

Regulation der Citrininbildung in *Penicillium*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Najim Touhami

1. Referent: Prof. Dr. Rolf Geisen

2. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2018

Erklärung:

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich meine Dissertation mit dem Titel Regulation der Citrininbildung in *Penicillium* selbständig verfasst und keine anderen als die in dieser Arbeit angegebenen Quellen in Anspruch genommen habe. Alle anderen übernommenen Textstellen sowie verwendete Abbildungen habe ich kenntlich gemacht. Außerdem versichere ich, dass die vorgelegte elektronische mit der schriftlichen Version der Arbeit übereinstimmt. Diese Dissertation oder Teile davon wurden weder an einer Hochschule des In- noch Auslands als Bestandteil einer Prüfung oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Karlsruhe, den 19. Februar 2018

Najim Touhami

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Schimmelpilze	3
2.2 Mykotoxine	4
2.3 Generelle Eigenschaften der Gattung <i>Penicillium</i>	8
2.4 Regulation der Mykotoxinbildung bei Pilzen	13
2.4.1 Osmoregulation durch den HOG-Signalweg	13
2.4.2 pH-Regulation durch den PACC-Signalweg	15
2.4.3 G-Protein-Signalweg	16
2.5 Rolle von Polyketidsynthasen in der Mykotoxinbildung	18
2.6 Zielsetzung	20
3 Ergebnisse	21
3.1 Biodiversität von <i>P. expansum</i> in Äpfeln	21
3.2 Kinetik der Toxinbildung bei <i>Penicillium</i>	24
3.3 Charakterisierung der Gencluster für die Citrininbildung in <i>Penicillium</i>	27
3.4 Rolle von pksCT in der Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	29
3.5 Einfluss der Umweltfaktoren auf die Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	34
3.5.1 Einfluss der Temperatur auf das Wachstum bei <i>Penicillium</i>	35
3.5.2 Einfluss der Temperatur auf die Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	38
3.6 Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	40
3.7 Einfluss des Salzstresses auf die Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	43
3.8 Rolle von HOG-Signalweg in der Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	46
3.9 Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	50
3.10 Rolle des PACC-Signalwegs in der Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	52
3.11 Heterologe Überexpression des Transkriptionsaktivators in <i>P. expansum</i>	58
3.12 Einfluss des oxidativen Stresses auf die Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	62

3.13 Rolle des cAMP-Signalwegs in der Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	67
3.14 Untersuchung der antioxidativen Wirkung von Citrinin.....	68
3.15 Rolle von Velvet in der Citrininbildung bei <i>Penicillium</i>	71
3.16 Biologische Bedeutung der Citrininbildung.....	77
4 Diskussion	103
5 Material und Methoden	124
5.1 Pilzstämmen.....	124
5.2 Materialien.....	124
5.3 Methoden.....	132
5.3.1 DNA-Isolierung.....	132
5.3.2 PCR.....	133
5.3.3 RAPD.....	134
5.3.4 Gelelektrophorese.....	135
5.3.5 Southern Blot.....	136
5.3.6 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	139
5.3.7 Transformation von Bakterienzellen.....	140
5.3.8 Animpfen der Pilzstämmen.....	141
5.3.9 Bestimmung der ROS-Konzentration in Äpfeln.....	142
5.3.10 Knock-out von Genen in <i>Penicillium</i>	142
5.3.11 Analyse der Mykotoxinbildung.....	143
5.3.12 Dünnschichtchromatografie.....	144
5.3.13 HPLC.....	145
5.3.14 Analyse der Genexpression.....	145
5.3.15 Einstellen der Wasseraktivität des Mediums.....	149
6 Literaturverzeichnis	150

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
a_w	Wasseraktivität
bp	Basenpaare
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CoA	Coenzym A
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy Spiro (1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo(3.3.1.1. ^{3,7})decan)-4-yl)-phenyl phosphate
DC	Dünnschichtchromatographie
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HOG	<i>high osmolarity glycerol</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
LB	Luria-Bertani-Medium
MAP-Kinase	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MG	Malz- und Glucose-Medium
OTA	Ochratoxin A
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
PEG	Polyethylenglykol
PKA	Proteinkinase A
PKS	Polyketidsynthase
RAPD	<i>randomly amplified polymorphic DNA</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SSC	NaCl-Na ₃ Citrat
TBE	<i>Tris-buffered-EDTA</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YES	<i>Yeast extract sucrose</i>

1 Zusammenfassung

Citrinin ist ein wichtiges lebensmittelrelevantes Mykotoxin. Wie die meisten Mykotoxine weist Citrinin verschiedene toxische Wirkungen gegenüber Menschen, und Tieren auf. Unter anderem (u. a.) kommen in der Gattung *Penicillium* mehrere citrininbildende Spezies vor. Das Mykotoxin Citrinin kommt auf einem breiten Spektrum von Lebensmittelprodukten vor. Jedoch existieren über die Regulation der Citrininbildung nur wenige Daten. In dieser Arbeit wurden *Penicillium verrucosum* (*P. verrucosum*), *Penicillium expansum* (*P. expansum*) und *Penicillium citrinum* (*P. citrinum*) als Modellspezies für die Untersuchung der Regulation der Citrininbildung ausgewählt. Da die Umweltfaktoren die Mykotoxinbildung beeinflussen können, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der wichtigsten Umweltfaktoren auf die Citrininbiosynthese untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Temperatur, die Wasseraktivität und der pH-Wert der Umgebung einen starken Einfluss auf die Citrininregulation bei den unterschiedlichen Spezies haben. Im Gegensatz zu *P. verrucosum* und *P. expansum* haben die Umweltfaktoren bei *P. citrinum* allerdings weniger Einfluss. In dieser Arbeit gelang es, auch die Gene der Citrininbildung bei den drei *Penicillium* Spezies zu charakterisieren. Die Citriningene in *Penicillium* weisen hohe Homologien untereinander und zu den Genen in *Monascus* auf. Durch die Inaktivierung des Polyketidsynthasegens (*pksCT*) konnte gezeigt werden, dass sie für die Citrininbiosynthese bei *P. citrinum* und *P. expansum* wichtig ist. Bei *P. verrucosum* ist die *pksCT* für die Bildung von Ochratoxin A und Citrinin verantwortlich. Weiterhin wurde gezeigt, dass die HOG-, PACC- und cAMP/G-Protein-Signalwege bei der Regulation der Citrininbildung eine wichtige, speziesabhängige Rolle spielen. Neben diesen spezifischen Regulatoren konnte auch gezeigt werden, dass der globale Regulator Velvet bei der Citrininbildung entscheidend ist. Für *P. expansum* wurde laut Literaturdaten gezeigt, dass Patulin, ein weiteres von dieser Spezies gebildete Mykotoxin, einen Kolonisierungsfaktor darstellt und die Kolonisierung von Äpfeln fördert. Laut Literaturdaten können viele *P. expansum* Stämme Citrinin bilden, obwohl dieses Toxin in Äpfeln nur in geringerer Menge nachgewiesen werden kann. In dieser Arbeit ist es gelungen die Bildung von Citrinin durch *P. expansum* in Äpfeln zu bestätigen und dessen geringe detektierbare Mengen zu erklären. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Pathogenitätsversuche auf Äpfeln und auf apfelbasiertem Medium durchgeführt. Die

Ergebnisse zeigten, dass die Bildung von Citrinin ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung von Äpfeln spielt.

2 Einleitung

2.1 Schimmelpilze

Schimmelpilze sind eine Gruppe der filamentösen Pilze. Sie stellen eine Gruppe der heterotrophen und eukaryotischen Mikroorganismen dar. Bei den Pilzen gibt es unterschiedliche Lebensformen. Filamentöse Pilze haben keine Photosynthese, da sie kein Chlorophyll besitzen. Sie sind daher C-heterotroph. Sie kommen als Saprophyten oder Parasiten auf Pflanzen oder Tieren vor. Einige Pilze gehen mit anderen Organismen Symbiosen ein. Die Pilze sind in der Lage verschiedene Sekundärmetaboliten zu bilden, u. a. die Mykotoxine. Bei den Pilzen, wie auch bei den meisten Mikroorganismen, ist während des Wachstums, zwischen dem Primärmetabolismus und dem Sekundärmetabolismus zu unterscheiden. Zu Beginn des Wachstums, wenn noch genügend Nährstoffe vorhanden sind, werden die für das Wachstum wichtigen Substanzen, wie z. B. Aminosäuren, Lipide, Vitamine, Zucker und Proteine synthetisiert. Wenn sich die Wachstumsbedingungen ändern, durch z. B. ein verringertes Nährstoffangebot, produzieren die Pilze die Sekundärmetaboliten. Bei den Pilzen gibt es unterschiedliche Wachstumsformen. Meistens vermehren sich die Pilze vegetativ durch die Bildung von Sporen. Diese werden auch Konidien genannt. Unter den Bedingungen, die für einen Pilz förderlich sind, wachsen die Sporen weiter und bilden das Myzel. Dies ist eine Verdichtung aus mikroskopischen knotenförmigen Fäden mit mehreren Kernen. Bestimmte Penicillien können sich auch sexuell durch die Bildung von Ascosporen vermehren. Andere Pilze vermehren sich vegetativ durch Knospung. Diese Form der Vermehrung ist u. a. bei *Saccharomyces cerevisiae* zu finden. Der Focus dieser Arbeit lag auf den Pilzen, die für Lebensmittel von Bedeutung sind. Ein Befall der Lebensmittel mit Schimmelpilzen hängt von vielen Faktoren ab und ist häufig mit einer Mykotoxinbildung verbunden. Entscheidend für einen Schimmelpilzbefall sind optimale Wachstumsbedingungen, die stammabhängig sind. So haben die meisten Pilze eine optimale Wachstumstemperatur von 25 °C bis 35 °C. Nicht nur die Temperatur spielt beim Wachstum und der Mykotoxinbiosynthese eine wichtige Rolle, sondern auch das Nährstoffangebot und ein bestimmtes Maß an Feuchtigkeit. Schimmelpilze können auch nützlich sein. Viele Schimmelpilze sind in der Industrie von großer Bedeutung. Für die Herstellung von verschiedenen Backprodukten

werden die Hefen verwendet und auch in der Pharmaindustrie werden manche Pilze eingesetzt. Viele Arzneimittel wie z. B. Antibiotika und viele Enzyme werden aus Schimmelpilzen isoliert. Aus Schimmelpilzen der Gattung *Penicillium* werden z. B. die Penicilline hergestellt. Bei der Herstellung von edelsüßen Weinen wird der Schimmelpilz *Botrytis cinerea* verwendet. Verschiedene Aspergillusarten kommen in der Produktion von asiatischen fermentierten Lebensmitteln vor. So kommen z. B. *A. oryzae* und *A. glaucus* bei der Herstellung von Shoyu und Miso, zwei bekannte Lebensmittel in Japan und China, zum Einsatz. *Penicillium camemberti*, ist eine Pilzart, die für die Herstellung verschiedener französischer Käse wie Camembert, Brie und Coulommiers wichtig ist (Frisvad et al., 2004).

2.2 Mykotoxine

Mykotoxine sind giftige Produkte der filamentösen Pilze. Für andere Organismen wie Pflanzen, Tiere und Menschen stellen Mykotoxine ein ernsthaftes Risiko dar und können bei diesen Organismen verschiedene Erkrankungen verursachen. Der Verzehr der mit Mykotoxinen befallenen Lebensmittel kann zu schwerwiegenden gesundheitlichen Problemen führen. Dies ist schon bei geringen Konzentrationen möglich. Bei den Menschen können die Mykotoxine verschiedene lebenswichtige Organe wie Nieren, Leber, Darm oder das Nervensystem schädigen. Viele Pilzarten der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und *Fusarium* können auf verschiedenen Lebensmittelprodukten wachsen und Mykotoxine bilden. Mykotoxine werden im Sekundärstoffwechsel der filamentösen Pilze gebildet. Mittlerweile gibt es mehr als 400 bekannte Mykotoxine. Es gibt Pilzarten, die mehr als ein Mykotoxin bilden können. *P. verrucosum* z. B. bildet u. a. zwei Mykotoxine, Ochratoxin A und Citrinin. Bei anderen Spezies ist nur die Bildung eines Mykotoxins bekannt. *Penicillium nordicum* (*P. nordicum*) bildet z. B. Ochratoxin A als wichtigsten Sekundärmetabolit, während *P. citrinum* Citrinin bildet. Das Gefährdungspotential der Mykotoxine ist sehr unterschiedlich. Es gibt Mykotoxine, die hochgiftig sind. Andere sind sogar krebserregend. Bei den Menschen mit abgeschwächtem Immunsystem können diese Stoffe schwerwiegende gesundheitliche Probleme verursachen. Mykotoxine werden unter bestimmten Bedingungen und auf bestimmten Habitaten gebildet. Sie sind in den Myzelien zu finden, werden aber auch ins Medium ausgeschieden. Die Sporen der filamentösen Pilze können ebenfalls Mykotoxine enthalten. Zu den bekanntesten

Mykotoxinen, die für die Lebensmittel von Bedeutung sind, gehören die Aflatoxine, Ochratoxine, Trichothecene, Fumonisine, Patulin und Citrinin. Ihre Produzenten gehören verschiedenen Gattungen an. Citrinin, Ochratoxin A und Patulin sind, wie die meisten Mykotoxine, Polyketide und werden über einen Polyketidweg synthetisiert. Verschiedene Umweltfaktoren haben einen großen Einfluss auf die Mykotoxinbildung. Zu den bekanntesten Umweltfaktoren, die die Bildung der Mykotoxine beeinflussen, zählen der pH-Wert, die Temperatur, die Wasseraktivität und die Substratzusammensetzung. Filamentöse Pilze können die Veränderungen im Umgebungsmilieu detektieren.

Die biologische Bedeutung der Mykotoxine ist noch nicht vollständig bekannt. Diesbezüglich wurden verschiedene Hypothesen erstellt. Da sie toxische Eigenschaften aufweisen wurde z. B. vermutet, dass filamentöse Pilze Mykotoxine als Verteidigungsstrategien gegen andere Organismen in ihrer Umgebung bilden oder als Substanzen, die den Pilzen für eine bessere Adaptation an bestimmte Habitate dienen. Es wurde z. B. gezeigt, dass Penicillien Ochratoxin A bilden, um sich in salzhaltigen Habitaten besser durchzusetzen (Schmidt-Heydt et al., 2012). In Bezug auf die Patulinbildung konnte gezeigt werden, dass Patulin als Kolonisierungsfaktor für die Infektion von Äpfeln durch *P. expansum* dient (Sanzani et al., 2012; Snini et al., 2016). Die Mykotoxine Citrinin und Patulin wurden nach ihrer Entdeckung als Antibiotika betrachtet, da sie hemmende Wirkung gegen Bakterien haben (Mazumder et al., 2002; Moake et al., 2005). Jedoch ihre toxischen Eigenschaften verhindern ihren Einsatz als Antibiotika für Menschen. Da die untersuchenden *Penicillium* Spezies Citrinin, Ochratoxin A und Patulin bilden, werden diese Mykotoxine in dieser Arbeit beschrieben.

Citrinin

Citrinin ist ein Mykotoxin, das von einigen Pilzarten der Gattungen *Aspergillus*, *Monascus* und *Penicillium* gebildet wird. Das Mykotoxin Citrinin wurde 1930 von *P. citrinum* isoliert (Hetherington and Raistrick, 1931). Nach zahlreichen Studien wurde es von anderen Pilzarten der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und *Monascus* isoliert (Comerio et al., 1998; Shimizu et al., 2005). In der Gattung *Penicillium* wird Citrinin von *P. citrinum*, *P. expansum* und *P. verrucosum*, von der Gattung *Aspergillus* von *A. candidus*, *A. terreus* und *A. niveus* gebildet. In der Gattung *Monascus* sind *Monascus purpureus* (*M. purpureus*) und *Monascus*

aurantiacus (*M. aurantiacus*) in der Lage, hohe Mengen an Citrinin zu bilden. Toxikologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Citrinin multiple toxische Effekte hat. Auf phänotypischer Ebene zeigt Citrinin nephrotoxische und hepatotoxische Eigenschaften, die durch seine molekularen Wirkungen, wie die Inhibierung der DNA- und RNA-Synthese hervorgerufen werden. Es kann auch Krebs und Mutationen bei verschiedenen Wirbeltieren auslösen. Außerdem wird vermutet, dass Citrinin neben Ochratoxin A die Ursache für die endemische Balkan-Nephropathie ist (Aiko et al., 2013; Vrabcheva et al., 2000). Zudem hat Citrinin auch antibiotische Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien (Kavanagh, 1947; Kiser and Zellert, 1945). Bereits durchgeführte Studien über das Vorkommen von Citrinin zeigten, dass dieses Mykotoxin in einer Vielzahl von Substraten gefunden werden kann (Dutta, 2008). Insbesondere kommt Citrinin auf Lebensmittelprodukten pflanzlichen Ursprungs vor. Es wurde auf verschiedenen Obst- und Gemüseprodukten, Getreide und Getreideprodukten nachgewiesen (Martins et al., 2002; Somorin et al., 2016; Xu et al., 2006). Allerdings ist die nachgewiesene Menge meist gering, was Vermutungen über eine relativ leichte Degradation des Citrinins bedingt hat (Dietrich et al., 2001). Eine Citrininbildung durch Penicillien tritt bevorzugt in den Regionen mit gemäßigttem Klima auf. *P. verrucosum* ist für die Bildung von Citrinin in Getreide verantwortlich. Neben Citrinin bildet *P. verrucosum* auch Ochratoxin A auf Getreide. *P. citrinum* ist der Hauptbildner von Citrinin in salzhaltigen Gemüseprodukten, wie Oliven (Heperkan et al., 2009). In Früchten wie Äpfeln, Trauben und in Birnen wird Citrinin durch *P. expansum* gebildet (Viñas et al., 1993).

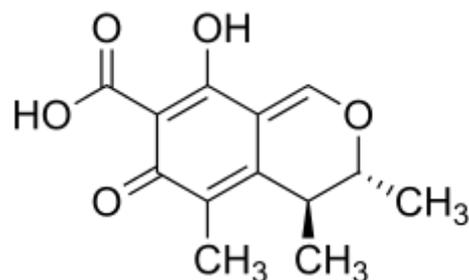


Abb. 1: Strukturformel von Citrinin

Ochratoxin

Die Ochratoxine sind eine Gruppe der Mykotoxine, die von vielen Arten der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* synthetisiert werden. Es gibt verschiedene

Typen der Ochratoxine, wobei Ochratoxin A, Ochratoxin B und Ochratoxin C die wichtigsten sind. Hinsichtlich der Toxizität der Ochratoxine ist Ochratoxin A das stärkste Toxin. Neben Ochratoxin A wurde auf den Lebensmitteln bisher nur Ochratoxin B gefunden. Die Struktur von Ochratoxin A besteht aus einem Isocoumarin-Rest, der mit der Aminosäure, Phenylalanin, über eine Peptidbindung verbunden ist (Harris and Mantle, 2001; Van der Merwe et al., 1965). Ochratoxin A wird von mehreren Spezies von *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet (Varga et al., 2001). In der Gattung *Penicillium* wird Ochratoxin A in großen Mengen vor allem von *P. nordicum* und *P. verrucosum* gebildet. *P. nordicum* kommt ebenfalls meistens auf salz- und proteinhaltigen Lebensmitteln vor. In der Gattung *Aspergillus* sind *A. ochraceus*, *A. niger* und *A. carbonarius* die Hauptbildner von Ochratoxin A. Ochratoxin A ist ein potentes nephrotoxisches Mykotoxin (Pohland et al., 1992). Im Jahre 1993 wurde Ochratoxin A von der internationalen Agentur für Krebsforschung als mögliches Humankarzinogen der Gruppe 2B eingestuft (IARC, 1993). Es ist weltweit als Lebensmittelkontaminant bekannt und kommt auf Getreideprodukten wie Weizen, Mais, Gerste, Hafer, Roggen, Mehl und Brot vor (El-dessouki, 1992). Zudem kann Ochratoxin A in anderen Lebensmittelprodukten wie Kaffee, Käse und Bohnen vorkommen (Varga et al., 2001). In den gemäßigten Zonen ist meist *P. verrucosum* für die Bildung von Ochratoxin A auf verschiedenen Lebensmittelprodukten verantwortlich, während die Aspergillen für die Ochratoxin A-Bildung wärmere Klimazonen bevorzugen. Frühere Studien über Mykotoxine zeigten, dass Ochratoxin A unterschiedliche Wirkungen auf das Immunsystem hat (Thurston et al., 1986). Seine toxische Wirkung in den Zellen beruht auf der Hemmung der Proteinbiosynthese durch kompetitive Hemmung der Phenylalanin-t-RNA Synthetase (Breitholz-Emanuelsson et al., 1995).

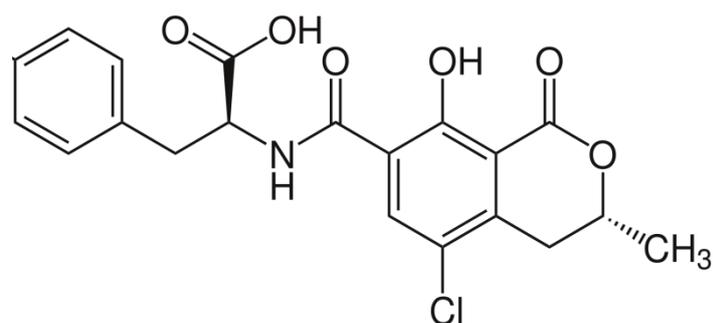


Abb. 2: Strukturformel von Ochratoxin A

Patulin

Das Mykotoxin Patulin wird von einigen Arten von *Aspergillus* und *Penicillium* auf verschiedenen Lebens- und Futtermitteln gebildet (Harwig et al., 1973; Stott and Bullerman, 1975). Patulin wird auch häufig als Kontaminant in Apfelprodukten wie Apfelsaft gefunden (Martins et al., 2002). In der Gattung *Penicillium* ist *P. expansum* der wichtigste Patulinbildner, der vor allem in kontaminiertem Obst und Gemüse vorkommt. Bereits durchgeführte toxikologische Studien mit Ratten haben gezeigt, dass Patulin verschiedene toxische Wirkungen hat. Es wurde u. a. gezeigt, dass Patulin eine hemmende Wirkung auf die DNA-Synthese hat (Moake et al., 2005). Außerdem konnten Puel et al. (2010) zeigen, dass Patulin genotoxische Eigenschaften aufweist. In Mäusen und Kaninchen wurde gezeigt, dass Patulin eine Veränderung im Immunsystem auslöst. Dabei wurde eine Zunahme der Anzahl der T-Lymphozyten, eine geringe Konzentration der Immunglobuline, eine verzögerte immunologische Reaktivität sowie eine Erhöhung in der Anzahl der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen (Escoula et al., 1988 a,b). Aufgrund des Patulinvorkommens in verschiedenen Lebensmittelprodukten und seiner toxischen Eigenschaften wurden innerhalb der EU gesetzliche Patulinhöchstmengen für bestimmte Lebensmittel erlassen (Bonerba et al., 2010).

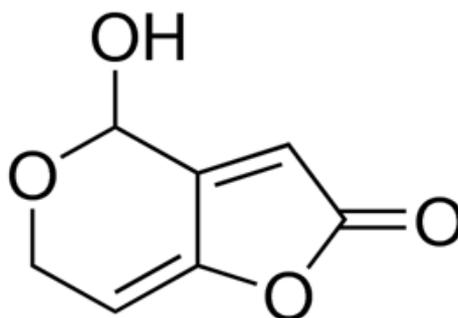


Abb. 3: Strukturformel von Patulin

2.3 Generelle Eigenschaften der Gattung *Penicillium*

Penicillium ist eine der wichtigsten Gattungen der filamentösen Pilze. Die Arten dieser Gattung sind weltweit verbreitet und kommen auf verschiedenen Habitaten

vor. Sie sind im Boden, in der Luft und auf kolonisierten Früchten zu finden. Die Penicillien bevorzugen Regionen mit moderatem bis warmen Klima. Die Arten dieser Gattung sind durch die Bildung von verschiedenen Sekundärmetaboliten bekannt (Frisvad and Filtenborg, 1983). Als Saprophyten bauen die Penicillien die organischen Substanzen vom toten Material ab und metabolisieren sie. Sie haben eine große ökologische Rolle in der Natur als Destruenten. Durch die Zersetzung der organischen Stoffe stellen sie anderen Organismen (Produzenten) die anorganischen Stoffe zur Verfügung und spielen somit eine wichtige Rolle in der Nahrungskette. Die Gattung *Penicillium* umfasst 354 Arten (Visagie et al., 2014). Einige *Penicillium*-Arten sind in der Nahrungsmittel- sowie der Pharmaindustrie von großer Bedeutung, da sie in der Produktion von verschiedenen Käsesorten oder Fleischprodukten eingesetzt werden. Ein sehr bekanntes Beispiel für die Wichtigkeit mancher Penicillien ist das Antibiotikum Penicillin, das von *P. chrysogenum* isoliert wurde. Viele Penicillien sind auch lebensmittelrelevant, da viele Spezies, die auf Lebensmittel wachsen können, der Gattung *Penicillium* angehören. Die Penicillien vermehren sich sowohl geschlechtlich (Spezies *Eupenicillium*, *Talaromyces*) als auch ungeschlechtlich. In dieser Gattung gibt es auch viele Arten, die sich nur durch ungeschlechtliche Weise durch die Bildung von Konidiosporen vermehren. Spezies dieser Gattung können verschiedene Mykotoxine bilden. Dazu zählen u. a. Ochratoxin A, Patulin und Citrinin. Bezüglich der Citrininbildung gibt es in dieser Gattung viele Citrininbildner, die auf verschiedenen Lebensmittelprodukten vorkommen. In dieser Arbeit wurden *P. citrinum*, *P. expansum* und *P. verrucosum* als Modelorganismen für die Untersuchung der Regulation der Citrininbiosynthese ausgewählt. Diese Spezies sind relativ nah miteinander verwandt und kommen auf verschiedenen Habitaten vor. Interessanterweise können alle drei Spezies zusammen auf salzhaltigen Habitaten vorkommen (Comi et al., 2004, Núñez et al., 1996).

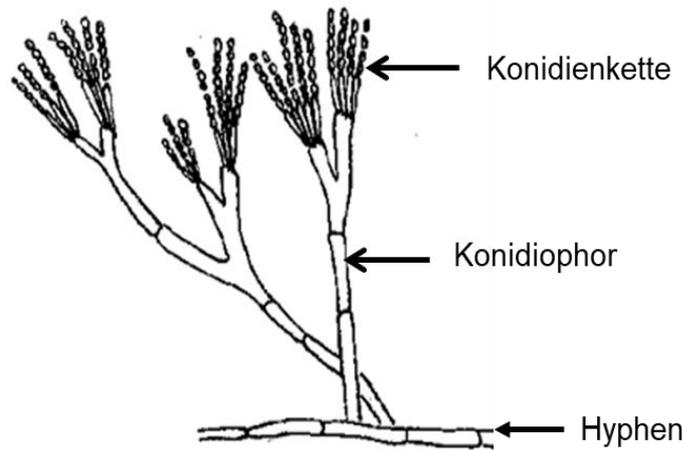


Abb. 4: Schematische Darstellung von *Penicillium*-Konidienträgern. Quelle des Bildes: <https://de.wikipedia.org/wiki/Pinselschimmel>.

Penicillium verrucosum

Penicillium verrucosum kommt vorzugsweise in Regionen mit kalten und moderaten klimatischen Bedingungen vor. Diese Spezies kommt hauptsächlich auf Getreide wie z. B. Weizen und verschiedenen Getreideprodukten vor (Bragulat and Cabañes, 2008; Lund and Frisvad, 2003). Diese Spezies kann verschiedene Sekundärmetaboliten, darunter Ochratoxin A und Citrinin, bilden (Larsen et al., 2001). Das Wachstum von *P. verrucosum* auf Getreide und Getreideprodukten führt zur Kontamination dieser Produkte mit Ochratoxin A (Lindblad et al., 2004; Lund and Frisvad, 2003) und Citrinin (Vrabcheva et al., 2000). Zudem kann diese Spezies auch auf den salzhaltigen Habitaten wie z. B. auf fermentierten Oliven und Käse (Gareis and Scheuer, 2000; Heperkan et al., 2009) oder getrockneten Fleischprodukten (Asefa et al., 2009; Comi et al., 2004) vorkommen. Auf diesen Substraten produziert *P. verrucosum* hohe Mengen an Ochratoxin A (Larsen et al., 2001). Die Wachstumsbedingungen haben einen großen Einfluss auf die Bildung dieser Mykotoxine. Je nach Bedingungen bildet *P. verrucosum* große Mengen an Citrinin oder Ochratoxin A.



Abb. 5: Getreide und Getreideprodukte, das wichtigste Habitat von *P. verrucosum*.
Quelle der Bilder: <https://de.wikipedia.org/wiki/Mykotoxin>.

Penicillium expansum

Penicillium expansum ist ein lebensmittelrelevanter Pilz. Die Spezies gilt als „post-harvest“ pflanzenpathogene Spezies. Früchte wie Äpfel, Kirschen und Birnen sind seine spezifischen Habitate, wobei Äpfel das hauptsächliche Habitat für diese Spezies ist. *P. expansum* kann aber ebenfalls auf anderen Produkten wie Walnüsse, Pecannüsse, Haselnüsse oder Eicheln gefunden werden (Filternborg et al., 1996). Außerdem kommt *P. expansum* auf salzhaltigen Habitaten zusammen mit anderen Penicillien wie *P. citrinum* und *P. verrucosum* vor. Diese Pilzart produziert zwei wichtige Mykotoxine, Citrinin und Patulin (Harwig et al., 1973). Es ist bekannt, dass Patulin einen Kolonisierungsfaktor darstellt. Patulin wird von dieser Spezies gebildet, um die Kolonisierung von Äpfeln zu verbessern. Mutanten, die kein Patulin mehr bilden, zeigen je nach Bedingung eine stark reduzierte Kolonisierungsfähigkeit (Sanzani et al., 2012; Snini et al., 2016). Citrinin, das zweite wichtige Mykotoxin wird nach Wachstum auf Labormedien in moderaten bis hohen Mengen gebildet, während auf Äpfeln wenig Citrinin gefunden wird (Dietrich et al., 2001; Martins et al., 2002; Pepeljnjak et al., 2002; Singh and Sumbali, 2008; Watanabe, 2008). *P. expansum* stellt die wichtigste Ursache für die Grünfäule dar, einem grünen Pilzrasen auf Früchten, wie Äpfeln, Birnen und Weintrauben. Der Pilz kann daher zu großen Ernteverlusten führen (Cappellini et al., 1987; Jurick et al., 2011). Auf Trauben kommt *P. expansum* meistens zusammen mit *Botrytis cinerea* vor, einem Pilz, der unter bestimmten Bedingungen Trauben befallen kann. *P. expansum* an sich stellt keine Gefahr für die Menschen dar. Aber der Verzehr der mit *P. expansum*

verschimmelten Futter- und Lebensmittel kann zu gesundheitlichen Problemen führen, da die Lebensmittel, die Toxine Citrinin und Patulin enthalten können (McCallum et al., 2002). Auch *P. expansum* kann, wie *P. verrucosum*, neben Äpfeln und Früchte als seinem wichtigsten Habitat, in salzreichen Umgebungen, wie fermentierte Fleischprodukte gefunden werden (Bailly et al., 2002; Battilani et al., 2007; Comi et al., 2004).

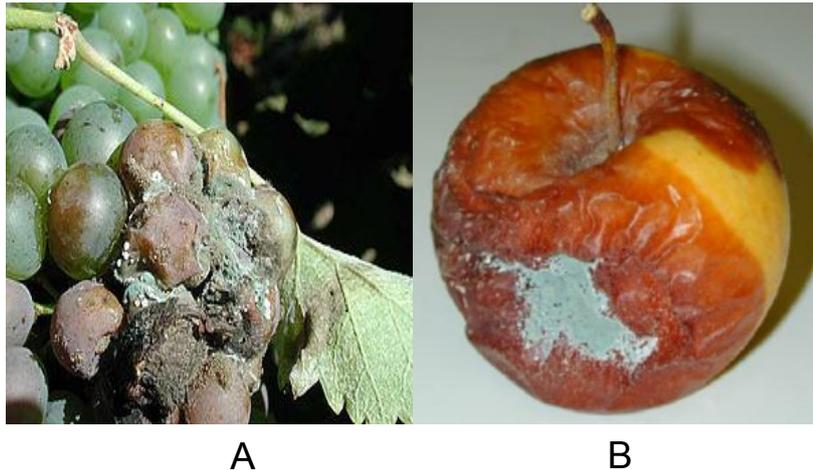


Abb. 6: Beispiele der natürlichen Habitate von *P. expansum*. Quelle der Bilder: A: https://de.wikipedia.org/wiki/Penicillium_expansum. B: (Puel et al., 2010)

Penicillium citrinum

Bisher ist *P. citrinum* durch die Bildung des einzigen Mykotoxins, des Citrinins, in hohen Mengen bekannt. Diese Pilzart bevorzugt kein bestimmtes Habitat, sondern sie kommt ubiquitär vor. Aufgrund seiner Eigenschaft als mesophiler Organismus ist *P. citrinum* weltweit zu finden. *P. citrinum* gilt ebenfalls als sehr resistent gegenüber verschiedenen Umweltfaktoren. *P. citrinum* kann bei Temperaturen bis 37 °C wachsen und wurde von verschiedenen Habitaten wie Wasser, Böden, Getreide, Früchten, verschiedenen Nüssen und Oliven isoliert (Dutta et al., 2007; Heparan et al., 2006). Konidiosporen von *P. citrinum* sind ubiquitär als eine der häufigsten Sporenarten in der Luft vorhanden (Khosravi et al., 2012). Außerdem wurde berichtet, dass *P. citrinum* auch als Endophyt auf verschiedenen Pflanzen, wie beispielsweise der Kaffeepflanze (Posada et al., 2007), in den Wurzeln von *Ixeris repenes* (Khan et al., 2008) oder auf den Blättern der Kathstrauchpflanzen

(Mahmoud, 2000) wachsen kann. *P. citrinum* kommt auch häufig auf salzhaltigen Habitaten bzw. Lebensmittelprodukten vor (Bailly et al., 2002).

