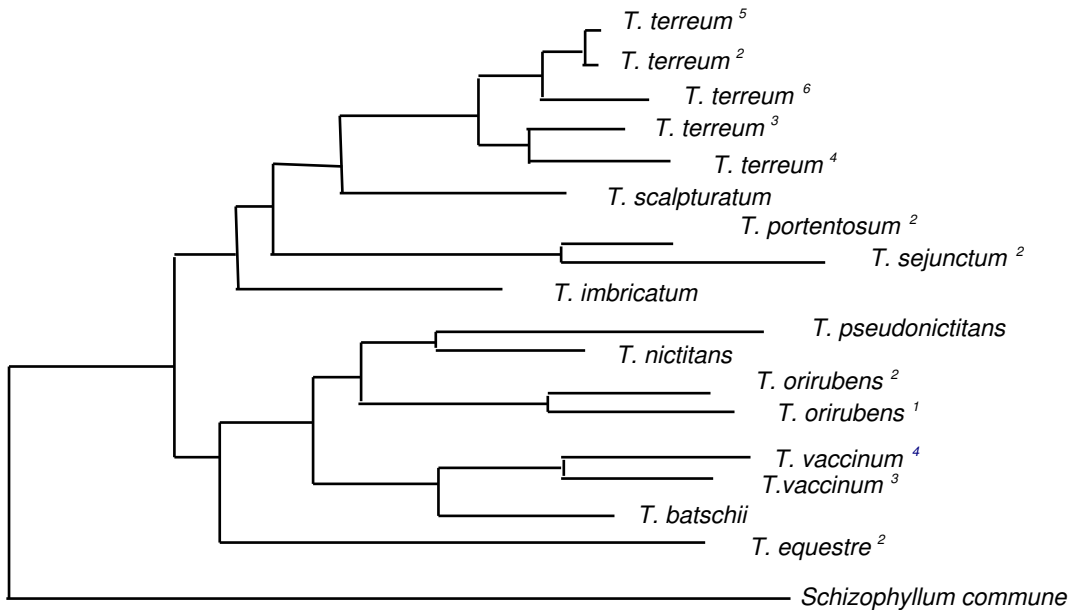


Abb. 8: Phylogenetischer Stammbaum von ITS-Sequenzen aus Fruchtkörper-DNA. Phylogenetischer Stammbaum von *Tricholoma*-Arten und *S. commune* abgeleitet aus Sequenzen von Amplifikationen der ITS-Regionen mit DNA durchgeführt, die aus Fruchtkörper extrahiert wurde.

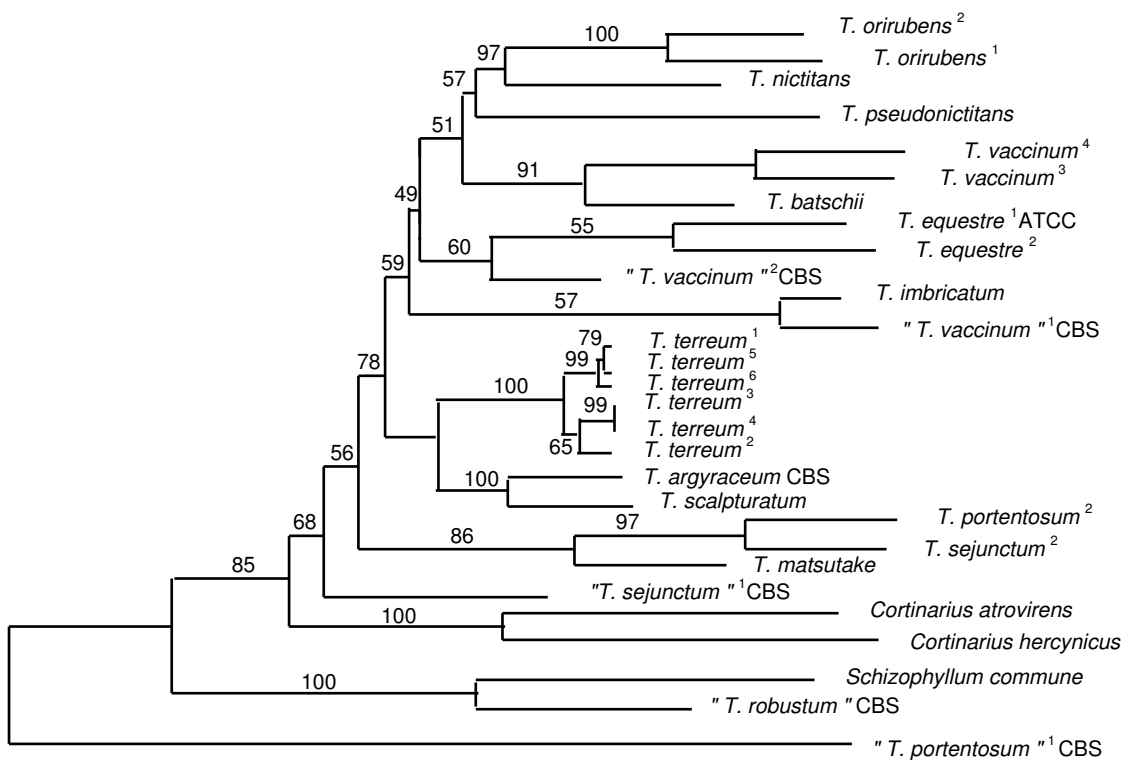


Abb. 9: Phylogenetischer Stammbaum von ITS-Sequenzen aus 13 *Tricholoma*-Spezies. Der phylogenetische Stammbaum resultiert aus den ITS-Sequenzen von 29 Isolaten, die Stämme von *Tricholoma*, *S. commune* und *Cortinarius* beinhalten.

2. *In vitro* Synthese der Mykorrhiza

Der dikaryotische *T. terreum* 3-Stamm bildete mit dem natürlichen Wirtsbaum *Pinus sylvestris* in axenischer Kultur die symbiotische Assoziation einer Ektomykorrhiza. Zur Synthese wurde ein Petrischalensystem verwendet, das sich semi-steril gestaltet. Das Pflänzchen befindet sich halb in der sterilen Petrischale, die Blätter jedoch im nicht-sterilen Außenbereich (Abb. 10). Dadurch sind Kulturbedingungen wie Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Tag-Nacht-Rhythmus für eine Pflanzenentwicklung optimal einzuhalten. Das Petrischalensystem gewährleistet eine Beobachtbarkeit der Wurzeln und eine Kontrolle von Kontaminationen. Molekularbiologische Untersuchungen an den Mykorrhizen verlangten zudem möglichst sterile und von jeglichem Substrat freie Gewebe. Daher erfolgte die Mykorrhizierung nicht direkt im Agar, sondern auf einer Cellophanfolie. Eine Abdeckung mit einer weiteren Cellophanfolie gewährleistete ein Wurzelwachstum nah am Agarbereich.

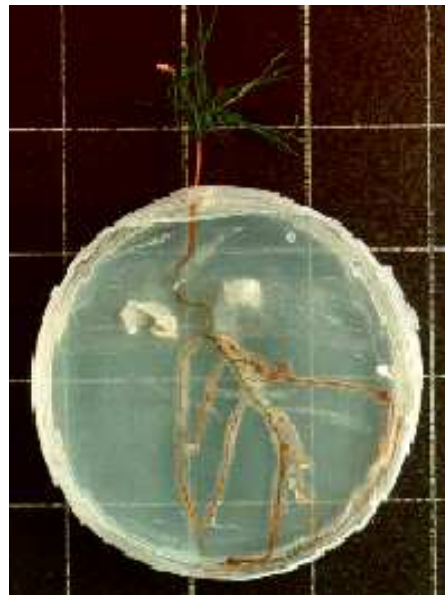


Abb 10: Petrischalensystem.
Die Wurzeln und Myzelstücke befinden sich zwischen zwei Cellophan-Folien der Dualkultur von *Pinus sylvestris* und *Tricholoma terreum*.

In der Entwicklung der Ektomykorrhiza erfolgte zunächst der Kontakt zwischen den Hyphen von *T. terreum* und der Oberfläche der Kurz- und Langwurzeln von *P. sylvestris*. Eine Rhizomorphenentwicklung mit verdickten Hyphensträngen und dem typischen Verzweigungsmuster konnte dabei nur in Ansätzen beobachtet werden. Es bildete sich vorerst ein lockeres Hyphengeflecht um die Wurzeln aus. Ausgleichend erfolgte eine Verdichtung des Hyphenmantels, die an mehreren, übereinanderliegenden Hyphenschichten zu erkennen war. Die Hyphen des Mantels vergrößerten sich, und es bildete sich durch Verzweigungen ein dichtes Plektenchym aus (Abb. 11 A). Nach etwa 30 Tage Dualkultur konnten die ersten interzellulären Hyphen im Cortex beobachtet werden. Hyphen des Hartig'schen Netzes einer differenzierten

Ektomykorrhiza zeigten eine völlig veränderte Hyphenmorphologie. Sie verloren ihre apicale Dominanz und bildeten starke Verzweigungen. Die Hyphen nahmen dabei ein fingerähnliches Aussehen an, das auch als Palmettistruktur bezeichnet wird (Abb.11 B+C). Ein voll entwickeltes Hartig'sches Netz zeigte sich in einer vollständigen Separation der corticalen Rindenzellen. Es bildet sich dabei in der Regel zwischen den Corticalzellen eine einlagige Hyphenschicht im interzellulären Raum aus (Abb. 11 D). Eine Ausbildung von Tanninzellen konnte teilweise beobachtet werden (Abb. 11 B).

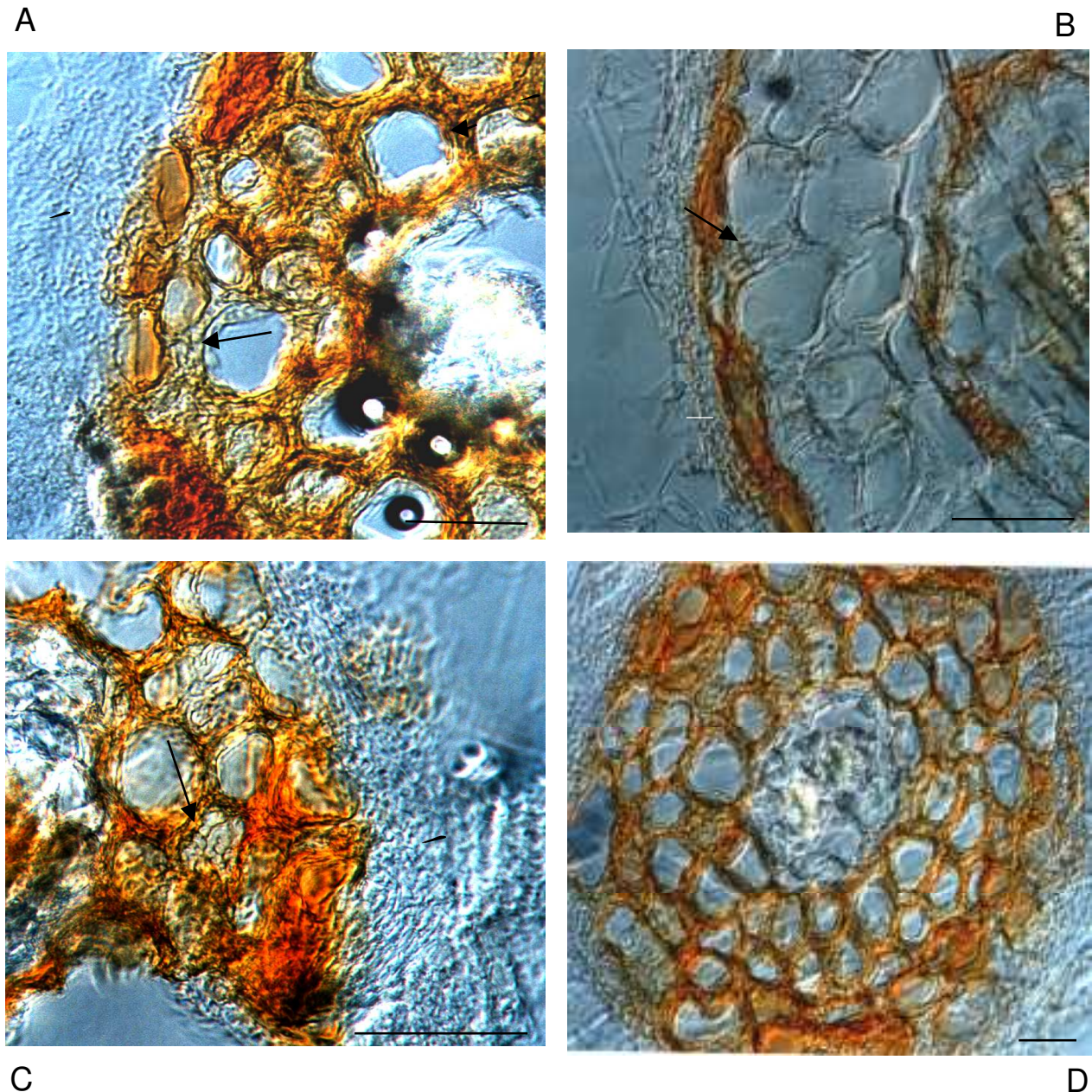


Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Ektomykorrhiza-Schnitten der kompatiblen Dualkultur *T. terreum* und *Pinus sylvestris*. Mantelbildung (⌞), Hartig'sches Netz (→), äußere Tanninschichtbildung (—). (A) Nach etwa 60 Tagen Dualkultur hatte sich ein dichter Hyphenmantel gebildet. (B), (C) Die Ausbildung von Palmetti-Strukturen konnte beobachtet werden. In (D) läßt sich die vollständige Separation der Corticalzellen erkennen. Teilweise kommt es zur Bildung von Tanninzellen. Größenbalken=100µm.

2.1 Isolieren eines Monokaryons durch Protoplastierung von *T. terreum*

Die Synthese der Mykorrhiza in axenischer Kultur wurde mit einem Stamm gezeigt, der aus einem Fruchtkörper isoliert war. Das Myzel wächst dementsprechend als Dikaryon (Abb.12 A). Es sollte analysiert werden, ob auch ein monokaryotischer Stamm in der Lage wäre, Mykorrhiza in axenischer Kultur zu bilden. Zur Synthese eines monokaryotischen Stammes mußte das dikaryotische Myzel einem Verdau mit lytischem Enzym (Novozym 234) unterzogen werden, um Protoplasten erzeugen zu können. Das Enzym lysierte die Zellwand und ermöglichte dem in der Zelle vorhandenen Protoplasma sich in das leicht hypotonische Medium auszubreiten. Die abgeschnürten Protoplasten besitzen entweder die beiden Kerne des Dikaryons, keinen Zellkern oder einen einzelnen Kern. Aus den nach zwei Wochen aus solchen Protoplasten entstandenen Myzelien wurden die Kernverhältnisse mittels DAPI-Färbung überprüft. Es konnte ein monokaryotischer Stamm isoliert werden, der als MK-2 bezeichnet wurde (Abb.12 B).

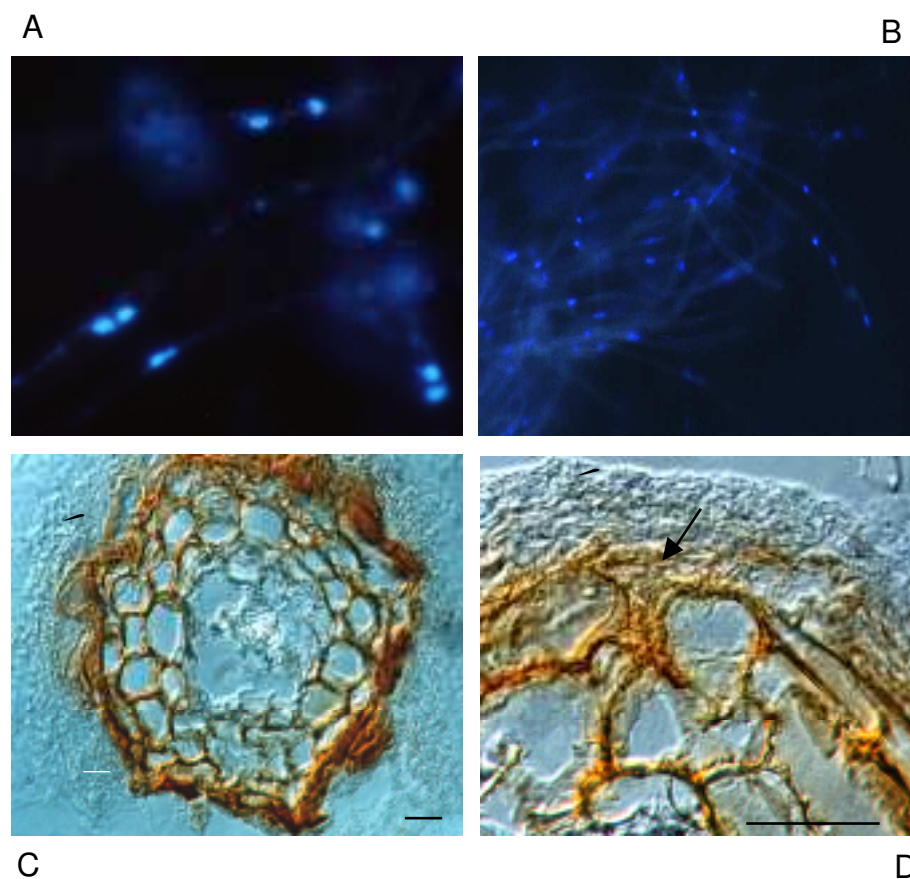


Abb. 12: Kernverhältnisse in *T. terreum*-Stämmen (A, B) und Mykorrhiza-Bildung von MK-2 (C, D). (A) DAPI-Färbung der Kerne des dikaryotischen *T. terreum* 3 (B) und Anfärbung des monokaryotischen *T. terreum* MK-2 Stamm. (C,D) Lichtmikroskopische Aufnahmen von *T. terreum* MK-2 und *Pinus sylvestris* in 54 Tage Dualkultur, Mantel (∩), Hartig'sches Netz (→), äußere Tanninschicht (___). Größenbalken=100μm.