Obwohl die drei *Penicillium*-Spezies *P. verrucosum*, *P. expansum* und *P. citrinum* auf unterschiedlichen Habitaten vorkommen, haben sie zwei gemeinsame Eigenschaften: die erste Eigenschaft ist, dass sie alle in der Lage sind, Citrinin zu bilden. Während *P. citrinum* konsistent hohe Mengen an Citrinin bilden kann, bilden *P. verrucosum* und *P. expansum* moderate bis hohe Citrininmengen. Die zweite gemeinsame Eigenschaft ist, dass sie zusammen in den salzhaltigen Habitaten vorkommen.

2.4 Regulation der Mykotoxinbildung bei den Pilzen

Die Umweltfaktoren wie Temperatur, Licht oder Osmolarität des umgebenden Milieus sind sehr variabel und können einen großen Einfluss auf die Mykotoxinbildung haben. Je nachdem, ob die Umweltbedingungen positiv oder negativ auf die Pilze wirken, werden die Mykotoxine entsprechend reguliert. Es wurde bereits gezeigt, dass die Signalkaskaden eine wichtige Rolle bei der Regulation der Mykotoxinbildung spielen. So wurde z. B. gezeigt, dass bei filamentösen Pilzen unter oxidativen Stressbedingungen die G-Protein/cAMP/PKA-Signalkaskade bei der Regulation der Biosynthese des Mykotoxins Sterigmatocystin eine wichtige Rolle spielt (Yu and Keller, 2005). HOG-MAP-Kinase Signalweg ist auch bei filamentösen Pilzen hoch konserviert. Kohut et al. (2009) haben herausgefunden, dass dieser Signalweg in der Regulation der Fumonisinbiosynthese unter osmotischem Stress involviert ist. Eine andere wichtige Signalkaskade, die bei der Mykotoxinbildung relevant ist, ist der PACC-Signalweg (Merhej et al., 2011). In dieser Arbeit wurden die wichtigsten Signalkaskaden, die bei der Regulation der Mykotoxinbildung eine Rolle spielen können, beschrieben und deren Bedeutung für die Citrininbildung untersucht.

2.4.1 Osmoregulation durch den HOG-Signalweg

Eine der wichtigen abiotischen Faktoren ist die Osmolarität des Umgebungsmilieus. Unter normalen Wachstumsbedingungen ist die Osmolarität der Pilzzellen normalerweise höher als die Osmolarität der Umgebung. Eine Erhöhung der

extrazellulären Osmolarität z. B. durch Erhöhung der Salzkonzentration des Umgebungsmilieus hat einen negativen Effekt auf die Pilze. Die Osmoregulation ist ein biologischer Prozess, bei dem die Pilze auf die Abweichung im osmotischen Druck reagieren. Die Pilze, wie auch alle anderen Organismen sorgen dafür, dass ihr Zellvolumen und die Konzentration der gelösten Stoffe in ihren Zellen bei einem bestimmten Maß bleiben. Für die Osmoregulation ist der HOG-Signalweg (*high osmolarity glycerol*) von großer Bedeutung (Hohmann, 2002; Warmka et al., 2001). Er ist ein wichtiger hochkonservierter Bestandteil der MAP-Kinase-Signaltransduktion bei filamentösen Pilzen. Über spezielle Sensoren werden die Veränderungen der Osmolarität der Umgebung wahrgenommen, mittels HOG-Signalweg verarbeitet und in den Zellkern transportiert. Darauf wird eine zelluläre Antwort eingeleitet. Die Osmoregulation durch den HOG-Signalweg wurde in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* im Detail beschrieben (Gustin et al., 1998). Wenn die Pilze dem osmotischen Stress ausgesetzt sind, durch z. B. Erhöhung der Osmolarität der Umgebung, wird der HOG-Signalweg aktiviert. Im Grunde ist das Ziel der HOG-Aktivierung, die Initiation der Expression von verschiedenen Genen, die für die Produktion von Osmoprotektanten involviert sind und somit eine Adaptation an die Stressbedingungen zu gewährleisten. Dadurch können die Pilze auf Substraten mit erhöhtem osmotischem Stress überleben. Die Pilze reagieren durch die Akkumulierung von Stoffen z. B. Proteinen und Glycerol, um die innere Osmolarität den neuen Bedingungen anzupassen (Blomberg and Adler, 1989). Der HOG-Signalweg ist bei der Regulation der Mykotoxinbildung involviert. Es wurde schon gezeigt, dass HOG-Signalweg bei der Regulation der Alternariolbildung bei *Alternaria alternata* eine wichtige Rolle spielt (Geisen et al., 2016; Graf et al., 2012), ebenso bei der Regulation der Fumonisinbildung durch *Fusarium proliferatum* (Kohut et al., 2009). Daher wird in dieser Arbeit überprüft, ob dieser Signalweg auch bei der Citrininregulation involviert ist.

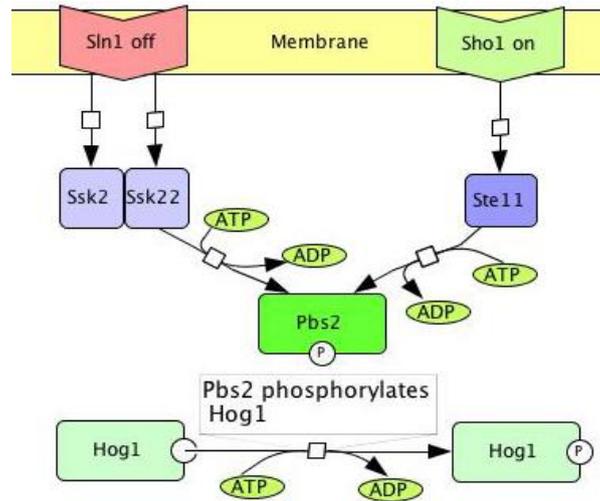


Abb. 7: Vereinfachte schematische Darstellung des HOG-Signalwegs. Sln1 und Sho1 sind Transmembranproteine. Unter hyperosmotischen Stressbedingungen wird Sho1 aktiviert und aktiviert durch Phosphorylierung die Proteine Ste11 und Pbs2. Aktiviertes Pbs2 phosphoryliert den Transkriptionsfaktor Hog1. Der aktivierte Hog1 reguliert die Transkriptionsfaktoren, die Zielgene für die Glycerolbiosynthese regulieren. Unter normalen Bedingungen ist Hog1 inaktiv und es wird kein Glycerol synthetisiert. Quelle des Fotos: http://2014.igem.org/Team:EPF_Lausanne/Yeast.

2.4.2 pH-Regulation durch den PACC-Signalweg

Bei filamentösen Pilzen hängt die Expression von vielen Genen stark vom pH-Wert der Umgebung ab. Der pH-Wert hat einen großen Einfluss auf verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsprozesse (Lamb et al., 2001). Pilze verfügen über verschiedene Regelsysteme, mit denen sie das innere Gleichgewicht (die Homöostase) gewährleisten. Bei filamentösen Pilzen ist der PACC-Signalweg bei Veränderungen des pH-Wertes von großer Bedeutung, mittels derer die Pilze die Expression von verschiedenen Genen regulieren. Dabei spielen sieben Gene eine wichtige Rolle. Diese werden *pacC*, *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* und *palI* genannt, wobei *pacC* das wichtigste Gen in dem PACC-Signalweg ist. PacC ist ein Zinkfinger Transkriptionsfaktor und ist die letzte Komponente der PACC-Kaskade. Er wird unter alkalischem pH exprimiert und spielt bei der pH-Regulation eine wichtige Rolle (Tilburn et al., 1995). Er befindet sich in den Zellen meistens in seiner inaktiven Form. Bei alkalischen pH-Bedingungen wird PacC durch eine proteolytische Strukturveränderung in seine aktive Form überführt. Der aktivierte PacC-Transkriptionsfaktor wird in den Zellkern transportiert und aktiviert dort die Expression der alkalisch induzierten Gene und hemmt die Expression der Säure induzierten Gene (Espeso and Arst, 2000; Orejas et al., 1995; Tilburn et al., 1995).

Die Gene, die unter der PacC-Kontrolle exprimiert werden sind u. a. Gene, die für verschiedene Enzyme wie Exoenzyme, Permeasen und die Gene, die für die Zellwandbiosynthese wichtig sind (Caddick et al., 1986; Fonzi, 1999). Bei der Regulation der Mykotoxinbildung kann der PACC-Signalweg eine Rolle spielen. Geisen et al. (2016) konnten herausfinden, dass die Alternariolbildung bei *Alternaria alternata* durch diese Signalkaskade reguliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wird überprüft, ob die Citrininbildung bei den drei ausgewählten *Penicillium* Spezies durch PACC-Signalweg reguliert wird.

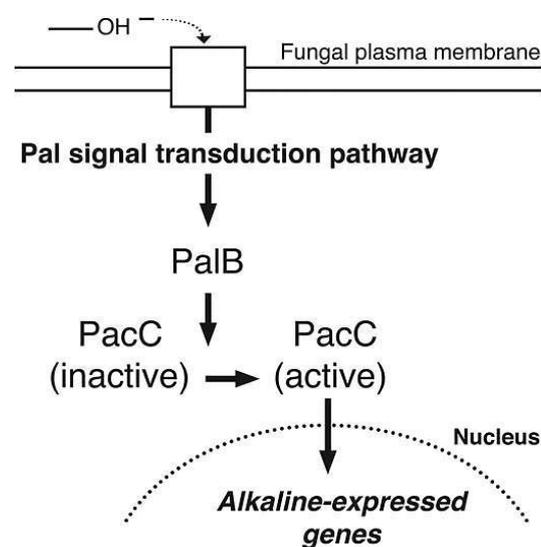


Abb. 8: Vereinfachtes Schema der pH-Regulation durch PACC-Signalweg (Hua et al., 2010). Die Veränderungen des pH-Wertes in der Umgebung werden vom Pilz detektiert. Durch den beschriebenen Signalweg wird der PacC Transkriptionsfaktor aktiviert und in den Zellkern transloziert. Im Zellkern kann der aktivierte PacC u. a. die Expression der Mykotoxingene regulieren.

2.4.3 G-Protein-Signalweg

Die Rolle von G-Protein in der Signaltransduktion in Eukaryoten ist relativ gut untersucht. In den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* wurde für das G-Protein eine Rolle beim Kreuzungsprozess beschrieben (Bardwell, 2005). Das G-Protein besteht aus drei Untereinheiten (α , β und γ), die an der Plasmamembran assoziiert sind (Neves et al., 2002). Die Untereinheit α besitzt sowohl eine GTP- als auch eine GDP-Bindedomäne. Wenn kein Ligand an den Rezeptor gebunden ist, ist das G-Protein inaktiv und die drei Untereinheiten bilden einen Komplex. Die Bindung eines

Liganden führt zu einer Änderung in der Struktur des G-Proteins und somit zur Dissoziation der Untereinheiten (α , β und γ). Entscheidend dafür ist ein GTP-Austauschfaktor (Guanosine triphosphate Austauschfaktor), der an das G-Protein bindet und GDP durch GTP ersetzt. Der Austausch von GDP durch GTP aktiviert das G-Protein. Das aktivierte G-Protein löst sich vom Rezeptor ab und bindet an eine Adenylatcyclase, ein membranständiges Enzym, das ATP zu cAMP umwandeln kann. Die Proteinkinasen (PKA) werden durch cAMP aktiviert und aktivieren eine Reihe von Signalkaskaden durch Phosphorylierung. In filamentösen Pilzen werden verschiedene Stoffwechselprozesse wie z. B. die Mykotoxinbildung durch diesen Signalweg reguliert. In *A. nidulans* wurde z. B. gezeigt, dass der G-Protein-Signalweg in der Regulation der Sterigmatocystinbildung involviert ist (Shimizu et al., 2001). In *A. parasiticus* konnte auch gezeigt werden, dass dieser Signalweg für die Regulation der Aflatoxinbildung eine Rolle spielt (Roze et al., 2004)

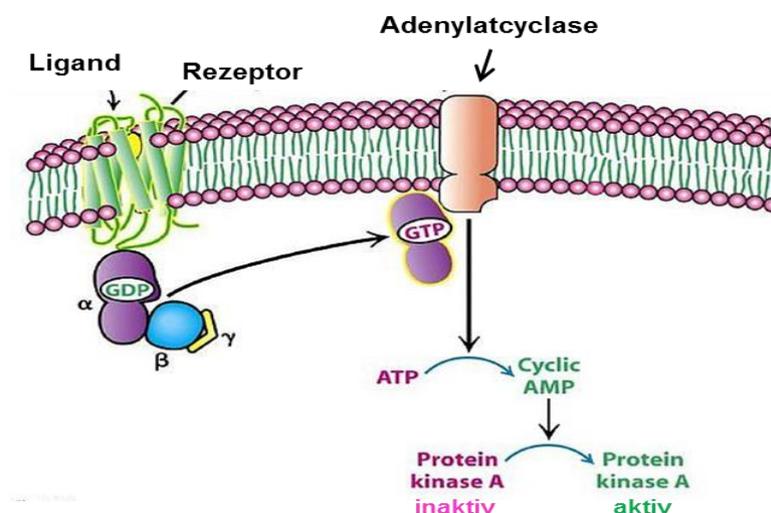


Abb. 9: Vereinfachtes Schema der G-Proteinsignaltransduktion. In der inaktiven Form bilden die Untereinheiten des G-Proteins ein Komplex und sind an den Rezeptor gebunden. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor führt zum Austausch von GDP gegen GTP und somit zur Dissoziation der Untereinheiten. Die α -GTP Untereinheit kann die Adenylatcyclase aktivieren, die wiederum ATP in cAMP umwandeln kann. Die Bindung des cAMP an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) führt zur Aktivierung der katalytischen PKA-Untereinheit. Nun kann die PKA andere Proteine durch Phosphorylierung aktivieren.

2.5 Rolle von Polyketidsynthasen in der Mykotoxinbildung

Wie schon erwähnt, handelt es sich bei den Mykotoxinen Citrinin, Ochratoxin A und Patulin um Polyketide. Bei der Biosynthese der Polyketide sind mehrere Enzyme beteiligt. Die Gene, die für die Mykotoxine kodieren liegen meistens direkt hintereinander auf demselben Chromosom und bilden ein Gencluster. Mittlerweile sind die Gencluster verschiedener Mykotoxine bekannt. Tannous et al. (2014) beschrieben den Patulin Gencluster. Der Cluster besteht aus 15 Genen, Diese wurden *patH*, *patG*, *patF*, *patE*, *patD*, *patC*, *patB*, *patA*, *patM*, *patN*, *patO*, *patL*, *patI*, *patJ* und *patK* genannt. Für die Ochratoxinbildung ist bisher bei den ochratoxinbildenden Spezies kein Gencluster bekannt. Es sind nur einige Gene bekannt, die für Bildung von Ochratoxin A verantwortlich sind. Bei *P. nordicum*, eine nah verwandte Spezies von *P. verrucosum*, ist das *otapksPN*-Gen für die OchratoxinA-Bildung verantwortlich. In *P. verrucosum* wurde eine Polyketidsynthase (*otapksPV*) gefunden. Die Inaktivierung dieses Gens führte zum Ausschalten der OchratoxinA-Biosynthese (O'Callaghan et al., 2013). Interessanterweise handelt es sich bei diesem Gen um die pks der Citrininbildung (*pksCT* = *otapksPV*). O'Callaghan et al. (2013) inaktivierten diese pks und konnten zeigen, dass die Mutante nicht mehr in der Lage war Ochratoxin A zu bilden. Leider präsentierten sie keine Daten über die Citrininbildung. Citrinin und Ochratoxin A besitzen ähnliche Polyketidstrukturen, so dass eine Beteiligung von *pksCT* an der Citrinin- und an der Ochratoxinbildung denkbar ist. Für die Citrininbildung sind mittlerweile die Gene bekannt. Ein Gencluster für die Citrininbildung wurde in *Monascus* beschrieben. In *M. purpureus* besteht der Citriningencluster aus sechs Genen (*orf1*, *ctnR*, *ctnA*, *ctnB*, *pksCT* und *ctnC*). Die Gene kodieren für eine Dehydrogenase, einen Transkriptionsfaktor, eine Oxygenase, eine Oxidoreduktase, eine Polyketidsynthase und einen Transporter (Shimizu et al., 2005). Die Inaktivierung des *pksCT*-Gens von diesen Autoren führte zum Ausschalten der Citrininbiosynthese bei den Mutanten. Der Biosyntheseweg von Citrinin wurde in einigen Pilzen aufgeklärt. In *Monascus ruber* z. B. fängt die Citrininbiosynthese mit der Kondensation von einem Acetyl-CoA Molekül mit drei Malonyl-CoA Molekülen an. Mittels einer Polyketidsynthase wird in erstem Schritt ein Tetraketid synthetisiert. Bei *A. terreus* oder *P. citrinum* werden vier Moleküle Malonyl-CoA mit einem Molekül Acetyl-CoA kondensiert, es entsteht ein Pentaketid.

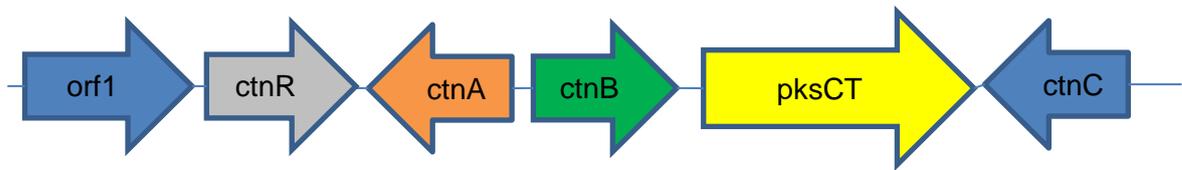


Abb. 10: Citriningencluster in *M. purpureus*. Nach Shimizu et al. (2005).

Die Biosynthese vieler Mykotoxine wird von Polyketidsynthasen katalysiert. Diese sind spezielle komplexe multifunktionale Enzyme mit mehreren Modulen. Die pilzlichen Polyketidsynthasen weisen hohe strukturelle Variabilität auf (Nicholson et al., 2001). Aufgrund ihrer Funktionalität lassen sich die Polyketidsynthasen in drei Gruppen unterteilen. Typ I Polyketidsynthasen sind multifunktionale Proteine und bestehen aus mehreren Modulen bzw. Domänen. Jedes Modul setzt sich aus einer β -Ketoacylsynthase (KS), einer Acyltransferase (AT) und einem Acyl-carrier Protein (ACP) (Cheng et al., 2002; Nicholson et al., 2001) zusammen. Jede Domäne erfüllt eine bestimmte Funktion. Die Ketosynthase katalysiert die Kondensation von Acetyl-CoA mit Malonyl-CoA Molekülen. Die Acyltransferase ist für den Transfer der Acylgruppen (Acetyl-CoA und Malonyl-CoA) verantwortlich. Zudem sind in den Polyketidsynthasen andere Domäne zu finden. Diese sind meistens eine Dehydrogenase (DH), Methyltransferase (MT), Ketoreduktase (KR), Enoylreduktase, Cyclase (CYC) und Thioesterase (TE). Diese Domänen sind für die Biosynthese der Polyketide nicht notwendig, jedoch können sie zusätzliche Aufgaben bei der Verarbeitung der Polyketide erfüllen (Keller et al., 2005). Die Typ I-Polyketidsynthasen lassen sich bei den Bakterien und den Pilzen finden. Bei den Polyketidsynthasen Typ I ist zwischen den Modularen und iterativen Polyketidsynthasen zu unterscheiden. In den Pilzen sind meistens iterative Polyketidsynthasen zu finden. Eine weitere Gruppe der Polyketidsynthasen sind die Typ II Polyketidsynthasen, die aus mehreren Proteinen bestehen. diese Polyketidsynthasen sind für die Biosynthese von aromatischen Polyketiden wie die Antibiotika Daunorubicin und Doxorubicin verantwortlich (Grimm et al., 1994; Stutzman-Engwall et al., 1989). Die dritte Gruppe beinhaltet die Typ III Polyketidsynthasen, die sich strukturell von den vorherigen Typen I und II groß unterscheiden. Diese wurden in Pflanzen, Bakterien und Pilzen gefunden. Trotz der

Vielfalt der Polyketide und dessen Ursprung ist der Biosyntheseweg bei allen Polyketiden ähnlich. Der erste Schritt bei der Polyketidbiosynthese ist meistens die Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA Molekülen. Je nachdem wie viele Moleküle beim ersten Schritt in die Biosynthese eingebaut werden, entstehen Tetraketide oder Pentaketide.

2.6 Zielsetzung

Citrinin ist ein bedeutender Sekundärmetabolit. Bereits durchgeführte Experimente über verschiedene *Penicillium*-Arten haben gezeigt, dass dieses Toxin in unterschiedlicher Menge, in Abhängigkeit von der Spezies, gebildet wird. Daher legt die Vermutung nahe, dass die Citrininbildung bei den unterschiedlichen Arten, unterschiedlich reguliert ist. Es gibt in der Literatur erste Hinweise über die ökologische Bedeutung der Citrininbildung, aber detaillierte Kenntnisse über die Regulation der Citrininbildung sind nicht verfügbar. In dieser Arbeit lag der Fokus auf den drei Spezies, *P. citrinum*, *P. expansum* und *P. verrucosum*. Aufgrund ihres Vorkommens auf Lebensmitteln, wurden diese Spezies für die Untersuchung der Regulation der Citrininbiosynthese innerhalb der Gattung *Penicillium* ausgewählt. Das Hauptziel dieser Arbeit war zunächst die Beschreibung der Citrininregulation bei den drei Spezies. Es sollten zunächst Daten über die Regulation der Citrininbildung unter lebensmittelrelevanten Bedingungen generiert werden, um Möglichkeiten für eine Verhinderung der Citrininbildung aufzuklären. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, welche externen Einflussfaktoren eine Rolle für die Citrininregulation spielen. Nach der Beschreibung der Citrininbildung wurde versucht, die biologische Bedeutung der Citrininbildung bei diesen Spezies zu verstehen. Das beinhaltet die Untersuchung der Rolle der Bildung von Citrinin durch *P. expansum* bei der Kolonisierung von Äpfeln, dem natürlichen Habitat dieser Spezies.

3 Ergebnisse

3.1 Biodiversität von *P. expansum* in Äpfeln

Isolierung von *P. expansum*-Stämmen

Die Citrininbildung von *P. expansum* wurde neben der Citrininbildung von *P. verrucosum* und *P. citrinum* in dieser Arbeit vertieft behandelt. Um einen Überblick über die Population an natürlich vorkommenden *P. expansum*-Stämmen und deren Fähigkeit Toxine zu bilden, zu bekommen wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst 20 *P. expansum* Stämme von verschiedenen kontaminierten Äpfeln unterschiedlicher Sorten isoliert. Zur Isolierung der Stämme wurde ein Stück eines befallenen Apfels mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und auf MG-Medium mit Chloramphenicol (100 µg/ml) aufgebracht. Chloramphenicol ist ein Antibiotikum und wurde eingesetzt, um die eventuell vorhandenen Bakterien abzutöten. Nachdem die Pilze auf MG-Platten gewachsen waren, wurden daraus Sporensuspensionen hergestellt. Die Sporensuspensionen wurden stark verdünnt und nochmal auf MG-Platten mit Chloramphenicol ausplattiert, um die eventuell verbleibenden Bakterien zu eliminieren. Von diesen Platten wurden Einzelsporkulturen der jeweiligen isolierten Pilzstämme angelegt. Diese Einzelsporkulturen wurden für alle weiterführenden Versuche eingesetzt. Sporen dieser gereinigten Einzelsporkulturen wurden auf MG-Platten aufgebracht und bei 25 °C inkubiert. Nach 6 Tagen Wachstum auf MG-Medium, wurde die DNA aus den Pilzstämmen isoliert. Das MG-Medium wurde in diesem Versuch verwendet, da es für die morphologische Charakterisierung der Pilze gut geeignet ist.

Charakterisierung der isolierten Stämme

Zur Identifizierung der isolierten *P. expansum*-Stämme wurden zwei Methoden eingesetzt. Im ersten Schritt wurde eine RAPD (engl. *randomly amplified polymorphic DNA*) mit den verschiedenen Stämmen durchgeführt. Als Kontrolle diente der *P. expansum* BFE189, ein Stamm, der bereits in unserem Labor charakterisiert wurde und als *P. expansum* bekannt ist. Die PCR-Produkte wurden mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Auftrennung der RAPD-Produkte entstanden auf dem Gel Bandenmuster. Der schon bekannte Stamm BFE189 wurde zum Vergleich genommen, und so konnte man abschätzen, ob die neuen Stämme mit dem Referenzstamm verwandt sind oder nicht. Anhand der erhaltenen

Bandenmuster, wurde ein Stammbaum mit den verbliebenen Stämmen mit Hilfe der Bionumerics Software erstellt.

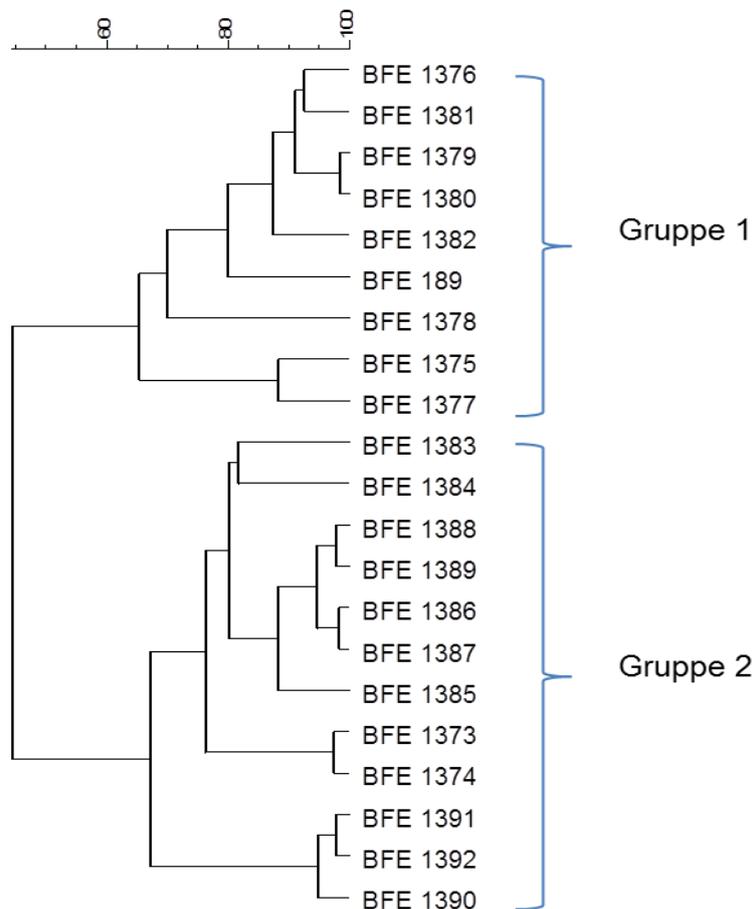


Abb. 11: Phylogenetischer Stammbaum mit den neu isolierten *P. expansum*-Stämmen. Zum Erstellen des Stammbaums wurde eine RAPD mit der DNA der neuen *P. expansum*-Stämme durchgeführt und deren PCR-Produkte auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle diente der *P. expansum* Stamm BFE189, der bereits charakterisiert war. Basierend auf den RAPD Bandenmustern, die bei der Gelelektrophorese entstanden sind, wurde ein Stammbaum mittels Bionumerics Software erstellt.

Wie das Ergebnis zeigt, haben sich zwei Hauptgruppen gebildet. Gruppe 1 und Gruppe 2. Die zwei Gruppen zeigen eine Ähnlichkeit von 65 %. Die Bildung von zwei Gruppen deutet darauf hin, dass die Population von *P. expansum* divers ist. Zur weiteren Charakterisierung der Stämme wurde eine ITS Sequenzierung durchgeführt. Nach der DNA-Extraktion aus den Stämmen, wurde eine PCR mit dem Primerpaar ITS 1 und ITS 4 durchgeführt. Mit diesen Primern sollte die Sequenz des 5,8 S rRNA-Gens sowie die benachbarten DNA-Sequenzen der ITS-Regionen amplifiziert werden. Diese Genombereiche sind bei den Pilzen teilweise sehr variabel

und können zur Speziesidentifizierung genutzt werden. Mittels der BLAST-Funktion auf der Webseite der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) wurden die ITS-Sequenzen mit den Sequenzen in der Gendatenbank des NCBI verglichen. Das Ergebnis der ITS-Sequenzierung zeigte, dass die ITS-Sequenzen der oben gezeigten Stämme alle identisch waren und mit der *P. expansum* ITS-Sequenz übereingestimmt haben. Dieses Ergebnis bestätigt weiterhin, dass die isolierten Stämme der Spezies *P. expansum* angehören.

Citrinin- und Patulinbildung bei verschiedenen Stämmen von *P. expansum*

Um die isolierten *P. expansum* Stämme weiter zu untersuchen, wurden sie auf PDA-Medium angeimpft und nach 7 Tagen bei 25 °C auf ihre Toxinbildung überprüft. PDA-Medium fördert die gleichzeitige Bildung von Citrinin und Patulin. Die Toxine wurden wie im Methodenteil beschrieben mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. Es wurden dreifach Bestimmungen durchgeführt.

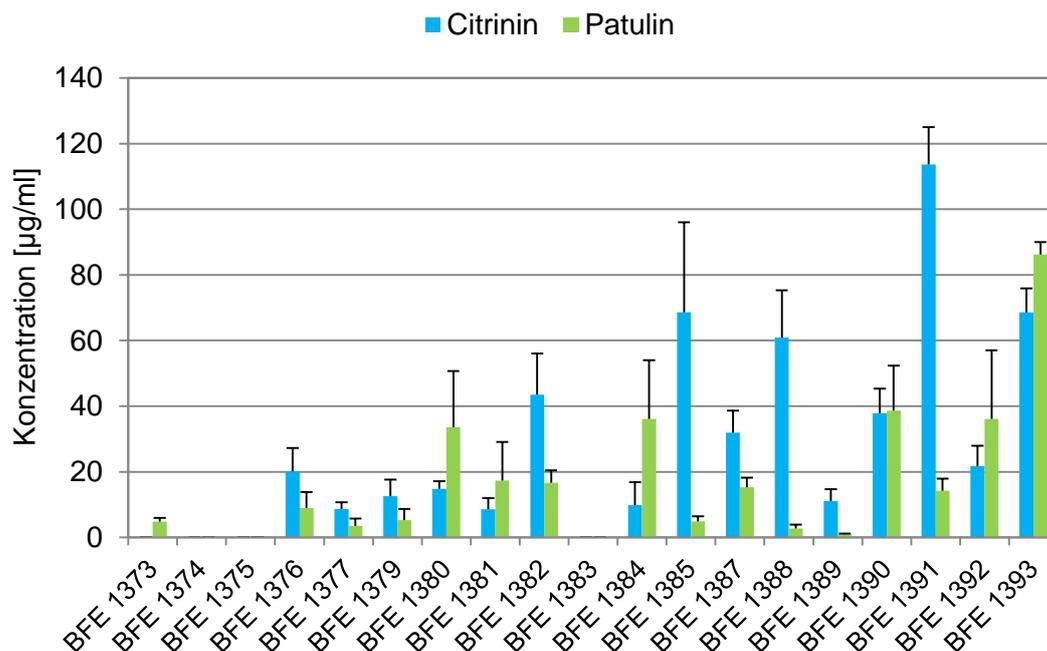


Abb. 12: Citrinin- und Patulinbildung bei verschiedenen *P. expansum*-Stämmen. Zuerst wurden Sporensuspensionen aus frischen Kulturen der isolierten Stämme hergestellt und die Sporenanzahl mittels Thoma Zählkammer auf 10^6 Sporen/ml eingestellt. Die Stämme wurden auf PDA-Medium angeimpft und nach 7 Tagen Inkubation bei 25 °C wurden Proben entnommen und die gebildeten Patulin- und Citrininmengen wurden mittels HPLC bestimmt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass nahezu alle Stämme Citrinin und Patulin bilden können. Da die Bildung von Citrinin und Patulin eine Eigenschaft von *P. expansum* ist, deutet das darauf hin, dass es bei den isolierten Stämmen um *P. expansum*

handelt. Hinsichtlich der Kapazität Citrinin oder Patulin zu bilden, verhält sich jeder Stamm anders (Abb. 12).

Das Ergebnis des RAPD-Dendrogramms zeigt, dass die isolierten *P. expansum* Stämme zwei Populationen bilden. Die Untersuchung der Citrinin- und Patulinbildung bei den Stämmen zeigt, dass die zwei Gruppen keine Korrelation in Bezug zur Citrinin- und Patulinbildung haben.

3.2 Kinetik der Toxinbildung bei *Penicillium*

Um sich einen ersten Überblick über den zeitlichen Verlauf der Citrininbildung durch *P. verrucosum*, *P. expansum* und *P. citrinum* zu verschaffen, wurde eine Analyse der Citrininbildungskinetik durchgeführt. Die entsprechenden Penicillien wurden auf PDA-Medium angeimpft und für mehrere Tage bei 25 °C inkubiert. Im Verlauf der Kinetik erfolgte von Tag 3 bis Tag 10 jeden Tag eine Probenentnahme. Am Ende der Kinetik wurden die Toxine extrahiert und mit der HPLC analysiert. *P. verrucosum* und *P. expansum* bilden neben Citrinin auch Ochratoxin A und Patulin. Daher wurden neben Citrinin auch Ochratoxin A bei *P. verrucosum* und Patulin bei *P. expansum* mitgemessen.