Der monokaryotische Stamm MK-2 wurde in axenischer Kultur mit dem natürlichen Wirtsbaum *Pinus sylvestris* zur Ausbildung von Mykorrhiza zusammen gebracht. Nach etwa 6-8 Wochen hatten die Hyphen einen relativ dichten Mantel über einigen sekundären Wurzeln gebildet, der als dichtes Plektenchym in lichtmikroskopischen Aufnahmen sichtbar wurde (Abb.12 C). Die Hyphen des Hartig'schen Netz penetrierten zwar in den Cortex, aber es erfolgte keine vollständige Separation der ersten Rindenzellschicht (Abb.12 D). Es konnte eine vermehrte Anreicherung von Tanninzellen beobachtet werden. Obwohl keine Quantifizierung vorgenommen wurde, ist die eingeschränkte Mykorrhiza-Entwicklung des Monokaryons im Vergleich zum Dikaryon zu erkennen.

3. Isolierung und Analyse von Hydrophobinen

3.1 Hydrophobine formen SDS-unlösliche Komplexe an der Wasser/Luft-Grenzschicht

Hydrophobine besitzen die charakteristische Fähigkeit zur Bildung von amphipatischen Aggregaten, wenn sie an eine hydrophobe-hydrophile Grenzschicht wie Luft/Wasser gelangen. Die unterschiedliche Löslichkeit der Aggregate führt zudem zur Einteilung in zwei Klassen. Bei Hydrophobinen der Klasse II dissoziieren die Proteine in SDS, dagegen bilden solche der Klasse I Aggregate aus, die in heißem SDS unlöslich sind und starke Oxidationsmittel zur Dissoziation in die Monomere benötigen. Die Fähigkeit zur Ausbildung der Proteinkomplexe wurde zur ersten Identifizierung und Isolierung von Hydrophobinen aus *Tricholoma* genutzt. Es wurden Myzelien von *T. terreum*, *T. vaccinum* und *T. nictitans* aufgebrochen und mit kochendem SDS-Extraktionspuffer versetzt. Die resultierenden Proteingemische wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Identifizierung und Detektion der Hydrophobin-Proteine erfolgte durch Western Blot-Analysen mit Antiserum, das gegen das Sc3-Hydrophobin aus dem Basidiomycet *S. commune* gewonnen war. Die Hydrophobin-Antikörper reagierten mit Proteine, die große apparente molekulare Massen von 50 bis 98 kDa besaßen (Abb. 13). Die detektierten Hydrophobin-Proteine aus den verschiedenen *Tricholoma*-Spezies lagen als Agglomerate vor, welche die von Hydrophobin-Monomeren abweichende typische Größe erklären könnte. Eine Dissoziation der Aggregate zu monomeren Einheiten fand nicht statt.

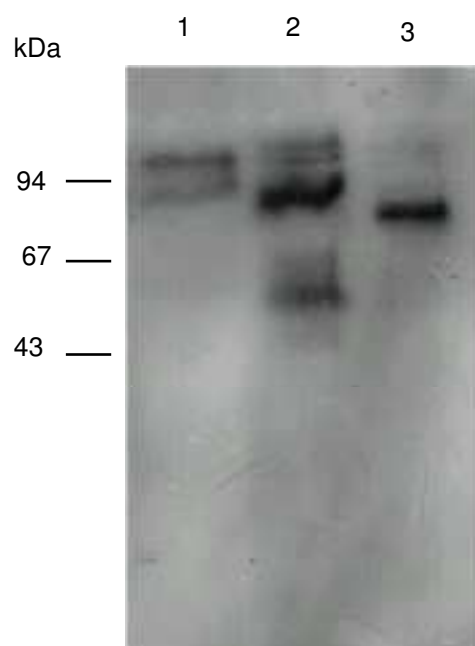


Abb. 13: Immunodetektion von Hydrophobinen aus *Tricholoma*-Spezies mit Anti-Sc3-Antikörper. Es wurden Proteinrohextrakte auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Hydrophobine wurden durch Anti-Sc3-Antikörper und einen Zweitantikörper zur Kopplung an ein Chemoluminiszenzsystem detektiert. Spur 1: *T. nictitans*, Spur 2: *T. vaccinum* und Spur 3: *T. terreum*.

3.2 Isolierung von T.t.hyd1-Hydrophobin aus *T. terreum*

Zur Reinigung von sekretierten Hydrophobinen wurde Kulturmedium benutzt, in dem gut entwickeltes Luftmyzel gewachsen war. Der geklärte Überstand wurde solange mit Luft vermischt, bis eine Trübung der Lösung eintrat. Spontane Aggregation der Hydrophobine zu Komplexen verursachte den Niederschlag, der mit Trifluoressigsäure dissoziiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurde. Die apparenten molekularen Massen der stärksten Banden in der Silberfärbung wurden durch ein 15 %iges Acrylamid-Gel mit 23, 16 und 9 kDa bestimmt (Abb. 14 A).

Die angereinigte Fraktion wurde mit Hilfe des heterologen Antiserum auf das Vorhandensein von Hydrophobinen untersucht. Als Positive Kontrolle wurde neben den *T. terreum*-Extrakten auch das gereinigte Sc3 von *S. commune* eingesetzt. Sowohl Sc3, als auch das angereinigte, 23 kDa große Protein wurden mit dem gegen Sc3 gerichteten Antikörper als spezifische Bande nachgewiesen (Abb.14 B). Die Detektion mit dem gegen Sc4 (fruchtkörper-spezifisch) gerichteten Antikörper blieb negativ (nicht dargestellt). Aufgrund der gezeigten Detektion sollte das von *T. terreum* ins Medium abgegebene und mit Anti-Sc3-Antikörper reagierende Hydrophobin näher untersucht werden. Zur weiteren Charakterisierung des 23 kDa großen Proteins, das als T.t.hyd1 bezeichnet wurde, erfolgte eine N-terminale Aminosäure-Sequenzierung. Aufgrund geringer Mengen an Protein konnten nur acht sichere N-terminale Aminosäuren (T P L P G G S S (Y)) bestimmt werden.

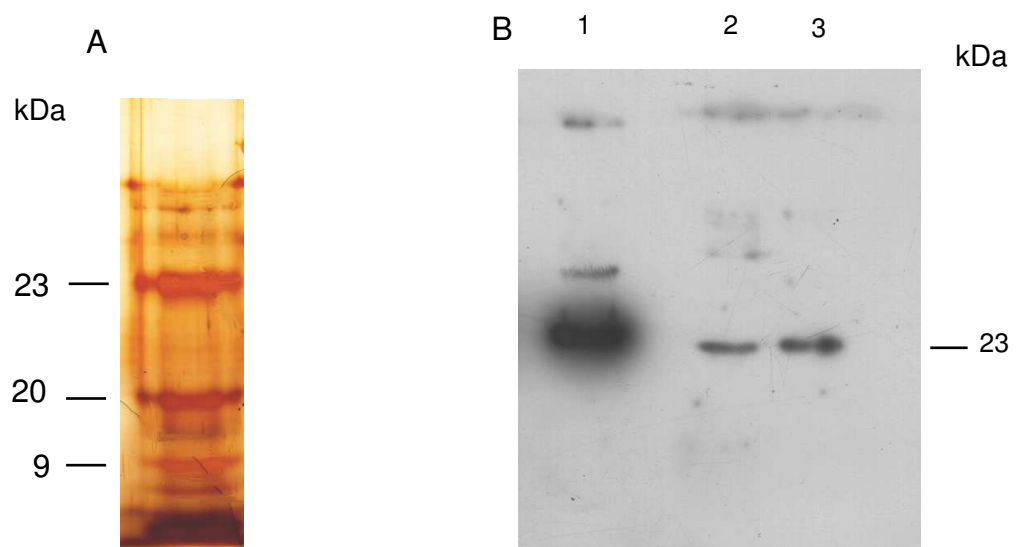


Abb. 14: Reinigung und Immunologischer Nachweis des T. t. hyd1-Hydrophobin aus *T. terreum*. (A) SDS-PAGE der Trifluoressigsäure-löslichen Fraktion der lufthyphen-spezifischen Hydrophobine mit Silber gefärbt. (B) Immunodetektion mit Anti-Sc3-Antikörper der gereinigten lufthyphen-spezifischen Hydrophobinen, die auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen wurden. In (1) wurde als Positivkontrolle das gereinigte Sc3 von *S. commune*, in (2) und (3) verschiedene TFA-Präparationen der lufthyphenspezifischen Hydrophobine aufgetragen.

3.3 Klonierung von *T.t.hyd1*

Die Bestimmung der ersten N-terminalen Aminosäuren des sekretierten *T.t.hyd1*-Proteins ermöglichte die Ableitung von vier degenerierten Oligonukleotiden. Die Primer wurden in Verbindung mit einem Oligo(dT)₁₇-Primer zur Amplifikation von cDNA zur RT-PCR eingesetzt. Für die RT-PCR-Reaktionen wurde Gesamt-RNA aus *T. terreum*- (Luft)-Myzel benutzt. Der degenerierte Primer Hyddeg3 (5'-CCI CTI CC(A/C/G/T) GG(A/C/G/T) GGI TCI AG(T/C) TA-3', I = Inosin, Tab. 3) ergab ein ca. 360 bp großes Fragment, das kloniert und sequenziert wurde (Abb.15 A). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit Proteinsequenzen der Datenbanken verglichen und erwartungsgemäß ergaben sich hohe Sequenzähnlichkeiten mit pilzlichen Hydrophobinen.

Zur Identifizierung und Analyse des Genortes der mittels RT-PCR amplifizierten und als *T.t.hyd1* bezeichneten cDNA sollten zunächst Southern Blot-Analysen durchgeführt werden. Als Sonde wurde ein genomisches Fragment benutzt. Dafür wurden von der *T.t.hyd1*-cDNA die Primer Hyd7for und Hyd7rev (Tab. 3) abgeleitet und mittels PCR ein 190 bp großes Fragment aus genomischer DNA amplifiziert (Abb.15 B). Die Sonde hybridisierte mit 3,6 kb *Eco*RI und 4,8 kb *Hind*III Fragmenten unter stringenten Bedingungen (Abb. 16). Unter Berücksichtigung der vermuteten Gengröße von *T.t.hyd1* wurde das stark hybridisierende 3,6 kb

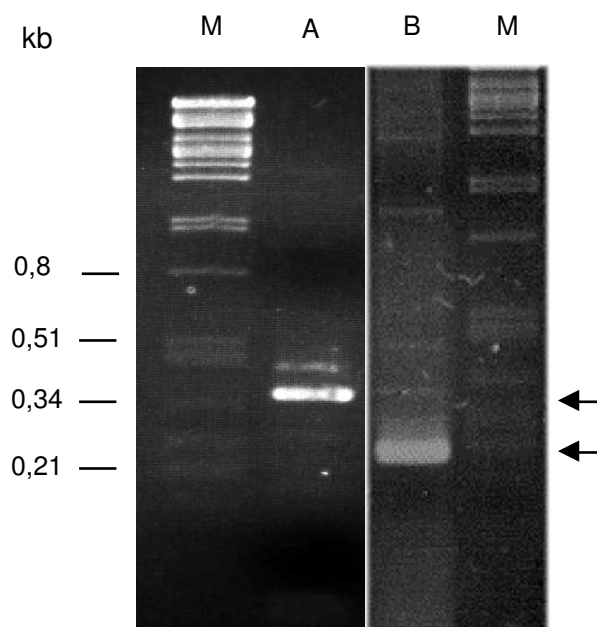


Abb. 15: Identifizierung der *T.t. hyd1*-cDNA durch RT-PCR-Amplifikation. (A) RT-PCR-Produkt, das mittels von der Aminosäuresequenz abgeleiteten degenerierten Primer Hyddeg3 und eines reversen Oligo(dT)₁₇-Primers aus Gesamt-RNA von *T. terreum*- (Luft)-Myzelien erhalten wurde. **(B)** PCR-Amplifikation des zur *T. t. hyd1*-cDNA korrespondierenden genomischen 190 bp großen Fragments mit den Primern Hyd7for und Hyd7rev. M=Markerspur.

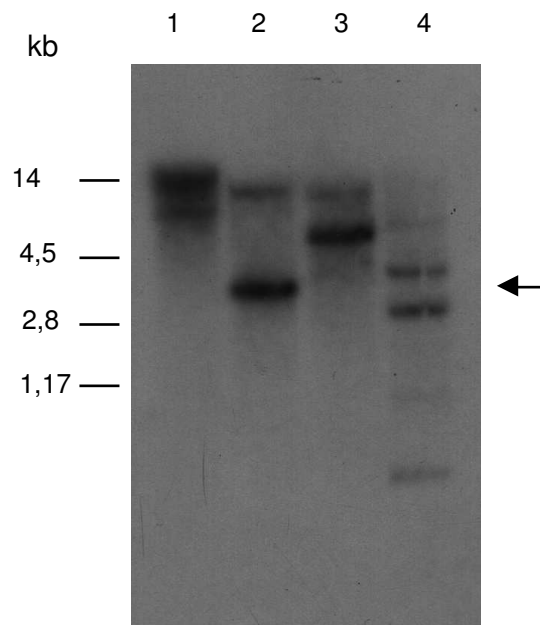


Abb. 16: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des genomischen *T.t.hyd1*-Fragments. Genomische DNA wurde isoliert und nach einem Restriktionsverdau mit *Bam*HI (1), *Eco*RI (2), *Hind*III (3) und *Pst*I (4) in einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der radioaktiv-markierten Sonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

*Eco*RI Fragment ausgewählt. Andere, schwächer detektierte Banden sind vermutlich im Genom vorkommende Gene anderer Hydrophobine. Für die Klonierung des 3,6 kb-*Eco*RI Fragments wurde genomische DNA einer vegetativ wachsenden Kultur mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI geschnitten, auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA aus dem *Eco*RI-Fragment zugehörigen Größenbereich eluiert. Die Eluate wurden in weiteren Southernexperimenten auf das Vorhandensein der gewünschten Fragmente hin untersucht, die DNA anschließend in die *Eco*RI-Schnittstelle eines linearisierten Vektors eingefügt und in *E. coli*-Zellen transformiert. Von 500 getesteten Kolonien enthielt eine das gewünschte 3,6 kb Fragment. Das entsprechende Plasmid wurde als pHyd2-2 bezeichnet.