Kinetik der Toxinbildung bei *P. verrucosum*

Die folgende Grafik (Abb.13) zeigt die Citrinin- und Ochratoxinbildung über einen Zeitraum von 10 Tagen. Wie auf der Grafik zu sehen ist, bildet *P. verrucosum* zuerst Ochratoxin A. Die gebildete Menge an Ochratoxin A steigt leicht von Tag 4 bis Tag 6 an und bleibt fast unverändert über den Rest der Kinetik bestehen. Die Citrininbildung beginnt erst nach 5 Tagen und steigt kontinuierlich von Tag 5 bis Tag 10 an.

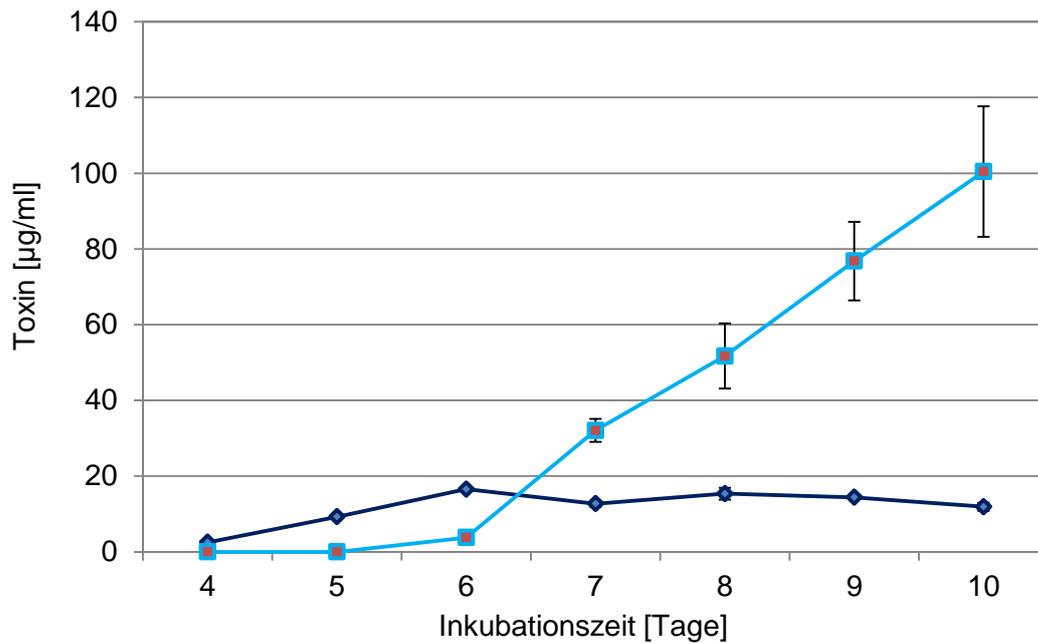


Abb. 13: Kinetik der OchratoxinA- und Citrininbildung bei *P. verrucosum* BFE808 auf PDA. Hellblau: Citrinin. Dunkelblau: Ochratoxin A.

Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum*

Auch bei *P. expansum* nahm die Citrininbildung von Tag 3 bis Tag 7 zu. Von Tag 7 bis Tag 9 ging die Citrininmenge um fast 50 % zurück. An Tag 10 war ein leichter Anstieg zu beobachten. Bei der Patulinbildung ist ein anderes Bild zu sehen. Verglichen mit der Citrininbildung ist die gebildete Patulinmenge nach 3 Tagen Wachstum viel höher. Im Gegensatz zum Citrinin ist die Patulinmenge von Tag 3 bis Tag 7 kontinuierlich gesunken. Nach längeren Inkubationszeiten ist nur noch wenig Patulin nachweisbar.

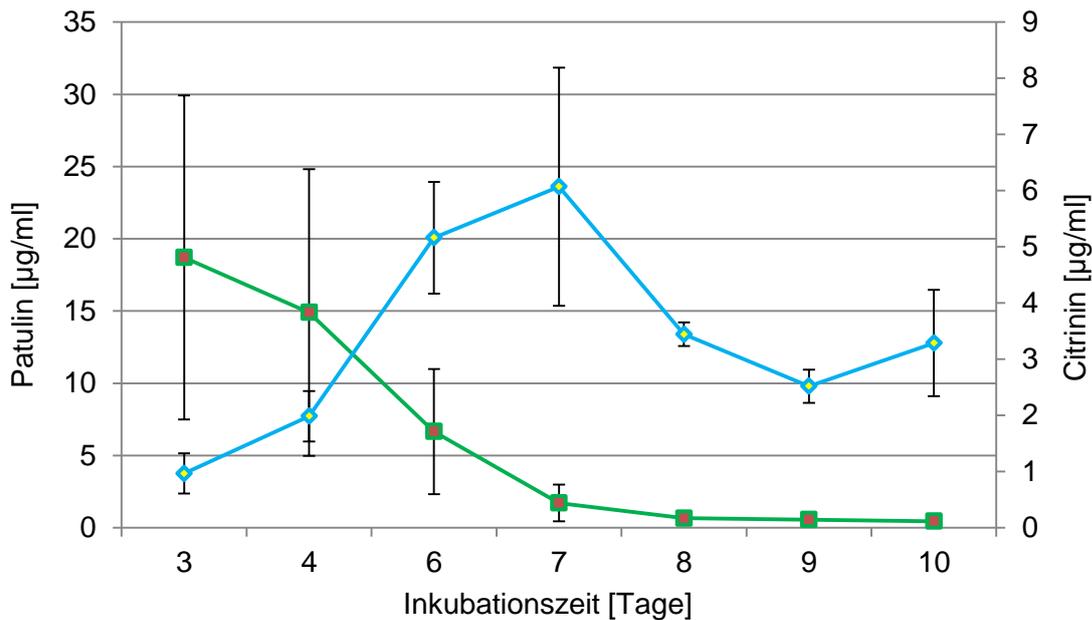


Abb. 14: Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* BFE189 auf PDA. Grün: Patulin. Hellblau: Citrinin.

Wenn man die Citrinin- und Patulinbildung in Bezug zueinander setzt, so kann man sagen, dass *P. expansum* zuerst Patulin in großen Mengen und später Citrinin bildet. Dies passt zu Literaturdaten, die zeigen, dass Patulin einen Kolonisierungsfaktor bei der Infektion von Äpfeln darstellt (Snini et al., 2016). Die spätere Bildung von Citrinin deutet darauf hin, dass Citrinin eventuell für die Etablierung der Infektion eine Rolle spielt.

Kinetik der Citrininbildung bei *P. citrinum*

Im Fall von *P. citrinum* wurden schon früh hohe Mengen an Citrinin gebildet. Bereits nach 3 Tagen Inkubation ist eine hohe Citrininbildung zu erkennen. Von Tag 3 bis Tag 10 zeigt die gebildete Citrininmenge nur geringe Veränderungen. Generell betrachtet ist die Citrininbiosynthese bei diesem Stamm über den gesamten Zeitraum hoch und konstant. Die Abbildung 15 zeigt die Kinetik der Citrininproduktion bei *P. citrinum*.

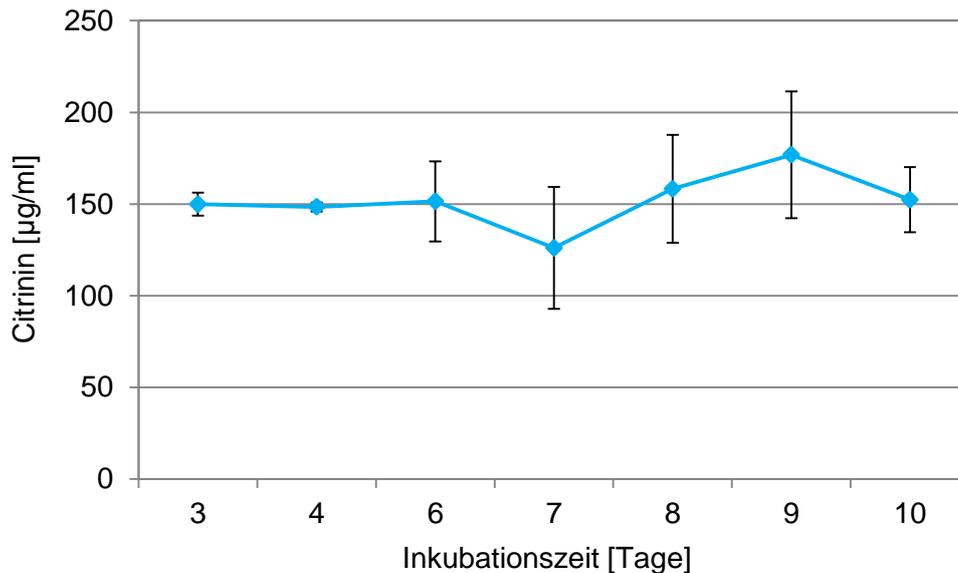


Abb. 15: Kinetik der Citrininbildung bei *P. citrinum* BFES12 auf PDA.

Die konstante Citrininbildung bei *P. citrinum* deutet auf eine geringe Regulation der Citrininbildung bei dieser Spezies hin.

In Bezug auf die gesamten Kinetiken kann gesagt werden, dass die drei Spezies auf Labormedium hohe Citrininmengen bilden. *P. citrinum* und *P. expansum* konnten sehr früh nach drei Tagen Inkubation Citrinin bilden. Außerdem ist die Citrininbildung in den drei Spezies unterschiedlich reguliert. *P. citrinum* bildet Citrinin auf PDA Medium praktisch konstitutiv, während bei *P. expansum* und *P. verrucosum*, stark unterschiedliche Bildungskinetiken auftreten.

3.3 Charakterisierung der Gencluster für die Citrininbildung bei *Penicillium*

In *Monascus* ist der Gencluster für die Citrininbildung schon beschrieben. Er besteht aus einer Dehydrogenase (orf1), einem Transkriptionsaktivator (ctnR), einer Oxygenase (ctnA), einer Oxidoreduktase (ctnB), einer Polyketidsynthase (pksCT) und einem Transporter (ctnC). Mit Hilfe der Gensequenzen aus *Monascus* wurden Primer für die Einzelgene abgeleitet. Um das Vorhandensein der Citriningene in *P. verrucosum*, *P. expansum* und *P. citrinum* zu überprüfen, wurde zuerst eine PCR mit der DNA aus diesen Spezies durchgeführt. Auf diese Weise konnten PCR-Produkte synthetisiert werden. Dies war ein erster Hinweis darüber, dass homologe Citriningene in den Penicillien vorhanden sind.

Die Genome von *P. citrinum* und *P. verrucosum* wurden in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Dominic Stoll und Dr. Markus Schmidt-Heydt sequenziert. Weiterhin wurde mit Hilfe der Blast-Funktion auf der Webseite des NCBI nach den Einzelgenen für die Citrininbildung gesucht. Dadurch hat sich das Vorhandensein der Citringene bei den drei *Penicillium* Spezies bestätigt. In Abbildung 16 sind die Gencluster der Citrininbildung bei verschiedenen Citrininbildnern dargestellt.

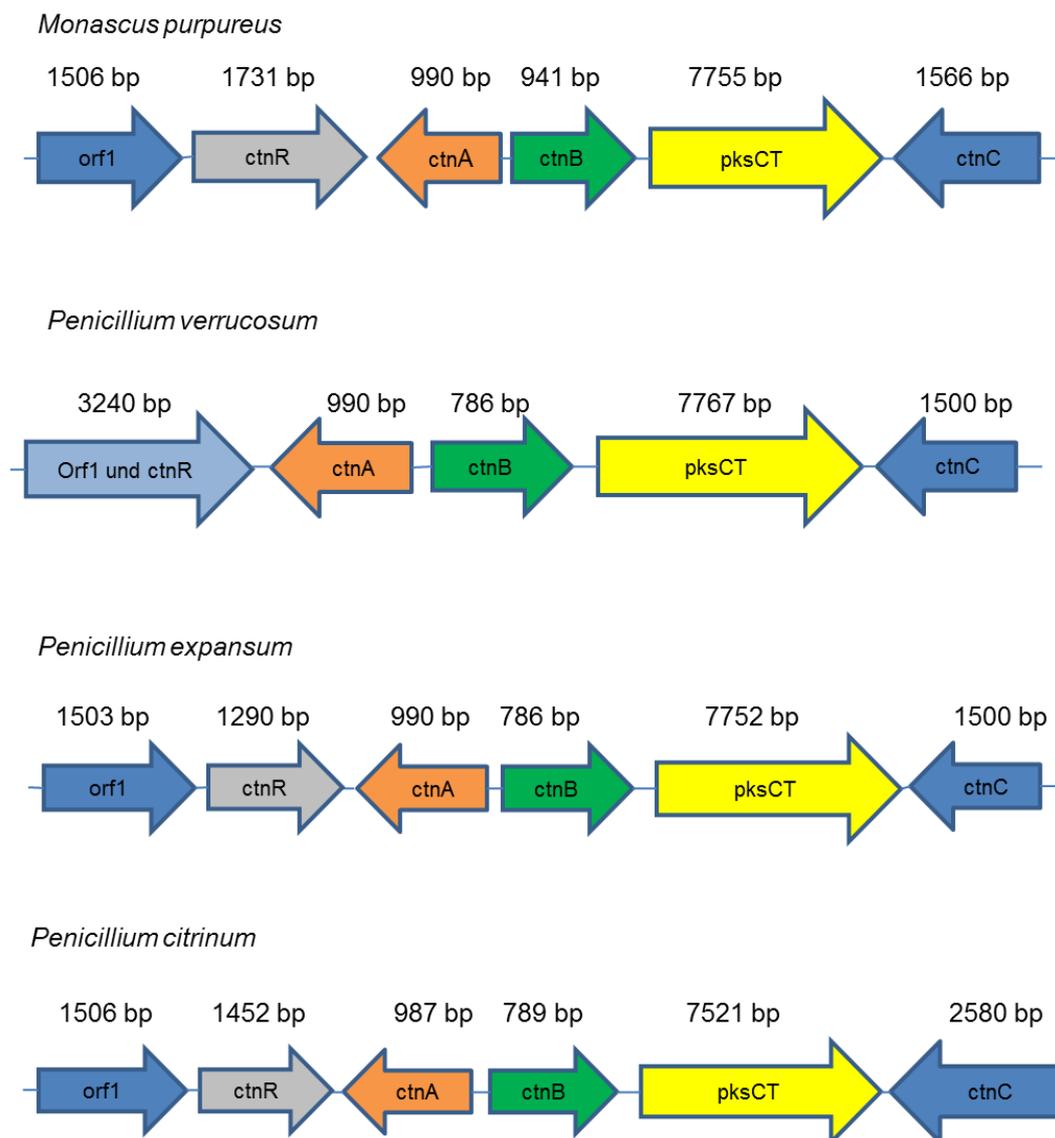


Abb. 16: Architektur der Gencluster der Citrininbildung in *Penicillium*. Orf1: Dehydrogenase, ctnR: Transkriptionsaktivator, ctnA: Oxygenase, ctnB: Oxidoreduktase, pksCT: Polyketidsynthase, ctnC: Transporter. Bp: Basenpaare.

Die Citriningene sind in den drei untersuchten Spezies der Gattung *Penicillium* vorhanden und zeigen untereinander eine hohe Homologie. Nach der Charakterisierung der Citriningencluster stellte sich die Frage, ob es durch Inaktivierung des jeweiligen *pksCT*-Gens zu einer Inaktivierung der Citrininbildung der einzelnen Spezies kommt.

3.4 Rolle von *pksCT* in der Citrininbildung bei *Penicillium*

Rolle von *pksCT* in der Citrininbildung bei *P. verrucosum*

Um die Bedeutung der Polyketidsynthase (*pksCT*) in der Citrininbildung bei *P. verrucosum* zu verstehen, wurde das *pksCT*-Gen in dieser Spezies mittels homologer Transformation, mit dem pGEM-T Vektor, der ein internes Fragment des *pksCT*-Gens einhielt, inaktiviert. Zur Konstruktion des Inaktivierungsvektors wurde das *pksCT*-Fragment mit dem Primerpaar *pksCT_P.exp_for* und *pksCT_P.exp_rev* verwendet. Nach 7 Tagen Wachstum der Transformanten auf YES-Medium bei 25 °C, wurde die Citrininbildung mit der Dünnschichtchromatographie (DC) untersucht. Das Ergebnis ist in der Abbildung 17 dargestellt.

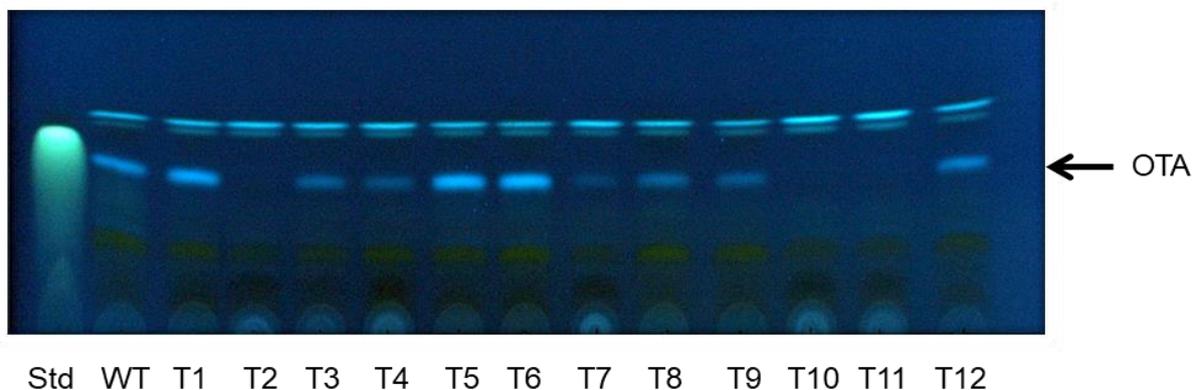


Abb. 17: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der *pksCT*-Transformanten von *P. verrucosum* BFE808. Std: Citrinin Standard. OTA: Ochratoxin A. WT: Wildtyp. T: *pksCT*-Transformanten.

Wie auf dem DC-Bild deutlich zu sehen ist, traten nach der Transformation zwei verschiedene Phänotypen auf. Einige potentielle Transformanten konnten, unterschiedliche Mengen an Ochratoxin A aber kein Citrinin bilden. Die anderen Transformanten (T2, T10 und T11) haben weder Citrinin noch Ochratoxin A gebildet.

Um die letztgenannten Stämme als tatsächliche Transformanten zu bestätigen, wurden die putativen Transformanten T2, T10 und T11 mittels PCR weiter analysiert.

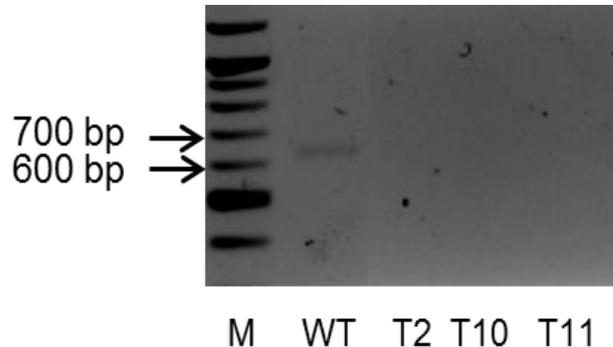


Abb. 18: Überprüfung der *pksCT*-Transformanten von *P. verrucosum* mittels PCR. M: 2-Log Marker, WT: *P. verrucosum* BFE808 Wildtyp, T: *pksCT*-Transformanten. Bp: Basenpaare.

Beim Wildtyp ist nur eine einzige Bande bei 650 bp zu sehen. Bei den Transformanten T2, T10 und T11 sieht man keine Banden. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass es eine Deletion im *pksCT*-Gen bei den drei Transformanten stattgefunden hat. Aus diesem Grund hat sich kein PCR-Produkt ergeben. Dies deutet daraufhin, dass die Polyketidsynthase *pksCT*, für die Citrinin- und Ochratoxinbildung bei *P. verrucosum* von Bedeutung ist. Das deckt sich mit den Literaturangaben von O'Callaghan et al. (2013).

Rolle von *pksCT* in der Citrininbildung bei *P. expansum*

Nach der Transformation von *P. expansum*, analog des Ansatzes bei *P. verrucosum*, wurden die transformierten Protoplasten auf Selektivmedium wachsen gelassen. Nachdem sie gewachsen waren, wurden sie auf YES-Medium überführt und nach 7 Tagen Wachstum bei 25 °C auf Citrininbildung hin überprüft. Es wurden mehrere Transformanten ausgewählt. Die Abbildung 19 zeigt die Citrininbildung der Transformanten.

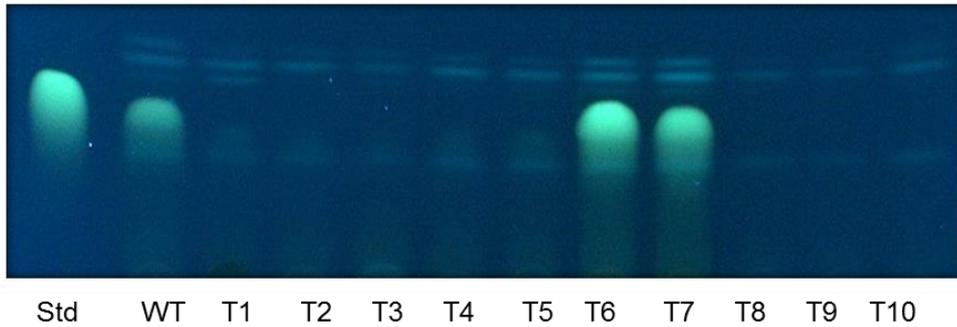


Abb. 19: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der *pksCT*-Transformanten von *P. expansum* BFE189. Std: Citrinin Standard, WT: *P. expansum* BFE189 Wildtyp. T: *pksCT*-Transformanten.

Es ist deutlich zu sehen, dass die Transformanten T1, T2, T3, T4 und T5, im Vergleich zum Wildtyp viel weniger Citrinin gebildet haben. Bei den Transformanten T8, T9 und T10 ist kein Citrinin zu sehen. Die Transformanten T6 und T7 sehen genauso aus, wie der Wildtyp. Um sicher zu gehen, dass durch die Transformation das *pksCT*-Gen inaktiviert wurde, wurden die Transformanten T1, T2 und T3, die weniger Citrinin gebildet haben, weiter analysiert. Die Transformanten und der Wildtyp wurden in MG-Bouillon angeimpft, für 6 Tage bei 25 °C inkubiert und anschließend wurde deren DNA isoliert. Weiterhin wurde ein Southern Blot mit der entsprechenden *pksCT*-Hybridisierungssonde, mit dem Wildtyp und den Transformanten durchgeführt. Die Abbildung 20 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung.

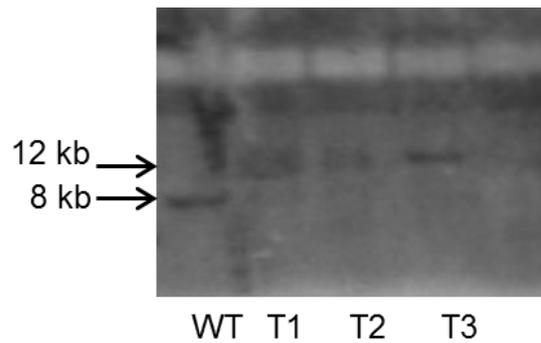


Abb. 20: Southern Blot Hybridisierung mit den *pksCT*-Mutanten von *P. expansum* BFE189. WT: Wildtyp, T: *pksCT*-Transformanten. Zur Überprüfung der *pksCT*-Transformanten wurde DNA auf einer Nylon-Membran übertragen und gegen eine Digoxigenin (DIG) markierte Sonde hybridisiert. Durch die Behandlung der Membran mit der Antikörperlösung bindet der Anti-DIG-Antikörper spezifisch an Digoxigenin auf der Membran. Eine CSPD-Lösung wurde frisch hergestellt und auf der Membran verteilt. Durch eine 10 minutige Inkubation bei 37 °C dephosphoryliert die alkalische Phosphatase (an dem Antikörper gebunden) die CSPD-Moleküle. Durch Anregung der Membran mit UV-Licht entsteht eine Lumineszenz, die mit dem ChemiDoc System (Bio-Rad, München, Deutschland) detektiert wurde.

Die Transformation basiert auf der homologen Rekombination, bei der das Zielgen inaktiviert wird. Generell werden bei der homologen Rekombination durch einen Crossing Over homologe Bereiche ausgetauscht. Dadurch baut sich das Inaktivierungskonstrukt (das Plasmid mit einem Fragment aus dem Zielgen) ins Genom der transformierten Protoplasten ein. Dies führt zur Inaktivierung des Zielgens. Aufgrund des integrierten Plasmids wird das zu inaktivierende Gen bzw. DNA Fragment größer. Auf dem Bild der Hybridisierung (Abb. 20) ist ein deutlicher Unterschied im Hybridisierungsmuster zwischen dem Wildtyp und den Transformanten zu sehen. Bei den Transformanten liegen die Banden weit höher als beim Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass sich bei der Transformation, wie erwartet, das Inaktivierungskonstrukt im Genom der Transformanten eingebaut hat. Die Integration des Plasmids im Genom von *P. expansum* führte zur Inaktivierung der Polyketidsynthase *pksCT*. Dadurch wurde die Citrininbildung ausgeschaltet. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass *pksCT* in *P. expansum* für die Citrininbildung benötigt wird.

Rolle von *pksCT* in der Citrininbildung bei *P. citrinum*

Da *P. citrinum* konstant hohe Mengen an Citrinin bildet, wurde auch hier die Polyketidsynthase *pksCT* analog den oben beschriebenen Ansätzen inaktiviert. Zur Herstellung des Inaktivierungskonstruktes wurde ein *pksCT*-Fragment mit dem Primerpaar P.S_ *pksCT*_for und P.S_ *pksCT*_rev amplifiziert. Die Citrininbildung bei den Transformanten wurde mittels DC überprüft. Die Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der DC.

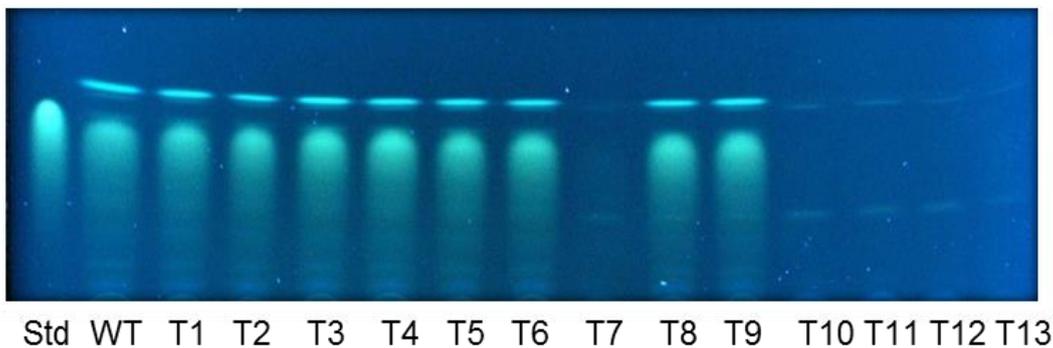


Abb. 21: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der *pksCT*-Transformanten von *P. citrinum* BFES12. WT: Wildtyp. Std: Citrinin Standard. T: *pksCT*-Transformanten.

Auf dem DC-Foto sind Transformanten zu sehen, die genauso so viel Citrinin gebildet haben wie der Wildtyp. Bei diesen Transformanten ist der Inaktivierungsvektor wahrscheinlich nicht in das *pksCT*-Gen integriert, so dass Wildtyp Eigenschaften sichtbar wurden. Diejenigen Transformanten, die nicht in der Lage waren, Citrinin zu bilden, sollten demnach die gesuchten Mutanten sein. Um die Inaktivierung des *pksCT*-Gens zu überprüfen, wurden die putativen Mutanten durch eine Southern Blot Hybridisierung weiter analysiert. Die Abbildung 22 zeigt die Hybridisierungsmuster beim Wildtyp und den Transformanten.

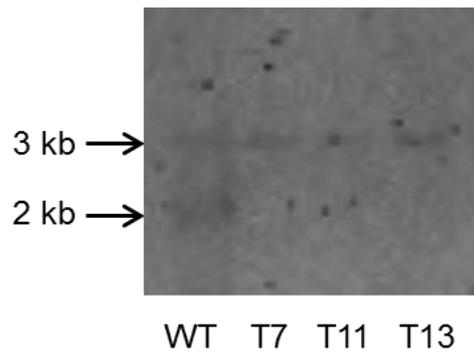


Abb. 22: Southern Blot Hybridisierung mit den *pksCT*-Transformanten von *P. citrinum*. WT: Wildtyp. T: *pksCT*-Transformanten.

Wie die Abbildung 22 zeigt, ist der Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Transformanten deutlich zu sehen. Der Wildtyp zeigt zwei Hybridisierungssignale, eine bei 2 kb und ein zweites bei 3 kb. Die Überprüfung der Zielsequenz des *pksCT*-Gens zeigte, dass in der Zielsequenz eine Schnittstelle für das Enzym *EcoRI* vorhanden ist. Da vor der Durchführung des Southern Blots die DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten wurde, deutet das darauf hin, dass die Zielsequenz geschnitten wurde und die zwei Banden den resultierten *pksCT*-Fragmenten entsprechen, die sich nach dem *EcoRI*-Verdau ergaben. Alle drei Transformanten zeigen nur die 3 kb Bande, was auf eine Deletion der 2 kb Bande hindeutet.

Nach der oben beschriebenen Situation würde das eine Inaktivierung der Wildtyp-*pks* bedeuten und die Unfähigkeit der Transformanten Citrinin zu bilden erklären. Damit zeigt auch die Inaktivierung der *pksCT* in *P. citrinum* das erwartete Ergebnis der Unfähigkeit Citrinin zu bilden.

3.5 Einfluss der Umweltfaktoren auf die Citrininbildung bei *Penicillium*

Nachdem der Einfluss der Zeit auf die Toxinbildung der drei *Penicillium* Spezies untersucht wurde, wurde der Einfluss der wichtigsten Umweltfaktoren auf die Citrininbildung bei diesen Spezies analysiert.

3.5.1 Einfluss der Temperatur auf das Wachstum bei *Penicillium*

Die Temperatur ist eine der wichtigsten abiotischen Faktoren, die beim Wachstum und der Mykotoxinbildung eine Rolle spielt. Die *Penicillium*-Arten kommen auf unterschiedlichen Habitaten mit verschiedenen Temperaturen vor. Das heißt sie müssen sich an unterschiedliche Temperaturen anpassen. Um den Einfluss der Temperatur auf die, in dieser Arbeit ausgewählten *Penicillium*-Arten, zu bestimmen, wurden sie auf PDA-Medium angeimpft und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Da die meisten *Penicillium*-Arten einen Temperaturbereich von 15 °C bis 25 °C bevorzugen, wurde der Einfluss der Temperatur bei 15 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C untersucht. Nach 7 Tagen Inkubation wurde das Wachstum bei den *Penicillium*-Arten analysiert. Da es in dieser Arbeit um den Vergleich der Regulation der Citrininbildung geht, waren in allen durchgeführten Versuchen die Vorkulturen der drei Spezies gleich alt. Außerdem wurden vor jedem neuen Versuch frische Sporensuspensionen hergestellt und die Sporenanzahl auf 10^6 Sporen/ml eingestellt.

Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von *P. verrucosum*

Wie der Abbildung 23 zu entnehmen ist, ist das Wachstum von *P. verrucosum* von der Temperatur stark beeinflusst. Bei dieser Spezies ist der Temperaturbereich von 20 °C bis 25 °C der optimale Temperaturbereich. Bei 15 °C ist das Wachstum etwas schwächer. Bei 30 °C konnte der Pilz nur sehr schlecht wachsen.

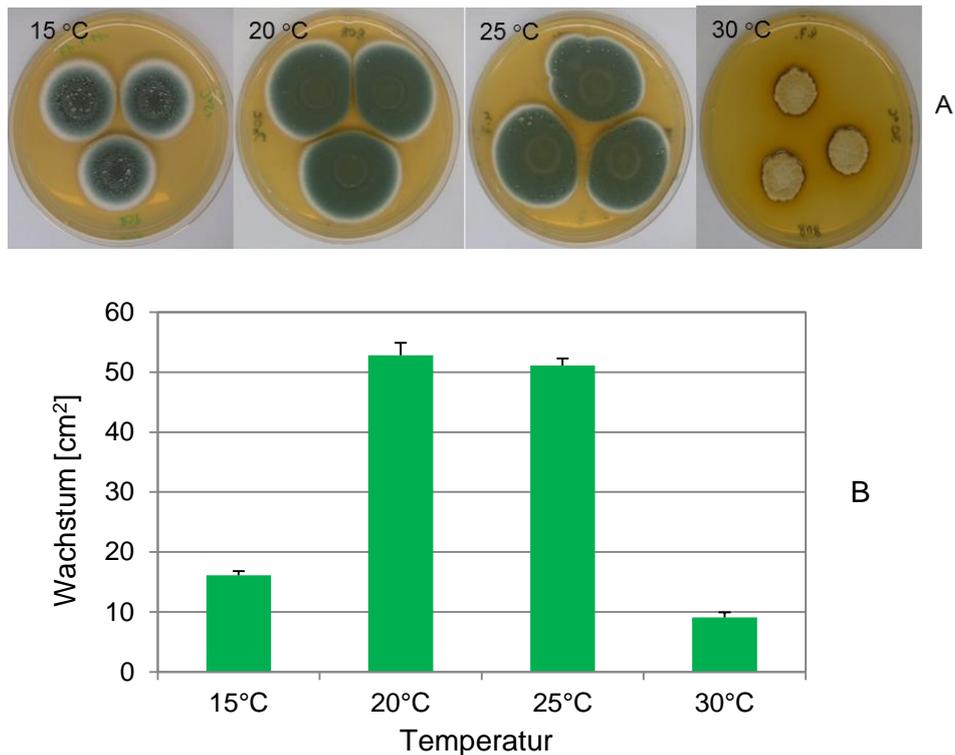


Abb. 23: Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von *P. verrucosum* BFE808. A: Der Pilz wurde auf PDA-Medium angeimpft und die Platten wurden nach 7 Tagen Inkubation bei den verschiedenen Temperaturen fotografiert. B: Fläche der Pilzkolonien.

Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von *P. expansum*

Wie die folgenden Wachstumsbilder in der Abbildung 24 zeigen, hat die Temperatur einen großen Einfluss auf das Wachstum von *P. expansum*. Bei 20 °C und 25 °C wächst diese Spezies am besten. Bei 15 °C zeigte *P. expansum* bereits Wachstum und Sporulation, jedoch reduziert im Vergleich zur Inkubation bei 20 °C und 25 °C. Es scheint, dass die Temperatur von 30 °C auch für diesen Pilz zu hoch ist. Er wächst sehr schlecht bei dieser Temperatur. Das Gesamtbild sieht ähnlich aus wie bei *P. verrucosum*.

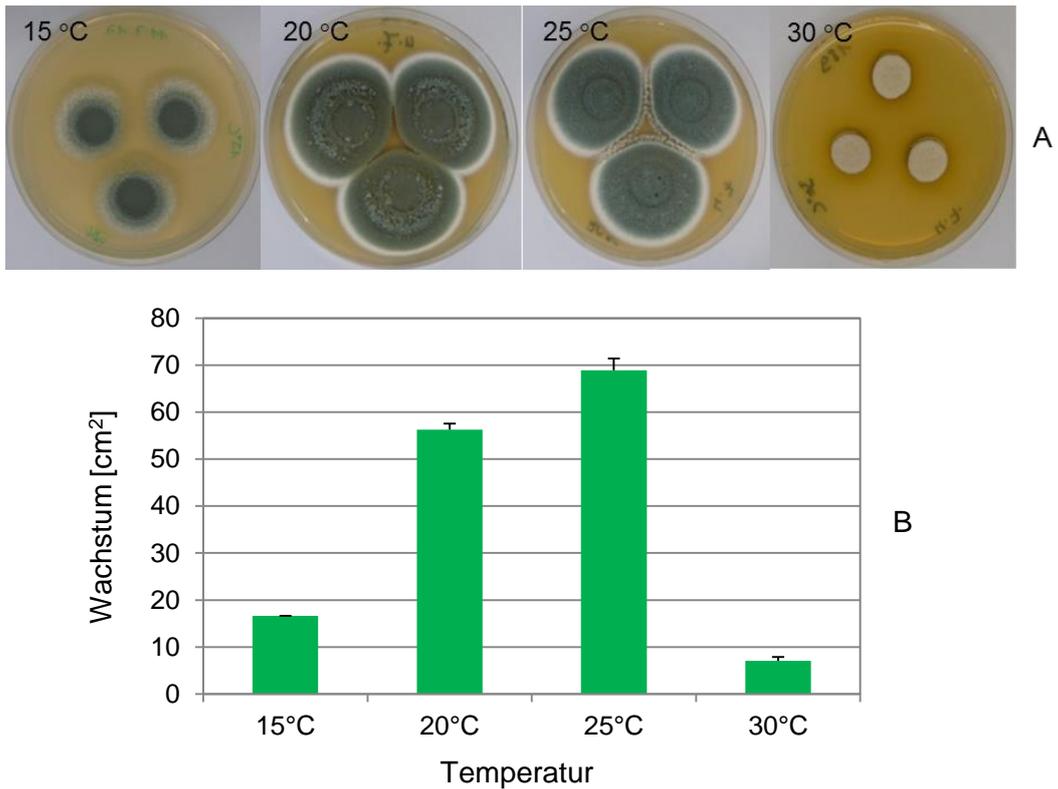


Abb. 24: Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von *P. expansum* BFE189. A: Die Platten mit den Kulturen wurden nach 7 Tagen Inkubation fotografiert. B: Fläche der Pilzkolonien nach 7 Tagen Inkubation bei verschiedenen Temperaturen.

Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von *P. citrinum*

Wie die folgenden Wachstumsbilder und die Grafik (Abb. 25) deutlich zeigen, wächst *P. citrinum* bei niedrigen Temperaturen sehr schlecht. Bei 15 °C ist das Wachstum am niedrigsten im Vergleich zum Wachstum bei den höheren Temperaturen. Wobei der Bereich zwischen 25 °C und 30 °C die optimalen Wachstumstemperaturen darstellt.

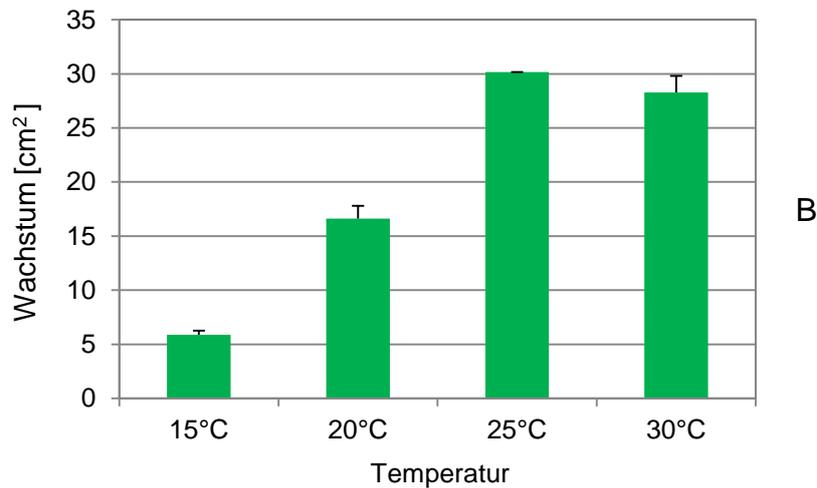
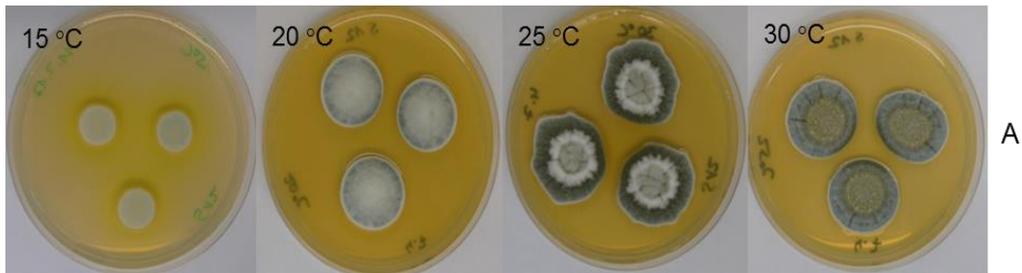


Abb. 25: Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von *P. citrinum* BFES12. A: *P. citrinum* wurde auf PDA-Platten angeimpft und nach 7 Tagen Wachstum bei den verschiedenen Temperaturen wurden die Platten fotografiert. B: Die Grafik zeigt die Fläche der Pilzkolonien auf PDA-Platten nach 7 Tagen Wachstum.

3.5.2 Einfluss der Temperatur auf die Citrininbildung bei *Penicillium*

Wie oben gezeigt, hat die Temperatur eine große Wirkung auf das Wachstum der drei ausgewählten *Penicillium* Stämme. Obwohl *P. verrucosum* und *P. expansum* bei 15 °C wachsen und sporulieren konnten, waren sie unter diesen Bedingungen nicht in der Lage nachweisbare Mengen an Citrinin zu bilden. Bei höheren Temperaturen hat sich die Citrininbildung bei beiden Stämmen deutlich verstärkt. Sowohl bei *P. expansum* als auch bei *P. verrucosum* ist bei 30 °C die höchste Citrininmenge zu sehen.

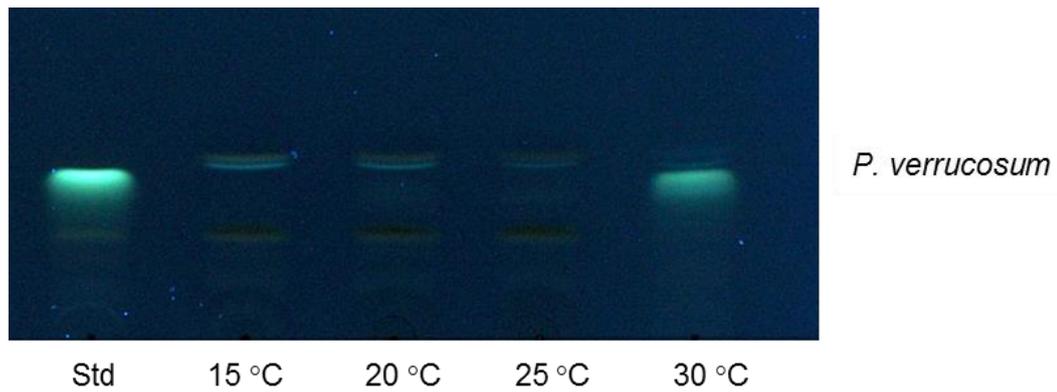


Abb. 26: Einfluss der Temperatur auf die Citrininbildung bei *P. verrucosum* BFE808. Std: Citrinin Standard.

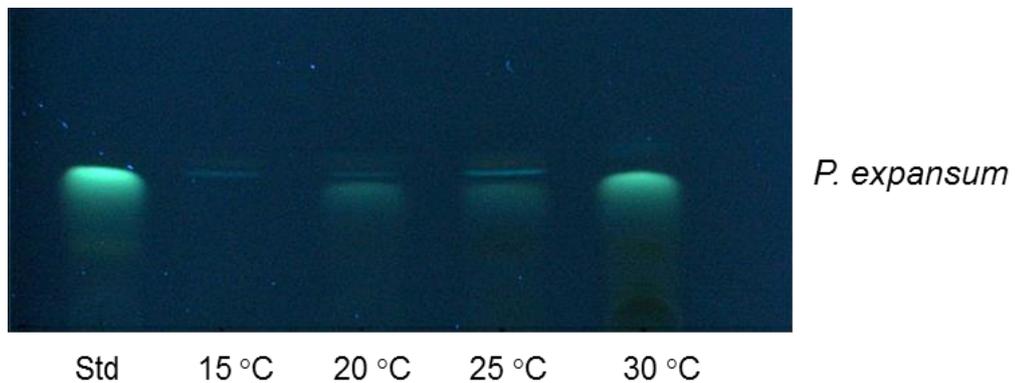


Abb. 27: Einfluss der Temperatur auf die Citrininbildung bei *P. expansum* BFE189.

Wie es auch bei *P. expansum* und *P. verrucosum* der Fall war, konnte *P. citrinum* bei 15 °C kein Citrinin bilden. Aber im Bereich zwischen 20 °C und 25 °C hat diese Spezies viel Citrinin gebildet. Im Gegensatz zu *P. expansum* und *P. verrucosum*, die bei 30 °C die höchste Citrininmenge gebildet hatten, bildete *P. citrinum* bei 30 °C weniger Citrinin als bei 20 °C und 25 °C.

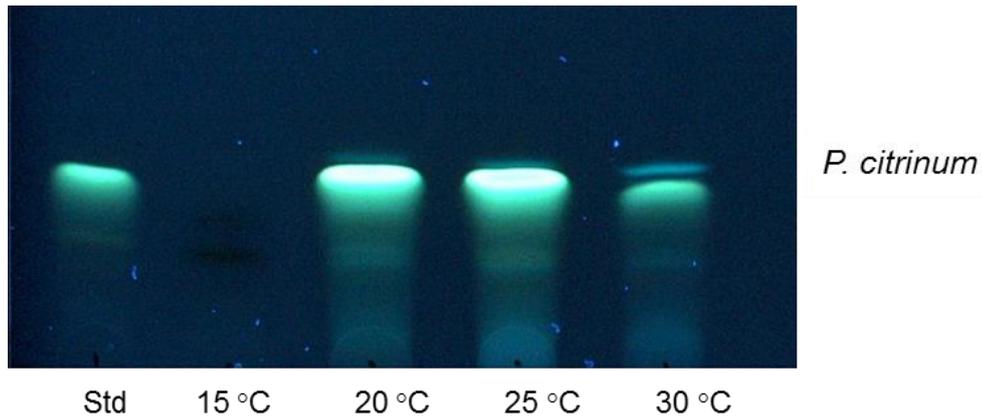


Abb. 28: Einfluss der Temperatur auf die Citrininbildung bei *P. citrinum* BFES12.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man sagen, dass die Citrininbildung nicht unbedingt mit dem Wachstum korreliert. *P. expansum* und *P. verrucosum* konnten bei 15 °C relativ gut wachsen aber sie konnten kein Citrinin bilden. Während diese beiden Spezies bei 30 °C ein sehr reduziertes Wachstum zeigten, bildeten sie die höchsten Mengen an Citrinin bei dieser Temperatur.

Es scheint, dass *P. citrinum* gegenüber höheren Temperaturen im Vergleich zu *P. expansum* und *P. verrucosum* resistenter ist. *P. citrinum* konnte sich im Bereich von 20 °C bis 30 °C besser durchsetzen und hohe Mengen an Citrinin bilden.

3.6 Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei *Penicillium*

Der Wassergehalt in den Lebensmitteln spielt eine große Rolle bei der Ansiedlung und dem Wachstum von Mikroorganismen. In den Lebensmitteln ist das Wasser zum Teil an die anderen Bestandteile gebunden und der restliche Teil des Wassers bleibt frei. Um über das gebundene Wasser zu verfügen, müssen die Mikroorganismen viel Energie aufbringen. Das wäre mit einem hohen Aufwand verbunden. Für die Mikroorganismen ist deshalb der freie Wasseranteil von großer Bedeutung. Die Wasseraktivität ist die frei verfügbare Wassermenge in einem System bzw. in Lebensmitteln. Die Wasseraktivitäten a_w 0,88; 0,90; 0,93; 0,95; 0,98 und 0,99 wurden durch die Zugabe von verschiedenen Mengen an Glycerol zum Medium eingestellt. Bei der Bestimmung der Citrininbildung wurden die a_w -Werte von 0,88 und 0,90 nicht berücksichtigt, da die drei Spezies auf diesen a_w -Werten nicht wachsen konnten.

Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei *P. verrucosum*

Penicillium verrucosum war nicht in der Lage, bei niedrigen Wasseraktivitäten zu wachsen. Daher ist bei dem a_w -Wert 0,93 keine Citrininbildung zu erkennen. Bei Wasseraktivitäten von 0,95; 0,98 und 0,99 konnte diese Spezies wachsen und Citrinin bilden. Das Bildungsmaximum ist bei a_w -Wert 0,99 zu sehen.

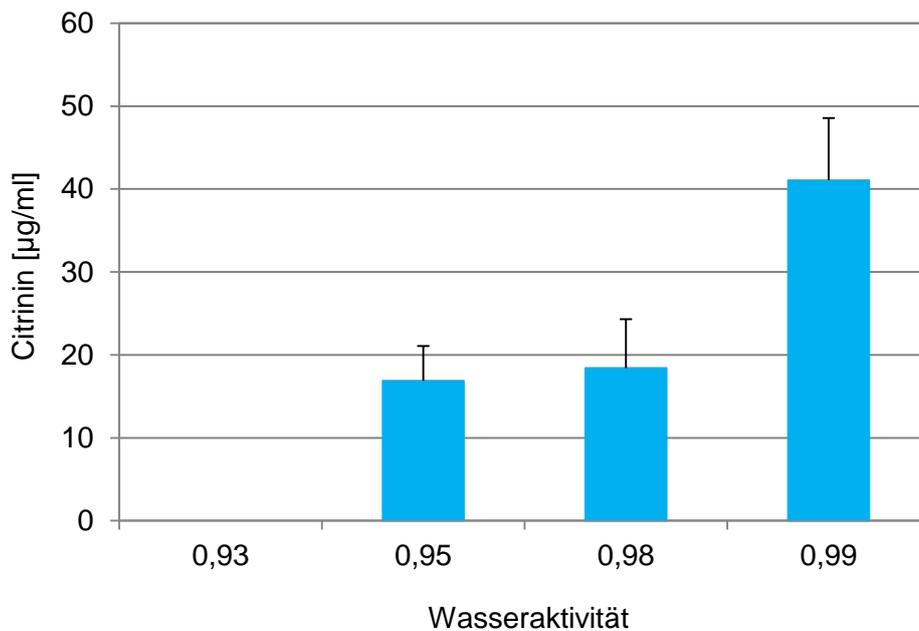


Abb. 29: Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei *P. verrucosum* BFE808 auf PDA. Das Wachstum und die Citrininmessung erfolgten bei 25 °C.

Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei *P. expansum*

Genauso wie *P. verrucosum*, konnte *P. expansum* auf niedrigen Wasseraktivitäten nicht wachsen, wobei der Einfluss der Wasseraktivität auf das Wachstum von *P. expansum* stärker war. Daher konnte bei den a_w -Werten 0,93 und 0,95 kein Citrinin nachgewiesen werden. Erst ab einem a_w -Wert von 0,98 war ein Wachstum bei dieser Spezies möglich und die Citrininbildung konnte gemessen werden. Die Abbildung 30 zeigt die Citrininbildung bei *P. expansum* auf PDA-Medium mit verschiedenen a_w -Werten nach 7 Tagen Wachstum bei 25 °C.

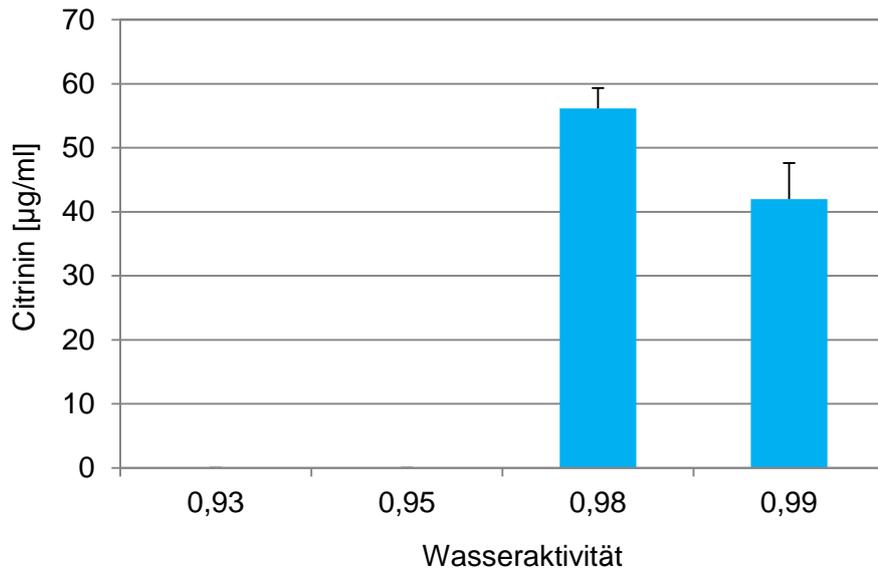


Abb. 30: Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei *P. expansum* BFE189 auf PDA.

Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei *P. citrinum*

Im Gegensatz zu *P. verrucosum* und *P. expansum* konnte *P. citrinum* im a_w -Bereich von 0,93 und 0,99 gut wachsen. Und wie auf der folgenden Grafik (Abb. 31) dargestellt ist, bildet *P. citrinum* bei a_w -Werten zwischen 0,93 und 0,99 verschiedene Citrininmengen.

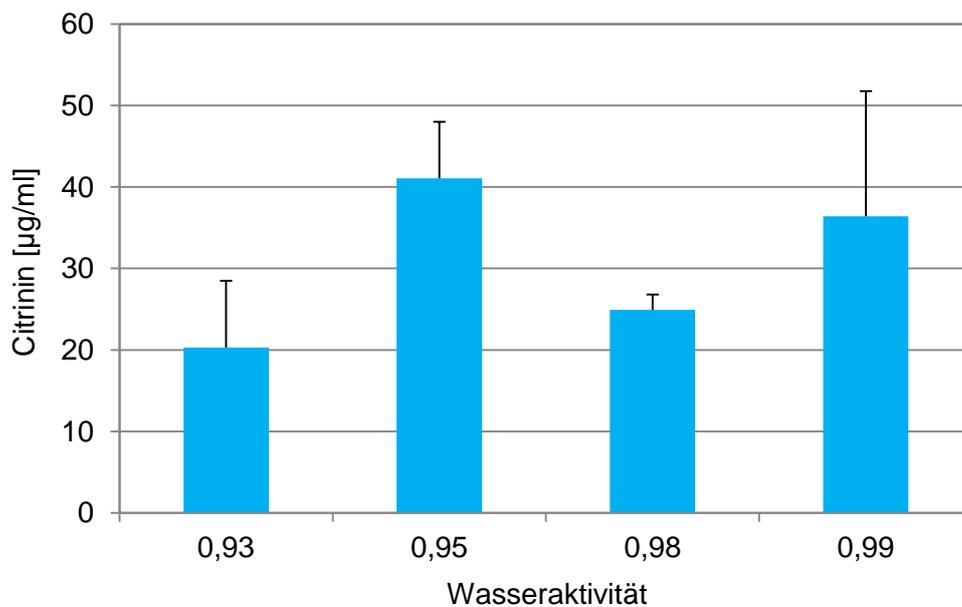


Abb. 31: Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei *P. citrinum* auf PDA.

Aus den gewonnenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Wasseraktivität des Milieus bzw. der Lebensmittel eine entscheidende Rolle für das Wachstum und die Citrininbildung bei den drei *Penicillium* Spezies spielt. Je höher die Wasseraktivität ist, desto besser können die Spezies wachsen und Citrinin bilden. Wenn man die drei Spezies miteinander vergleicht, merkt man, dass die Wasseraktivität einen geringeren Einfluss auf *P. citrinum* hat. Dies deutet darauf hin, dass die Citrininbildung bei den drei Spezies unterschiedlich reguliert ist. Es scheint, dass die Citrininbildung bei *P. citrinum* nicht so stark abhängig von der Wasseraktivität ist wie bei *P. expansum* und *P. verrucosum*.

3.7 Einfluss des Salzstress auf die Citrininbildung bei *Penicillium*

Die drei untersuchten *Penicillium* Spezies können zusammen in salzhaltigen Habitaten vorkommen. Daher wurde die Regulation der Citrininbildung unter diesen Bedingungen untersucht. Die drei Spezies wurden auf PDA-Medium mit steigenden NaCl-Konzentrationen angeimpft und für 7 Tage bei 25 °C inkubiert. Danach wurde die Citrininbildung mittels HPLC bestimmt.

Einfluss des Salzstress auf die Citrininbildung bei *P. verrucosum*

Da *P. verrucosum* Citrinin und Ochratoxin A bildet, wurde die Bildung beider Toxine analysiert. In der Abbildung 32 ist deutlich zu erkennen, dass auf PDA mit niedrigen NaCl-Konzentrationen die Citrininbildung deutlich höher ist. Das Maximum der Citrininbildung wurde bei 5 g/l NaCl erreicht. Danach ging die Citrininkonzentration wieder herunter. Die Citrinin- und Ochratoxin A-Bildung haben ähnliche Kinetiken. Jedoch ist das Optimum der Ochratoxin A-Bildung zu höheren NaCl-Konzentrationen verschoben. Die Ochratoxin A-Bildung nimmt mit steigender NaCl-Konzentration, bis zu einer NaCl-Konzentration von 30 g/l zu und dann verringert sich wieder mit zunehmenden NaCl-Konzentrationen.

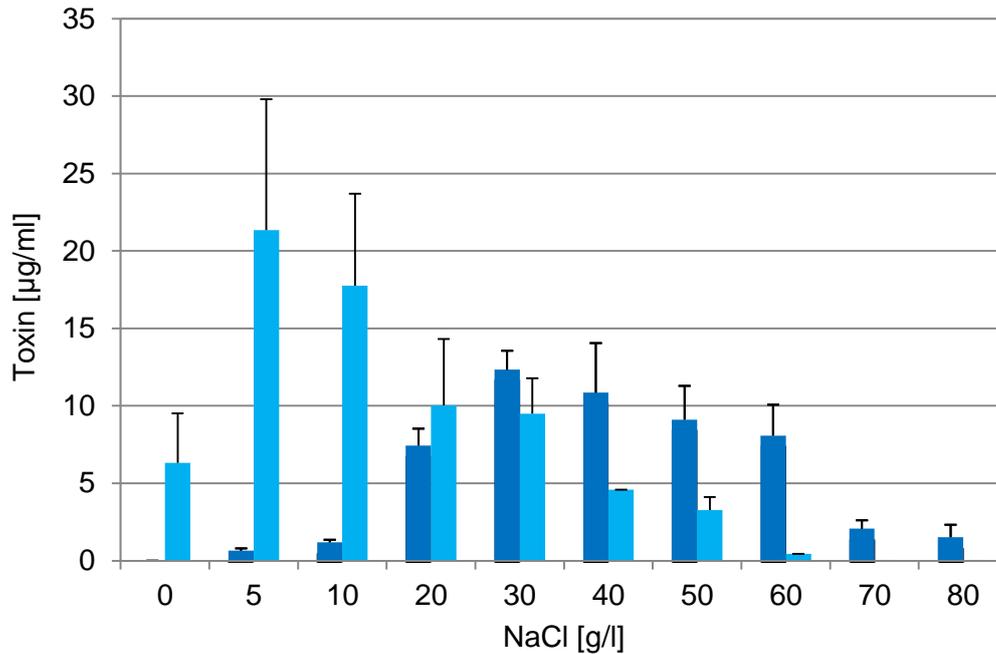


Abb. 32: Einfluss des Salzstresses auf die Citrinin- und Ochratoxin A-Bildung bei *P. verrucosum* BFE808 auf PDA. 0: Die Citrininbildung auf PDA-Medium ohne NaCl (Kontrolle). Hellblau: Citrinin. Dunkelblau: Ochratoxin A.

Einfluss des Salzstresses auf die Citrininbildung bei *P. expansum*

Auch bei *P. expansum* nimmt die Citrininkonzentration auf PDA mit niedrigen NaCl-Konzentrationen stark zu. Auf PDA mit 10 g/l NaCl hat *P. expansum*, gegenüber PDA ohne zugesetztes NaCl, die doppelte Citrininmenge gebildet. Bei höheren NaCl-Konzentrationen nimmt die Citrininbildung allmählich wieder ab. Wie bei *P. verrucosum* ist *P. expansum* auf NaCl-Konzentrationen ab 70 g/l nicht mehr in der Lage Citrinin zu bilden.

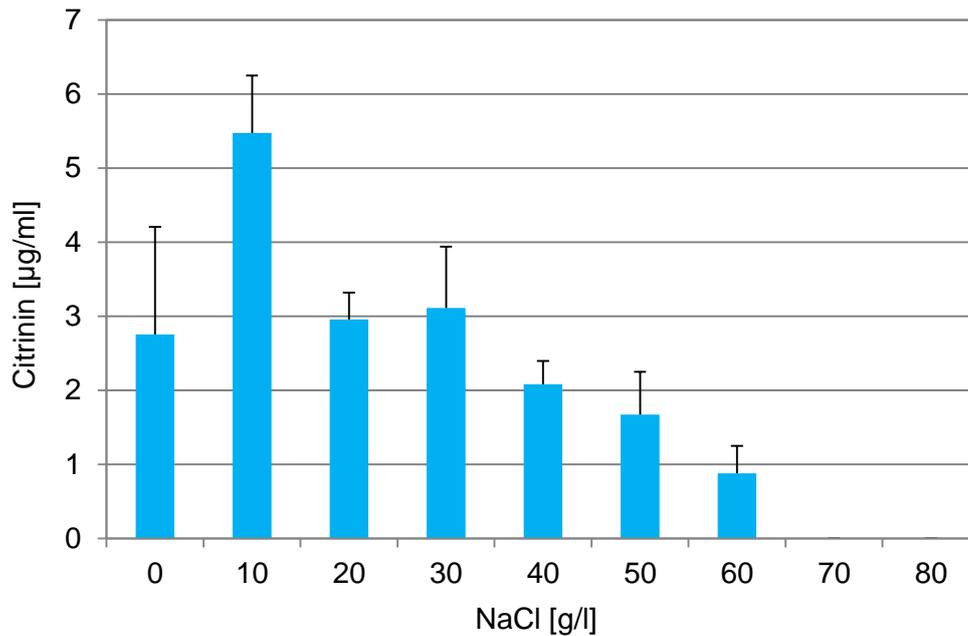


Abb. 33: Einfluss des Salzstresses auf die Citrininbildung bei *P. expansum* auf PDA.

Einfluss des Salzstresses auf die Citrininbildung bei *P. citrinum*

Der Einfluss von NaCl auf die Citrininbildung bei *P. citrinum* ist auf der Abbildung 34 dargestellt. Wie auf der Grafik deutlich zu sehen ist, ist die Citrininkonzentration auf PDA mit 10 g/l NaCl stark angestiegen. Die gebildete Citrininmenge von 10 µg/ml auf PDA ohne NaCl ist bei PDA mit 10 g/l NaCl auf ca. 70 µg/ml angestiegen. Die Citrininmenge nimmt danach mit zunehmenden NaCl-Konzentrationen durchgehend bis zu PDA mit 70 g/l NaCl zu, wo die maximale Citrininkonzentration erreicht wird.

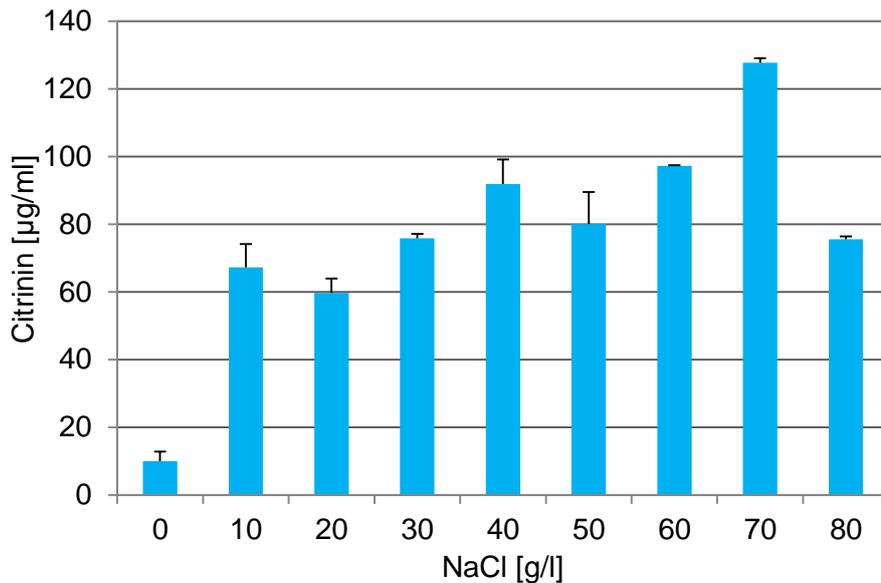


Abb. 34: Einfluss des Salzstresses auf die Citrininbildung bei *P. citrinum* auf PDA.

Die Ergebnisse zeigen, dass es innerhalb des untersuchten Salzbereiches signifikante Unterschiede in der Citrininbildung bei den drei *Penicillium* Spezies gibt. Trotz erhöhten Salzstresses konnte *P. citrinum* gut wachsen und auf allen NaCl-Konzentrationen hohe Citrininmengen bilden. Im Gegensatz zu *P. citrinum*, sind *P. expansum* und *P. verrucosum* empfindlicher gegenüber Salzstress. Interessanterweise ist die Citrininbildung bei allen drei Spezies bei niedrigen NaCl-Konzentrationen im Gegensatz zum nicht substituierten Medium stark angestiegen. Dies ist ein Hinweis, dass ein gewisser Salzstress einen starken Einfluss auf die Citrininbildung hat.

3.8 Rolle von HOG-Signalweg in der Citrininbildung bei *Penicillium*

Die Untersuchungen der Citrininbildung unter Salzstress haben gezeigt, dass die Citrininbiosynthese bei den drei *Penicillium*-Spezies unterschiedlich reguliert ist. Bei filamentösen Pilzen ist bekannt, dass der HOG-Signalweg, bei der Biosynthese von verschiedenen Sekundärmetaboliten involviert ist. Bei der Mykotoxinbildung konnte gezeigt werden, dass der HOG-Signalweg bei der Regulation der Bildung von Ochratoxin A und Citrinin bei *P. verrucosum* eine wichtige Rolle spielt (Stoll et al., 2013). In dieser Arbeit wird versucht, die Rolle von HOG-Signalweg bei der Regulation der Citrininbildung bei *P. expansum* und *P. citrinum* zu verstehen. Um die

genaue Aufgabe dieses Signalwegs bei der Citrininbildung in *P. expansum* zu verstehen, wurde der Hog1 Transkriptionsfaktor durch die Inaktivierung des *Hog1*-Gens ausgeschaltet.