3.4 Ermittlung der genomischen und cDNA-Sequenz von *T.t. hyd1*

Zunächst wurde von dem 3,6 kb großen Insert des Plasmids pHyd2-2 eine Restriktionskarte erstellt (Abb. 17). Anschließend wurden beide Stränge dieses Fragments sequenziert. Dafür wurden zunächst Standardprimer verwendet (Tab. 3), mit denen pHyd2-2 und Subklone von pHyd2-2 (Abb. 17; Tab. 3) analysiert wurden. In der Analyse konnte in der genomischen Sequenz an Position 1770 ein Startkodon gefunden werden, welches den offenen Leserahmen von *T.t.hyd1* initiiert. Die mittels von der genomischen Sequenz abgeleiteten Primer Hydstart1 und Hydstop1 (Tab. 3) amplifizierten die 324 bp große *T.t.hyd1*-cDNA, die den Translationsstart und den Translationsstopp beinhalteten. Um zu untersuchen, ob das *T.t.hyd1*-Gen Introns enthielt, wurde die genomische *T.t.hyd1*-Sequenz mit der beidsträngig sequenzierten *T.t.hyd1*-cDNA verglichen. Es wurden zwei Introns mit einer Länge von 53 und 74 Nukleotiden identifiziert. Die Sequenzen im Bereich der Spleißstellen wiesen für beide Introns die typischen konservierten Sequenzabschnitte (5'GT und 3'AG) für Introns auf, die für filamentöse Pilze beschrieben wurden (Gurr *et al.*, 1987). Innerhalb von ca. 200 Basenpaare vor dem Translationsstart befanden sich eine CAAT- und eine TATA-Box, deren Sequenz in Übereinstimmung mit anderen Daten für Promotoren aus Eukaryoten stehen (Benoist *et al.*, 1980). Am 3'-Ende der *T.t.hyd1*-cDNA wurden ca. 100 Basenpaare stromabwärts des Stoppkodons Polyadenylierung der mRNA gefunden (Position 2319 in der genomischen Sequenz). Der offene Leserahmen kodiert für ein Polypeptid von 108 Aminosäuren (Abb. 18)

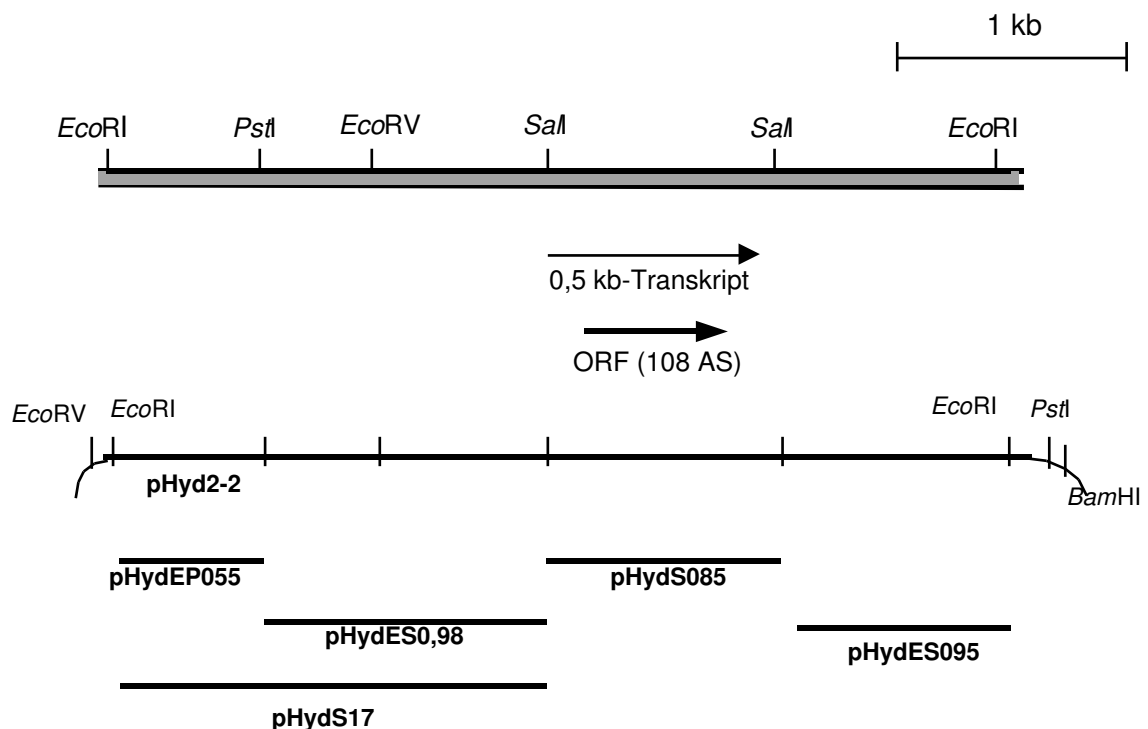


Abb. 17: Partielle Restriktionskarte des *T.t.Hyd1*-Genortes. Analysiert wurde das 3,6 kb-*EcoRI*-Insert von pHyd2-2. Die Lage des Transkripts und des offenen Leserahmens ist angedeutet. Ebenso sind Subklone, die zum Sequenzieren konstruiert worden sind, eingezeichnet.

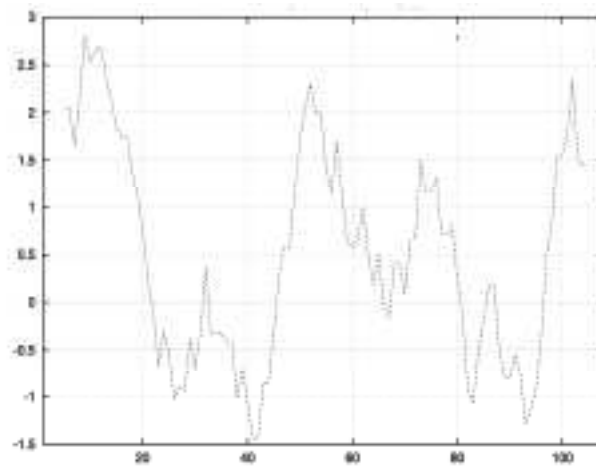
3.5 Charakterisierung des T.t.hyd1-Proteins

Die *T. t.hyd1*-cDNA kodiert für ein Protein mit 108 Aminosäuren und besitzt die für Hydrophobine typische Struktur von Signalsequenzen sekretierter Proteine (von Heijne, 1986). Die N-terminale Peptidsequenzierung bestätigt eine Prozessierung von T.t.hyd1 zwischen Ala₁₈ und Thr₁₉. Das reife Polypeptid beinhaltet somit 90 Aminosäuren, besitzt eine errechnete Masse von 8846 Da und einen kalkulierten isoelektrischen Punkt von pI = 4,37. Außerdem konnte bei T.t.hyd1 mit Thr₁₉ und Ser₄₂ zwei mögliche O-Glykolysestellen gefunden werden (NetOGlyc 2.0 prediction program; Hansen *et al.*, 1997). Glykosylierungen sind posttranslationale Modifikationen, die die Hydrophobizität eines Proteins verändern und eine Selbst-Aggregation auslösen können. Das Protein besitzt acht Cystein-Reste in einer für Hydrophobine typischen konservierten Abfolge (Konsensus: X₂₋₃₈-C-X₅₋₉-CC-X₄₋₃₉-C-X₈₋₂₃-C-X₅₋₉-CC-X₆₋₁₈-C-X₂₋₁₃, C=Cystein, X=beliebige Aminosäure; Wessels, 1996).

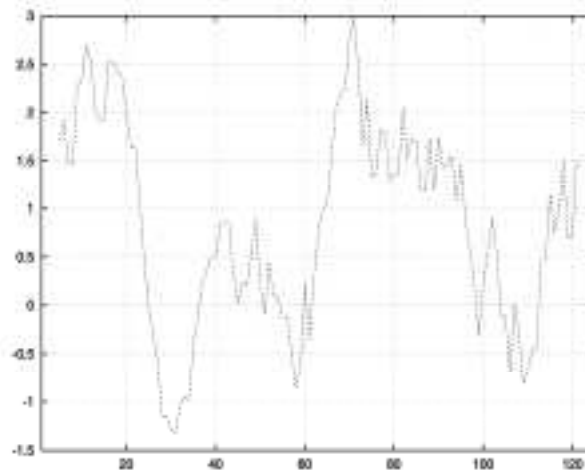
Die Aminosäuresequenz von T.t.hyd1 wurde mit den analogen Hydrophobinen, die aus anderen Pilzen stammten, verglichen. Das resultierende Aminosäure-Alignment zeigte, das zwischen T.t.hyd1 und den anderen Hydrophobinen auf Aminosäureebene nur geringe Homologien (34-43%) bestanden, die hauptsächlich im C-Terminus zu finden waren. Die höchste Homologie (43%) wurde mit HYDPt-1, welches ein Hydrophobin aus einem Ektomykorrhizapilz war, gefunden (Abb. 19 A). Die Homologie mit dem Sc3-Hydrophobin aus *S. commune* betrug nur 39%. Ein erweitertes Alignment und ein phylogenetischer Stammbaum mit Hydrophobinen aus verschiedenen Basidiomyceten ergab die distanzierte Gruppierung der fruchtkörper-spezifischen Polypeptide aus *S. commune*, *Agaricus bisporus* und *Pleurotus ostreatus* (Sc1, Sc4, ABH1+2, POH1) sowie der Hydrophobine, die vom vegetativen Myzel von *S. commune* und *Coprinus cinereus* sekretiert werden (Sc3, CoH1+CoH2). Die Ektomykorrhiza-Hydrophobine T.t.hyd1 und HYDPt-1 sind dagegen im phylogenetischen Stammbaum in einer von den fruchtkörper- und vegetativ-spezifischen Hydrophobinen abgetrennten Gruppierung zu finden (Abb. 19 B)

Mit der aus dem offenen Leseraster von T.t.hyd1 abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde eine Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte und Doolittle (1982) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß T.t.hyd1, ähnlich wie die bekannten Hydrophobine Sc3 aus *S. commune* und HYDPt-1 aus *Pisolithus tinctoris*, einen stark hydrophoben Bereich am N-Terminus des Proteins aufweist (Abb. 20). Diese Bereiche besitzen zumeist eine durchschnittliche Ausdehnung von 20 Aminosäuren und sind strukturell als Signalpeptide zu werten. Die eigentlichen, reifen Proteine bestehen ebenfalls aus hydrophoben Domänen, die einer charakteristischen Verteilung unterliegen. Obwohl die Homologie der Aminosäuresequenzen zwischen den Hydrophobinen eher gering ist, belegen die Hydrophobizitäts-Muster von T.t.hyd1 mit Hydrophobizitäts-Mustern anderer Hydrophobine wie HYDPt-1 und Sc3, daß T.t.hyd1 zur Klasse I der Hydrophobinen gehört (Stringer and Timberlake, 1995).

T.t.hyd1



HYDPt-1



Sc3

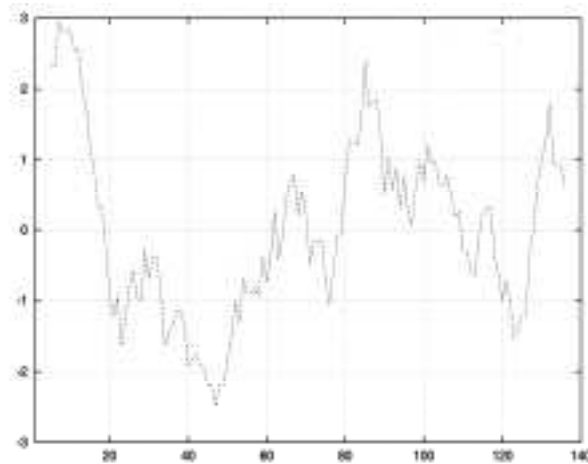


Abb. 20 : Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte und Doolittle (1982) mit Aminosäuresequenzen von T.t.hyd1, HYDPt-1 und Sc3. (Fenstergröße: 9). Punkte oberhalb der x-Achse kennzeichnen hydrophobe Bereiche der Proteine.

3.6 Expression von *T.t.hyd1*

Die Transkripte des *T.t.hyd1*-Gens sollten durch Northern Blot-Analysen nachgewiesen werden. Dafür wurde Gesamt-RNA isoliert, die von 1-4 Wochen alten, dikaryotischen, vegetativ wachsenden Myzelien aus Flüssigkulturen sowie Kulturen von Agarplatten stammten. Es wurde zudem noch Gesamt-RNA aus frischen Fruchtkörpern benutzt. Die Kontrolle und Mengenabschätzung der eingesetzten RNA erfolgte über die Methylenblau-Anfärbung der ribosomalen RNA-Banden im Blot (Abb. 21 B). Die DNA-RNA-Hybridisierung wurde mit der *T.t.hyd1*-cDNA als Sonde durchgeführt, die in der PCR mit den Primern Hydstart1 und Hydstop1 amplifiziert wurde. Für *T.t.hyd1* ließ sich ein Hybridisierungssignal von etwa 500 nt Länge detektieren. Transkripte konnten in vegetativen Myzelien gefunden werden, aber nicht in Fruchtkörpern (Abb. 21 A). Die höchste Akkumulation von *T.t.hyd1*-Transkripten trat bei den 2 Wochen alten, vegetativen Agarplatten-Kulturen auf, während bei gleichem Alter der Flüssigkultur nur geringere Expression des Hydrophobin-Gens nachweisbar war. Insgesamt nahm die Transkriptmenge von *T.t.hyd1* bei gleichzeitiger Zunahme des Wachstum von Luftmyzels zu.

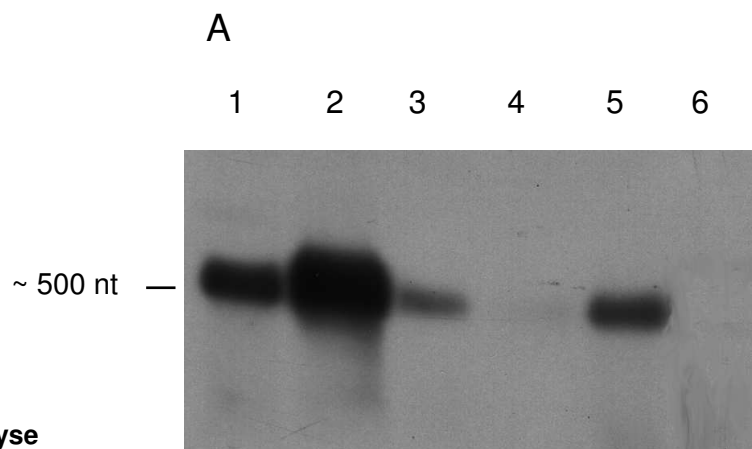
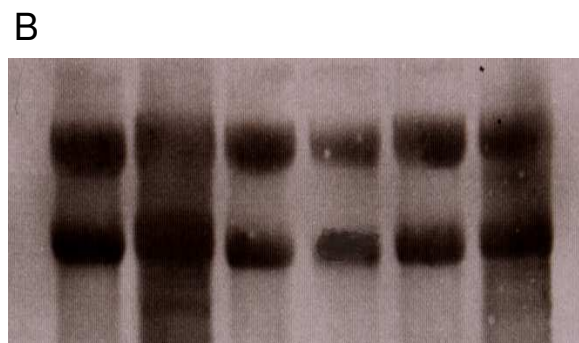


Abb. 21: Die Northern Blot-Analyse zeigt die differenzielle Expression von *T.t.hyd1*. Gesamt-RNA wurde aus vegetativ wachsenden Flüssig- und Agarplattenkulturen, sowie auch aus frischen Fruchtkörpern isoliert. **(A)** Die aufgetragene Gesamt-RNA aus (1) 4 wöchiger Flüssig-, (2) 2 wöchiger Agarplatten-, (3) 2 wöchiger Flüssig-, (4) 1 wöchiger Flüssig-, (5) 3 wöchiger Flüssigkultur und (6) Fruchtkörper wurden mit der *T.t.hyd1* (cDNA)-Sonde hybridisiert. **(B)** Zur Kontrolle der RNA-Mengen wurde eine Methylenblau-Färbung des Northern Blots durchgeführt.



3.7 Quantifizierung des *T.t.hyd1*-Transkripts in der Mykorrhiza mittels kompetitiver RT-PCR

Um zu untersuchen, ob das gereinigte Hydrophobin eine spezifische Funktion für die Ektomykorrhizabildung besitzt, wurde die Expression nicht nur in verschiedenen vegetativen Myzelien (siehe 3.6), sondern auch in Mykorrhiza untersucht. Wegen der geringen Materialmengen eignen sich für solche Untersuchungen allerdings nur Methoden mit geringer Nachweisgrenze. Daher wurde die Expression und Quantifizierung des *T.t.hyd1*-Transkripts in Mykorrhiza mittels kompetitiver RT-PCR untersucht. Gleichzeitig wurden kompatible und inkompatible Interaktionen verglichen, indem Mykorrhizen von *T. terreum* mit *Pinus sylvestris* (kompatibel) und *Picea abies* (inkompatibel) eingesetzt wurden.