Rolle von HOG-Signalweg in der Citrininbildung bei *P. expansum*

Zur Inaktivierung von *Hog1*-Gen in *P. expansum* wurde ein Inaktivierungsvektor hergestellt. Zur Konstruktion des Vektors wurde ein Fragment aus der *Hog1*-Gen in *P. expansum* mit dem Primerpaar HogPN_For und HogPN_Rev amplifiziert und in den Vektor pGEM-T Easy kloniert. Mit diesem Vektor wurden die Protoplasten von *P. expansum* transformiert. Die Citrininbildung bei den Transformanten wurde mittels DC überprüft. Die Abbildung 35 zeigt einige Transformanten, deren Unterschied zum Wildtyp deutlich zu erkennen ist.

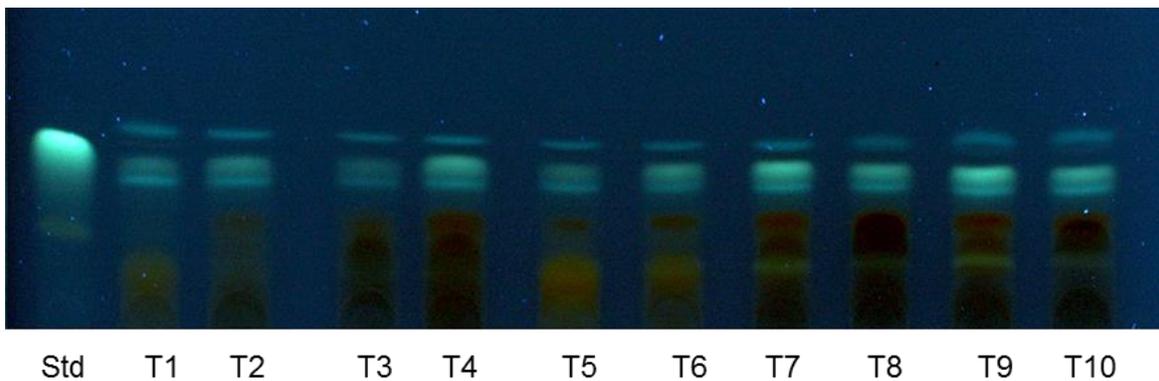


Abb. 35: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Hog1-Transformanten von *P. expansum*. Std: Citrinin Standard. WT: *P. expansum* Wildtyp. T: Transformanten. Nach der Transformation wurden die transformierten Protoplasten auf einem Minimalmedium ausplattiert. Nachdem sie gewachsen waren, wurden einige davon für die Weiteruntersuchung auf YES-Medium überführt. Nach 7 Tagen Wachstum bei 25 °C wurde eine DC mit den Transformanten durchgeführt. Als Kontrolle wurde der Wildtyp mitgeführt.

Die Transformanten T4, T7, T8 und T9 haben im Gegensatz zum Wildtyp deutlich mehr Citrinin gebildet. Die anderen Transformanten unterscheiden sich nicht so stark vom Wildtyp. Die vier Transformanten mit hohen Citrininmengen wurden weiteranalysiert, in dem sie mittels Southern Blot Hybridisierung überprüft wurden.

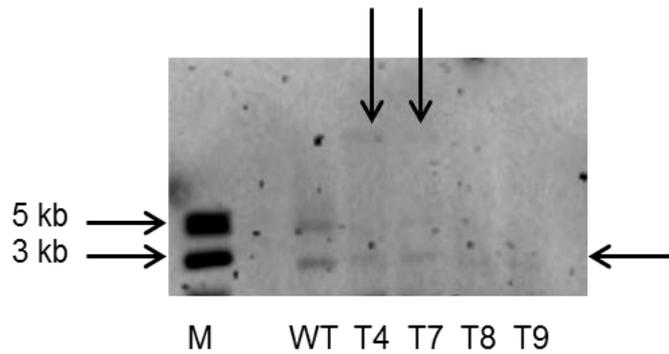


Abb. 36: Überprüfung der Hog1-Transformanten von *P. expansum* mittels Southern Blot. M: 2-log Standard, WT: *P. expansum* Wildtyp. T4, T7, T8 und T9 sind die Hog1-Transformanten.

Wenn man sich das Bild der Hybridisierung (Abb. 36) anschaut, sieht man Unterschiede in den Hybridisierungsmustern zwischen dem Wildtyp und den Transformanten. Beim Wildtyp sind zwei Banden zu sehen: Eine Bande befindet sich bei 3 kb und die andere Bande befindet sich bei 5 kb. Das liegt daran, dass in *P. expansum* eine *Eco*RI-Schnittstelle in der Zielsequenz des *Hog*1-Gens vorhanden ist. Bei allen Transformanten ist ebenso eine Bande bei 3 kb oder geringfügig verkleinerte Banden zu erkennen. Bei den Transformanten T4 und T7 ist zudem eine größere Bande (> 5 kb) zu erkennen. Dies spricht wahrscheinlich für eine homologe Integration des Inaktivierungsplasmids mit dem *Hog*1-Fragment ins Genom von *P. expansum*. Die Transformanten T8 und T9 zeigen nur die 3 kb Bande, was für eine Deletion der 5 kb Bande spricht. Die gegenüber dem Wildtyp auftretenden Unterschiede im Southern Blot Muster zeigen eine komplexe Integration des Inaktivierungsvektors an und deuten auf eine Inaktivierung des *Hog*1-Gens.

Rolle von HOG-Signalweg in der Citrininbildung bei *P. citrinum*

Um die Rolle des HOG-Signalwegs in der Regulation der Citrininbildung zu verstehen, wurde das *Hog*1-Gen in dieser Spezies inaktiviert. Nach der Inaktivierung und nachdem die Transformanten auf Minimalmedium gewachsen waren, wurden sie auf YES-Agar überführt. Nach 7 Tagen Inkubation bei 25 °C wurde die Citrininbildung mittels DC analysiert. Wie die Abbildung 37 deutlich zeigt, hat die Transformante 7 verglichen mit dem Wildtyp und den anderen Transformanten etwas weniger Citrinin gebildet. Das sieht man deutlich an der schwächeren Citrininbande bei dieser Transformante.

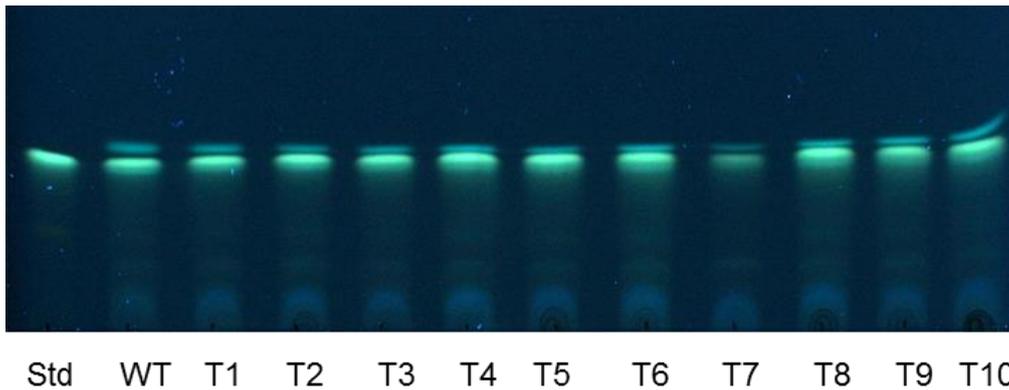


Abb. 37: Einfluss der Hog1-Inaktivierung auf die Citrininbildung bei *P. citrinum*. Std: Citrinin Standard. WT: *P. citrinum* Wildtyp. T: Hog1-Transformanten.

Die Transformante T7 wurde mittels Hybridisierung weiter untersucht. Die DNA wurde aus dem Wildtyp und der Transformante isoliert, mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und anschließend wurde ein Southern Blot durchgeführt.

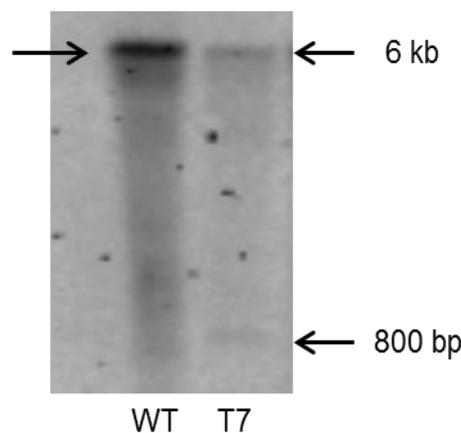


Abb. 38: Überprüfung der Hog1-Transformante von *P. citrinum* mittels Southern Blot. WT: Wildtyp. T: Hog1-Transformante.

Bei der Transformante sieht das Hybridisierungsmuster anders aus als beim Wildtyp. In der Spur der Transformante sind zwei deutliche Banden zu erkennen. Die eine ist 800 bp lang und die andere, größere Bande entspricht einer Länge von 6 kb. Bei dem Wildtyp ist nur eine Bande zu sehen. Dies deutet auf eine Veränderung des *Hog1*-Gens der Transformante hin. Die Citrininbildung bei dieser Transformante wurde durch die Transformation nicht komplett ausgeschaltet, sondern sie hat sich nur geschwächt. Es könnte gut sein, dass es sich bei dieser Transformante um ein Heterokaryon handelt.

Sowohl bei *P. citrinum*, als auch bei *P. expansum* konnte der HOG-Signalweg inaktiviert werden. Vergleicht man nun das Ergebnis der Hog1-Inaktivierung bei *P. expansum* und *P. citrinum*, so kann man feststellen, dass HOG-Signalweg nicht immer die gleiche Rolle bei der Citrininbildung spielt. Bei *P. expansum* hat die Hog1-Inaktivierung zur Erhöhung der Citrininbildung geführt, während bei *P. citrinum* die Hog1-Inaktivierung eine Reduktion der Citrininbildung verursacht hat, die eventuell aufgrund der Heterokaryonbildung nicht vollständig war. Es scheint, dass die Funktion des HOG-Signalwegs bei der Citrininbildung speziesspezifisch ist.

3.9 Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *Penicillium*

Neben der Wasseraktivität ist der pH-Wert ein wichtiger Umweltfaktor. Um zu untersuchen, inwieweit der pH-Wert die Citrininbildung beeinflusst, wurden die drei *Penicillium* Spezies auf PDA-Medium mit verschiedenen pH-Werten angeimpft und nach 7 Tagen Wachstum bei 25 °C, die gebildete Citrininmenge mittels HPLC gemessen.

Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *P. verrucosum*

Die vorliegende Grafik (Abb. 39) stellt die Wirkung des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *P. verrucosum* dar. Im sauren Bereich, bei pH 5 und pH 6, hat diese Spezies viel Citrinin produziert, wobei bei pH 6 die Citrininproduktion am höchsten ist. Danach nahm die Citrininbildung bei den höheren pH-Werten ab. Bei pH 7 und pH 8 wurde fast die gleiche Menge an Citrinin gebildet. Bei pH 9 hat sich die Citrininkonzentration etwas reduziert.

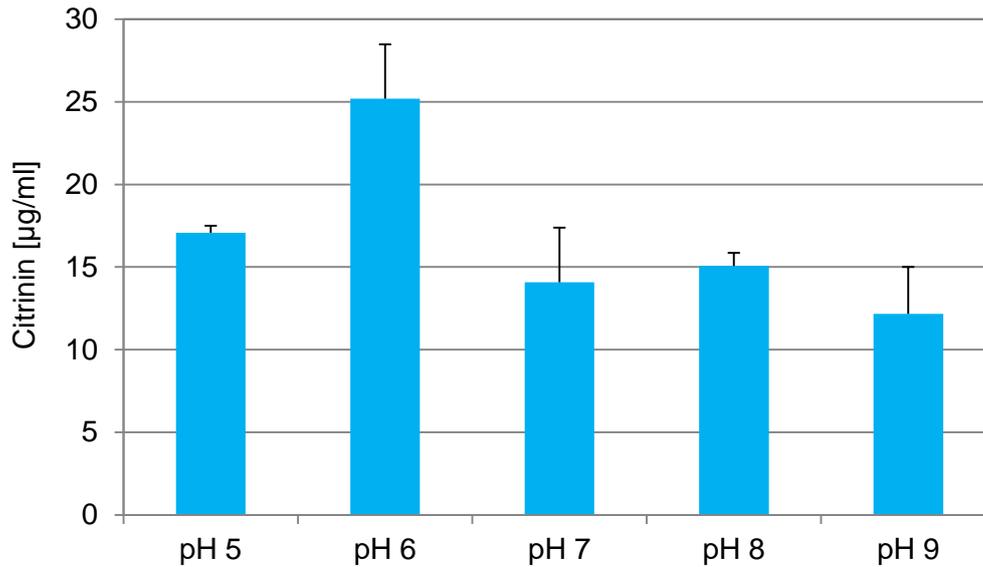


Abb. 39: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *P. verrucosum* BFE808.

Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *P. expansum*

Bei *P. expansum* ist ein anderes Bild zu sehen als bei *P. verrucosum*. Im sauren Bereich, bei einem pH-Wert von 5, wurde wenig Citrinin gebildet. Danach stieg die Citrininmenge bei pH 6 und pH 7 an. Bei pH 7 ist die Bildung am stärksten. Im basischen Bereich, also mit steigendem pH-Wert, nahm die Citrininbildung wieder ab.

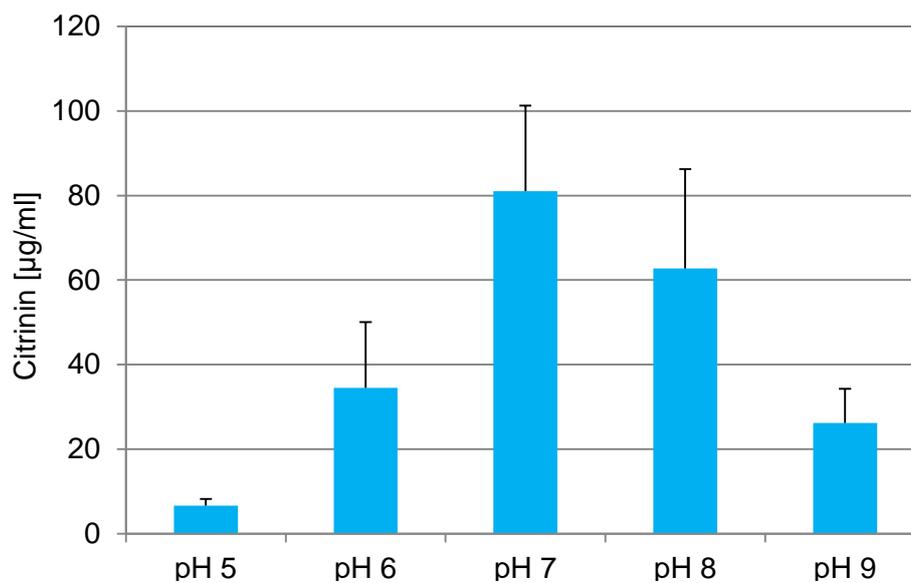


Abb. 40: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *P. expansum* BFE189.

Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *P. citrinum*

Wie auf der Abbildung 41 deutlich zu erkennen, wurden bei allen pH-Werten, sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich, hohe Mengen an Citrinin gebildet. Es ist eine leichte Oszillation zu sehen, aber generell betrachtet, ist die Citrininmenge bei allen pH-Werten relativ hoch und konstant.

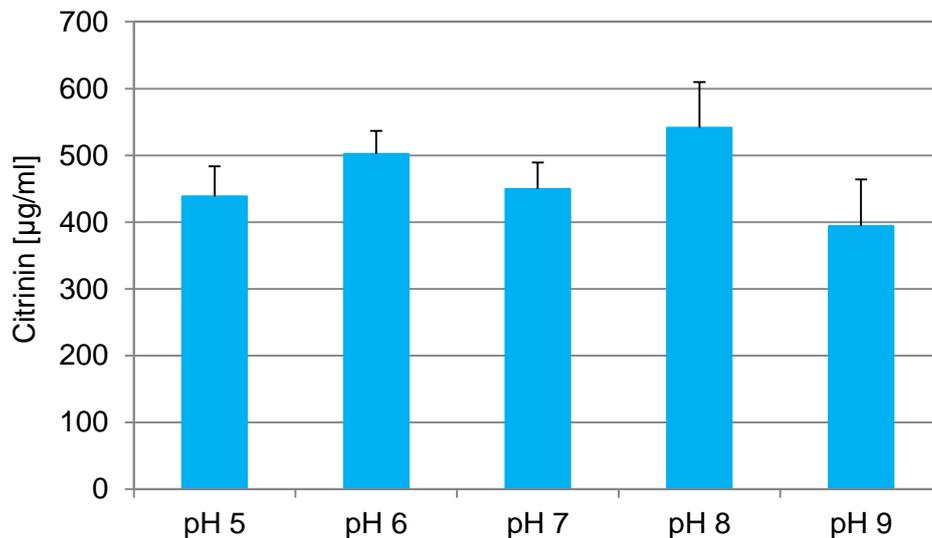


Abb. 41: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *P. citrinum* BFES12.

Es scheint, dass der pH-Wert keinen großen Einfluss auf die Citrininbildung bei *P. citrinum* hat.

Abschließend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass der pH-Wert einen starken Einfluss auf die Citrininbildung bei *P. expansum* und *P. verrucosum* hat, während die Citrininbildung bei *P. citrinum* sich kaum durch den pH-Wert verändert hat. Dies deutet wieder auf eine geringere Regulation der Citrininbildung in *P. citrinum* hin.

3.10 Rolle des PACC-Signalwegs in der Citrininbildung bei *Penicillium*

Aus den vorherigen Ergebnissen ist bekannt, dass der pH-Wert ein wichtiger abiotischer Faktor ist, der die Citrininbildung beeinflusst. Wie schon beschrieben spielt der PACC-Signalweg bei der pH-Regulation eine wichtige Rolle. Um die Rolle dieses Signalwegs in der Citrininbildung zu verstehen, wurde der PacC

Transkriptionsfaktor in *P. expansum* und *P. citrinum* durch das Ausschalten des *PacC*-Gens inaktiviert.

Rolle des PACC-Signalwegs in der Citrininbildung bei *P. expansum*

Zur Inaktivierung des *PacC* in *P. expansum* wurde ein Fragment des *PacC*-Gens mit dem Primerpaar *PacC_P.exp_for* und *PacC_P.exp_rev* amplifiziert und in den pGEM-T Vektor kloniert. Der Vektor wurde im Bakterium *E. coli* vermehrt und mit dem *EcoRI*-Enzym auf die richtige Klonierung des *PacC*-Fragmentes überprüft. Danach wurden die Protoplasten von *P. expansum* mit diesem Vektor transformiert. Die Untersuchung der *PacC*-Transformanten mittels DC zeigte, dass einige Transformanten weniger Citrinin gebildet haben. Eine der *PacC*-Transformanten, die weniger Citrinin gebildet hat, wurde auf PDA-Medium mit verschiedenen pH-Werten angeimpft und bei 25 °C inkubiert. Nach 7 Tagen Wachstum wurde die Citrininbildung des Wildtyps und der Transformante mittels DC/HPLC bestimmt.

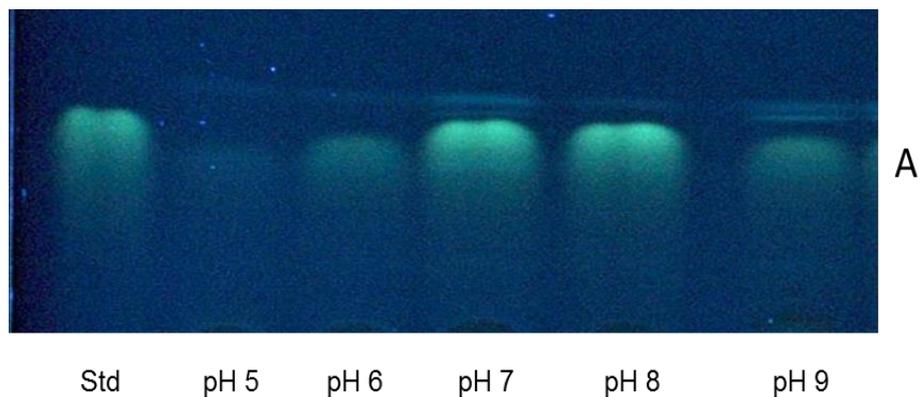


Abb. 42: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *P. expansum*.

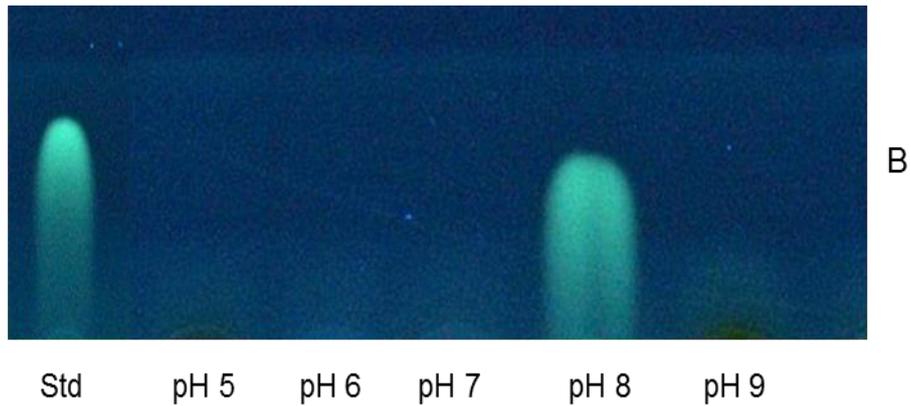


Abb. 43: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei der PacC-Transformante von *P. expansum*.

Der Wildtyp konnte wie erwartet auf allen pH-Werten unterschiedliche Mengen an Citrinin bilden (Abb. 42). Bei pH 7 und pH 8 hat der Wildtyp die höchsten Citrininmengen gebildet. Die Transformante konnte nur bei pH 8 hohe Mengen an Citrinin bilden (Abb.43). Bei den anderen pH-Werten wurden nur sehr geringe Mengen gebildet. Die Messung der Citrininbildung mittels HPLC bestätigt das Ergebnis der DC (Abb. 44).

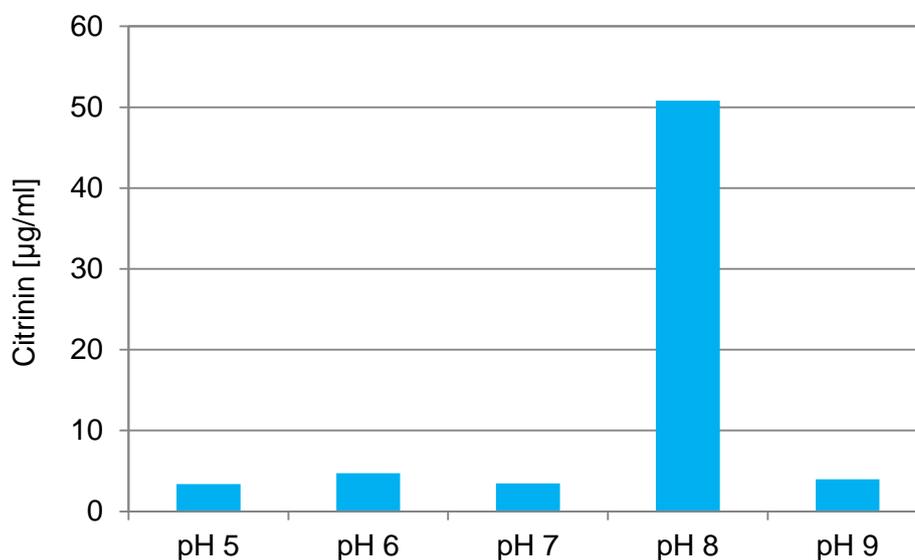


Abb. 44: Bestimmung der Citrininbildung bei der PacC-Transformante von *P. expansum* mittels HPLC.

Es scheint, dass der PACC-Signalweg bei *P. expansum* eine wichtige Rolle bei der Citrininbildung, insbesondere im sauren und im basischen pH-Bereich spielt.

Eine mögliche Veränderung des *PacC*-Gens wurde mittels Southern Blot überprüft. Dazu wurden der Wildtyp und die Transformante im flüssigen MG-Medium für 6 Tage bei 25 °C inkubiert. Nach der DNA-Isolation wurde der Southern Blot, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Die Abbildung 45 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung.

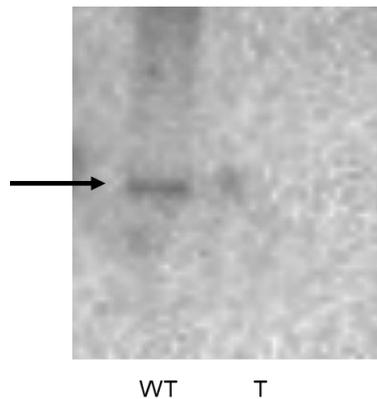


Abb. 45: Überprüfung der *PacC*-Transformante von *P. expansum* mittels Southern Blot. WT: Wildtyp. T: *PacC*-Transformante.

Beim Wildtyp ist eine deutliche Bande zu erkennen, während in der Spur der Transformante keine Bande zu sehen ist, obwohl die DNA-Konzentrationen des Wildtyps und die der Transformante gleich hoch waren. Außerdem wurde die Effizienz des *EcoRI*-Verdau auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. Nach dem *EcoRI*-Verdau war auf der Spur der Transformante dieselbe Bandenanzahl wie beim Wildtyp zu sehen. Dies bedeutet, dass bei der Transformante der Verdau genauso gut funktioniert hatte, wie beim Wildtyp. Daher wird hier vermutet, dass das *PacC*-Gen oder ein Teil davon bei der Transformation deletiert wurde, so dass es nicht mehr möglich war dies nachzuweisen.

Nach diesem Ergebnis kann man sagen, dass PACC insgesamt eine wichtige Rolle bei der Citrininbildung bei *P. expansum* spielt. Die Bildung hoher Citrininmengen der *PacC*-Mutante bei pH 8, deutet darauf hin, dass bei diesem pH-Wert der PACC-Signalweg für die Citrininbildung nicht wichtig ist.

Rolle des PACC-Signalwegs in der Citrininbildung bei *P. citrinum*

Um zu untersuchen, ob der PACC-Signalweg für die Citrininbildung bei *P. citrinum* wichtig ist, wurde das *PacC*-Gen, das für PacC-Transkriptionsfaktor codiert, in *P. citrinum* inaktiviert. Neun putative Transformanten wurden auf ihre Citrininbildung mit der DC untersucht.

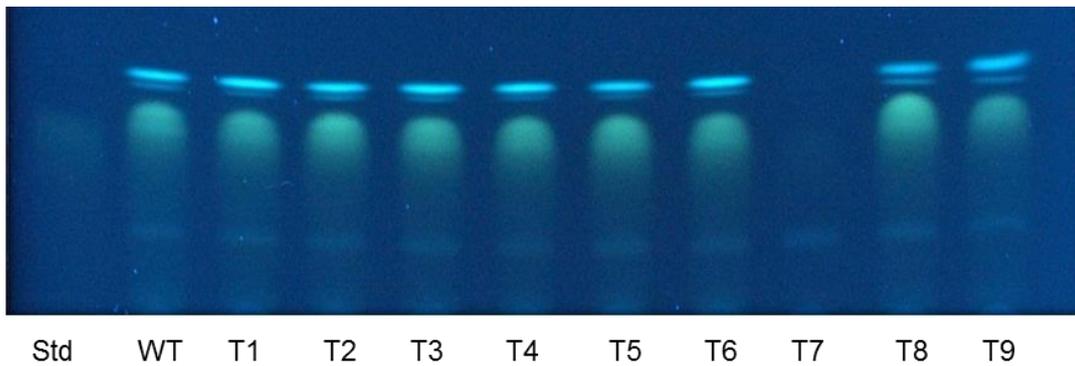


Abb. 46: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der *PacC*-Transformanten von *P. citrinum*. Std: Citrinin Standard, WT: *P. citrinum* Wildtyp. T: *PacC*-Transformanten.

Wie auf dem DC-Bild (Abb. 46) zu sehen ist, konnte die Transformante 7 kein Citrinin bilden. Diese Transformante wurde weiter analysiert, in dem sie auf PDA-Medium mit verschiedenen pH-Werten angeimpft und nach 7 Tagen Wachstum bei 25 °C, die Citrininbildung mit der DC untersucht wurde. Der Wildtyp *P. citrinum* diente als Kontrolle.

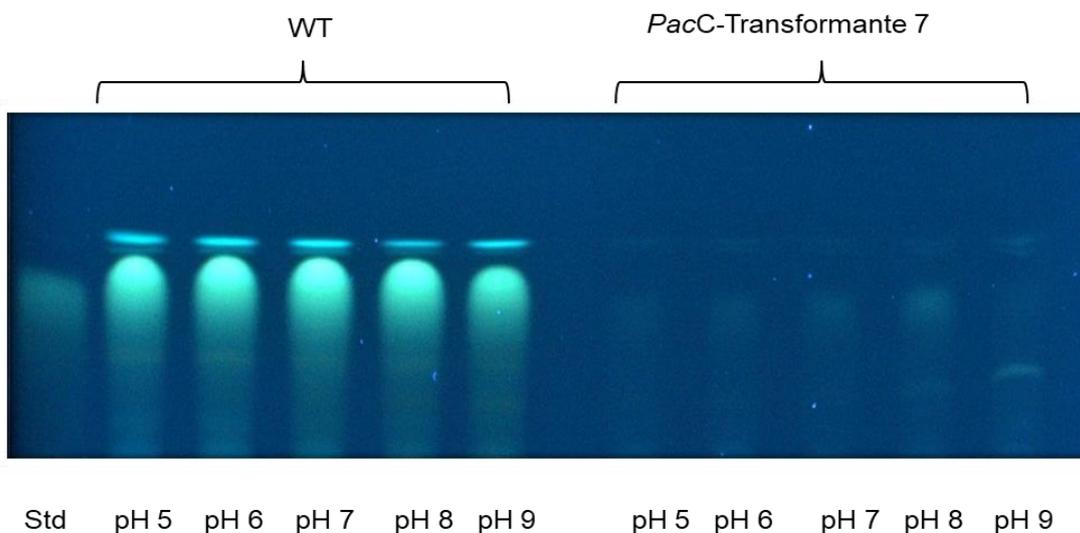


Abb. 47: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei der *PacC*-Mutante von *P. citrinum*. Std: Citrinin Standard.

Im Gegensatz zum Wildtyp bildete die Transformante bei allen pH-Werten viel weniger Citrinin (Abb. 47). Aber auf pH 8 konnte die Transformante im Vergleich zu den anderen pH-Werten mehr Citrinin bilden, allerdings in geringerem Umfang als die *P. expansum* Mutante. Um zu überprüfen, ob das *PacC*-Gen durch die Transformation inaktiviert wurde, wurde die Transformante 7 mittels Southern Blot überprüft. Die DNA wurde aus dem Wildtyp und der Transformante, wie im Methodenteil beschrieben, isoliert und anschließend wurde ein Southern Blot durchgeführt. Die folgende Abbildung 48 stellt das Ergebnis der Hybridisierung dar.

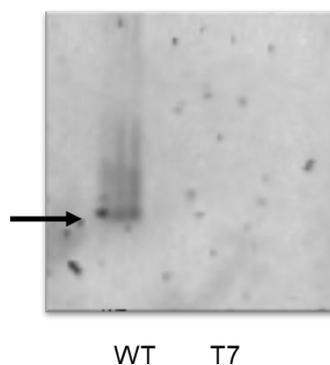


Abb. 48: Überprüfung der *PacC*-Mutante von *P. citrinum* mittels Southern Blot. WT: *P. citrinum* Wildtyp. T7: *PacC*-Transformante.

Beim Wildtyp ist eine klare Bande zu sehen, während bei der Transformante keine Hybridisierung nachzuweisen war, obwohl die DNA-Konzentrationen bei dem Wildtyp und der Transformante gleich waren. Dies deutet stark auf eine Deletion des ursprünglichen *PacC*-Gens hin und bestätigt die Inaktivierung dieses Gens. Obwohl der pH-Wert keinen großen Einfluss auf die Citrininbildung bei *P. citrinum* hatte, hat die *PacC*-Inaktivierung bei dieser Spezies zur Hemmung der Citrininbildung geführt. Dies deutet darauf hin, dass der *PACC*-Signalweg für die Citrininbildung entscheidend ist.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der *PacC*-Inaktivierung zwischen *P. expansum* und *P. citrinum*, so stellt man fest, dass *PACC*-Signalweg unterschiedliche Reaktionen hervorrufen kann. Bei *P. expansum* reguliert der *PACC*-Signalweg die Citrininbildung im sauren und im alkalischen Bereich. Bei *P. citrinum* ist der *PACC*-Signalweg für die gesamte Bildung des Citrinins wichtig aber nicht für die Regulation.

Zusammenfassend kann man sagen, der PACC-Signalweg unterschiedliche Aufgaben bei der Regulation der Citrinbildung in *P. expansum* und *P. citrinum* wahrnimmt. Dies könnte eventuell an der Aktivität des Transkriptionsfaktors *ctnR* liegen. Eine Möglichkeit wäre, dass der Transkriptionsfaktor *ctnR* durch den PACC-Regulator unterschiedlich reguliert wird. Um das zu überprüfen, wurde eine heterologe Überexpression des *ctnR*-Transkriptionsfaktors aus *P. citrinum* in *P. expansum* durchgeführt.

3.11 Heterologe Überexpression des Transkriptionsaktivators in *P. expansum*

Zur heterologen Überexpression des Transkriptionsaktivators, wurde das *ctnR*-Gen mit dem Promotor und Terminator aus *P. citrinum* mit dem Primerpaar For_ *ctnR* und Rev_ *ctnR* mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pGEM-T Easy kloniert. Im nächsten Schritt wurden Protoplasten aus *P. expansum* generiert und mit diesem Vektor transformiert. Die Transformation wurde, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Nach 7 Tagen Inkubation wurde die Citrinbildung bei den Transformanten mittels DC analysiert.