Aus beiden Mykorrhiza-Gewebe etwa gleicher Entwicklungsstadien wurde Gesamt-RNA (~100 ng) isoliert, die für die anschließende reverse Transkription eingesetzt wurde. Da die Mykorrhiza als symbiotisches Gewebe aus pilzlichem und pflanzlichem Gewebe zusammengesetzt ist, war eine Kallibrierung der effektiven Menge an pilzlicher, revers transkribierter RNA für die weitere RT-PCR unerlässlich. Die Quantifizierung des Anteils an pilzlicher RNA aus beiden Mykorrhizen wurde über Amplifikationen der 18S rRNA erreicht. Die NS1 und NS8-Primer (Tab. 3) erzeugten für pilzliche und pflanzliche Gewebe Fragmente, die etwa 1700 bp groß waren. Ein Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Mbol* ließ verschiedene Fragmente im Agarosegel erscheinen, die eine eindeutige Unterscheidung von pflanzlicher und pilzlicher cDNA zuließ (Abb. 22 A). Über

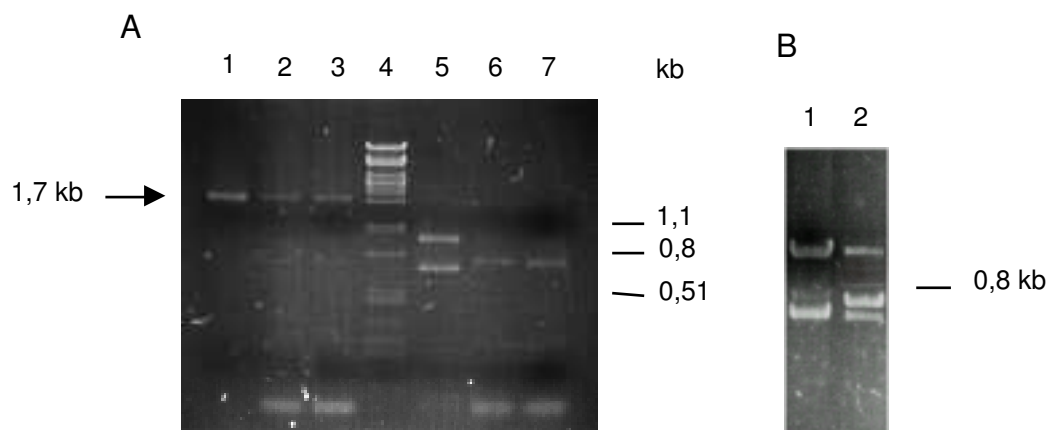


Abb. 22: Amplifikation der 18S rRNA. (A) *T. terreum* (Spur 1), *P. sylvestris* (Spur 2), *P. abies* (Spur 3) und die Restriktion mit *Mbol* der Fragmente von *T. terreum* (Spur 5), *P. sylvestris* (Spur 6) und *P. abies* (Spur 7), Spur 4: DNA-Größenmarker. **(B)** Amplifikation und Restriktion mit *Mbol* der 18S rRNA der kompatiblen *T. terreum/P. sylvestris*- (1) und der inkompatiblen *T. terreum/P. abies*-Interaktion (2).

die Mengen an amplifizierter, geschnittener 18S rRNA wurde errechnet, wieviel cDNA für beide RT-PCR-Reaktionen eingesetzt werden mußte. So ergab die Amplifizierung und Restriktion, daß für die (inkompatible) RT-PCR-Reaktion im Vergleich zur (kompatiblen) Reaktion die ca. 1,6-fache Menge an cDNA eingesetzt werden mußte (Abb. 22 B). Durch kompetitive RT-PCR konnte dann die Menge der *T.t.hyd1*-Transkripte in der kompatiblen Interaktion relativ zu den Transkriptmengen der inkompatiblen bestimmt werden. Den PCR-Ansätzen wurde zusätzlich zur cDNA ein interner Standard unterschiedlicher Mengen Kompetitor-DNA zugesetzt. Diese Kompetitor-DNA weist ebenfalls Bindestellen für die jeweiligen spezifischen Primer (Hydstart1+Hydstopp1, Tab. 3) auf, führt aber zu einem 150 bp größeren, gelelektrophoretisch unterscheidbaren PCR-Produkt. Als Kompetitor-DNA wurde hier die genomische DNA verwendet. Die Kompetitor-DNA konkurriert mit der cDNA um die Oligonukleotid-Primer. Anhand der erhaltenen DNA-Mengenverhältnisse von amplifizierter (zuvor in definierten Mengen zugesetzter) Kompetitor-DNA und cDNA-Fragmente kann innerhalb eines PCR-Ansatzes in Ethidiumbromid-gefärbten Gelen auf die Menge der vorhandenen *T.t.hyd1*-Transkripte geschlossen werden (Abb. 23). Konstante Mengen cDNA zusammen mit der abnehmenden Mengen Kompetitor-DNA führen dabei zu einem stärker werdenden Signal der amplifizierten cDNA (untere Bande) und einer abnehmenden Signalstärke des amplifizierten Kompetitors (obere Bande).

Die Ergebnisse der kompetitiven RT-PCR-Experimente sind wie folgt zusammenzufassen: Die Transkriptmenge des *T.t.hyd1*-Gens der kompatiblen Mykorrhiza war etwa achtfach stärker exprimiert als das Transkript der inkompatiblen Mykorrhiza (Tab. 6). Dieses Ergebnis belegt die Annahme, das es in der kompetenten Interaktion zu einem deutlichen Anstieg der Expression des Hydrophobin-Gens kommt. Genauere Transkriptmengenangaben von *T.t.hyd1* in der Mykorrhiza wären nur dann möglich, wenn eine getrennte Quantifizierung des pilzlichen Hyphenmantels und des Hartig'schen Netzes erfolgen könnte. Noch bessere Auflösung kann nur durch den Nachweis *in situ* erfolgen, was allerdings durch Immunfluoreszenz als Nachweis des Proteins leichter zu handhaben ist, als ein Nachweis des Transkripts *in situ*.

Tabelle 6: Relative Mengen des Transkripts *T.t.hyd1* der kompatiblen und inkompatiblen Mykorrhiza.

	kompatible Interaktion	inkompatible Interaktion
<i>T.t.hyd1</i>	~ 0,4 pg	~ 0,05 pg

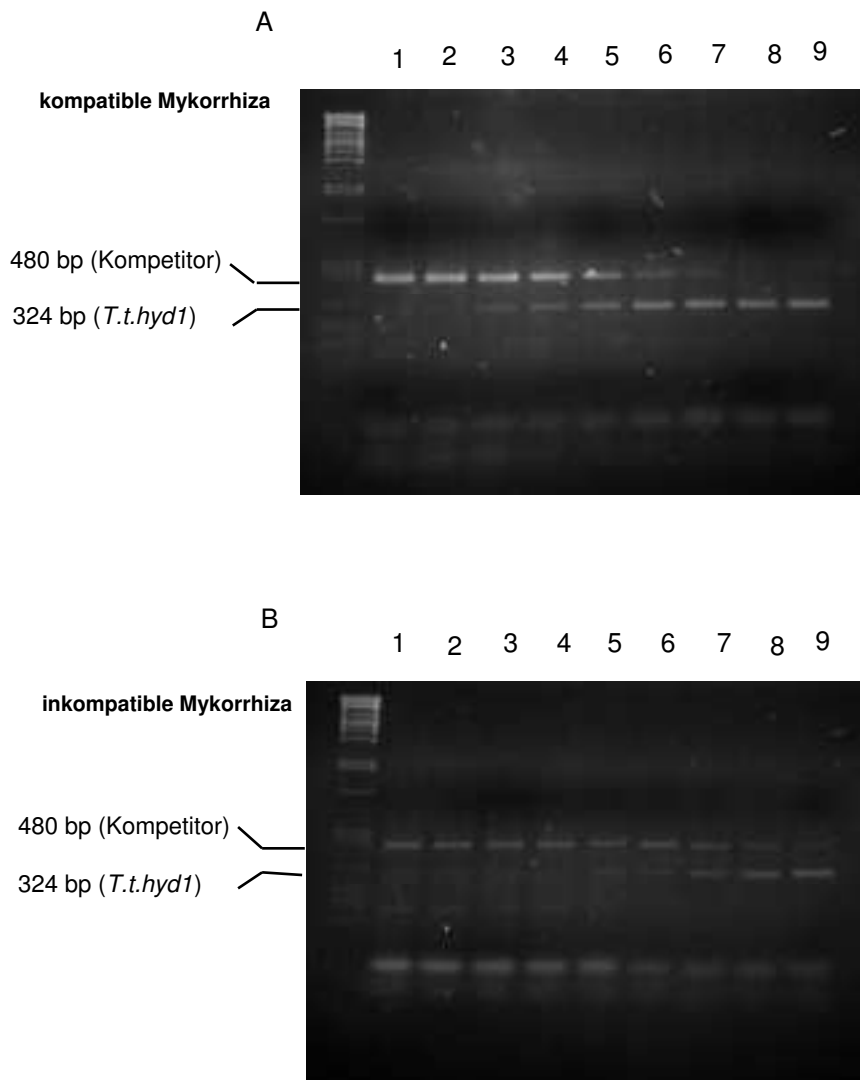


Abb. 23: Bestimmung der cDNA-Mengen von *T.t.hyd1* in Mykorrhiza mit Hilfe kompetitiver RT-PCR. RNA wurde aus der **(A)** kompatiblen *T. terreum*/Kiefer- und der **(B)** inkompatiblen *T. terreum*/Fichte-Mykorrhiza isoliert, die unter axenischer Kultur synthetisiert wurden. Spuren M: DNA-Größenmarker. Konstante Mengen cDNA wurden mit abnehmenden Mengen Kompetitor-DNA gemischt. Für die Reaktionen in den Spuren 1-9 wurden 100, 50, 10, 1, 0,5, 0,2, 0,05, 0,03 und 0,01 pg Kompetitor-DNA zu gegeben. Die oberen Banden zeigen jeweils die mit Kompetitor-DNA erhaltenen PCR-Produkte, die unteren Banden, die mit cDNA erhaltenen PCR-Produkte.

3.8 Immunlokalisierung von *T.t.hyd1* in *T. terreum*

Um zu unterscheiden, ob Akkumulation des Proteins auf einen speziellen Zelltyp in der Mykorrhiza beschränkt ist, mußten *in situ*-Analysen durchgeführt werden. Mit Hilfe der Antikörper, die gegen das Sc3-Hydrophobin aus *S. commune* stammten, war es möglich, das *T.t.hyd1*-Protein *in situ* zu lokalisieren. Für die Etablierung der Lokalisierungsexperimente wurde eine *T.terreum*-Flüssigkultur verwendet, die Luftmyzel entwickelt hatte. In den Myzelien wurde eine Immunlokalisierung mit Anti-Sc3 und einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper durchgeführt. Gleichzeitig wurde Tubulin in den Zellen nachgewiesen, um die Permeabilisierbarkeit der Zellen zu zeigen (Abb. 24 A). *T.t.hyd1* konnte an der Hyphenoberfläche detektiert werden (Abb. 24 B). Myzel, das keine Lufthyphen entwickelt hatte, zeigte keine Reaktion (nicht dargestellt).

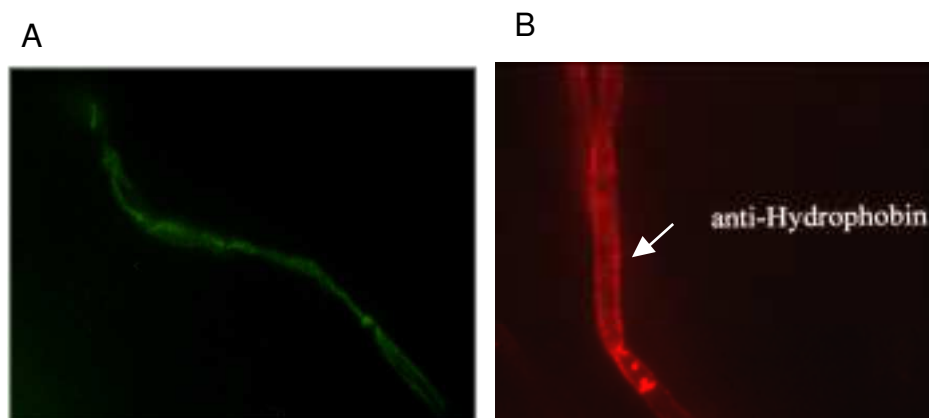


Abb. 24: *In situ*-Lokalisierung von Tubulin und *T.t.hyd1* in Hyphen. (A) Immunfluoreszenz der Tubulinstränge in Hyphen mit Anti-Tubulin-Antikörper (□). **(B)** Lufthyphen in der Immunfluoreszenz mit Anti-Sc3-Antikörper gefärbt (□).

3.9 *T.t.hyd1*-Akkumulation im Hartig'schen Netz der kompatiblen Ektomykorrhiza

Zum Nachweis des *T.t.hyd1*-Proteins *in situ* wurden kompatible und inkompatible Mykorrhiza von *T. terreum* eingesetzt. Mit Hilfe des anti-Sc3-Antiserum wurde *T.t.hyd1* in den Wurzelschnitten der Mykorrhiza detektiert. Während in der inkompatiblen Interaktion Fluoreszenz fast nur im Hyphenmantel auftrat, wurde in der kompatiblen Interaktion auch Fluoreszenz im Hartig'schen Netz gefunden (Abb. 25). Es konnte Akkumulation von *T.t.hyd1* in den Zellwänden der Hyphen innerhalb der Strukturen des Hartig'schen Netzes der kompatiblen Assoziation von *T. terreum* und der Kiefer (*Pinus sylvestris*) beobachtet werden (Abb. 25 A + C). Diese Fluoreszenz war in Schnitten der inkompatiblen Interaktion der Fichte *Picea abies* nicht vorhanden (Abb. 25 E).

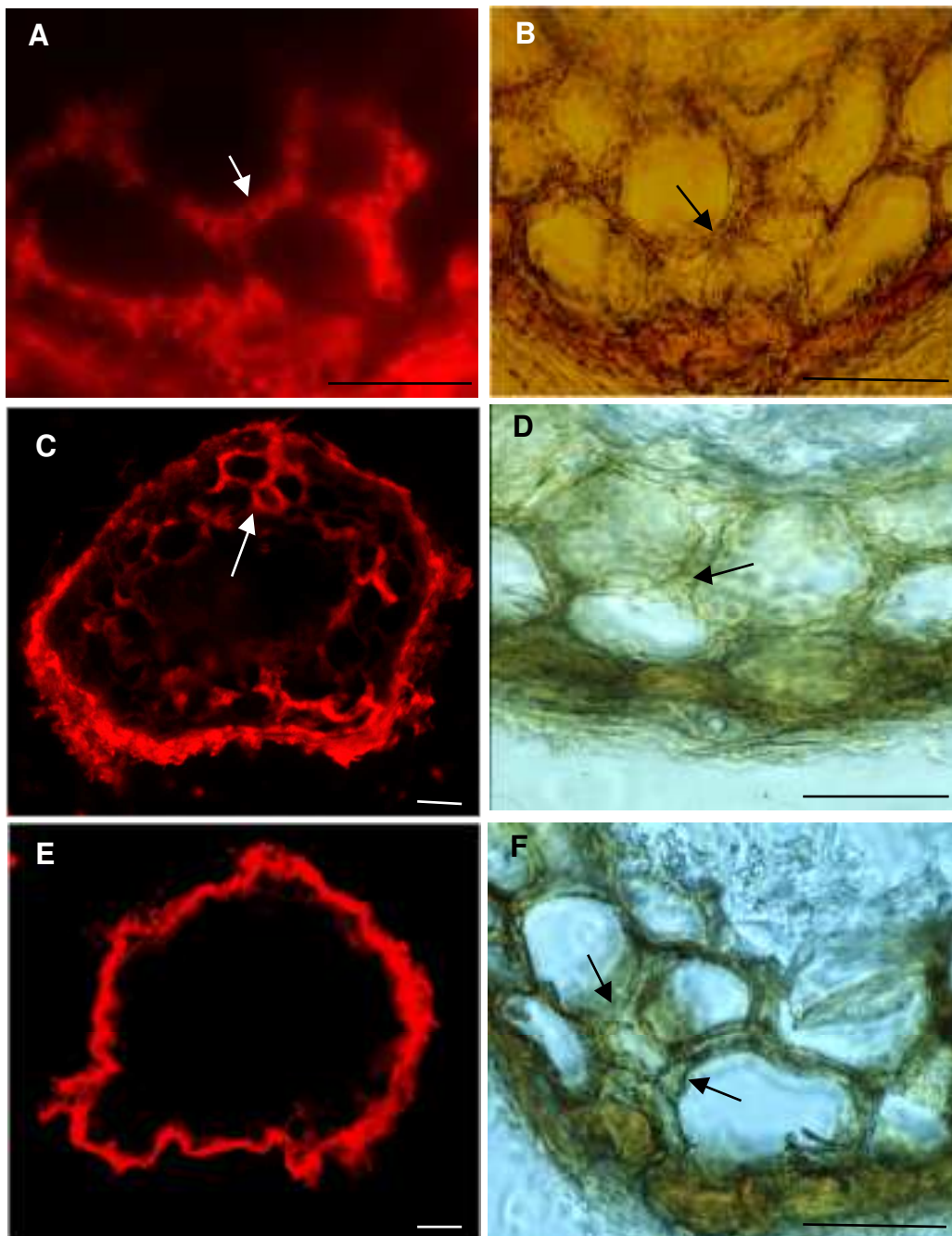


Abb. 25: Hydrophobin-Akkumulation in der Mykorrhiza. Inkompatible (*Picea abies*; **E, F**) und kompatible (*Pinus sylvestris*; **A, B, C, D**) Interaktionen von *T. terreum* mit den beiden Wirtsbäumen wurde untersucht. Hartig'sches Netz (□). Immunlokalisierung mit anti-Sc3-Antiserum in mykorrhizierten Wurzelquerschnitte wird in (**A, C, E**) gezeigt, sowie die Schnitte zum Vergleich im Phasenkontrast (**B, D, F**). Größenbalken=100µm.

V. Diskussion

Systematik innerhalb der Gattung *Tricholoma*

Die Verwendung der ribosomalen RNA-Gene für phylogenetische Untersuchungen hat sich bereits in vielen Fällen bewährt. So dienten die ITS Sequenzen zur Unterscheidung von Arten und Gattungen innerhalb der Heterobasidiomyceten (Zambino and Szabo, 1993), der Deuteromyceten (Jasalavich *et al.*, 1995; Sherriff *et al.*, 1994) und insbesondere auch von *Phytophthora*-Arten (Cooke and Duncan, 1997; Lee and Taylor, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden die ITS-Sequenzen daher verwendet, um phylogenetische Analysen innerhalb der bisher schlecht aufgelösten Gattung *Tricholoma* (Kost, 1981; Kühner, 1980; Singer, 1986) durchführen zu können.

Die Primer ITS1 und ITS4 wurden zur Amplifikation der ITS-Regionen von 13 Arten des Ektomykorrhizapilzes *Tricholoma* verwendet. Die Größe der ITS-Region war innerhalb der Gattung *Tricholoma* uniform, differierte dagegen bei anderen Gattungen wie *S. commune* und *Cortinarius*. Der resultierende, phylogenetische Stammbaum der sequenzierten ITS-Fragmente konnte diese distanzierte Gruppierung von *Tricholoma* zur Gattung *Cortinarius* aufzeigen, die in neueren Untersuchungen der Gattung *Cortinarius* zudem bestätigt wurden (Hoiland and Holst-Jensen, 2000). Eine enge Verwandtschaft beider Gattungen wurde von Hoiland (1984) vorgeschlagen, da Arten von *Tricholoma* wie *T. equestre* verwandte Typen des Pigments Anthraquinoid (Gill and Steglich, 1987) und gleiche morphologische Aspekte wie den Lamellentypus der Fruchtkörperhüte zu Arten der Gattung *Cortinarius* aufwiesen. Diese morphologischen Ähnlichkeiten beider Gattungen, vermuten Hoiland und Holst-Jensen (2000), haben sich wahrscheinlich unabhängig voneinander in Anpassung an trockene, kalkige oder auch reiche Waldböden entwickeln können. Zudem zeigten chemische Untersuchungen, daß das Pigment Anthraquinoid in *Tricholoma* und *Cortinarius* als Stereoisomere vorliegen und somit auf verschiedenen Biosynthesewegen hergestellt werden müssen (Gill and Steglich, 1987).

Zur Analyse wurden zunächst nur Fruchtkörper und Kulturen aus Sporen verwendet, die eine sichere Identifizierung zuließen. Das erlaubte eine Analyse, die auf einer eigenen, morphologischen Bestimmung der Taxa beruhte. Zusätzlich wurden auch Stämme verwendet, die u. a. von verschiedenen Kultursammlungen als *Tricholoma*-Arten bezogen waren. Die Durchführung der Analyse mit Isolaten gleicher taxonomischer Einteilung zeigte eine deutliche Abweichung bei einigen der kultivierten Isolate. Es ist anzunehmen, daß die gewonnenen, molekularen Daten ausreichen, die offensichtlich falsche Kennzeichnung der bezogenen Stämme zu belegen. Diese Kulturstämme besitzen keine Kriterien für eine morphologische Identifizierung, denn *Tricholoma* kann als obligater Mykorrhiza-Pilz keine Fruchtkörper in axenischer Kultur ausbilden.

Die ITS-Sequenzanalyse der sechs *T. terreum*-Stämme, die aus verschiedenen Regionen Deutschlands und Österreichs sowie aus Stammsammlungen bezogen worden waren, konnten trotz verschiedener Ursprungsgebiete eine hohe Sequenzhomologie innerhalb des ITS aufzeigen. Die Homologien beschränkten sich dabei nicht nur auf die konservierte 5.8S rRNA, sondern konnten auch in den angrenzenden ITS1- und ITS2-Bereichen gefunden werden. Trotz der großen Homologie ließ sich eine Nukleotiddivergenz über den gesamten Bereich von insgesamt 5,3% für einen Stamm beobachten, jedoch finden sich noch höhere Divergenzen in einem bei *S. commune* untersuchten Biosynthesegen wieder (Lengeler and Kothe, 1994). Eine Verwandtschafts-Analyse der ITS-Sequenzen, die innerhalb verschiedener Arten und Herkunftsbereiche der Gattung *Phytophthora* durchgeführt wurde, konnte im Vergleich zur in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchung einen höheren Grad an Homologie der ITS-Sequenzen aufweisen (Cooke and Duncan, 1997). Diese offensichtliche Differenz könnte eventuell darauf zurückgeführt werden, daß im Genom eine inhomogene Weitergabe der rRNA-Gene durch Genkonversion stattfindet, die die auftretenden Nukleotiddivergenzen der verschiedenen ITS-Sequenzen verursacht haben könnte (Li and Graur, 1991).

Die phylogenetische Untersuchung bewies zudem eine Unterteilung der Gattung *Tricholoma* in mehrere Gruppierungen: *T. scalpturatum* gehört derselben Gruppe wie *T. terreum* an, bildet aber eine eigene, distanzierte Verzweigung. Diese Arten zeigen eine graue Färbung der Fruchtkörperhüte, wobei die Farbe des Hutes in der Natur von weißlich bis dunkelgrau variiert. Die zweite Gruppe besteht aus *T. nictitans*, *T. orirubens*, *T. pseudonictitans* und *T. vaccinum* mit einer bräunlichen, rötlichen oder gelblichen Hutfarbe. Die Arten *T. portentosum* und *T. sejunctum* besitzen gelblich gefärbte Fruchtkörper und bilden ein dritte unabhängige Gruppe.

Bisher werden morphologische Kriterien zur Einteilungen in übergreifende Sektionen innerhalb der Gattung *Tricholoma* herangezogen. Die wichtigen Sektionen, *Tricholoma* (wie *T. equestre*, *T. portentosum* und *T. sejunctum*), *Atrosquamosa* (mit *T. argyraceum*, *T. orirubens*, *T. scalpturatum* und *Tricholoma terreum*), *Imbricata* (für *T. imbricatum* und *T. vaccinum*) und *Albobrunnea* (mit *T. batschii*, *T. nictitans* und *T. pseudonictitans*) stimmen nicht mit den Einteilungen aufgrund molekularer Daten dieser Studie überein. Die Einteilung und Festlegung der Sektionen basierend auf morphologischen Aspekten wie Färbung und Charakter des Fruchtkörpers vorgenommen (Kost, 1981). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Anlaß zur neueren Diskussionen der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattung *Tricholoma*.

***Tricholoma* bildet in axenischer Kultur Mykorrhiza aus**

Die symbiotische Struktur des dikaryotischen *T. terreum*-Stamm mit dem natürlichen Wirt *Pinus sylvestris* bestand aus einem weißlichen, dichten Hyphenmantel und in lichtmikroskopischen Aufnahmen von Schnitten ließ sich ein ausdifferenziertes Hartig'sches Netz erkennen. In der Entwicklung der Mykorrhiza kolonisierten erste Hyphen nach etwa 30 Tagen axenischer Dualkultur die interzellulären Bereiche der corticalen Kurzwurzelzellen. Diese primären Hyphen, deren Hyphenwachstum eine apikale Dominanz besitzt, waren noch langgestreckt und wenig verzweigt. Eine ausgeprägte Rhizomorphenentwicklung, wie sie häufig bei Mykorrhizabildungen angetroffen wird, konnte in den axenischen Kulturen nicht beobachtet werden. Dennoch ließen sich grundsätzlich Ansätze einer Rhizomorphendifferenzierung erkennen, wie sie auch von Agerer (1988) beschrieben worden. Es konnte dabei das typische Verzweigungsmuster der Rhizomorphenentwicklung beobachtet werden. Parallel zur Entwicklung des Hartig'schen Netzes differenzierte sich der Hyphenmantel zu einem dichten Plektenchym mit einer viellagigen, dichten Hyphenschicht. Die wachsende Hyphenfront führte zur kompletten Umschließung und Separation der corticalen Rindenzellen. Es bildete sich in der Regel eine einlagige Hyphenschicht aus. Kottke und Oberwinkler (1985) beschrieben bei *Amanita muscaria* eine Veränderung der Hyphenmorphologie, bevor überhaupt eine Penetration der Interzellularräume erfolgte. Bei *T. terreum* ließ sich diese Strukturveränderung nachvollziehen, indem starke Verzweigungen und ein fingerartiges Wachstum der Hyphen zu beobachten war. Diese, als Palmettistrukturen bezeichnete, morphologische Erscheinungsform der Hyphen im Hartig'schen Netz wurde auch für andere Ektomykorrhizapilze beschrieben (Massicotte, 1990).

Die symbiotische Assoziation, die vom hergestellten Monokaryon MK-2 mit *Pinus sylvestris* gebildet wurde, ließ Ansätze einer differenzierten Ektomykorrhiza erkennen. Das zeigte sich in der Ausbildung eines dichten Hyphenmantels an wenigen, schwächer besiedelten Kurzwurzeln, die jedoch in lichtmikroskopischen Aufnahmen von Schnitten keine vollständige Separation der Corticalzellen erkennen ließ. Diese Entwicklungsstufe des Hartig'schen Netzes wäre als ein Typ I- zu bezeichnen, bei dem eine Penetration der Hyphen stattfindet, aber keine vollständigen Separationen der corticalen Wurzelzellen beobachtet wird. In der Interaktion des dikaryotischen Stammes mit *P. sylvestris* läßt sich dagegen ein Typ III beobachten, der die komplette Separation und eine Umschließung der äußeren corticalen Zellen zeigt (Wong *et al.* , 1989).

In der Literatur wird die Mykorrhizierungsfähigkeit von Monokaryen und Dikaryen kontrovers diskutiert. Es konnte bei *Laccaria bicolor* und *Hebeloma cylindrosporum* beobachtet werden, daß sich die Bildung einer differenzierten Mykorrhiza nicht ausschließlich auf den dikaryotischen Zellzustand begrenzen läßt. Von beiden Gattungen konnten bisher viele, aus Sporen gekeimte monokaryotischen Isolate beschrieben werden, die die Fähigkeit zur Bildung von Mykorrhiza zeigten. Daß das nicht immer der Fall ist, konnte von Ducamp *et al.* (1986) beobachtet werden, dessen Monokaryen aus gekeimten Sporen von *Suillus granulatus* unfähig waren,

mykorrhizierende Strukturen zu entwickeln, während die heterokaryotischen Kulturen die normale Assoziation ausbildeten. In anderen Studien über Mykorrhiza-Differenzierung von *Tuber melanosporum* vermuteten die Autoren Fasalo-Bonfante und Brunel (1972), daß die sich aus gekeimten Sporen entwickelnden Hyphen zwar monokaryotisch seien, jedoch im Myzelium des Hyphenmantels der Mykorrhiza der heterokaryotische Zellzustand vorlag. Rouquerol und Payre (1974) schloßen daraus, daß in der Natur die aus Sporen entstandenen, monokaryotischen Hyphen zuerst mit kompatiblen Hyphen fusionierten, um den dikaryotischen Zellzustand zu erreichen, bevor eine Mykorrhiza-Differenzierung überhaupt erfolgte. Kropp und Fortin (1986) konnten zeigen, daß auch monokaryotische Kulturen eine voll differenzierte Ektomykorrhiza bildeten, die von Protoplasten des Dikaryon von *Laccaria bicolor* abstammten. Diese Myzelien konnten auch in Kreuzungsexperimenten eingesetzt werden. Es zeigte sich also bisher, daß Ektomykorrhizapilze nicht generell mit jedem Monokaryon, das aus einer heterokaryotischen, mykorrhizierenden Kultur hervorging, die Fähigkeit zur Ausbildung der Symbiose besteht. Vielmehr sind diese Isolate individuell verschieden wie u. a. bei *Hebeloma crustuliniforme*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctoris* und *Thelephora terrestris* beobachtet werden konnte (Giltrap, 1982; Kropp and Fortin, 1988; Laiho, 1970; Dixon *et al.*, 1987; Marx and Bryan, 1971).

Eine Unterscheidung kompatibler und schwach kompatibler Interaktionen stellte die Braunfärbung der Rindenzellen dar. Molina und Trappe (1982), Malajczuk (1984) und Duddrigde (1986) beschrieben, daß Akkumulationen von phenolischen Verbindungen in Wurzelzellen, wie auch eine vermehrte Lignifizierung der Zellwände, hauptsächlich mit nicht oder nur schwach mykorrhizierenden Stämmen auftreten können. Diese phenolischen Verbindungen können u. a. Tannine sein, die in pflanzlichen Zellen Teil der Pathogenabwehr sind. Zellschichten, in denen Tannine angereichert sind, können als Barriere für einen kolonisierenden Pilz wirken. Daher sind solche Phänomene speziell in der Wurzel-Interaktion mit inkompatiblen, pilzlichen Arten beobachtet worden (Molina, 1981). So findet sich auch eine vermehrte Ansammlung von Tanninen in den Corticalzellen der Interaktion des monokaryotischen Stamm MK-2 und macht damit die auftretende, nur schwach kompatible Interaktion bei Kolonisierung des Wirtes deutlich. Im Einklang damit konnte die vollständige Differenzierung des Hartig'schen Netzes nicht beobachtet werden. Die dikaryotische Interaktion *T. terreum*-*P. sylvestris* zeigte dagegen nur vereinzelt, mit Tanninen gefüllte Zellen, die auch auf Trockenstreß der Wurzel zurückzuführen sein können.

Während viele Arten der Gattung *Tricholoma* ein breites Wirtsspektrum aufweisen, ist *T. terreum* fast ausschließlich auf einen Wirt begrenzt. So findet man in der Natur den grauen Ritterling hauptsächlich mit der Kiefer *Pinus sylvestris* assoziiert. Fruchtkörper bildet *T. terreum* als obligater Ektomykorrhizapilz nur in dieser Interaktion, die hier als "kompatibel" bezeichnet werden soll. Mykorrhizierungen in axenischer Kultur mit der "kompatiblen" Kiefer und der "inkompatiblen" Fichte *Picea abies* konnten zeigen, daß eine Wirtsspezifität *in vitro* nicht uneingeschränkt mit der Wirtsspezifität *in vivo* gleichzusetzen ist (Read, 1991; Duddrigde, 1986).

In der *T. terreum-Picea abies*-Interaktion konnte eine Ausbildung der Mykorrhiza nach 3-4 Monaten Dualkultur beobachtet werden, während die Entwicklung der "kompatiblen" Mykorrhiza in nur etwa 6 Wochen gelang. In der "inkompatiblen" symbiotischen Struktur selbst läßt sich zudem lichtmikroskopisch erkennen, daß das Hartig'sche Netz weniger dicht entwickelt ist und feinste Palmettistrukturen der Hyphen fehlen (Genenger, 1997). Diese Interaktion könnte man dementsprechend nur als "schwach kompatibel" anstatt "inkompatibel" bezeichnen. Die Möglichkeit eines Wirtswechsels von *T. terreum* wäre zudem laut Kost (1981) denkbar, wenn die Wirte einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen. Da die Fichte, wie auch die Kiefer der Familie der *Pinaceen* angehören, könnte hier ein solcher Wirtswechsel möglich sein. Dies könnte in weiteren Untersuchungen überprüft werden, indem Interaktionen mit anderen den *Pinaceen* angehörigen Baumarten durchgeführt würden.