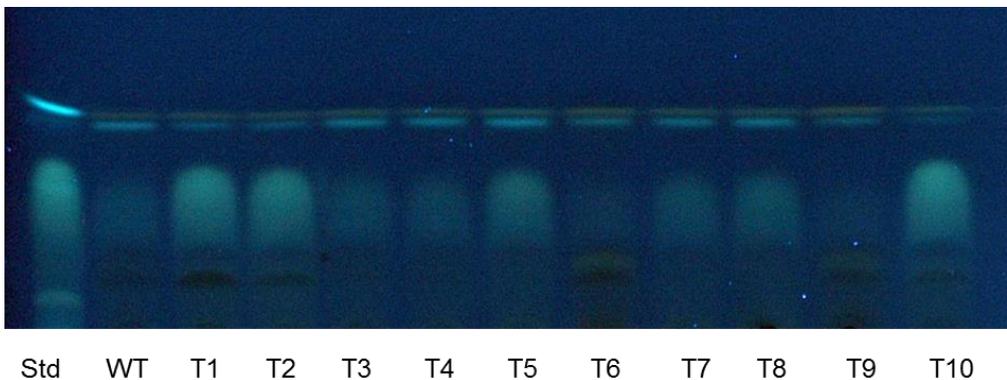


Abb. 49: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Citrinbildung bei den *ctnR*-Transformanten von *P. expansum* BFE189. Std: Citrinin Standard. WT: *P. expansum* Wildtyp. T: *ctnR*-Transformanten.

Das Ergebnis der DC zeigt, dass die Transformanten unterschiedliche Citrininmengen gebildet haben. Im Vergleich zum Wildtyp haben manche Transformanten wesentlich mehr Citrinin produziert (T1, T2, T5, und T10). Die Citrininbildung bei den drei Transformanten T2, T5 und T10 wurde mit der HPLC weiter bestimmt.

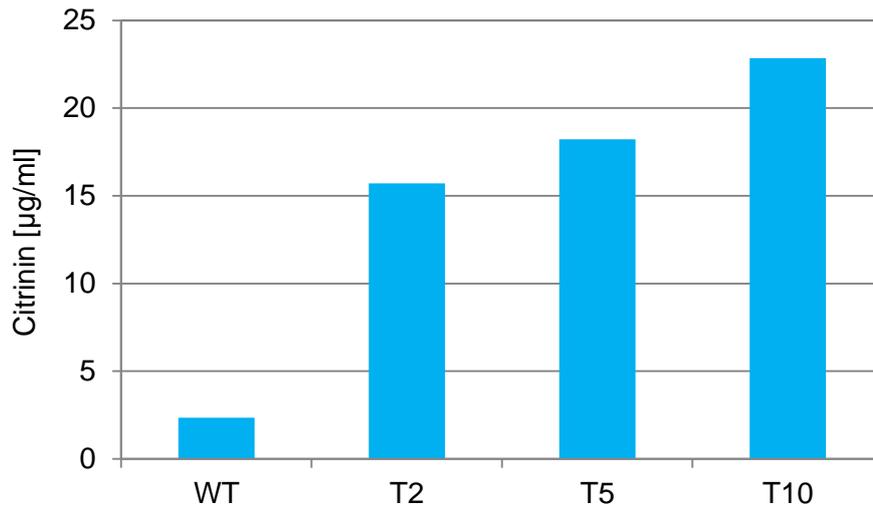


Abb. 50: Bestimmung der Citrininbildung bei den *ctnR*-Transformanten von *P. expansum* BFE189 mittels HPLC. WT: *P. expansum* BFE189 Wildtyp. T: *ctnR*-Transformanten.

Das Ergebnis der HPLC bestätigt das Ergebnis der DC. Bei den drei untersuchten Transformanten T2, T5 und T10 ist im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich höhere Citrininbildung zu beobachten. Die Transformanten T5 und T10 wurden mittels PCR weiter überprüft (Abb. 51).

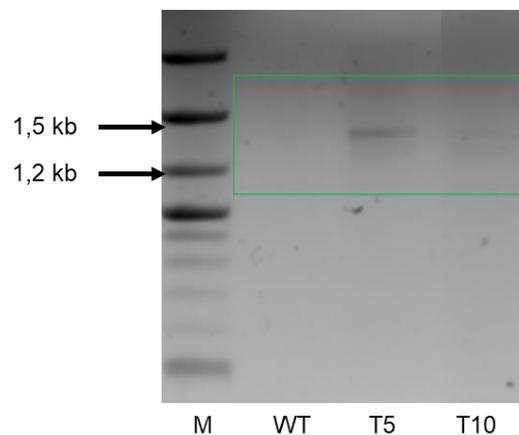


Abb. 51: Überprüfung der *ctnR*-Überexpression mittels PCR. M: 2-Log Marker. WT: *P. expansum* BFE189 Wildtyp. T: *ctnR*-Transformanten.

Beim Wildtyp ist keine Bande zu sehen. Dies wurde erwartet, da Primer verwendet wurden, die spezifisch für das *ctnR*-Gen aus *P. citrinum* sind. Bei den Transformanten T5 und T10 trat eine Bande bei ca. 1,5 kb auf. Dies deutet auf die Präsenz des *ctnR*-Gens aus *P. citrinum* in *P. expansum* hin. Für die weiteren Analysen wurde die Transformante T5 selektiert.

Um den Einfluss der *ctnR*-Überexpression auf die Citrininbildung bei der *ctnR*-Transformante weiter zu überprüfen, wurde die Transformante T5 auf PDA-Medium mit verschiedenen pH-Werten angeimpft und nach 7 Tagen Inkubation bei 25 °C wurde die Citrininbildung mittels DC untersucht.

Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung der *ctnR* Transformante

Neben der *P. expansum ctnR*-Transformante, wurden der *P. citrinum* und der *P. expansum* Wildtyp als Kontrollen mitgeführt. Wie auf den folgenden Bildern deutlich zu erkennen ist, bildet *P. citrinum* wie erwartet auf dem gesamten pH-Spektrum große Citrininmengen (Abb. 52). Im Vergleich zu *P. citrinum*, der durchgehend hohe Mengen an Citrinin bildet, ist die Citrininbildung bei *P. expansum* im gesamten pH-Spektrum viel schwächer (Abb. 53). Die höchste Citrininmenge ist im neutralen Bereich zu sehen. Die Ergebnisse stimmen vollkommen mit vorherigen Experimenten überein (siehe Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung).

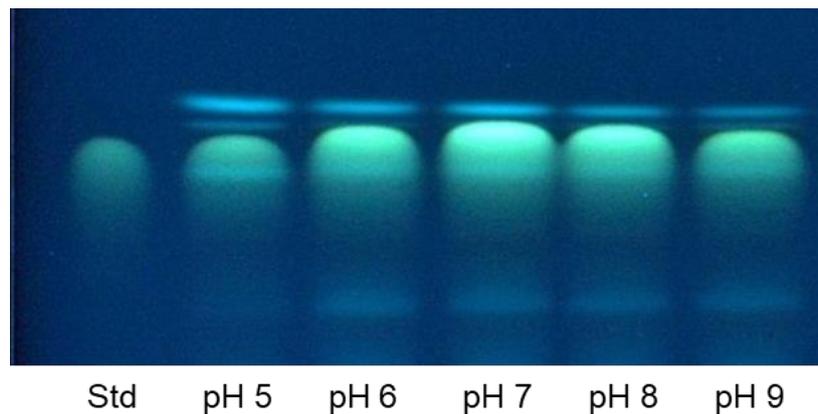


Abb. 52: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Wirkung des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *P. citrinum*. Std: Citrinin Standard.

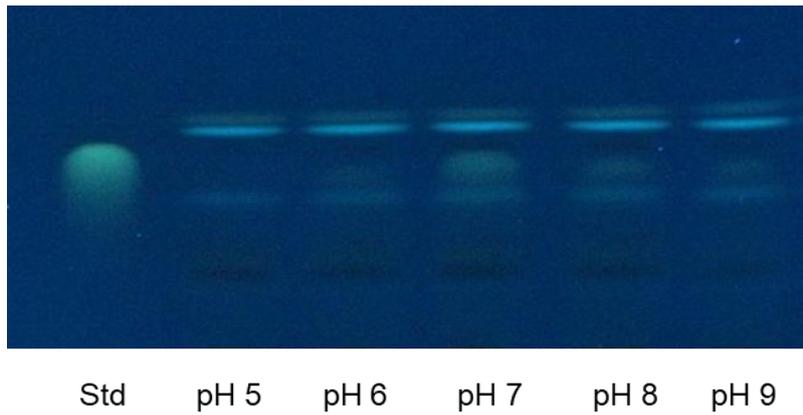


Abb. 53: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Wirkung des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei *P. expansum* BFE189. Std: Citrinin Standard.

Die *ctnR*-Transformante von *P. expansum*, die den Transkriptionsaktivator von *P. citrinum* enthält zeigt eine andere Citrininbildungskinetik (Abb. 54), verglichen mit dem *P. expansum* Wildtyp. Die Bildungskinetik von Citrinin bei der Transformante unter verschiedenen pH-Werten ähnelt sehr stark der Bildungskinetik von *P. citrinum*, d. h. sie wird durch den pH-Wert kaum beeinflusst. Auch die gebildete Citrininmenge ähnelt der von *P. citrinum*. Dies deutet darauf hin, dass die nahezu konstitutive Citrininbildung der *P. expansum ctnR*-Transformante durch die Expression des Transkriptionsfaktors *ctnR* aus *P. citrinum* bedingt wird.

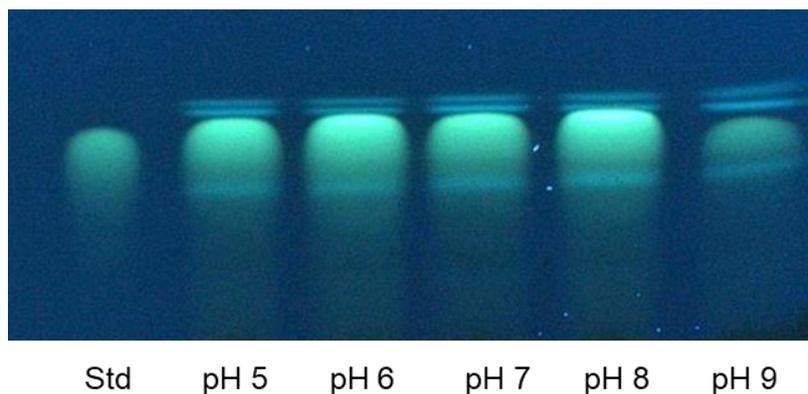


Abb. 54: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei der *ctnR*-Transformante von *P. expansum* BFE189. Std: Citrinin Standard.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Citrininbildung stark von der Aktivität des Transkriptionsfaktors *ctnR* abhängt. Bei *P. expansum* führt die Aktivierung des Transkriptionsaktivators zur starken Regulation der Citrininbildung durch den PACC-Signalweg. Die Aktivierung des Transkriptionsaktivators bei *P. citrinum* führt zu einer starken aber kaum regulierten Citrininbildung.

3.12 Einfluss des oxidativen Stresses auf die Citrininbildung bei *Penicillium*

Es ist bekannt, dass filamentöse Pilze Mykotoxine als Antwort gegen Stressbedingungen bilden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Salzstress unterschiedliche Wirkungen auf die Citrininbildung bei den drei untersuchten *Penicillium* Spezies hat. Eine andere wichtige Stressform ist der oxidative Stress, der die Mykotoxinbildung beeinflussen kann. Bei *P. verrucosum* konnte gezeigt werden, dass erhöhter oxidativer Stress die Mykotoxinbildung von Ochratoxin A in Richtung Citrinin verschiebt. Mit der Erhöhung des oxidativen Stresses im Nährmedium nahm die Ochratoxinbildung ab und Citrininbildung hat sich erhöht (Schmidt-Heydt et al., 2015). Um zu sehen, was für einen Einfluss der oxidative Stress auf die Citrininbildung bei den drei *Penicillium* Spezies hat, wurden die Spezies auf PDA-Medium mit verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen (H_2O_2) angeimpft und das Wachstum und die Citrininbildung der Spezies darauf analysiert.

Einfluss des oxidativen Stresses auf die Citrininbildung bei *P. verrucosum*

Wenn man sich das Wachstum auf den gesamten H_2O_2 -Konzentrationen anschaut, merkt man, dass H_2O_2 das Wachstum beeinflusst. Das Wachstum auf PDA mit 2 mM H_2O_2 sieht genauso aus wie auf PDA ohne H_2O_2 . Auf den höheren H_2O_2 Konzentrationen 5 mM und 10 mM hat sich das Wachstum verringert.

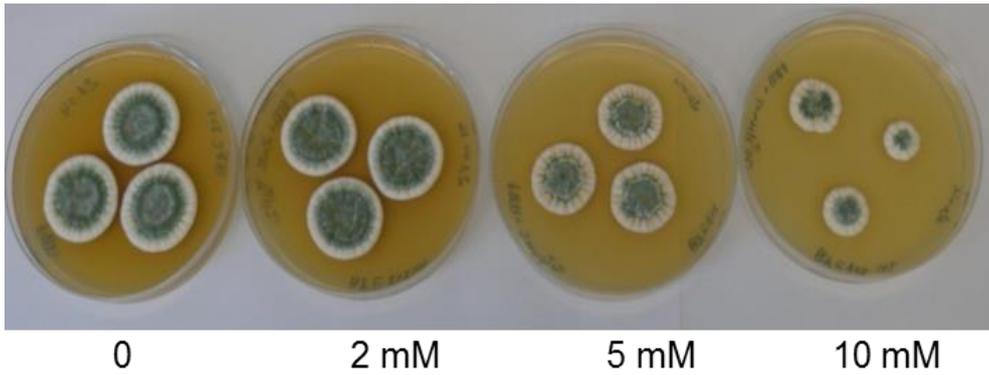


Abb. 55: Einfluss von H_2O_2 auf das Wachstum von *P. verrucosum* BFE808. Das PDA-Medium wurde hergestellt und autoklaviert. Nach Abkühlung des Mediums auf ca. $45\text{ }^\circ\text{C}$ wurde H_2O_2 mit den Konzentrationen 2 mM, 5 mM und 10 mM steril zum Medium gegeben. Nach 7 Tagen Inkubation bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln wurde das Wachstum dokumentiert.

Im Gegensatz zum Wachstum, hat H_2O_2 einen positiven Effekt auf die Citrininbildung. Wie der Abbildung 56 zu entnehmen ist, hat die gebildete Citrininmenge auf PDA mit 2 mM und 5 mM H_2O_2 deutlich zugenommen, während die Citrininbildung bei 10 mM wieder die Höhe des Ausgangswertes erreicht hat. Diese geringere Induktion der Citrininbildung könnte die höhere Sensitivität gegenüber H_2O_2 während den Wachstumsversuchen bedingen.

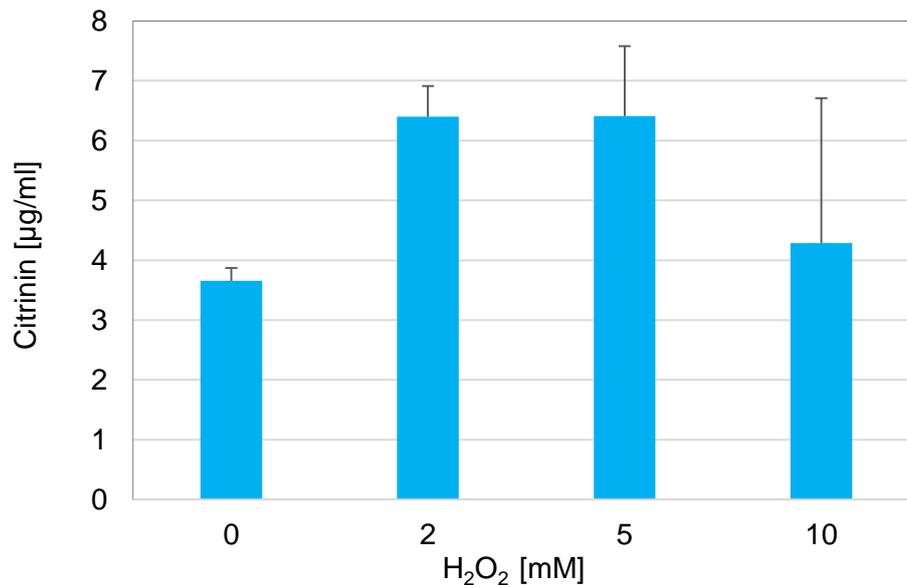


Abb. 56: Einfluss von H_2O_2 auf die Citrininbildung bei *P. verrucosum* BFE808. Die Messung der Citrininbildung erfolgte nach 7 Tagen Wachstum bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ mittels HPLC.

Einfluss des oxidativen Stresses auf die Citrininbildung bei *P. expansum*

Im Gegensatz zu *P. verrucosum*, hat H_2O_2 weniger Einfluss auf das Wachstum von *P. expansum*. Auf PDA mit 2 mM H_2O_2 ist das Wachstum etwas besser als auf PDA ohne H_2O_2 . Es scheint, dass H_2O_2 mit niedrigen Konzentrationen das Wachstum von *P. expansum* sogar fördert.

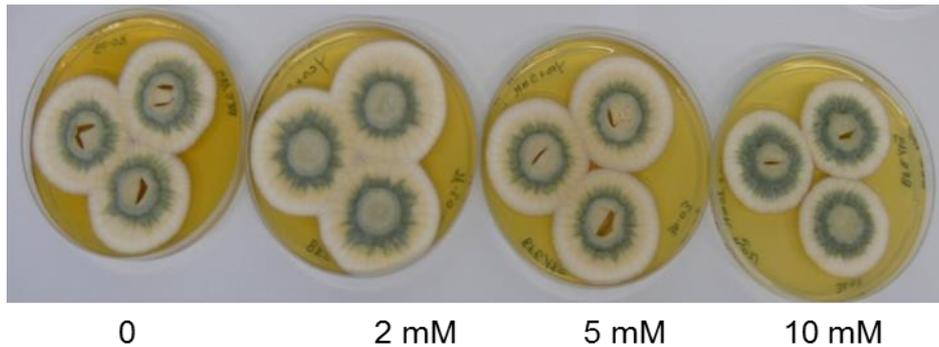


Abb. 57: Einfluss von H_2O_2 auf das Wachstum von *P. expansum* BFE189. Die Patten wurden nach 7 Tagen Inkubation bei 25 °C fotografiert.

Die Grafik über die Wirkung von H_2O_2 auf die Citrininbildung bei *P. expansum* in der Abbildung 58 zeigt, dass die gebildete Citrininmenge auf PDA mit H_2O_2 zugenommen hat. Auf PDA mit 2 mM H_2O_2 hat sich die Citrininproduktion verdoppelt. Bei 5 mM und 10 mM H_2O_2 hat sich die Citrininbildung weiter erhöht, wobei bei 5 mM und 10 mM dieselbe Citrininmenge zu sehen ist. Im Vergleich mit *P. verrucosum* bildet *P. expansum* deutlich höhere Mengen an Citrinin bei steigenden H_2O_2 Konzentrationen.

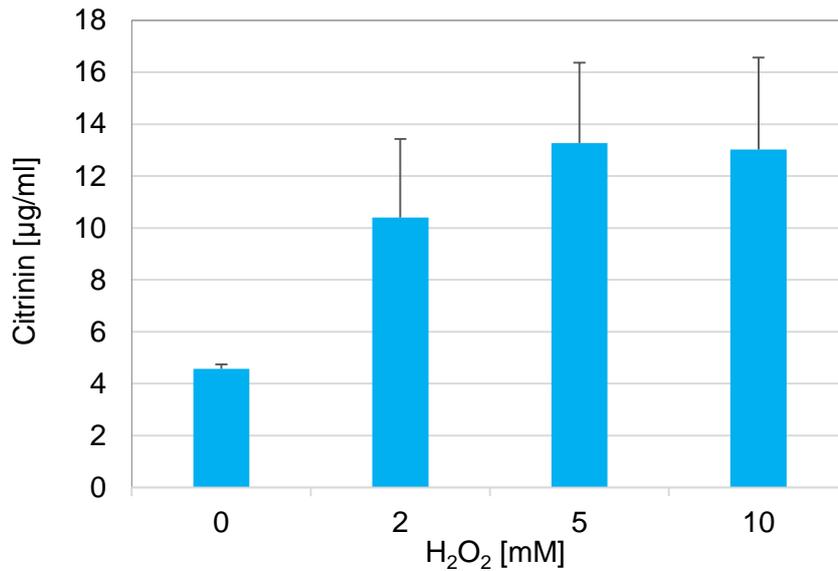


Abb. 58: Einfluss von H₂O₂ auf die Citrininbildung bei *P. expansum* BFE189. Die Citrininbildung wurde auf PDA-Medium mit H₂O₂ nach 7 Tagen bei 25 °C im Dunkeln mit der HPLC gemessen.

Das Wasserstoffperoxid hat einen starken Einfluss auf die Citrininbildung bei *P. expansum*. Obwohl das Wachstum nicht beeinflusst wurde, ist die Citrininproduktion unter erhöhten oxidativen Stressbedingungen stark angestiegen.

Einfluss des oxidativen Stresses auf die Citrininbildung bei *P. citrinum*

Wie bei *P. expansum* haben die verwendeten H₂O₂ Konzentrationen keinen großen Einfluss auf das Wachstum von *P. citrinum*. Diese Spezies konnte sich trotz Erhöhung des oxidativen Stresses durchsetzen und gut wachsen.

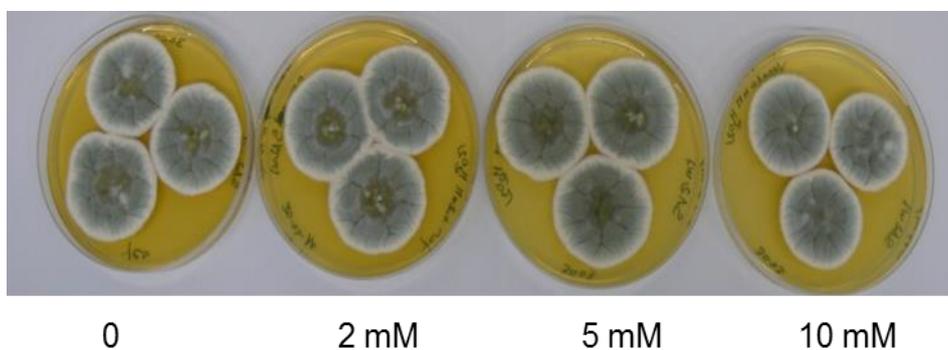


Abb. 59: Einfluss von H₂O₂ auf das Wachstum von *P. citrinum* BFES12.

Unter denselben Bedingungen wurde neben den Wachstumsversuchen auch die Citrininbildung bestimmt. Wenn man sich die folgende Grafik in der Abbildung 60 anschaut, merkt man, dass nach der Zugabe von H_2O_2 mehr Citrinin gebildet wurde. Im Vergleich zu den beiden anderen Spezies ist die Citrininbildung bei *P. citrinum* um mehrere Größenordnungen höher.

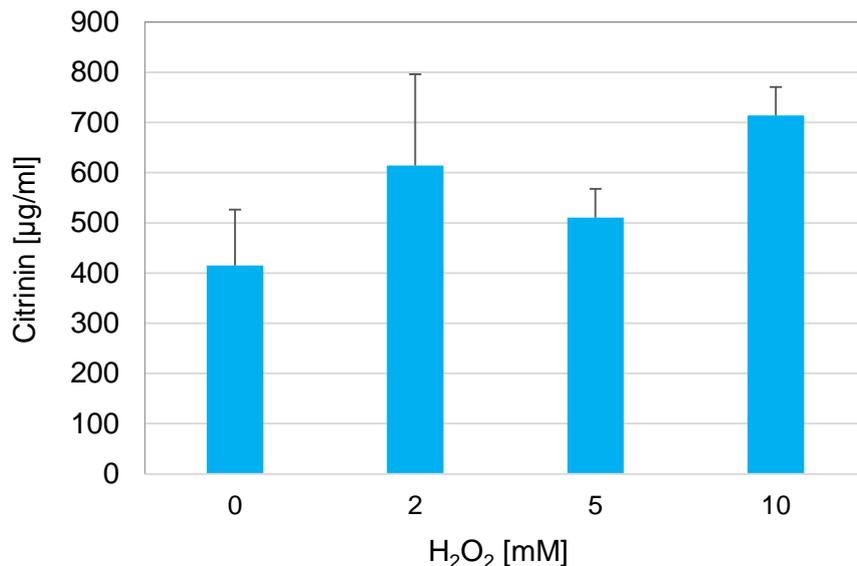


Abb. 60: Einfluss von H_2O_2 auf die Citrininbildung bei *P. citrinum* BFES12.

Obwohl sich das Wachstum mit steigenden H_2O_2 -Konzentrationen nicht verändert hat, hat die Citrininbildung deutlich zugenommen. Wenn man die Citrininwerte auf PDA und auf PDA mit 10 mM H_2O_2 miteinander vergleicht, so kann man deutlich erkennen, dass es nahezu zur Verdopplung der Citrininkonzentration kam.

Bei den drei *Penicillium* Arten hat H_2O_2 die Citrininbildung gefördert. Bei *P. citrinum* und *P. expansum* steigt die Citrininkonzentration auf PDA mit 2 mM H_2O_2 und bleibt auch bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen hoch. Bei *P. verrucosum* ist bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen ein leichter Rückgang in der Bildung zu erkennen, was die höhere Sensitivität dieser Spezies bei höheren H_2O_2 Konzentrationen erklären könnte.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse kann man sagen, dass H_2O_2 bei den drei Spezies einen positiven Effekt auf die Citrininbildung hat. Dies könnte über den cAMP/PKA-Signalweg bei diesen Spezies reguliert werden.

3.13 Rolle des cAMP-Signalwegs in der Citrininbildung bei *Penicillium*

Der cAMP-Signalweg ist bei Pilzen hochkonserviert und kann an der Regulation der Mykotoxinbildung beteiligt sein. Dieser Signalweg wird durch verschiedene externe Faktoren aktiviert. Einer dieser Faktoren ist der oxidative Stress. Um zu überprüfen, ob dieser Signalweg ebenso bei der Citrininbiosynthese involviert ist, wurde die Citrininbildung bei *P. verrucosum*, *P. expansum* und *P. citrinum* auf PDA-Medium mit vier verschiedenen Konzentrationen an cAMP untersucht. Die verwendeten Konzentrationen sind 5 mM, 10 mM, 15 mM und 20 mM. Nachdem das PDA-Medium hergestellt und autoklaviert wurde, wurden die entsprechenden Mengen an cAMP zum Medium steril hinzugegeben. Die Citrininbildung wurde mit der DC nach 7 Tagen Inkubation bei 25 °C untersucht.

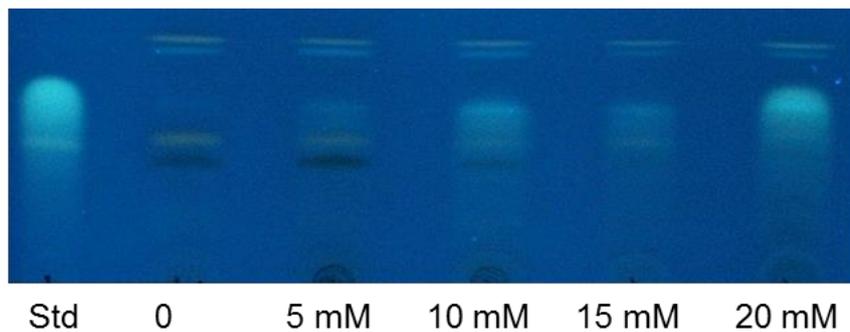


Abb. 61: Einfluss von externem cAMP auf die Citrininbildung bei *P. verrucosum* BFE808. Std: Citrinin Standard. 0: Kontrolle (PDA ohne cAMP).

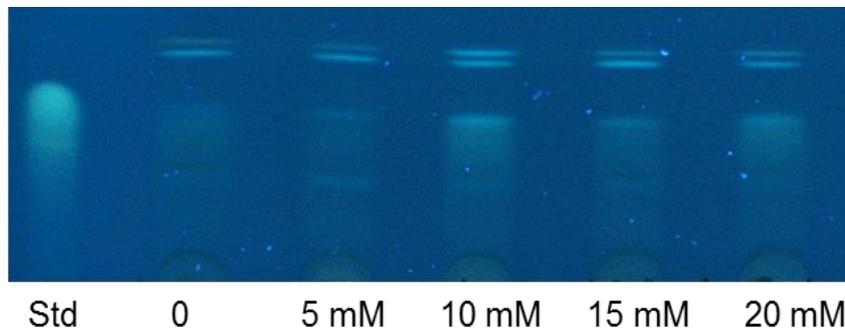


Abb. 62: Einfluss von externem cAMP auf die Citrininbildung bei *P. expansum* BFE189. Std: Citrinin Standard. 0: PDA ohne cAMP.

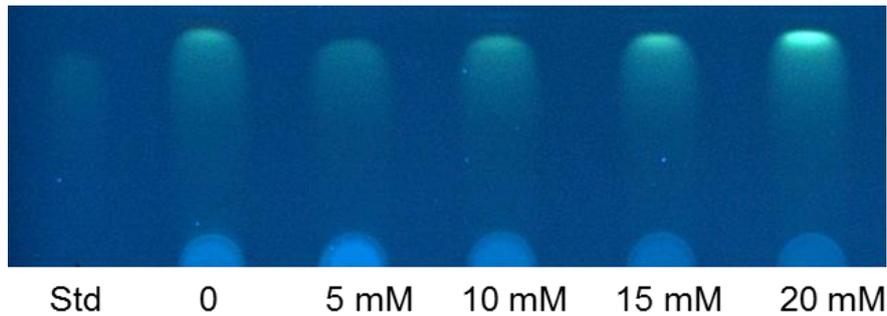


Abb. 63: Einfluss von externem cAMP auf die Citrininbildung bei *P. citrinum* BFES12.

Wie deutlich auf den DC-Bildern zu erkennen ist, ist die Citrininbildung bei *P. verrucosum* und *P. expansum* auf PDA mit 10 mM, 15 mM und 20 mM höher, als im Vergleich zur Citrininbildung auf PDA ohne cAMP. Beide Spezies haben auf PDA und PDA mit 5 mM cAMP weniger Citrinin gebildet als auf PDA mit 10 mM, 15 mM und 20 mM. Während bei *P. verrucosum* und *P. expansum* das cAMP einen starken Einfluss auf die Citrininbildung hat, hat es bei *P. citrinum* einen geringeren Einfluss. *P. citrinum* hat auf PDA ohne cAMP schon viel Citrinin gebildet. Auf PDA mit 10 mM und 15 mM cAMP hat diese Spezies fast die gleiche Menge an Citrinin, wie auf PDA ohne cAMP, gebildet. Auf PDA mit 20 mM cAMP ist die Citrininbildung etwas höher.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Regulation der Citrininbildung durch cAMP bei diesen Spezies unterschiedlich ist. Bei *P. expansum* und *P. verrucosum* ist die Citrininproduktion stark von cAMP abhängig. Bei *P. citrinum* ist die Citrininbildung kaum durch cAMP reguliert. Bei *P. citrinum* ist eventuell der cAMP-Signalweg an der Citrininbiosynthese beteiligt aber nicht entscheidend, da dieser Pilz ohne Zufuhr von cAMP hohe Mengen an Citrinin bilden konnte. Bei *P. expansum* und *P. verrucosum*, scheint der cAMP-Signalweg eine große Rolle bei der Citrininregulation zu spielen.

3.14 Untersuchung der antioxidativen Wirkung von Citrinin

Um die biologische Bedeutung von Citrinin weiter zu untersuchen, wurde die Citrininbildung bei *P. citrinum*, dem Wildtyp und einer Citrininmutante, unter oxidativen Stressbedingungen untersucht. Die Mutante und der Wildtyp wurden auf PDA und PDA mit 10 mM H₂O₂ angeimpft und nach 7 Tagen bei 25 °C wurde das Wachstum dokumentiert.

Wie die Abbildung 64 deutlich zeigt, ist der Wildtyp in der Lage auf PDA mit 10 mM H_2O_2 so gut zu wachsen wie auf PDA ohne H_2O_2 . Nicht nur die Größe der Kolonien auf PDA und PDA mit H_2O_2 ist ähnlich, sondern auch die Sporulation ist durch die hohe H_2O_2 -Konzentration nicht beeinträchtigt. Der Wildtyp konnte auf PDA mit H_2O_2 genauso gut sporulieren wie auf PDA ohne H_2O_2 .

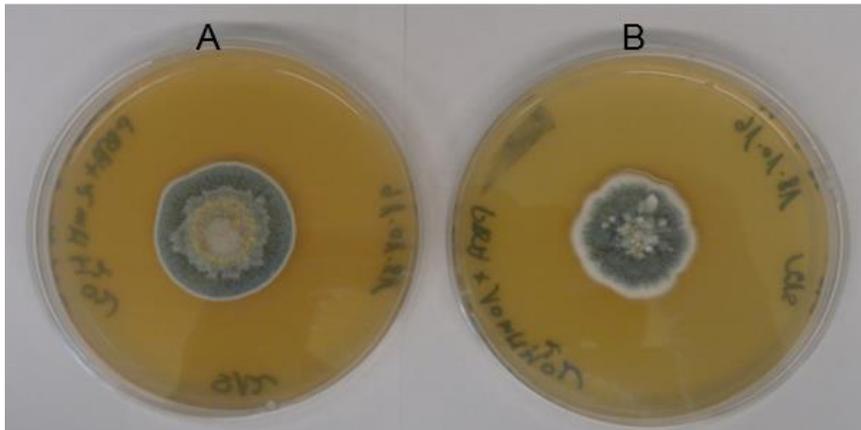


Abb. 64: Einfluss von H_2O_2 auf das Wachstum von *P. citrinum* BFES12 auf PDA. A: Wachstum auf PDA. B: Wachstum auf PDA mit 10 mM H_2O_2 .