Identifizierung des T. t. hyd1-Hydrophobins aus *T. terreum*

Die Identifizierung, Reinigung und Sequenzierung des Proteins T.t.hyd1 ergab eine signifikante Ähnlichkeit mit einer Klasse von pilzlichen Polypeptiden, die als Hydrophobine bezeichnet werden. Diese Hydrophobine sind kleine, sekretierte, überwiegend hydrophobe Proteine, die ein konserviertes Aminosäuremotiv von acht Cystein-Resten in einer bestimmten Abfolge besitzen (Wessels, 1993, 1994; 1996, 1997; Kershaw and Talbot, 1998). Die Proteine werden entweder in das Medium abgegeben oder sind in der Zellwand verankert zu finden. Hydrophobin-Ansammlungen lösen die verstärkte Hydrophobizität der Hyphenoberfläche aus, was eine Adhäsion an eine Wirtsoberfläche oder auch eine Aggregation der Hyphen erlaubt (Wösten *et al.*, 1994). Hydrophobine wurden lange Zeit nicht detektiert, da sie als dicht gepackte Zellwand-Polymere starke Oxidationsmittel wie konzentrierte Performsäure oder Trifluoressigsäure zur Lösung benötigten (de Vries *et al.*, 1993). Daher wurden diese stark unlöslichen Proteine erst durch Sequenzierungen von cDNA-Sequenzen gefunden, die in unterschiedlichen Stadien der pilzlichen Entwicklung spezifisch exprimiert waren (Wessels, 1993, 1997). Diese Hydrophobin-Gene wurden zuerst bei dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* entdeckt, in dem gezielt nach Genen des Lufthyphen-spezifischen Wachstums gesucht wurde (Wessels *et al.*, 1991). Seitdem konnten Hydrophobin-ähnliche Proteine bisher in 20 verschiedenen Ascomyceten- und Basidiomyceten-Arten beschrieben werden (de Vries *et al.*, 1993; Kershaw and Talbot, 1998). Sie werden im Lufthyphen-Wachstum (Wessels, 1997), in der Fruchtkörper- und Konidientwicklung (Wessels *et al.*, 1991; Stringer *et al.*, 1991) zur Pathogenität (Talbot *et al.*, 1993), und in der Symbiose (Martin *et al.*, 1995; Tagu *et al.*, 1996) spezifisch exprimiert. Bereits aus dieser Aufzählung wird klar, daß Hydrophobine viele Funktionen in verschiedenen Pilzen besitzen und auch, daß innerhalb einer einzelnen Art unterschiedliche Funktionen von verschiedenen Hydrophobinen wahrgenommen werden. So werden sie auch von einigen

biotrophen Pilzen benutzt, um mittels Oberflächeninteraktionen einen pflanzlichen oder tierischen Wirt zu infizieren, und kürzlich wurde eine wichtige Rolle in der Ektomykorrhiza bestätigt. (Tagu *et al.*, 2000).

T.t.hyd1 wird, wie das Hydrophobin Sc3 von *S. commune* als Monomer, bei in Wachstum in einem Glucose-haltigen Medium in das Kulturmedium sekretiert. Dabei beginnen Hyphen, nachdem sie ein größeres Volumen an Substratmyzelium entwickelt haben, das Hydrophobin direkt von den wachsenden Hyphenspitzen in das Medium abzugeben (Wösten *et al.*, 1994). In Abwesenheit des Hydrophobins erfolgt das Wachstum unterhalb der Oberfläche, denn ein Wachstum aus dem Medium ist durch die hohe Oberflächenspannung der Wasser-Luft-Grenzschicht nicht möglich. Sekretiertes Hydrophobin aggregiert an der Wasser-Luft-Grenzschicht und führt zu einer Verringerung der Oberflächenspannung, so daß Hyphen die Mediumoberfläche durchbrechen können, um in die Luft zu wachsen. Die Hyphen sind dabei mit einer aggregierten Hydrophobin-Schicht des Hydrophobins Sc3 bedeckt (Wessels, 1991). Die hydrophobe Seite dieser Zellwandauflagerung befindet sich an der Hyphen-abgewandten Seite, zur Luft hin, um die Hydrophobizität der Lufthyphen zu gewährleisten (Wösten and Wessels, 1997; Wessels, 1999).

Die Fähigkeit zu unterschiedlichen Löslichkeiten in SDS, ließ eine Einteilung von Hydrophobinen in zwei Klassen zu. Klasse I Hydrophobine bilden Protein-Komplexe aus, die unlöslich in heißem SDS sind. Die Akkumulate von Klasse II Hydrophobinen unterscheiden sich durch eine Löslichkeit in SDS und besitzen zudem eine andere Anordnung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäurereste gegenüber den Klasse I Hydrophobinen (Wessels, 1994). *T.t.hyd1* ist eindeutig als ein Klasse I Hydrophobin einzustufen, da eine Unlöslichkeit der Aggregate in heißem SDS besteht und zudem die charakteristische Anordnung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäurereste in Hydrophobizitätsanalysen eines Klasse I-Protein gefunden werden kann. Typische Vertreter der Klasse II Hydrophobine sind Cerato-ulmin (Stringer and Timberlake, 1993) und Cryparin (Zhang *et al.*, 1994), die von den pflanzenpathogenen Pilzen *Ophiostoma ulmi* und *Cryphonectria parasitica* herrühren. Beide Hydrophobine konnten mittels Immunfluoreszenz in Zellwänden der Lufthyphen von *C. parasitica* und *O. ulmi* lokalisiert werden. (Carpenter *et al.*, 1992). Eine Lokalisierung von *T.t.hyd1* mit Hilfe des *S.commune* Antiserum, das gegen das lufthyphen-spezifische Sc3 Hydrophobin gerichtet war, konnte auch *T.t.hyd1* in Zellwänden von Lufthyphen nachweisen. Es konnte somit ermittelt werden, daß *T.t.hyd1* nicht nur im Medium zu finden ist, sondern auch als Aggregat in Zellwänden der Lufthyphen von *T. terreum* vorliegt.

Die starke Unlöslichkeit der aggregierten Klasse I-Hydrophobine, war für die Identifizierung von Hydrophobin-Genen wie hier *T.t.hyd1* aus *T. terreum* von großem Vorteil. Die sekretierten Hydrophobin-Monomere von vegetativ gewachsenen Kulturen wurden durch starkes Vermischen mit Luft zu Protein-Komplexen akkumuliert. Nach dem Entfernen nahezu aller Proteine durch Extraktionen mit heißem SDS sind Hydrophobine fast die einzigen, verbleibenden Proteine. Die

aggregierten *T.t.hyd1*-Hydrophobine erfahren anschließend eine Behandlung mit Trifluoressigsäure, um eine Solubilisierung in Monomere zu erreichen. In der SDS-PAGE konnte so eine 23 kDa große Bande identifiziert und isoliert werden. Die N-terminale Sequenz der acht ersten Aminosäuren des Proteins wurde benutzt, um degenerierte Primer basierend auf der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu synthetisieren. Zusammen mit einem Oligo-dT-Primer, der zur Synthese der kodierenden DNA-Sequenz der mRNA benötigt wird, wurde mit Hilfe von RT-PCR das korrespondierende Gen *T.t.hyd1* isoliert. Eine ähnliche Technik wurde auch bei der Identifizierung eines dritten Hydrophobins aus *Agaricus bisporus* (Lugones *et al.*, 1998) und für mehrere Hydrophobin-Gene in *Pleurotus ostreatus* (Asgeirsdottir *et al.*, 1998; Penas *et al.*, 1998) angewendet.

Charakterisierung des *T. t. hyd1*-Hydrophobins

Die Identifizierung des korrespondierenden Gens ließ die vollständige Ermittlung der chromosomalen Struktur des Genortes zu. Das offene Leseraster von *T.t.hyd1* umfaßt 324 bp und kodiert für ein 108 Aminosäure großes Protein. Im Promotorbereich des Gens findet sich zwischen Position 1650 und 1655, d. h. 119 Nukleotide stromaufwärts vom Translationsstart eine mögliche TATA-Box, die für Transkriptionsinitiation eine wichtige Rolle spielen kann (Nussinov, 1990). In dem Promotor-Bereich von *T.t.hyd1* ist 169 Nukleotide (Position 1600-1605) vor dem Translationsstartpunkt eine CCAAT-Box zu erkennen, deren Motiv auch bei vielen anderen eukaryotischen Genen auftritt, aber gewöhnlich zwischen Position -70 und -90 vom Transkriptionsstartpunkt zu finden ist und für eine erhöhte Transkriptionsrate erforderlich sein kann (Benoist *et al.*, 1980).

Der nicht translatierte 3'-Bereich des Gens *T.t.hyd1* umfaßt 94 bp. Ein für Eukaryonten typisches Polyadenylierungssignal (AATAAA, Zaret and Sherman, 1982) ist in diesem Bereich nur in der Form AATTA AA 10 bp stromaufwärts vom Poly(A)-Schwanz zu erkennen. Die Intron-Positionen wurden durch Vergleiche der cDNA und der genomischen Sequenz ermittelt. Das *T.t.hyd1* Leseraster wird von zwei Introns unterbrochen, was für Klasse I Hydrophobine eine unübliche Anzahl bedeutet. Alle bisher charakterisierten, aus Basidiomyceten stammenden Hydrophobine weisen drei Introns auf. Diese wiederkehrende Anzahl an Introns entspricht der Hypothese, daß Introns bei pilzlichen Genen einer Genfamilie, aber in verschiedenen Spezies, in konservierter Position auftreten können (Unkles, 1992). Die Introns von *T.t.hyd1* besitzen die übliche Größen von 53 und 74 bp Länge, die auch bei anderen Introns von pilzlichen Genen (Gurr *et al.*, 1987) wie Sc1, Sc3 und Sc4 von *S. commune* gefunden wurden (Schuren and Wessels, 1990). Die Spleißstellen beider Introns tragen die für Basidiomyceten typischen konservierten Sequenzenabschnitte (5'GT und 3'AG), die auch für andere filamentöse Pilze beschrieben wurden (Gurr *et al.*, 1987).

Der GC-Gehalt des *T.t.hyd1*-Gens beträgt 65,5 %. Dieser Wert entspricht anderen, hoch exprimierten Hydrophobin-Genen, deren GC-Gehalt zwischen 60-64% liegt. Ein hoher GC-Gehalt weist auch auf ein starkes Expressionsniveau hin (Timberlake, 1990). Hoch exprimierte Gene aus vielen Organismen zeigen einen eingeschränkten Codongebrauch. Überwiegend korreliert der Codongebrauch von *T.t.hyd1* mit dem hohem GC-Gehalt, indem *T. terreum* in den Wobble-Positionen Cytosin und Guanin den anderen Basen vorzieht (Abb. 26). Sowohl der hohe GC-Gehalt, als auch der relativ eingeschränkte Codongebrauch lassen im Vergleich mit anderen Hydrophobingenen auf ein hoch exprimiertes Gen schließen. Diese Annahme wurde durch starke Signale des Gens *T.t.hyd1* in Northern Blot-Analysen unterstützt.

aa	Codon	<i>T.t.hyd1</i>	aa	Codon	<i>T.t.hyd1</i>	aa	Codon	<i>T.t.hyd1</i>
Ala	GCT	5	Gly	GGT	2	Pro	CCT	1
	GCC	4		GGC	9		CCC	4
	GCA	0		GGA	1		CCA	0
	GCG	0		GGG	0		CCG	0
Arg	AGA	0	His	CAT	0	Ser	AGT	1
	AGG	0		CAC	0		AGC	3
				CGT	0			
	CGT	0	Ile	ATT	2	TCT	5	
	CGC	0		ATC	7	TCC	7	
CGA	0	ATA		0	TCA	1		
CGG	0				TGC	3		
Asn	AAT	0	Leu	CTT	2	Thr	ACT	3
	AAC	5		CTC	2		ACC	4
Asp	GAT	0		CTA	4		ACA	0
	GAC	1		CTG	0		ACG	0
Cys	TGT	1		TTA	0	Trp	TGG	0
	TGC	7		TTG	3			
Gln	CAA	1	Lys	AAA	1	Tyr	TAT	0
	CAG	7		AAG	0		TAC	2
Glu	GAA	0	Met	ATG	1	Val	GTT	3
	GAG	1		Phe	TTT		0	GTC
		TTC	2		GTA		0	
							GTG	0

Abb. 26: Codongebrauch des Gens *T.t.hyd1*. Angegeben sind die absoluten Zahlen der verwendeten Codons im Gen *T.t.hyd1* aus *T. terreum*. aa = Aminosäure

Für das *T.t.hyd1*-Protein konnte somit eine Länge von 108 Aminosäuren ermittelt werden und außerdem zeigte sich die für Hydrophobine typische Struktur von Signalsequenzen sekretierter Proteine (von Heijne, 1986). Die N-terminale Peptidsequenzierung bestätigte eine Prozessierung von *T.t.hyd1* zwischen Ala₁₈ und Thr₁₉. Das reife Polypeptid ist somit 90 Aminosäuren lang und besitzt eine errechnete Masse von 8846 Da. Die Analyse des angereinigten *T.t.hyd1*

Hydrophobins hatte in der SDS-PAGE die molekulare Größe von etwa 23 kDa ergeben. Diese Diskrepanz konnte auch bei anderen Hydrophobinen beobachtet werden, wie z. B. bei *Agaricus bisporus* (ABH3, Lugones *et al.*, 1998) und *S. commune* (Sc3, Sc4, Wessels *et al.*, 1991). Die Ursache könnte entweder in einer Glykosylierung liegen, die eine Veränderung der Molekularmasse auslöst, oder die bestehende Hydrophobizität der Hydrophobine verursachte eine veränderte elektrische Beweglichkeit in der SDS-PAGE.

T.t.hyd1 zeigt Akkumulation in Ektomykorrhiza

Das Protein T.t.hyd1 zeigt bei einer Suche nach bekannten Sequenzen in Proteindatenbanken die größte Ähnlichkeit zu dem Hydrophobin HYDPt-1 aus dem Ektomykorrhizapilz *Pisolithus tinctoris*. Die mRNA von *HYDPt-1* wurde bei in Flüssigkultur gewachsenen Myzelien detektiert und hoch akkumuliert in Lufthyphen gefunden. Dieses Transkript wird zudem in der *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctoris* Ektomykorrhiza in frühen Entwicklungsstadien der Wurzelkolonisation stark exprimiert (Tagu *et al.*, 1996). Die Ähnlichkeit dieses Proteins zu T.t.hyd1 beträgt 43% identischer Aminosäuren. Geringere Ähnlichkeiten bestehen mit Hydrophobinen wie Sc3 (*Schizophyllum commune*), ABH3 (*Agaricus bisporus*), CoH1 und CoH2 (*Coprinus cinereus*) zu 34-39%. Diese Proteine und T.t.hyd1 werden alle von vegetativen Myzelien sekretiert und akkumulieren in Lufthyphen. Eine Abgrenzung dieser Hydrophobine gegenüber T.t.hyd1 aber wird im phylogenetischen Stammbaum sichtbar. T.t.hyd1, wie auch HYDPt-1, zeigen eine distanzierte Gruppierung. Beide stammen von Basidiomyceten, die im Unterschied zu den vorher genannten zur Ausbildung einer Ektomykorrhiza fähig sind. Diese Gruppierung im phylogenetischen Stammbaum weist auf eine neue Gruppe von Hydrophobinen der Klasse I hin.

T.t.hyd1 ist ein Gen, das eine starke Expression zeigt. Die vermehrte Transkriptakkumulation tritt dabei spezifisch in vegetativen Myzelien auf. Die höchste Menge an *T.t.hyd1* Transkript findet sich in Myzel, das ein ausgeprägtes Lufthyphen-Wachstum zeigt. Dabei korreliert die Expression offensichtlich mit der Entwicklung der Hyphen. So sind Hydrophobin-Gene in jungen, heranwachsenden Hyphen inaktiv. Die erste, entwicklungsabhängige Veränderung erfolgt mit fortlaufendem Wachstum hin zur Aktivierung des Gens, so daß Hydrophobin-Monomere nun in das Kulturmedium sekretiert werden. Durch weiteres Wachstum erreichen die Hyphen die Luft/Wasser-Grenzschicht, die eine Anlagerung der Hydrophobine an die Zellwände, und somit ein Lufthyphenwachstum auslöst. Da Lufthyphen nicht zur Aufnahme von Nährstoffen fähig sind, wird ein Anschalten des lufthyphen-spezifischen *T.t.hyd1*-Gens erst nach der Bildung ausreichender Substrathyphen erfolgen. Die weitere, regulatorische und damit morphologische Veränderung des dikaryotischen Myzeliums würde dann durch eine Entwicklung der Fruchtkörper eintreten. Eine Expression von *T.t.hyd1* in Fruchtkörpern wurde nicht festgestellt.

T.t.hyd1 wird ausschließlich in vegetativem Myzel exprimiert. Ob eine Expression in monokaryotischem Myzel stattfindet, wurde nicht überprüft.

T.t.hyd1 wird von dem heterologen Antiserum, das gegen Sc3 aus *S. commune* gerichtet ist, in der Immunfluoreszenzmikroskopie in Zellwänden von Lufthyphen lokalisiert. Eine Homologie auf Aminosäureebene zwischen *T.t.hyd1* und Sc3 besteht nur zu 39%. Es stellt sich damit die Frage, weshalb eine Erkennung trotzdem erfolgt. Sc3 von *S. commune* liegt als glykolysiertes Polypeptid vor und es wird angenommen, daß die gegen Sc3 gerichteten Antikörper hauptsächlich die Zucker-Reste der Glykolysierung erkennen (Asgeirsdottir *et al.*, 1998). Glykolysierungen sind posttranslationale Modifikationen, die die Hydrophobizität eines Proteins verändern und eine Selbst-Aggregation auslösen können. Das bedeutet, daß mit Sc3-Antikörper reagierende Hydrophobine dementsprechende Glykolysierungen und damit angehängte Zucker-Reste aufweisen müßten. Vermutlich erkennen die Sc3-Antikörper das heterologe Hydrophobin *T.t.hyd1*, da *T.t.hyd1* mit Thr₁₉ und Ser₄₂ zwei putative Glykolysierungsstellen besitzt. Das aus vegetativem Myzelium isolierte Hydrophobin POH2 aus dem Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* liegt glykolysiert vor und besitzt wie Sc3 einen Threonin-reichen N-terminus und kann mit heterologen Sc3-Antikörper ebenfalls detektiert werden (Asgeirsdottir *et al.*, 1998). Dagegen wird das andere lufthyphen-spezifische Hydrophobin POH3 aus *P. ostreatus* nicht vom Antiserum erkannt, und dieses weist entsprechend auch keine Glykolysierung auf. Daher kann hier angenommen werden, daß die Affinität zum homologen wie auch heterologen Hydrophobin der gegen Sc3 gerichteten Antikörper auf die Glykolysierungsmuster zurückzuführen ist.

Rolle von *T.t.hyd1* in der kompatiblen Interaktion

Als Mykorrhiza-Pilz befindet sich *T. terreum* zumeist assoziiert in einer Interaktion. Doch beinhaltet der Lebenszyklus von *T. terreum* auch saprophytische Abschnitte, die eine Kultivierung auf Nährböden gewährleistet und die Identifizierung von *T.t.hyd1* möglich machte. Es konnte gezeigt werden, daß *T.t.hyd1* in Lufthyphen akkumuliert, aber auch eine Funktion in der sich ausbildenden Mykorrhiza besitzt. Die höchste Transkriptmenge konnte in der kompatiblen Interaktion gefunden werden.

Die Lokalisierung des Hydrophobins *T.t.hyd1* in der pilzlichen Zellwand des Hartig'schen Netzes macht eine Rolle in der Ausbildung der Symbiose wahrscheinlich und deutet auf eine mögliche Funktion in der symbiotischen Struktur hin. Jedoch ist das Hydrophobin nicht essenziell für die Ausbildung der Mykorrhiza, da in der inkompatiblen Interaktion, die ebenfalls die vollständige Mykorrhiza-Morphologie aufweist, fast keine Proteinakkumulation im Hartig'schen Netz sichtbar war. Da die Entwicklung der inkompatiblen Interaktion aber auch langsamer verläuft, legt die Vermutung einer Interaktions-fördernden Rolle von *T.t.hyd1* in der Mykorrhizabildung nahe.

Eine der vielen, ungelösten Fragen in Zusammenhang mit Mykorrhiza besteht in der Wirtsspezifität eines Ektomykorrhizapilzes. Das Auftreten der differenzierten Hydrophobin-Expression und -Akkumulation würde auch die Entwicklung von Fruchtkörpern erklären, die ausschließlich unter dem kompatiblen Baum auftreten. In der Natur wird die etwaige, auftretende inkompatible Interaktion durch die schneller wachsende kompatible Mykorrhiza begrenzt. Nur unter axenischen Laborbedingungen ist eine langsame Entwicklung der schwach "kompatiblen" Interaktion möglich.

Der Frage nach der Wirtsspezifität könnte wohl erst nachgegangen werden, wenn Deletionsmutanten zur Verfügung stehen. Dafür müßte aber zuerst ein Transformationssystem für *Tricholoma* etabliert werden. In die weiteren Untersuchungen sollten auch Konkurrenzexperimente mit eingeschlossen werden. Dafür werden zwei Arten für eine Mykorrhizaentwicklung inokuliert und zu verschiedenen Zeiten untersucht, wie groß der Anteil der jeweiligen Spezies an der Symbiose ist. Zur Detektion eignen sich hier als molekulare Marker die in der vorliegenden Arbeit etablierten Methoden zur ITS-Sequenzierung (Mankel *et al.*, 1998).

Damit ergibt sich für die Rolle des Hydrophobins in Ausbildung und Funktion des Hartig'schen Netzes möglicherweise eine strukturelle Natur. Vermutlich erleichtert das Hydrophobin die Entwicklung des pseudoparenchymatischen Gewebes, das sich um die corticalen Wurzelzellen im Hartig'schen Netz bildet. Die amphipatische Natur des Hydrophobins erleichtert zudem wahrscheinlich eine Verbindung zu der Pflanzenzelloberfläche, die bis zu 30% an hydrophoben Substanzen wie Ligninen und Lignocellulosen besitzt. Jedoch sollte es nicht den Austausch von Mineralstoffen und Zucker behindern, der an der Struktur des Hartig'schen Netzes erfolgt. Die Schichtung von Hydrophobinen, die sich zwischen entgegengesetzten Hyphenzellwänden befindet, ist insoweit durchlässig, daß der Nahrungsefflux nicht verhindert wird. Die Art der ausgetauschten Moleküle wird sich auf kurze Peptide, einzelne Aminosäuren, Ionen oder auch Zuckermoleküle beschränken. Molekülen dieser Größe ist es vermutlich auch möglich, durch Zellwände von Lufthyphen zu gelangen, die mit den aus der Natur bekannten dichtesten Lagen an Hydrophobinen versehen sind. So konnten Fourier Transformations-Analysen von Sc3 und Sc4 Hydrophobin-Schichten zeigen, daß auch Moleküle wie Zucker in der Lage sind, durch Poren der Hydrophobin-Struktur zu diffundieren (Wösten and Wessels, 1997).

Insgesamt zeigt sich, daß in der symbiotischen Interaktion die Rolle der Hydrophobine nicht nur auf die Kontaktaufnahme zwischen Pflanze und Pilz beschränkt ist, die in der Hyphenmantelbildung mündet (Jacobs *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1995, 1999; Tagu, 1996). Vielmehr ist mit der hier gezeigten Arbeit auch eine Beteiligung an Aufbau und Funktion des Hartig'schen Netzes gezeigt. Damit könnte sich eine Möglichkeit abzeichnen, nunmehr gezielt nach den Signalen zu suchen, die vom Baum kommend notwendig sind, um die gezielte Hydrophobin-Expression zu ermöglichen. Solche Signale werden bereits seit Jahrzehnten vergeblich gesucht, da sie als Voraussetzung für eine axenische Fruchtkörperbildung gesehen

werden. Und die Zucht von Speisepilzen wie Steinpilz (*Boletus edulis*), Pfifferling (*Cantharellus cibarius*), aber auch Matsu-take (*Tricholoma matsutake*), der auch als Trüffel Asiens bezeichnet wird, könnte ein großer Markt werden, wenn solche Signale tatsächlich zur Zucht der Speisepilze führen könnten.

VI. Literatur

Agerer, R. (1988). The ontogeny of the ectomycorrhizal rhizomorphs of *Paxillus involutus* and *Thelephora terrestris* (Basidiomycetes). *Nova Hedwigia* **47**, 311-334.

Asgeirsdottir, S. A., de Vries, O. M., and Wessels, J. G. H. (1998). Identification of three differentially expressed hydrophobins in *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Microbiology* **144**, 2961-9.

Asgeirsdottir, S. A., Halsall, J. R., and Casselton, L. A. (1997). Expression of two closely linked hydrophobin genes of *Coprinus cinereus* is monokaryon-specific and down-regulated by the *oid-1* mutation. *Fungal Genet Biol.* **22**, 54-63.

Ausubel, F. M., Brent R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.

Baldwin, B. G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. *Mol. Phytoenet. Evol.* **1**, 3-16.

Benoist, C., O'Hare, K., Breathnach, R., and Chambon, P. (1980). The ovalbumin gene: sequence of putative control regions. *Nucl. Acids Res.* **8**, 127-142.

Bidochka, M. J., St Leger, R. J., Joshi, L., and Roberts, D. W. (1995). An inner cell wall protein (cwp1) from conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology* **141**, 1075-1080.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.

Bon, M. (1967). Révision des Tricholomes. Bull. *Trimestrielle de Soc. Mycologique de France* **83**, 324-335.

Bon, M. (1974a). Tricholomes de France et d'Europe occidentale. Tome 1: généralités. *Ducomentes mycologique* **3**, 1-53.

- Bon, M. (1974b). Tricholomes de France et d'Europe occidentale. Tome II: partie descriptive. *Ducomentes mycologique* **4**, 55-110.
- Bon, M. (1975). Tricholomes de France et d'Europe occidentale (suite du tome II, partie descriptive). *Ducomentes mycologiques* **5**, 111-164.
- Bon, M. (1984). Tricholomes de France et d'Europe occidentale. Editions Lechevalier, S.A.R.L., Paris.
- Bowden, C. G., Hintz, W. E., Jeng, R., Hubbes, M., and Horgen, P. A. (1993). Isolation and characterization of the cerato-ulmin toxin gene of the Dutch elm disease pathogen, *Ophiostoma ulmi*. *Curr. Genet.* **25**, 323-329.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Breitenbach, J. und Kränzlin, F. (1991). Röhrlinge und Blätterpilze. Luzern: Verlag Mykologia.
- Bruckner, B. Novotny, C. P., and Ullrich, R. C. (1988). Organization of the ribosomal RNA genes of *Schizophyllum commune*. *Curr. Genet.* **13**, 417-424.
- Bruns, T. D. and Gardes, M. (1993). Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. *Mol. Ecol.* **2**, 233-242.
- Carpenter, C. E., Mueller, P., Kazmierczak, P., Zhang, L., Vilallon, D., and Van Alfen, N. K. (1992). Effect of a virus on accumulation of a tissue-specific cells-surface protein of the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 55-61.
- Chilvers, G. A., Douglass, P. A., and Lapeyrie, F. F. (1986). A Paper-Sandwich technique for rapid synthesis of Ectomycorrhizas. *New Phytol.* **103**, 397-402
- Clémenton, H. (1983). Die Erdritterlinge und ihre nächst verwandten Arten aus der Gattung *Tricholoma*, Sektion *Tricholoma*. *Mycol. Helvetica* **1**, 17-30.
- Cooke, D. E. L. and Duncan, J. M. (1997). Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycol. Res.* **101**, 667-677

Davis, B. (1985). Factors influencing protoplasts isolation. In *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics*. Ed. by J. F. Peberdy and L. Ferenczy. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 45-72.

de Bary, A. (1879). Die Erscheinung der Symbiose. Straßburg.

de Groot, P. W. J., Schaap, P. J., Sonnenberg, A. S. M., Visser, J., and Van Griesven, L. J. L. D. (1996). The *Agaricus bisporus hypA* gene encodes a hydrophobin and specifically accumulates in peel tissue of mushroom caps fruit body development . *J. Mol. Biol.* **257**, 1008-1018.

de Vocht, M. L., Scholtmeijer, K., van der Vegte, E. W., de Vries, O. M. H., Sonveaux, N., Wösten, H. A., Ruyschaert, J. M., Hadziloannou, G., Wessels, J. G.H., and Robillard, G.T. (1998). Structural characterization of the hydrophobin Sc3, as a monomer and after self-assembly at hydrophobic/hydrophilic interfaces. *Biophys J.* **74**, 2059-68.

de Vries, O. M. H., Fekke, M. P., Wösten, H. A. B., and Wessels, J. G. H. (1993). Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch. Microbiol.* **159**, 330-335.

Debaud, J. C., Gay, G., and Bruchet, G. (1986). Intraspecific variability in an ectomycorrhizal fungus: *Hebeloma cylindrosporium* I. Preliminary studies on *in vitro* fruiting, spore germination and sexual compartment. In *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Ed. by V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi. INRA Paris, pp. 581-588.

Debaud, J. C., Gay, G., Prévost, A., Lei, J., and Dexheimer, J. (1988). Ectomycorrhizal ability of genetically different homokaryotic and dikaryotic mycelia of *Hebeloma cylindrosporium*. *New. Phytol.* **108**, 323-328.

Dixon, R. K., Garrett, H. E., and Stelzer, H. E. (1987). Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine progenies inoculated with three isolates of *Pisolithus tinctoris*. *Siv. Genet.* **36**, 240-245.

Ducamp, M., Poitou, N., and Olivier, J. M. (1986). Comparaison cytologique et biochimique entre cultures monospores et boutures de carpophores chez *Suillus granulatus* (fr. ex L.) Kuntze. In *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Ed. by V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi. INRA Paris, pp. 575-579.

- Duddridge, J. A. (1986). The development and ultrastructure of ectomycorrhiza III. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. And 11 species of hosts *in vitro* in the absence of exogenous carbohydrate. *New Phytol.* **103**, 457-464
- Ebbole, D. J. (1997). Hydrophobins and fungal infection of plants and animals. *Trends Microbiol.* **10**, 405-408.
- Fasalo-Bonfante, P. and Brunel, A. (1972). Caryological features in a mycorrhizal fungus. *Tuber melanosporum* Vitt. *Allionia* **18**, 5-11.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Felsenstein, J. (1991). PHYLIP 3.4-Computer package distributed by author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Fischer, R. and Timberlake, W. E. (1995). *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein necessary for nuclear positioning and completion of asexual development. *J. Cell Biol.* **128**, 485-498.
- Fortin, A. and Piche, Y. (1979). Cultivation of *Pinus strobus* roothypokotyl explants for synthesis of ectomycorrhizae. *New Phytol.* **83**, 109-119.
- Fortin, A., Piche, Y., and Godbout, C. (1983). Methods for synthesizing ectomycorrhizas and their effect on mycorrhizal development. *Plant Soil.* **71**, 275-284.
- Frank, A. (1885). Über die Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **3**, 128-145.
- Gardes, M., White, T. J., Fortin, J. A., Bruns, T. D., and Taylor, J. W. (1991) Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can J. Bot.* **69**, 180-190.
- Genenger, M. (1997). Vergleichende morphologische und ontogenetische Untersuchungen zur *in vitro*-Spezifität von *Tricholoma terreum* und *Tricholoma vaccinum* mit *Pinus sylvestris* und *Picea abies*. Diplomarbeit, Universität Marburg.

Gill, M. and Steglich, W. (1987). Pigments of fungi (Macromycetes). *Progr. Chem. Organic. Nat. Prod.* **51**, 1-317.

Giltrap, N. J. (1982). Production of polyphenol oxidases by ectomycorrhizal fungi with special reference to *Lactarius* spp. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **78**, 75-81.

Gluchoff, K. and Steglich, W. (1974). Les pigments de *tricholoma sulfureum* Fr. Ex Bull.; identification de nouveaux dérivés de la flavomannine. Travaux mycologiques dédiés à R. Kühner, numéro spécial du Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon, 163-173.

Gurr, S. J., Unkles, S. E., and Kinghorn, J. R. (1987). The structure and organization of nuclear genes in filamentous fungi. In *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*, SGM Special Publications. Ed. by J. R. Kinghorn. Oxford, IRL Press, pp. 93-139.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Hansen, J. E., Lund, O., Rapacki, K., and Brunak, S. (1997). O-glycbase version 2.0-a revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Res.* **25**, 278-282.

Harley, J. L. and Smith, S. E. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. London, Academic Press Inc.

Henrion, B., Le Tacon, F., and Martin, F. (1992). Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* **122**, 289-298.

Hershkovitz, M. A. and Lewis, L. A. (1996). Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 1276-1295.

Higgins, D. G. and Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**, 237-244.

Hilbert, J. L. and Martin, F. (1988). Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. *New Phytol.* **110**, 339-346.

Hillis, D. M. and Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.* **66**, 411-453.

Hoiland, K. (1984). *Cortinarius* subgenus *Dermocybe*. *Opera Bot.* **71**, 1-113.

Hoiland, K. and Holst-Jensen, A. (2000). *Cortinarius* phylogeny and possible taxonomic implications of ITS rDNA sequences. *Mycologia* **92**, 694-710.

Innis, M. A. and Gelfand, D. H. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press., San Diego.

Jacobs, P. F., Peterson, R. L., and Massicote, H. B. (1989). Altered fungal morphogenesis during early stages of ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus pilularis*. *Scanning Microscopy* **3**, 249-255.

Jasalavich, C. A., Morales, V. M., Pelcher, L. E., and Seguin-Swartz, G. (1995). Comparison of the nuclear ribosomal DNA sequences of the *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycol. Res.* **99**, 604-614.

Kershaw, M. J. and Talbot, N. J. (1998). Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal. Genet. Biol.* **23**, 18-33.

Kochel, H. G. and Kuntzel, H. (1982). Mitochondrial L-RNA from *Aspergillus nidulans*: potential secondary structure and evolution. *Nucl. Acids Res.* **10**, 4795-4801.

Kost, G. (1978). Vergleichende Merkmalstudien von Arten der Gattungen *Hygrophorus* FR. und *Tricholoma* (FR.) STAUDE (*Agaricales*). *Zeitschrift Mykologie* **45**, 167-189.

Kost, G. (1981). Vergleichende morphologische, anatomische und feinstrukturelle Merkmalstudien an Arten der Gattung *Tricholoma* (Fr.) Staude, Sektion Genuina (Fr.) Sacc. Dissertation, Universität Tübingen

Kost, G. (1992). Macrofungi on soil in coniferous forests. In *Fungi in Vegetation Science*. Ed. by Winterhoff. Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp. 79-111.

Kottke, I. and Oberwinkler, F. (1985). Root-fungus interactions observed on initial stages of mantle formation and Hartig net establishment in mycorrhizas of *Amanita muscaria* on *Picea abies* in pure culture. *Can J. Bot.* **64**, 2348-2354.

Kottke, I. and Oberwinkler, F. (1989). Amplification of root-fungus interface in ectomycorrhizae by Hartig net architecture. *Annales des Sciences Forestieres.* **46** (suppl.), 737-740.

- Kottke, I., Guttenberger, M., Hampp, R., and Oberwinkler, F. (1987). An *in vitro* method for establishing mycorrhizae on coniferous seedlings. *Trees* **1**, 191-194.
- Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research* **12**, 857-872.
- Kropp, B. R. and Fortin, J. A. (1988). The incompatibility system and relative ectomycorrhizal performance of monokaryons and reconstituted dikaryons of *Laccaria bicolor*. *Can. J. Bot.* **66**, 289-294.
- Kropp, B. R. and Fortin, J. A. (1986). Formation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Can. J. Bot.* **64**, 1224-1226.
- Kropp, B. R., McAfee, B. J., and Fortin, J. A. (1987). Variable loss of ectomycorrhizal ability in monokaryotic and dikaryotic cultures of *Laccaria bicolor*. *Can. J. Bot.* **65**, 500-504.
- Kühner, R. (1980). Les Hyménomycètes agaricoides (Agaricales, Tricholomatales, Pluteales, Russulales). Étude générale et classification. *Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon* **49** (numéro spécial), 1-1027.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **175**, 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laiho, O. (1970). *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. *Acta For. Fenn.* **106**, 1-72.
- Lamhamedi, M. S., Fortin, J. A., Kope, H. H., and Kropp, B. R. (1990). Genetic variation in ectomycorrhiza formation by *Pisolithus arhizus* on *Pinus pinaster* and *Pinus baksiana*. *New Phytol.* **115**, 689-698.
- Lee, S. B. and Taylor, J. W. (1992). Phylogeny of five fungus-like protist species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 636-653.

- Lengeler, K. and Kothe, E. (1994). Molecular characterization of *ura1*, a mutant allele for orotidine-5'-monophosphate decarboxylase in *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 243-248.
- Li, W. and Graur, D. (1991). *Fundamental of molecular evolution*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Lugones, L. G., Bosscher, J. S., Scholtmeyer, K., de Vries, O. M. H., and Wessels, J. G. H. (1996). An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology* **142**, 1321-1329.
- Lugones, L. G., Wösten, H. A. B., and Wessels, J. G. H. (1998). A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology* **144**, 2345-2353.
- Malajczuk, N. Molina, R., and Trappe, J. M. (1984). Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. II. The ultrastructure of compatibility mycorrhizal fungi and associated roots. *New. Phytol.* **96**, 43-53.
- Mankel, A., Kost, G., and Kothe, E. (1998). Re-evaluation of the phylogenetic relationship among species of the genus *Tricholoma*. *Microbiol. Res.* **153**, 377-388.
- Martin, F., Laurent, P., de Cavalho, D., Burgess, T., Murphy, P., Nehls, U., and Tagu, D. (1995). Fungal gene expression during ectomycorrhiza formation. *Can. J. Bot.* **73**, 541-547.
- Martin, F., Laurent, P., de Cavalho, D., Voiblet, C., Balestrini, R., Bonfante, P., and Tagu, D. (1999). Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctoris*: Identification, function and expression in symbiosis. *Fungal Genet. Biol.* **27**, 161-174.
- Marx, D. H. and Bryan, W. C. (1971). Pure culture synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctoris* on different conifer hosts. *Can. J. Bot.* **22**, 338-341.
- Massicotte, H. B., Peterson, R.L., Ackerley, C. A., and Melville, L. H. (1990). Structure and ontogeny of *Betula alleghaniensis*-*Pisolithus tinctoris* ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.* **68**, 579-593.
- Molina, R. (1981). Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. *Can. J. Bot.* **59**, 325-334.
- Molina, R. and Trappe, J. M. (1982). Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific northwest conifers and fungi. *For. Sci.* **28**, 423-458.

- Moser, M. (1983). *Die Röhrlinge und Blätterpilze*. 5. Auflage, ed. Stuttgart; New York, Gustav Fischer Verlag.
- Mulder, G. H. and Wessels, J. G. H. (1986). Molecular cloning of RNAs differentially expressed in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune* in relation to fruiting. *Exp. Mycol.* **10**, 214-227.
- Nussinov, R. (1990). Sequence signals in eukaryotic upstream elements. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 185-221.
- O'Donnell, K. and Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**, 103-116.
- Parta, M., Chang, Y., Rulong, S., Pinto da Silva, P., and KwonChung, K. J. (1994). *Hyp1*, a hydrophobin gene from *Aspergillus fumigatus* complements the rodletless phenotype in *Aspergillus nidulans*. *Infect. Immun.* **62**, 4389-4395.
- Peberdy, J. F. (1979). Fungal protoplasts: isolation, reversion, and fusion. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**, 21-39.
- Penas, M. M., Asgeirsdottir, A., Lasa, I., Culiánez-Macia, F. A., Pisabarro, A. G., Wessels, J. H. G., and Ramirez, L. (1998). Identification, characterization, and *in situ* detection of a fruit-body-specific hydrophobin of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Env. Microbiol.* **64**, 4028-4034.
- Peyronel, B., Fassi, B., and Trappe, J. M. (1969). Terminology of Mycorrhizae. *Mycologia* **61**, 401-411.
- Rayner, A. D. M., Griffith, G. S., and Ainsworth, A. M. (1991). Mycelial interconnectedness. In *The growing fungus*. Ed. by N. A. R. Gow and G. M. Gadd. Chapman and Hall, London, pp. 21-40.
- Read, D. J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems-nature's response to the "law of the minimum". In *Frontiers in mycology*. Ed. by D.L. Hanksworth. CAB International, Cambridge, pp. 101-130.
- Rohe, M., Gierlich A., Hermann, H., Hahn, M., Schmidt, B., Sosahl, S., and Knogge, W. (1995). The race-specific elicitor *NIP 1*, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the *Rrs1* resistance genotype. *EMBO J.* **14**, 4168-4177.

Rouquerol, T. and Payre, H. (1974). Observations sur le comportement de *Tuber melanosporum* dans un site naturel. *Rev. Mycol.* **39**, 107-117.

Russel, P. J., Wagner, S., Rodland, K. D., Feinbaum, R. L., Russel, J. P., Bret-Harte, M. S., Free, S. J., and Metzenberg, R. L. (1984). Organization of the ribosomal nucleic acid genes in various wild-type strains and wild-collected strains of *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 275-282.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A Laboratory Manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbour, New York.

Schuren, F. H. J. and Wessels, J. G. H. (1990). Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating type genes. *Gene* **90**, 199-205.

Schwalb, M. N. and Miles, P. G. (1967). Morphogenesis of *Schizophyllum commune* I. Morphological variation and mating behavior of the *thin* mutation. *American Journal of Botany* **54**, 440-446.

Sherriff, C., Whelan, M. J., Arnold, G. M., Lafay, J.-F., Brygoo, Y., and Bailey, J. A. (1994). Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Exp. Mycol.* **18**, 121-138.

Singer, R. (1986). The agaricales in modern taxonomy. 4. Aufl., Koeltz Scientific Books, Koenigstein/Ts.

Smith, S. E. and Read, D. J. (1997). Mycorrhizal Symbiosis, Second Edition. Academic Press.

Southern, E. M. (1975). Deletion of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.

Steglich, W. and Töpfer-Petersen, E. (1972). Pilzpigmente, XII: Phlegmacin und Anhydrophlegmacin, neuartige Farbstoffe aus dem Anisklumpfuß *Cortinarius odorifer* (Agaricales). *Zeitung für Naturforscher* **27b**, 1286-1287.

Steglich, W., Töpfer-Petersen, E., Reiniger, W., Gluchoff, K., and Arpin, N. (1972). Isolation of flavomanin-6,6'-dimethyl ether and one of its racemates from higher fungi. *Phytochemistry* **11**, 3299-3304.

Stickler, M. B. and Bolyard, M. (1994). Refinement of physiological roles for cerato-ulmin by analogy with other hydrophobins. *Trends Microbiol.* **2**, 213-215.

Stringer, M. A. and Timberlake, W. E. (1993). Cerato-ulmin, a toxin involved in Dutch Elm disease, is a fungal hydrophobin. *Plant Cell.* **5**, 145-146.

Stringer, M. A., Dean, R. A., Sewall, T. C., and Timberlake, W. E. (1991). *Rodletless*, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene activation. *Genes Dev.* **5**, 1161-1171.

Stringer, M. A. and Timberlake, W. E. (1995). DewA, encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol. Microbiol.* **16**, 33-44.

Tagu, D., De Bellis, R., Balestrini, R., Piccoli, G., Stocchi, V., de Vries, O. M. H., Bonfante, P., and Martin, F. (2000). Immuno-localization of the hydrophobin HYDPt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctoris* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. In press.

Tagu, D., Nasse B., and Martin, F. (1996). Cloning and characterization of hydrophobin-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctoris*. *Gene* **168**, 93-97.

Talbot, N. J., Ebbole, D. J., and Hamer, J. E. (1993). Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**, 1575-1590.

Talbot, N. J., Kershaw, M., Wakley, G. E., de Vries, O. M. H., Wessels, J. G. H., and Hamer, J. E. (1996). MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**, 985-999.

Templeton, M. D., Greenwood, D. R., and Beever, R. E. (1995). Solubilization of *Neurospora crassa* rodlet proteins and identification of the predominant protein as the proteolytically processed *eas* (*ssg2*) gene product. *Exp. Mycol.* **19**, 166-169.

Templeton, M. D., Rikkerink, E. H. A., and Beever, R. E. (1994). Small, cystein-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **7**, 320-325.

Thau, N., Monod, M., Crestani, B., Rolland, C., Tronchin, G., Latgé, J. P., and Paris, S. (1994). *Rodletless* mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **62**, 4380-4388.

- Timberlake, W. E. (1990). Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Ann. Rev. Genet.*, **24**, 5-36.
- Trappe, J. M. (1962). Fungus Associates of Ectotrophic Mycorrhizae. *Botanical Review* **28**, 538-606.
- Unkles, S. E. (1992). Gene organization in industrial filamentous fungi. In *Applied molecular genetics of filamentous fungi*. Ed. by J. R. Kinghorn and G. Turner. Chapman and Hall, London, pp 28-53.
- Van den Ackervecken, G. F. J. M., Van Kann, J. A. L., and De Wit, P. G. M. (1992). Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant J.* **2**, 359-366.
- Von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acids Res.* **14**, 4683-4690.
- Warrington, S.J., Black, H. D., and Coons, L. B. (1981). Entry of *Pisolithus tinctoris* hyphae in *Pinus taeda* roots. *Can. J. Bot.* **59**, 2135-2139.
- Wendland, J., Lengeler, K. B., and Kothe, E. (1996). An instant separation method for nucleic acids of filamentous fungi. *Fungal Genet. Newsl.* **43**, 54-55.
- Werner, D. (1992). Ektomykorrhiza, Ericales und Orchideen-Mycorrhiza. In *Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen*. Ed. by D. Werner. Stuttgart, New York, Thieme Verlag, pp. 207-230.
- Wessels, J. G. H. (1993). Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytol.* **123**, 397-413.
- Wessels, J. H. G. (1994). Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 413-437.
- Wessels, J. G. H. (1996). Fungal hydrophobins: Proteins that functions at an interface. *Trends Plant Sci.* **1**, 9-15.
- Wessels, J. G. H. (1997). Fungal Hydrophobins: Proteins that change the nature of fungal surface. *Adv. Microbiol. Physiol.* **38**, 1-45.

- Wessels, J. G. H. (1999). Fungi in their own right. *Fungal Genet. and Biol.* **27**, 134-145.
- Wessels, J. G. H., de Vries, O. M. H., Asgeirsdottir, S. A., and Schuren, F. H. J. (1991). Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum commune*. *Plant Cell* **3**, 793-799.
- Wong, K. K. Y and Fortin, J. A. (1990). Root colonization and intraspecific variation in ectomycorrhiza. *Symbiosis* **8**, 197-231.
- Wong, K. K. Y. and Fortin, J. A. (1989). A Petri dish technique for the aseptic synthesis of ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.* **67**, 1713-1716.
- Wong, K. K. Y., Piché, Y., Montpetit, D., and Kropp, B. R. (1989). Differences in the colonization of *Pinus baksiana* roots by sib-monokaryotic and dikaryotic strains of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Can. J. Bot.* **67**, 1717-1726.
- Wösten, H. A. B. and Wessels, J. G. H. (1997). Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience* **38**, 363-374.
- Wösten, H. A. B., de Vries, O. M. H., and Wessels, J. G. H. (1993). Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell* **5**, 1567-1574.
- Wösten, H. A. B., Schuren, F. H. J., and Wessels, J. G. H. (1994). Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* **13**, 5848-5854.
- Wösten, H. A.B. , Bohlmann, R., Eckerskom, C., Lottspeich, F., Bölker, M., and Kahmann, R. (1996). A novel class of small amphipathic peptides affect aerial growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **16**, 4274-4281.
- Yaguchi, M., Pusztai-Carey, M., Roy, C., Surewicz, W. K., Carey, P. R., Stevenson, K. J. Richards, W. C., and Takai, S. (1993). Amino acid sequence and spectroscopic studies of Dutch elm disease toxin, cerato-ulmin. In *Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches*. Ed. by M. B. Sticklen and J. L. Sherald. Springer-Verlag, New-York, pp. 152-170.
- Zambino, P. J. and Szabo, L. J. (1993). Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rust based on rDNA sequence analysis. *Mycologia* **85**, 401-414.

Zaret, K. S. and Sherman, F. (1982). DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* **28**, 563-573.

Zhang, L., Vilallon, D., Sun, Y., Kazmierczak, P., and Van Alfen, N. K. (1994). Virus-associated down-regulation of the gene encoding cryparin, an abundant cell-surface protein from the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Gene* **139**, 59-64.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Angela Mankel
Geburtsdatum: 30.12.1969
Geburtsort: Marburg/Lahn
Familienstand: ledig

Schulbildung

1976 – 1980 Besuch der Grundschule in Dautphetal-Buchenau
1980 – 1989 Besuch des Gymnasium der Lahntalschule in Biedenkopf (Abitur)

Studium

1989 – 1992 Studium des Diplomstudiengang Chemie an der Universität-Gesamthochschule Siegen

1992 – 1996 Fortführung des Chemie-Studium mit Hauptfach Biochemie an der Philipps-Universität Marburg, Abschluß als Diplom-Chemikerin
Anfertigung der Diplomarbeit im Fachbereich Biologie-Molekulargenetik bei Prof. A. Klein
Thema der Diplomarbeit:
“Reinigung von β -Galaktosidasen des Basidiomyceten *Schizophyllum commune*“

Promotion

seit April 1996 Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Sonderforschungsbereich 395 “Interaktion, Anpassung und katalytische Fähigkeiten von Bodenorganismen“ im Fachbereich Biologie-Molekulargenetik, Philipps-Universität Marburg. Anfertigung der Doktorarbeit bei Prof. M. Bölker und Prof. E. Kothe, Mikrobielle Phytopathologie, Friedrich-Schiller Universität, Jena mit dem Thema: Spezifische Genexpression in der Ektomykorrhizabildung durch den Pilz *Tricholoma terreum*.

Ich versichere, daß ich meine Dissertation „Spezifische Genexpression in der Ektomykorrhizabildung durch den Pilz *Tricholoma terreum*“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn, den 09.11.2000