Im Gegensatz zum Wildtyp konnte die Citrininmutante nur auf PDA ohne H_2O_2 gut wachsen. Auf PDA mit 10 mM H_2O_2 war sie nicht in der Lage zu wachsen. Das Ergebnis ist auf der Abbildung 65 dargestellt.

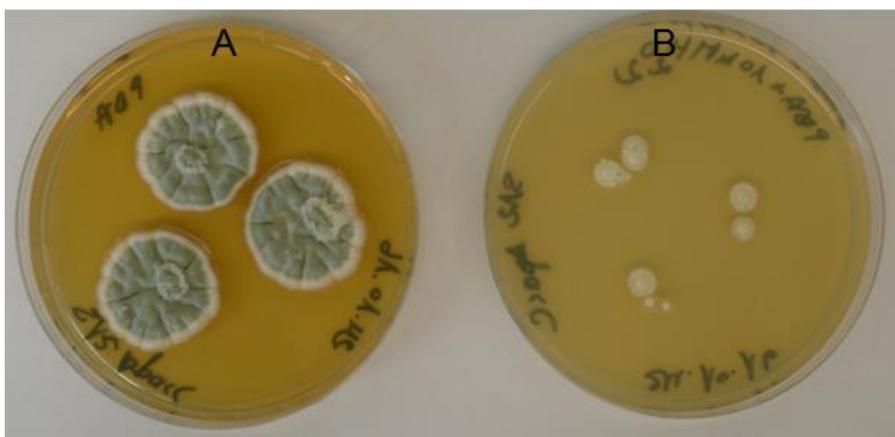


Abb. 65: Einfluss von H_2O_2 auf das Wachstum der Citrininmutante von *P. citrinum* BFES12. A: Wachstum der Mutante auf PDA. B: Wachstum der Mutante auf PDA mit 10 mM H_2O_2 .

Da die Citrininmutante nicht in der Lage ist Citrinin zu bilden, ist eventuell die Unfähigkeit auf PDA mit 10 mM H₂O₂ zu wachsen auf die Unfähigkeit Citrinin zu synthetisieren, zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, wirkt Citrinin antioxidativ und dadurch kann sich der Pilz unter oxidativen Stressbedingungen durchsetzen. Dies wird hier durch die Inaktivierung der Citrininbiosynthese bestätigt.

Einfluss des oxidativen Stresses auf das Wachstum von *P. nordicum*

Penicillium nordicum ist eine Pilzart, die kein Citrinin bildet. Diese Spezies bildet hohe Mengen an Ochratoxin A. Um zu untersuchen, ob diese Spezies, die kein Citrinin bilden kann, unter oxidativen Stressbedingungen wachsen kann, wurde sie auf PDA und PDA mit 10 mM H₂O₂ angeimpft und nach 7 Tagen Wachstum bei 25 °C wurde das Wachstum dokumentiert. Auf den folgenden Wachstumsbildern (Abb. 66) ist deutlich zu erkennen, dass *P. nordicum* auf PDA mit H₂O₂ sehr schlecht wachsen kann. Auf PDA ohne H₂O₂ ist diese Pilzart ganz normal gewachsen und hat auch normal sporuliert.

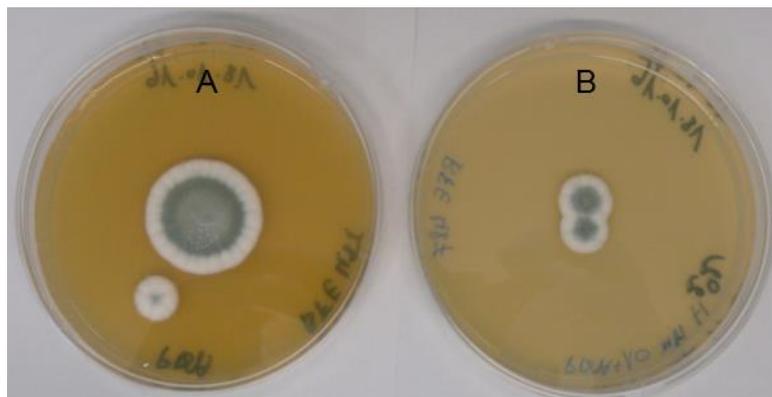


Abb. 66: Einfluss von H₂O₂ auf das Wachstum von *P. nordicum* BFE487.
A: Wachstum auf PDA. B: Wachstum auf PDA mit 10 mM H₂O₂.

Während *P. citrinum*, der viel Citrinin bilden kann, auf PDA mit steigenden H₂O₂-Konzentrationen gut wachsen konnte und seine Citrininproduktion erhöht hat, konnten die Citrininmutante von *P. citrinum* und der *P. nordicum* Wildtyp, die kein Citrinin bilden können, unter erhöhten oxidativen Stressbedingungen kaum bzw. geringer wachsen. Obwohl *P. nordicum* hohe Mengen an Ochratoxin A bilden kann, konnte diese Pilzart unter oxidativen Stressbedingungen nicht normal wachsen.

Diese Ergebnisse bestätigen weiter die Bedeutung der Bildung von Citrinin als Schutzmechanismus gegen oxidative Stressbedingungen.

3.15 Rolle von Velvet in der Citrininbildung bei *Penicillium*

Filamentöse Pilze verfügen über globale und spezifische Regulatoren. Velvet (VeA) ist ein hoch konservierter Regulator bei filamentösen Pilzen. Dieser globale Regulator spielt laut Literatur eine große Rolle bei der Sekundärmetabolitenbildung. Er ist auch in der Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen involviert. Die Inaktivierung von VeA in früheren Studien in *Fusarium graminearum* führte u. a. zur Reduktion der Desoxynivalenolbildung, eines der Sekundärmetabolite von *Fusarium* (Jiang et al., 2011). Daher wurde hier vermutet, dass VeA eventuell eine Rolle bei der Citrininbildung bei *Penicillium* spielen könnte. Aus diesem Grund wurde VeA in *P. verrucosum*, *P. expansum* und in *P. citrinum* inaktiviert.

Rolle von VeA in der Citrininbildung bei *P. verrucosum*

Zur Inaktivierung von VeA in *P. verrucosum* wurde ein VeA-Fragment mittels PCR mit dem Primerpaar VeA_for und VeA_rev amplifiziert, aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt. Das PCR-Produkt wurde dann in das Plasmid pGEM-T Easy kloniert und im Bakterium *E. coli* DH5 α amplifiziert. Nachdem das Plasmid mittels *EcoRI*-Verdau auf die richtige Klonierung des VeA-Fragmentes hin überprüft wurde, wurde *P. verrucosum* damit transformiert. Die Transformation wurde, wie in den vorherigen Versuchen dargestellt, durchgeführt. Viele der Transformanten, zeigten einen anderen Phänotyp als der Wildtyp. Sie zeigten keine Sporenbildung und die Kolonien waren morphologisch stark verändert. Von diesen putativen Transformanten wurden 13 selektiert und auf ihre Citrininbildung überprüft. Die Toxinbildung wurde mittels DC bestimmt.

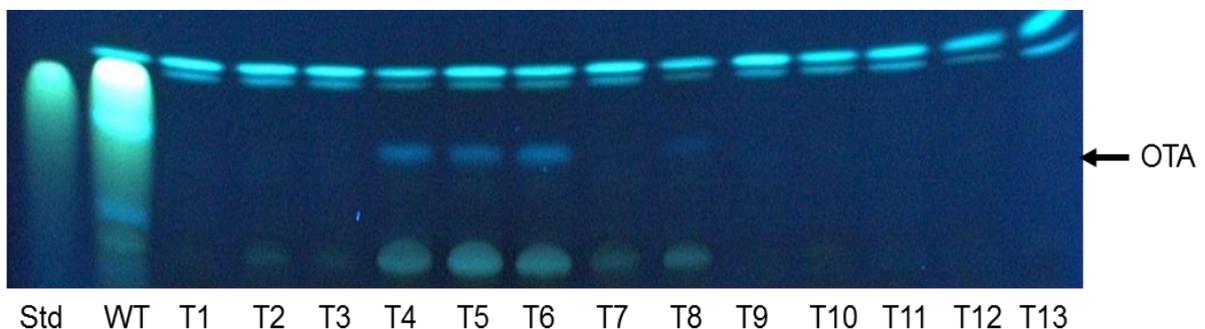


Abb. 67: Überprüfung der Toxinbildung bei den VeA-Transformanten von *P. verrucosum*. Std: Citrinin Standard. OTA: Ochratoxin A. WT: *P. verrucosum* Wildtyp. T: VeA-Transformanten.

Wie auf dem DC-Foto (Abb. 67) zu entnehmen ist, hat der Wildtyp viel Citrinin und Ochratoxin A gebildet. Nach dem Ergebnis lassen sich die Transformanten in zwei Gruppen einteilen. Eine Gruppe, die weder Citrinin noch Ochratoxin A gebildet hat. Dies sind die Transformanten T1, T2, T3, T7, T9, T10, T11, T12 und T13. Die andere Gruppe beinhaltet die Transformanten, die kein Citrinin, aber unterschiedliche Mengen an Ochratoxin A gebildet haben. Diese sind die Transformanten T4, T5, T6 und T8. Die Variabilität im Phänotyp war ein Anzeichen für eine Genomveränderung bei diesen Transformanten. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Untersuchungen die Transformanten T2, T3 und T7 ausgewählt.



Abb. 68: Einfluss der VeA-Inaktivierung auf das Wachstum von *P. verrucosum*. WT: *P. verrucosum* BFE 808 Wildtyp. T: VeA-Transformanten.

Die Transformanten T2, T3, und T7 wurden ausgewählt, um die Inaktivierung des VeA-Gens mittels Southern Blot zu überprüfen. Die Transformanten und der Wildtyp wurden wie üblich in MG-Flüssigmedium für 6 Tage bei 25 °C inkubiert. Danach wurde die DNA daraus isoliert und eine Hybridisierung durchgeführt. Für den Southern Blot wurde jeweils die gleiche DNA Menge eingesetzt. Nach dem *EcoRI*-Verdau wurden die Verdauprodukte DNAs mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Verdau hat bei allen Proben vollständig und gut funktioniert.

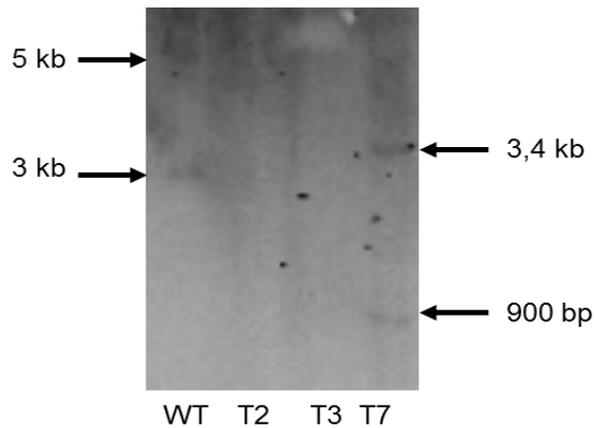


Abb. 69: Überprüfung der VeA-Transformanten von *P. verrucosum* BFE808 mittels Southern Blot. WT: *P. verrucosum* Wildtyp. T: VeA-Transformanten.

Das Ergebnis der Hybridisierung zeigt, dass beim Wildtyp zwei Banden zu sehen sind. Dies liegt daran, dass in der VeA-Sequenz eine *EcoRI*-Schnittstelle vorhanden ist. Bei den Transformanten T2 und T3 sind keine Banden zu erkennen. Das spricht für eine Deletion der beiden Fragmente. Bei der Transformante T7 sind zwei Banden erkennbar. Eine ist bei 3,4 kb und die andere ist bei 900 bp. Beide Banden zeigen andere Größen als die des Wildtyps. Dies deutet auf eine Veränderung in den zwei VeA-Fragmenten bei dieser Transformante hin.

Rolle von VeA in der Citrininbildung bei *P. expansum*

Bei *P. expansum* wurde auch das VeA-Gen inaktiviert. Die Inaktivierung wurde genauso, wie oben bei *P. verrucosum* beschrieben, durchgeführt. Nach der Transformation wurden 12 putative Transformanten auf die Citrininbildung hin überprüft.

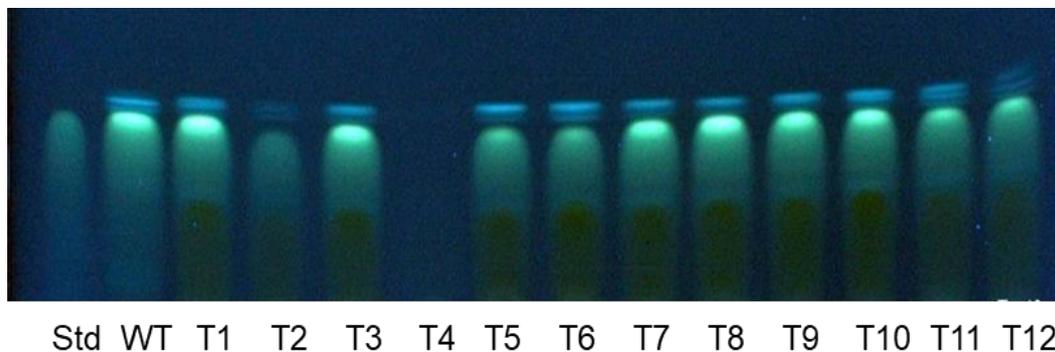


Abb. 70: Einfluss der VeA-Inaktivierung auf die Citrininbildung bei *P. expansum* BFE189. Std: Citrinin Standard. WT: Wildtyp. T: VeA-Transformanten.

Wie es deutlich zu sehen ist, konnte die Transformante T4 kein Citrinin bilden (Abb. 70). Diese Transformante hatte, wie auch die Transformanten von *P. verrucosum*, einen anderen Phänotyp als die anderen Transformanten und der Wildtyp (Abb. 71).

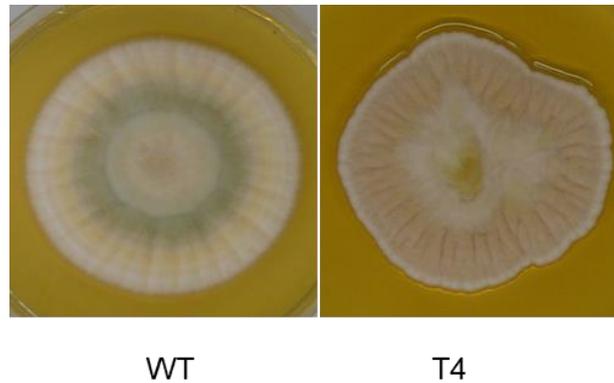


Abb. 71: Einfluss der VeA-Inaktivierung auf Wachstum von *P. expansum* BFE189. Der Wildtyp und die VeA-Transformante wurden auf YES-Medium angeimpft und nach 7 Tagen Inkubation bei 25 °C, wurde das Wachstum dokumentiert.

Die Transformante wurde weiterhin mit einer PCR analysiert. Die PCR wurde mit dem Primerpaar VeA_for und VeA_rev durchgeführt. Bei der PCR konnte bei der Transformante kein PCR-Produkt erzielt werden, während beim Wildtyp ein PCR-Produkt erzielt werden konnte. Da das Ergebnis bei den Transformanten negativ war, wurde die PCR mehrmals wiederholt. Trotz mehrmaliger Wiederholungen der PCR konnte bei der Transformante kein PCR-Produkt erzielt werden. Daher wurde vermutet, dass das VeA-Gen bei der Transformante deletiert wurde. Die Transformante wurde durch Southern Blot weiter überprüft.

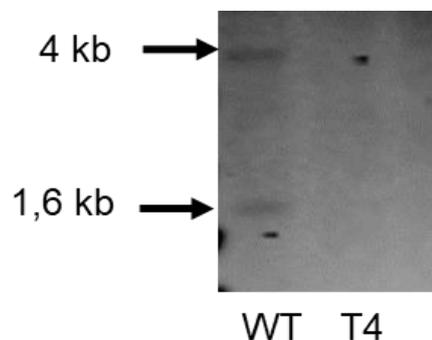


Abb. 72: Überprüfung der VeA-Transformante von *P. expansum* mittels Southern Blot. WT: *P. expansum* BFE189 Wildtyp. T: VeA-Transformante 4.

Das Ergebnis des Southern Blots (Abb. 72) zeigt, dass beim Wildtyp zwei Banden zu erkennen sind. Das war auch der Fall bei *P. verrucosum*. Der Grund dafür ist, dass auch in der Zielsequenz des *VeA*-Gens bei *P. expansum* eine *EcoRI*-Schnittstelle zu finden ist. Bei der Transformante T4 fehlen die beiden Banden. Da auch bei der PCR kein Produkt erzielt werden konnte, spricht das Ergebnis für eine Deletion des *VeA*-Gens bei der Transformante.

Rolle von *VeA* in der Citrininbildung bei *P. citrinum*

Zur Inaktivierung von *VeA* in *P. citrinum* wurde zuerst ein Inaktivierungskonstrukt hergestellt. Das Inaktivierungskonstrukt ist der Vektor pGEM-T Easy, der ein Fragment von 700 bp des zu inaktivierenden *VeA*-Gens enthält. Für die Herstellung des Inaktivierungsplasmids wurde ein *VeA*-Fragment mit dem Primerpaar P.S_VeA_for und P.S_VeA_rev amplifiziert und das PCR-Produkt mittels einer Gelelektrophorese überprüft. Die relevante Bande bei 700 bp wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Danach wurde das PCR-Produkt in den Vektor pGEM-T Easy ligiert und im Bakterium *E. coli* DH5 α vermehrt. Nach der Plasmidisolierung aus dem Bakterium wurde es mittels *EcoRI*-Verdau überprüft und die Protoplasten von *P. citrinum* mit diesem Vektor transformiert. Um zu sehen, ob die Inaktivierung von *VeA* bei *P. citrinum* einen Effekt auf die Citrininbildung hat, wurde die Citrininbildung bei den Transformanten mittels DC analysiert.

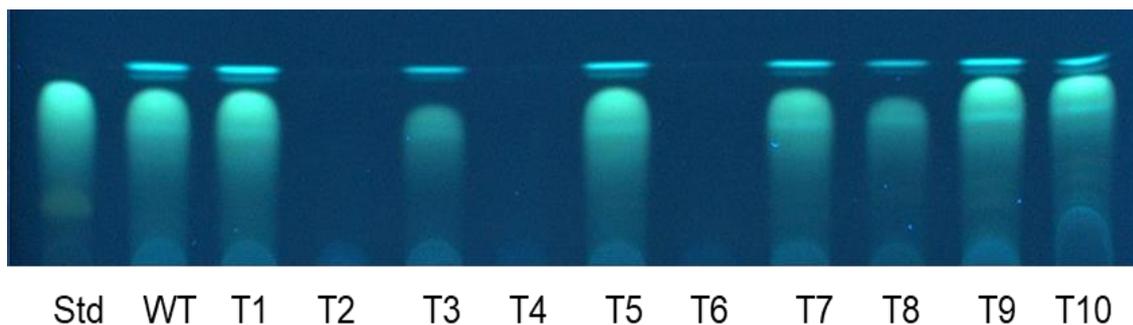


Abb. 73: Einfluss der Inaktivierung von *VeA* auf die Citrininbildung bei *P. citrinum*. Std: Citrinin Standard. WT: *P. citrinum* Wildtyp. T: *VeA*-Transformanten.

Wie auf dem DC-Bild (Abb. 73) deutlich zu sehen ist, waren die Transformanten T2, T4, und T6 nicht in der Lage Citrinin zu bilden. Nicht nur die Citrininbildung wurde bei diesen Transformanten gehemmt, es sind auch keine anderen Sekundärmetaboliten bei diesen Transformanten zu sehen. Beim Wildtyp und bei den anderen

Transformanten, sind zusätzlich zum Citrinin zwei blaue Banden darüber zu erkennen. Diese sind bei den Transformanten T2, T4 und T6 abwesend.

Die putativen VeA-Mutanten zeigten ein reduziertes Wachstum und konnten nicht normal sporulieren. Ein Beispiel dafür ist in der Abbildung 74 gezeigt.



Abb. 74: Einfluss der VeA-Inaktivierung auf das Wachstum bei *P. citrinum*. WT: Wildtyp. T: VeA-Transformante.

Da diese Transformante T4 einen anderen Phänotyp als der Wildtyp aufwies und kein Citrinin gebildet hatte, ist anzunehmen, dass eine Veränderung in ihrem Genom stattgefunden hat. Das reduzierte Wachstum, die veränderte Morphologie und die Abwesenheit der gesamten Sekundärmetaboliten bei der Transformante deuten auf einen pleiotropen Effekt der VeA-Mutante hin. Zum Überprüfen der erfolgreichen Transformation wurde ein Southern Blot mit der Transformante 4 durchgeführt (Abb. 75).

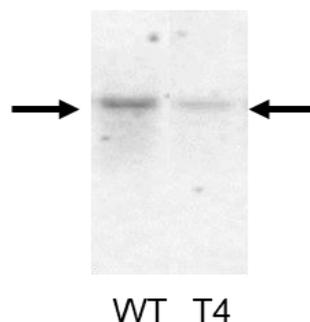


Abb. 75: Überprüfung der VeA-Transformante von *P. citrinum* mittels Southern Blot.

Wie das Ergebnis der Hybridisierung deutlich zeigt, trat bei der Transformante eine Bande auf. Die Bande der Transformante liegt in derselben Höhe wie die des Wildtyps. Jedoch ist die Bande bei der Transformante viel schwächer im Gegensatz

zur Bande des Wildtyps, obwohl die gleiche Menge an DNA für den Southern Blot verwendet wurde. Dies deutet auf die Entstehung eines Heterokaryon hin.

Wie die vorherigen Ergebnisse gezeigt haben, kam es bei den durchgeführten Transformationsexperimenten häufiger zu Deletionen des Zielgens. Für die Transformationsexperimente wurden Protoplasten aus vegetativen, also mehrkernigen Zellen, durchgeführt. Falls es bei der Transformation von *P. citrinum* zu einer solchen Deletion in einem oder mehreren der gesamten Kerne des Protoplasten gekommen ist, führt dies zu einer Reduktion der Kopienanzahl des Zielgens in der Transformanten-DNA und damit zu einem schwächeren Hybridisierungssignal.

Im Gegensatz zu den obigen Regulatoren HOG und PACC, hat die Inaktivierung von VeA bei den drei *Penicillium* Spezies zum selben Effekt geführt. Bei allen Spezies kam es bei den VeA-Mutanten zur kompletten Inhibierung der Citrininbildung und zur Änderung des Phänotyps. Dies deutet auf einen pleiotropen Effekt der Inaktivierung des VeA-Gens hin.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass VeA für alle drei Spezies eine wichtige Rolle als positiver Regulator der Citrininbildung spielt.

3.16 Biologische Bedeutung der Citrininbildung

Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* auf verschiedenen Apfelsorten

Penicillium expansum ist ein wichtiger pathogener Pilz, der Pilzkrankungen an verschiedenen Früchten verursacht. Eine Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* auf PDA-Medium zeigte, dass diese Toxine unterschiedlich reguliert sind. Um zu untersuchen, wie die Citrinin- und Patulinbildung auf natürlichen Habitaten aussehen, wurde die Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* auf verschiedenen Apfelsorten analysiert. Zu diesem Zweck wurde der Stamm BFE1393 ausgewählt. Dieser Stamm wurde aus einem kontaminierten Apfel isoliert und mittels RAPD und der Sequenzierung der ITS-Regionen charakterisiert. Die Überprüfung der Citrinin- und Patulinbildung bei diesem Stamm zeigte, dass er auf PDA-Medium hohe Mengen an Citrinin und Patulin bilden kann. Um einen weiteren Überblick über die Regulation der Citrinin- und Patulinbildung zu bekommen, wurde dieser Stamm

auf unterschiedlichen Apfelsorten angeimpft und die Citrinin- und Patulinbildung wurden mittels HPLC gemessen.

Wachstum von *P. expansum* auf verschiedenen Apfelsorten

Um das Wachstum von *P. expansum* auf Äpfeln zu bestimmen, wurde die kolonisierte Fläche nach einer bestimmten Inkubationszeit gemessen. Es wurden drei biologische Replikate durchgeführt. Beispielhaft wurde das Wachstum auf den drei Apfelsorten Granny Smith, Golden Delicious und Jonagold gezeigt.

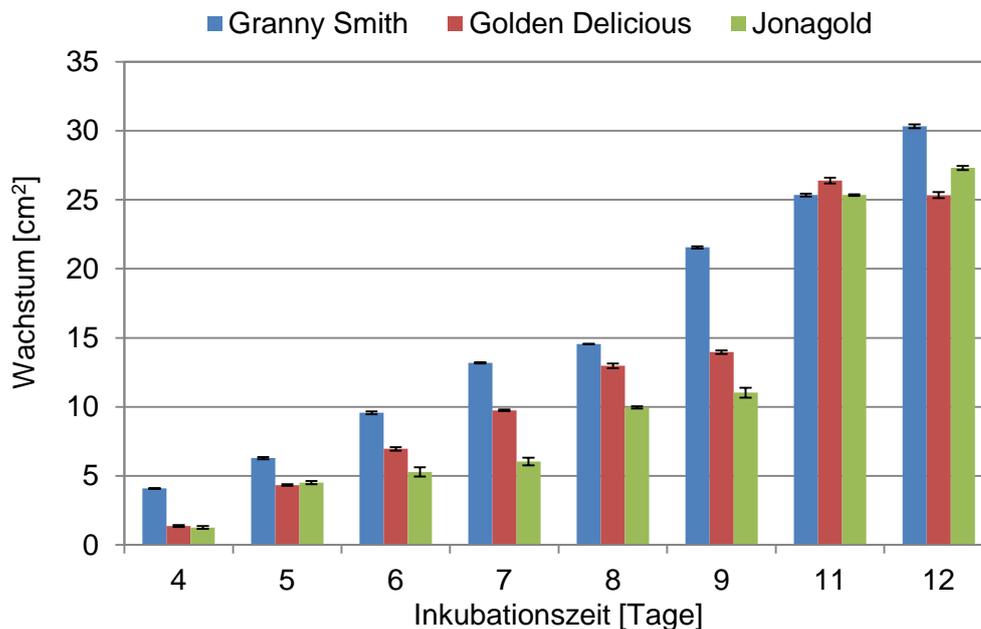


Abb. 76: Wachstum von *P. expansum* BFE1393 auf verschiedenen Apfelsorten. Die Äpfel wurden zuerst mit Ethanol 70 % besprüht und danach gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Zum Animpfen des Pilzes wurden die Äpfel mit einem sterilen Skalpell leicht angeritzt (ca. 5 mm in das Apfelgewebe) und mit 5 µl einer Sporensuspension (10^4 Sporen/ml) angeimpft. Nach dem Animpfen von *P. expansum* BFE1393, wurden die beimpften Äpfel bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. An aufeinanderfolgenden Tagen wurde das Wachstum gemessen.

In der Grafik (Abb. 76) ist deutlich zu erkennen, dass dieser Stamm nicht auf allen Apfelsorten das gleiche Wachstum zeigt. Auf der Apfelsorte Granny Smith zeigt er das stärkste Wachstum. Auf den anderen Apfelsorten ist das Wachstum etwas geringer.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Wachstum von *P. expansum* auf Äpfeln von den Apfelsorten abhängt.

Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* auf der Sorte Granny Smith

Die Untersuchung der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* BFE1393 auf der Apfelsorte Granny Smith zeigt, dass dieser Stamm größere Mengen an Patulin in der frühen Wachstumsphase produziert. Das Maximum der Patulinbildung ist nach 4 Tagen zu erkennen. Danach verringert sich die Patulinmenge mit zunehmender Inkubationszeit. An Tag 12 ist jedoch nochmal ein leichter Anstieg zu erkennen. Im Gegensatz zur Patulinbildung, wird bis Tag 11 kein Citrinin nachgewiesen. Erst an Tag 12 ist Citrinin messbar.

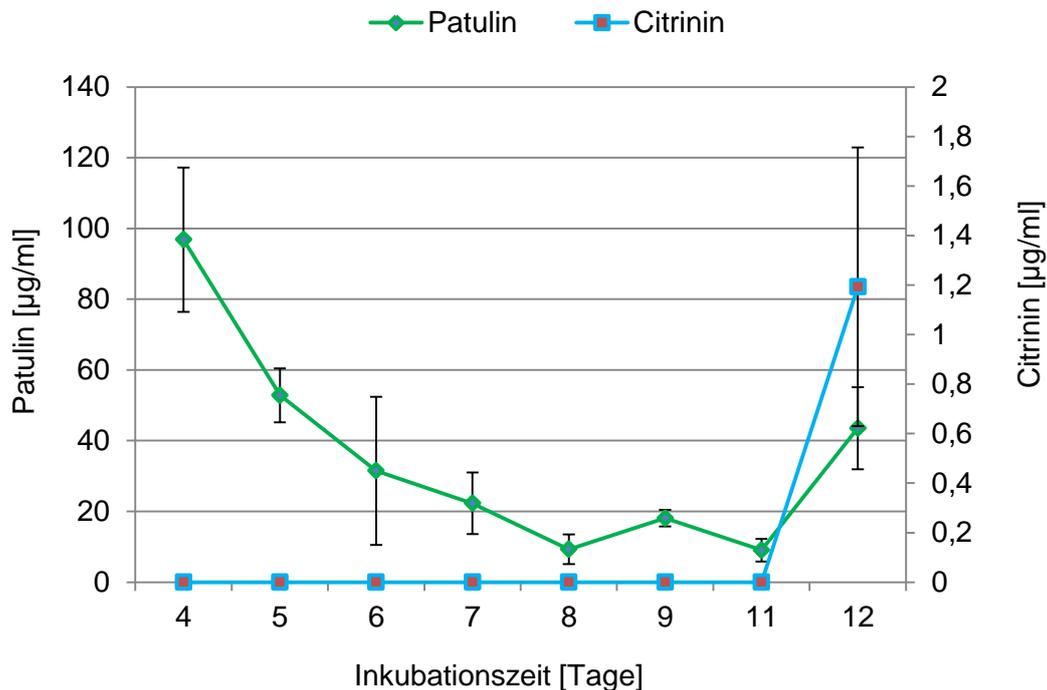


Abb. 77: Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* BFE1393 auf der Apfelsorte Granny Smith. Zum Animpfen von *P. expansum* wurde die Sporenanzahl mit der Thoma-Zählkammer unter dem Mikroskop auf 10^4 Sporen/ml eingestellt. Während des Wachstums wurden an verschiedenen Tagen Proben entnommen. Jeweils 1 g der kontaminierten Apfelflächen wurde in 2 ml Eppendorfgefäße eingewogen und mit 1 ml Chloroform extrahiert. Die Toxinkonzentrationen wurden mittels HPLC gemessen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

Diese stark unterschiedliche Bildungskinetiken deuteten auf eine unterschiedliche Expression der beiden Polyketidsynthasegene hin, was im Folgenden untersucht wurde. Eine Untersuchung der Kinetik der *pksCT*- und *patK*-Expression, der Polyketidsynthasen für die Citrinin- und Patulinbildung, zeigt deutlich, dass sowohl *pksCT* als auch *patK* über den gesamten Beobachtungszeitraum exprimiert werden.

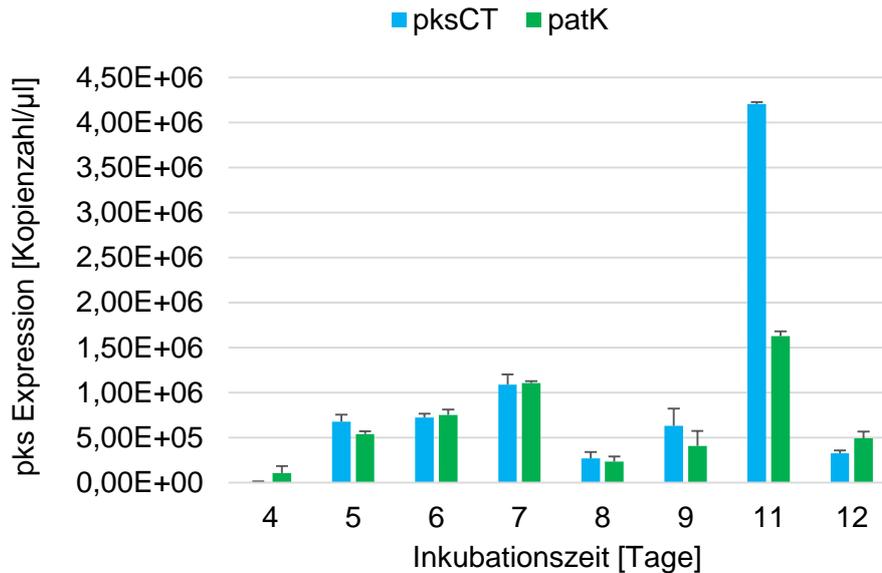


Abb. 78: Kinetik der *pksCT*- und *patK*-Expression von *P. expansum* BFE1393 nach Kolonisierung von Äpfeln (Granny Smith). Von den kontaminierten Apfelstellen wurden Proben entnommen und in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Pistills und eines Mörsers gemörsert und die RNA isoliert. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die *pksCT*- und *patK*-Expression wurde mit der RT-PCR analysiert. Die Normalisierung der Expression erfolgte über die Expression des Haushaltsgens β -Aktin.

Da *pksCT* auch während der ersten Tage der Wachstumsphase hoch exprimiert wird, steht die Vermutung nahe, dass Citrinin auch früh während der Wachstumsphase gebildet wird. Es könnte sein, dass Citrinin zwar gebildet wird, dieses jedoch wieder abgebaut bzw. an Matrixbestandteile gebunden wird.

Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* auf der Sorte Golden Delicious

Auf der Apfelsorte Golden Delicious zeigt sich die Tendenz der Citrinin- und Patulinbildung fast genauso wie bei Granny Smith. Auch auf dieser Sorte wird zuerst Patulin in großen Mengen synthetisiert, welches sich allmählich nach längeren Inkubationszeiten verringert. Citrinin ist nur an Tag 11 detektierbar (Abb. 79).

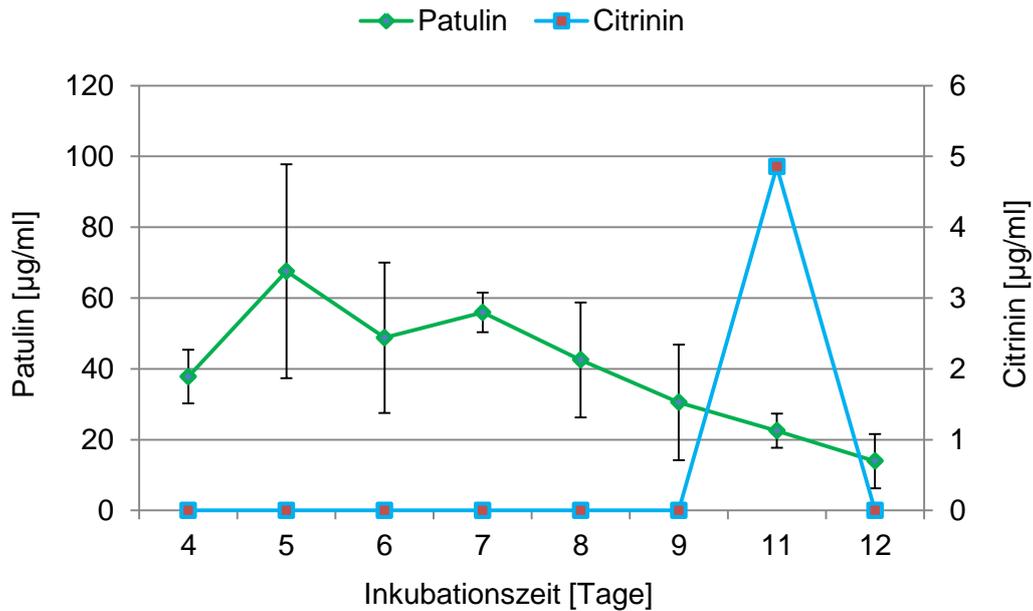


Abb. 79: Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* auf Golden Delicious. An verschiedenen Tagen wurden Proben aus der Mitte der kolonisierten Flächen der Äpfel entnommen (1 g), mit 1 ml Chloroform extrahiert und mittels HPLC gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

Die Untersuchung der Expression von *pksCT* und *patK* in einer Kinetik zeigt, dass beide Polyketidsynthasen während der ganzen Kinetik exprimiert werden. Allerdings ist die Expression in den ersten Tagen der Kinetik etwas höher.

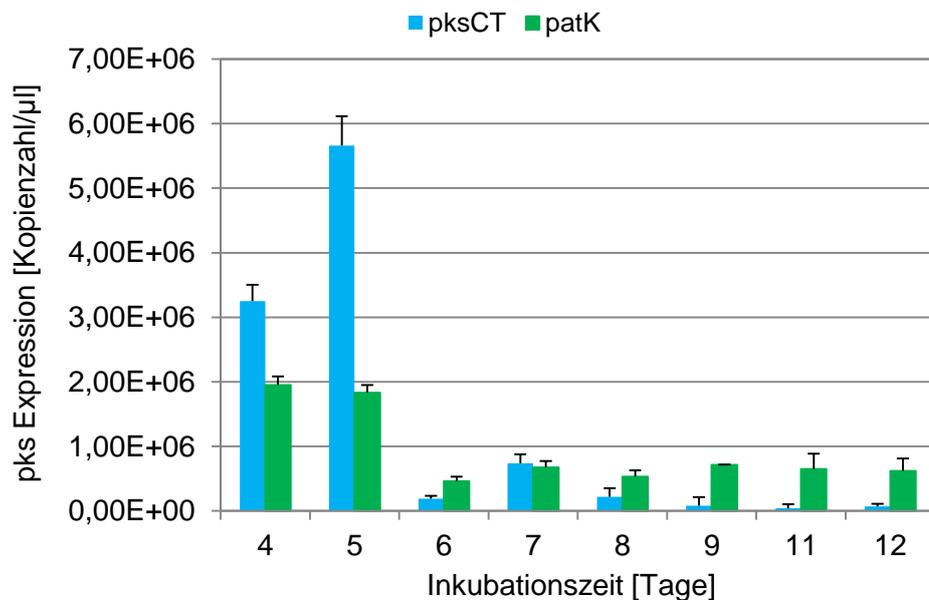


Abb. 80: Kinetik der *pksCT*- und *patK*-Expression nach Wachstum von *P. expansum* BFE1393 auf der Apfelsorte Golden Delicious. Die Expression wurde mit der RT-PCR gemessen und auf das Haushaltsgen β -Aktin normalisiert.

Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* auf der Sorte Jonagold

Der Grafik der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* auf der Apfelsorte Jonagold ist zu entnehmen, dass Patulin in den ersten Tagen in großen Mengen produziert wird. Es ist hier auch zu erkennen, dass die Patulinbildung ein Optimum erreicht und dann wieder abnimmt. Im Vergleich zur Patulinbildung auf den anderen Sorten, erhöht sich die Patulinkonzentration langsam bis Tag 7. Nach einer Inkubation von 8 Tagen und darüber ist die Patulinkonzentration deutlich zurückgegangen. Citrinin wird ab Tag 6 in geringen Mengen nachgewiesen, erreicht ein Maximum am Tag 9 und sinkt danach wieder ab.

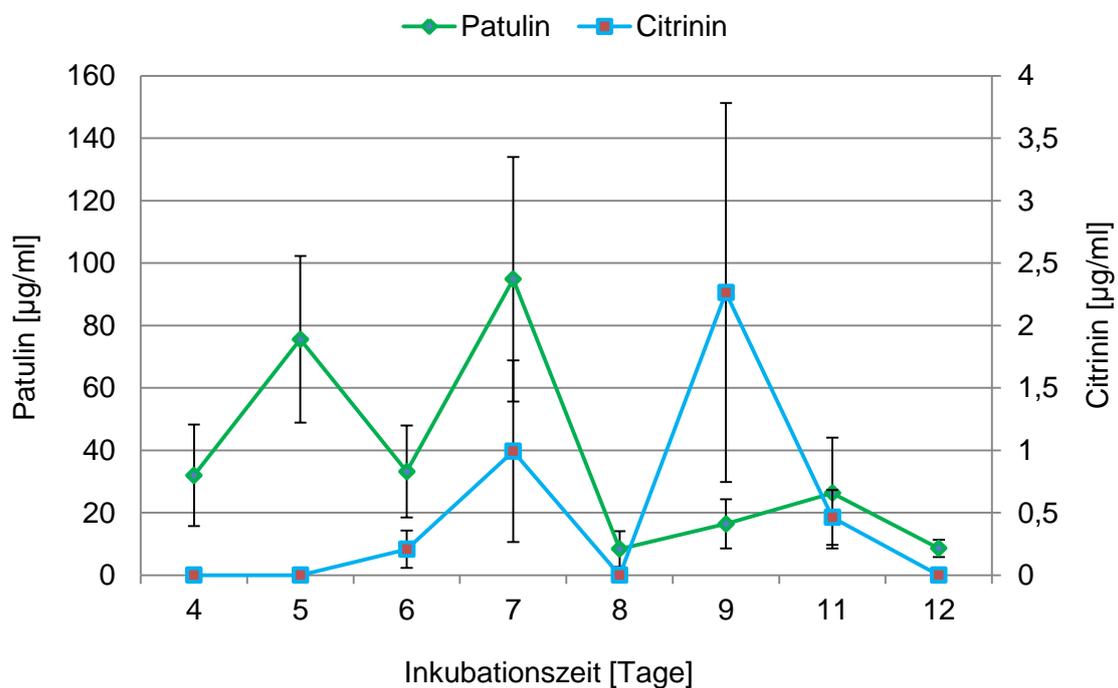


Abb. 81: Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* BFE1393 auf Jonagold. Die Toxine wurden aus der Mitte der kolonisierten Apfelflächen mit Chloroform extrahiert und mit der HPLC gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

Im Gegensatz zu den vorherigen Apfelsorten ist Citrinin auf dieser Sorte schon ab Tag 6 detektierbar. Wie bei den anderen Sorten ist die Citrininkonzentration viel geringer als die Patulinkonzentration. Um einen Überblick über die Expression der Polyketidsynthasen für die Citrinin- und Patulinbildung zu verschaffen, wurde die Expression von *pksCT* und *patK* auf dieser Apfelsorte auch analysiert. Wie in der Grafik (Abb. 82) zu erkennen ist, werden beide Gene gleichzeitig exprimiert.

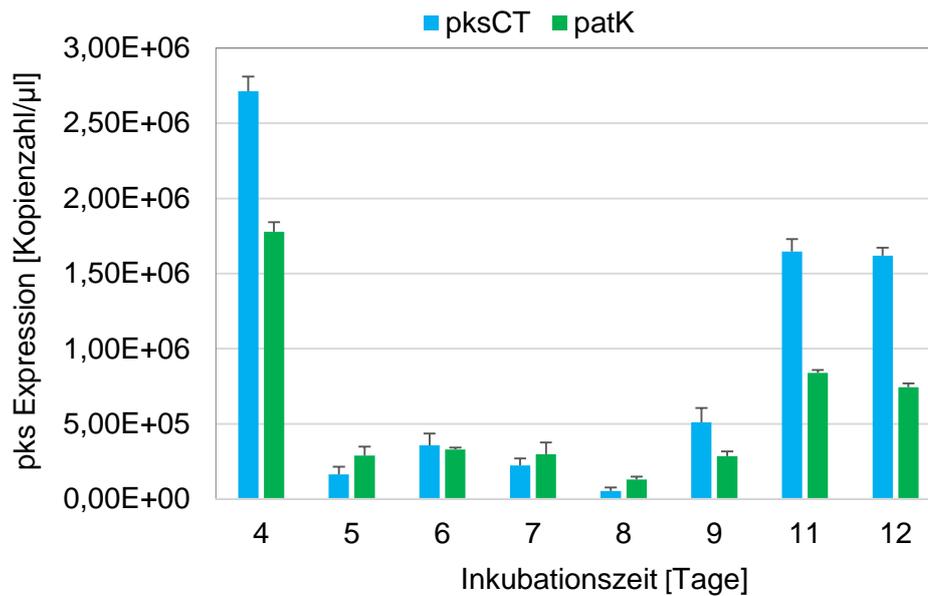


Abb. 82: Kinetik der *pksCT*- und *patK*-Expression bei *P. expansum* BFE1393 auf Jonagold. Zur Analyse der *pks* Expression wurde die RNA aus der Mitte der kolonisierten Apfelflächen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die *pks* Expression wurde mit der RT PCR gemessen.

Die Grafik der Expression lässt sich in drei Zeitspannen einteilen. An Tag 4 ist die Expression beider Gene sehr hoch. Von Tag 5 bis Tag 9 ist die Expression der beiden Gene niedriger geworden als an Tag 4, aber beide Gene sind ungefähr gleich exprimiert. In der dritten Zeitspanne (Tag 11 und Tag 12) hat die Expression beider Gene wieder zugenommen.

Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* auf der Sorte Royal Gala

Wie auf den anderen Sorten der Fall war, wird Patulin auch auf dieser Sorte früh und in großen Mengen gebildet. Zudem oszilliert die Patulinbildung mit der Zeit genauso wie auf den anderen Apfelsorten. Allerdings ist Oszillierung der Patulinkonzentration auf dieser Apfelsorte sehr ausgeprägt und stärker als auf den vorherigen Sorten. Nachdem auf manchen Tagen bestimmte Mengen gebildet werden (Tag 4, Tag 7 und Tag 11) nimmt die Bildung an den darauffolgenden Tagen ganz ab, wobei die Bildung an den Tagen 5, 10 und 12 sich stark reduziert hat. Es ist auch zu bemerken, dass nach der Reduzierung der Bildung wieder ein stärkeres Maximum erreicht wird. An Tag 7 wurde mehr als an Tag 4 gebildet und an Tag 11 ist die Bildung am stärksten.

In Bezug auf die Citrininbildung konnte an den Tagen 4 bis 10 kein Citrinin gemessen werden. Erst an den Tagen 11 und 12 konnten kleine Citrinin Mengen detektiert werden. Auf der folgenden Abbildung 83 ist die Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung dargestellt.

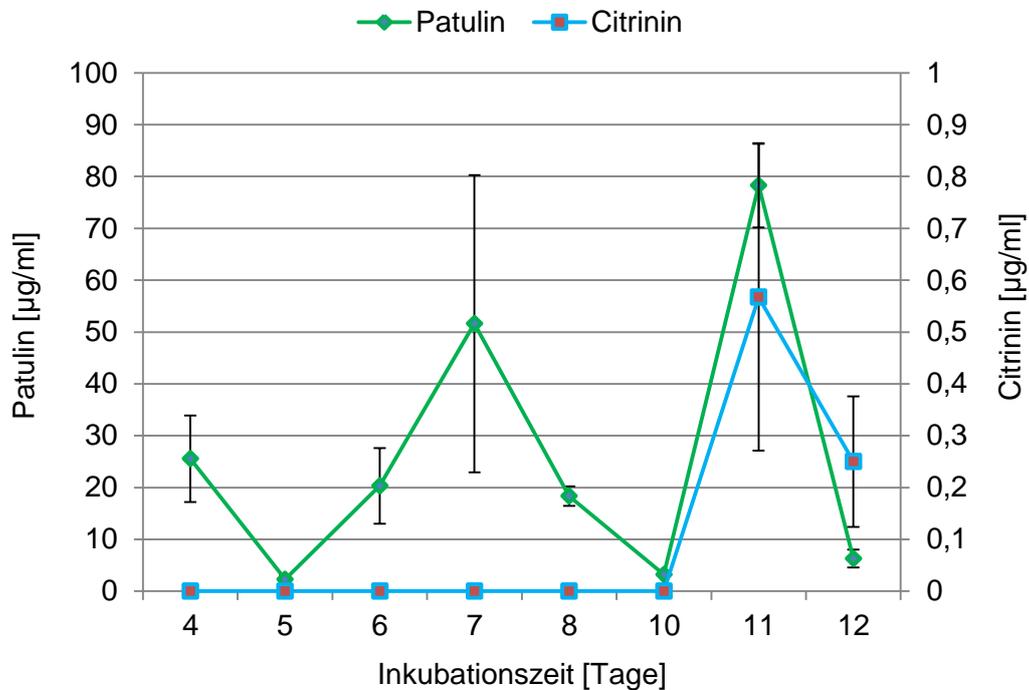


Abb. 83: Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* BFE1393 auf Royal Gala. Die Äpfel wurden, wie oben bei den anderen Apfelsorten beschrieben, angeimpft. Es wurden 5 μl von einer Sporensuspension von 10^4 Sporen/ml angeimpft und bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. An verschiedenen Tagen wurden Proben entnommen und die Toxinkonzentration wurde mit der HPLC gemessen.

Neben der Messung der Toxinbildung wurde die Expression der Polyketidsynthasegene für die Citrinin- und Patulinbildung (*pksCT* und *patK*) untersucht. Für die Genexpressionsanalyse wurden an verschiedenen Tagen Proben von den kolonisierten Apfelflächen entnommen und daraus die RNA isoliert. Die RNA wurde wie üblich mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die folgende Abbildung 84 zeigt die *pksCT*- und *patK*-Expression bei *P. expansum* BFE1393 auf der Sorte Royal Gala.

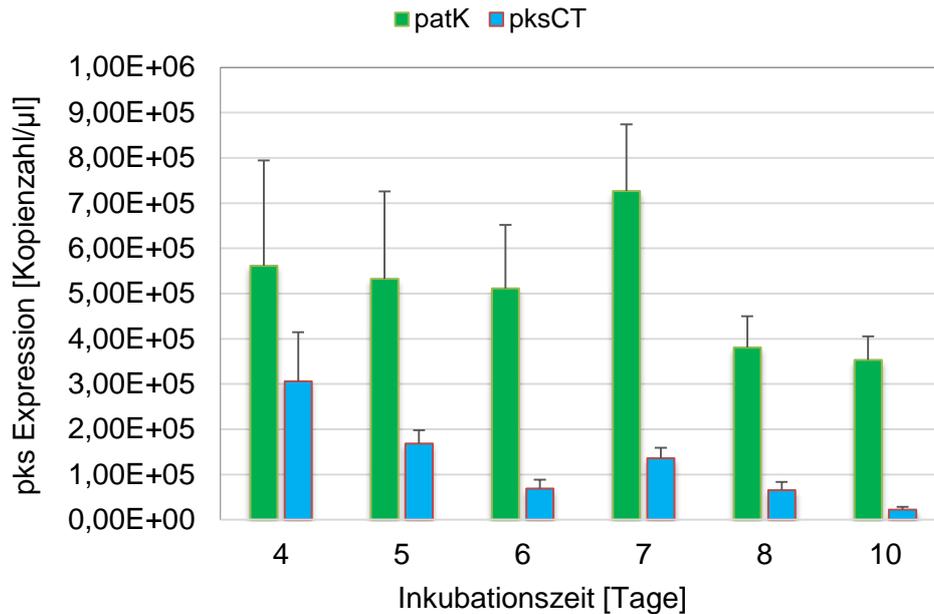


Abb. 84: Kinetik der *pksCT*-und *patK*-Expression bei *P. expansum* BFE1393 auf Royal Gala. Die *pks* Expression wurde mit der RT PCR gemessen.

Die Untersuchung der Citrinin- und Patulinbildung bei *P. expansum* auf verschiedenen Apfelsorten zeigte, dass sowohl Citrinin als auch Patulin auf Äpfeln gebildet werden. Obwohl das *pksCT*-Gen über die gesamte Zeitkinetik exprimiert wird, kann die Citrininbildung erst bei späteren Inkubationszeiten und nur in kleinen Mengen detektiert werden. Im Gegensatz zur Citrininbildung konnten große Mengen an Patulin gemessen werden. Die gebildeten Patulinmengen bleiben nicht gleich, sondern sie ändern sich im Laufe der Zeit. Außerdem ändert sich die Tendenz der Patulinbildung stark mit den unterschiedlichen Apfelsorten. Da die verschiedenen Apfelsorten mit demselben *P. expansum* Stamm und mit der gleichen Sporenmenge angeimpft wurden, deutet dies darauf hin, dass die Regulation der Patulinbildung auf den unterschiedlichen Apfelsorten unterschiedlich ist.

Citrinin konnte erst spät in der Wachstumsphase und nur in geringen Mengen gemessen werden. Das könnte auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein. Einer dieser Gründe ist eventuell die Bindung an die Apfelmatrix.

Bindung von Citrinin an die Apfelmatrix

Um eine mögliche Bindung von Citrinin an Apfelbestandteile zu überprüfen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Im ersten Versuch wurden Äpfel der Sorte Granny Smith leicht angeritzt und mit reinem Citrinin inkubiert. Um zu untersuchen,

ob das aufgebrachte Citrinin wieder von der Apfelmatrix extrahiert werden kann, wurden Proben nach unterschiedlichen Zeiten von den Applikationsstellen mittels Skalpell entnommen und anschließend wurden die Proben mit Chloroform extrahiert und eine DC durchgeführt.

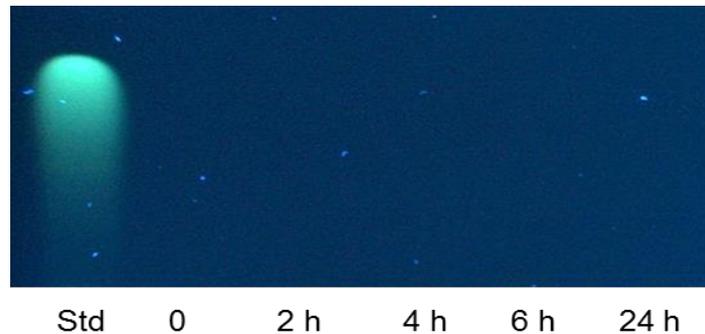


Abb. 85: Überprüfung der Citrininbindung an Apfelbestandteile. Um zu überprüfen, ob Citrinin an die Apfelmatrix gebunden wird, wurden drei Äpfel der Sorte Granny Smith mit einem sterilen Skalpell leicht angeritzt und 5 µl einer Citrininlösung (0,1 µg/µl) aufgebracht. Die Äpfel wurden im Dunkeln bei 25 °C inkubiert. Nach 2 h, 4 h, 6 h und 24 h wurden mehrere Stücke (0,5 x 0,5 x 0,5 cm) aus den angeritzten Apfelstellen entnommen und mit Chloroform extrahiert. Std: Citrinin Standard (5 µl; 0,1 µg/µl). h: Stunde.

Wie das Ergebnis zeigt, konnte nach allen Inkubationszeiten kein Citrinin mehr extrahiert werden. Derselbe Versuch wurde mit den Apfelsorten Braeburn, Golden Delicious und Royal Gala wiederholt und dasselbe Ergebnis konnte erzielt werden. Dies deutet darauf hin, dass Citrinin stark an die Apfelmatrix gebunden wird.

Bindung von Citrinin an Pektin

Pektine gehören zu wichtigsten Bestandteilen der Apfelmatrix. Daher wurde vermutet, dass Citrinin u. a. an Pektin gebunden werden kann. Um das zu überprüfen, wurde Citrinin mit reinem Pektin gemischt. Zu diesem Zweck wurde Pektin mit verschiedenen Konzentrationen in Wasser aufgelöst und mit reinem Citrinin gemischt. Als Kontrolle wurde Citrinin mit Wasser ohne Pektin vermischt. Um zu untersuchen, ob Citrinin von dem Pektin wiedergewonnen werden kann, wurden die Mischungen mit Chloroform extrahiert und eine DC durchgeführt (Abb. 86).

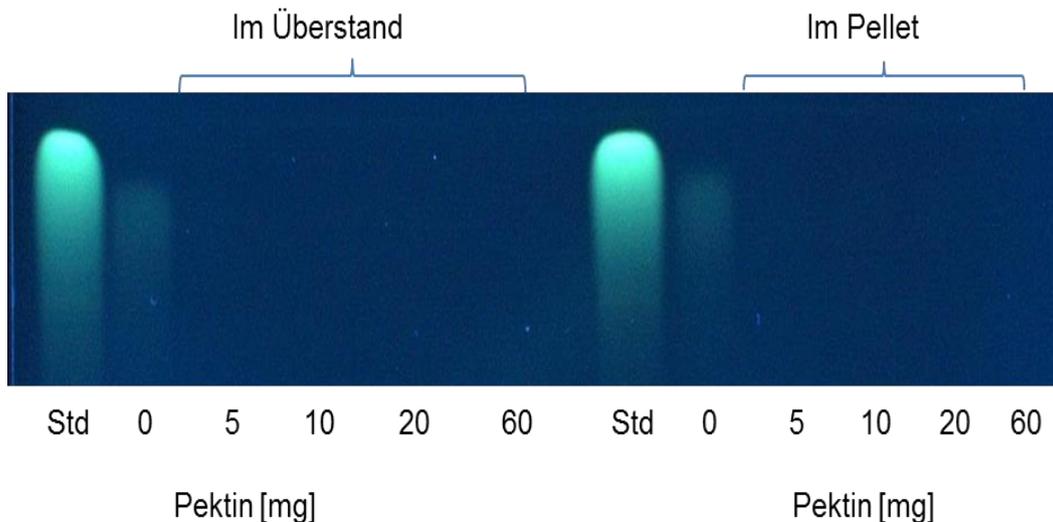


Abb. 86: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Bindung von Citrinin an Pektin. Zur Überprüfung der Bindung von Citrinin an Pektin wurden verschiedene Pektinmengen (5 mg, 10 mg, 20 mg und 60 mg) in 500 ml Wasser aufgelöst und mit Citrinin gemischt. Die Proben wurden 30 min stark geschüttelt und 15 min bei 13000 UPM zentrifugiert. Der Überstand und das Pellet wurden weiterhin separat für 30 min mit 500 μ l Chloroform extrahiert und das Chloroform in einer Vakuumzentrifuge eingedampft. Die Extrakte wurden in 60 μ l Methanol resuspendiert und jeweils 10 μ l davon für die DC verwendet. Std: 10 μ l von Citrinin Standard mit der Konzentration 0,1 μ g/ μ l. 0: Kontrolle (Mischung von Citrinin mit Wasser ohne Pektin).

Wie auf dem DC-Bild deutlich zu sehen ist, konnte Citrinin bei dem Kontrollexperiment wieder extrahiert werden (Spur 0). Bei der Mischung von Citrinin mit Pektin konnte kein Citrinin extrahiert werden. Auch bei der niedrigsten Pektinkonzentration von 5 mg war es nicht möglich Citrinin aus der Pektinsuspension wieder zu gewinnen. Dies deutet darauf hin, dass Citrinin an Pektin gebunden wird. Um eine eventuelle Bindung von Citrinin an die Pektinmatrix zu bestätigen, wurden verschiedene Mengen an Pektin, das Citrinin gebunden hatte in Wasser aufgelöst und mit einer Pektinase behandelt. Nach der Behandlung mit der Pektinase wurden 10 μ l von Citrinin mit der Konzentration 0,1 μ g/ μ l zu den Pektinproben pipettiert und für 15 min gut geschüttelt, damit sich Citrinin in den Eppendorfgefäßen gut verteilt. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 13000 UPM, wurden die Überstände von den Pellets getrennt, für 30 min in Chloroform extrahiert und anschließend wurde eine DC durchgeführt. Das Ergebnis ist auf der Abbildung 87 dargestellt.

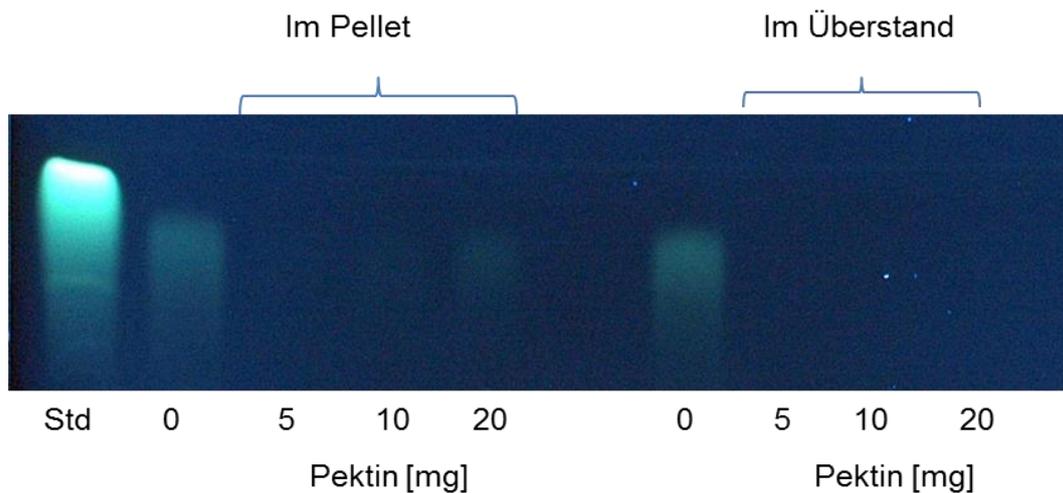


Abb. 87: Wiedergewinnung von Citrinin nach dem Pektinabbau. Die Pektinmengen 5 mg, 10 mg und 20 mg wurden in jeweils 500 ml Wasser aufgelöst und für 15 min auf einem Schüttler für eine gleichmäßige Verteilung des Pektins, geschüttelt. Danach wurden zu den Proben jeweils 20 mg Pektinase (Konzentration 40 mg/ml) gegeben und für eine Stunde bei 40 °C inkubiert. Std: Citrinin Standard (10 µl; 0,1 µg/µl).

Wie das Ergebnis zeigt, kann Citrinin nach der Behandlung des Pektins mit der Pektinase, wieder extrahiert werden. Das ist bei 10 mg und 20 mg im Pellet deutlich zu sehen. Vom Überstand konnte kein Citrinin wieder extrahiert werden.

Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass Citrinin an die Pektinmatrix gebunden wird. Diese starke Bindung von Citrinin an Pektin erklärt die Diskrepanz zwischen der frühen Expression des *pksCT*-Gens bei der Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum* und der späten Nachweisbarkeit von Citrinin während der Kolonisierungskinetik. Dies ist in direktem Gegensatz zum Patulin, das schon in einer sehr frühen Kolonisierungsphase nachgewiesen werden kann.

Citrininbildung bei *P. expansum* auf Apfelagar

Um die Citrininbindung an die Pektinmatrix weiter zu analysieren, wurde die Citrininbildung bei *P. expansum* auf einem Apfelmedium untersucht. Zur Herstellung des Mediums wurden Äpfel der Sorten Golden Delicious und Royal Gala mit einem Mixer zermahlen, in ddH₂O vermischt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium in Petrischalen gegossen und trocknen gelassen. Nach dem Animpfen von *P. expansum* wurden die Platten bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Zur Analyse der Citrininbildung wurden während des Wachstums an verschiedenen Tagen Proben entnommen (mit einem sterilen Korkbohrer jeweils 2 Agarblöckchen

aus der Mitte der Kolonien) und anschließend wurde die Citrininkonzentration mittels HPLC quantifiziert.

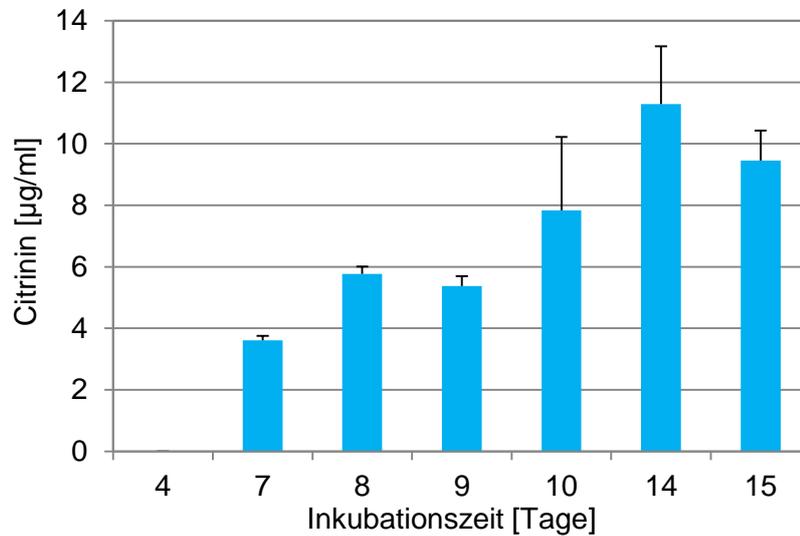


Abb. 88: Kinetik der Citrininbildung bei *P. expansum* BFE1393 auf Apfelmedium der Sorte Golden Delicious. 500 g Äpfel wurden mit einem Mixer zermahlen und mit 16 g Agar in einem Liter Wasser gemischt und 20 min bei 120 °C autoklaviert. Danach wurde *P. expansum* BFE1393 mit einer Sporensuspension von 10^4 Sporen/ml aufgebracht und bei 25 °C für eine Kinetik inkubiert.

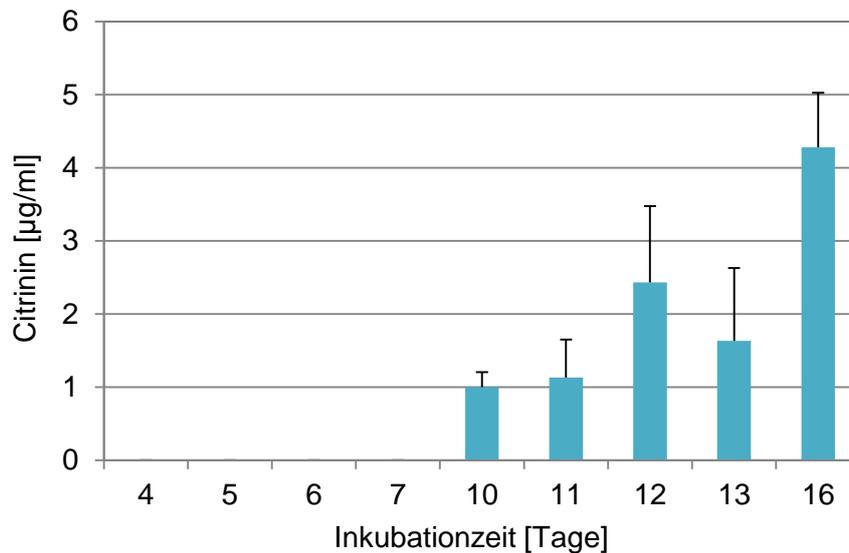


Abb. 89: Kinetik der Citrininbildung bei *P. expansum* BFE1393 auf Apfelmedium der Sorte Royal Gala. Äpfel der Sorte Royal Gala wurden mit ddH₂O gewaschen. 500 g Äpfel wurden mit einem Mixer zermahlt und mit 16 g Agar in einem Liter Wasser gemischt und autoklaviert. Anschließend wurde der Stamm BFE1393 aufgebracht (wie oben beschrieben) und bei 25 °C inkubiert.

Auf Apfelmedium beider Sorten konnte Citrinin gemessen werden. Auf Medium, das mit der Sorte Golden Delicious hergestellt wurde, war Citrinin schon nach 7 Tagen Inkubation messbar, während auf Medium, das mit der Sorte Royal Gala hergestellt wurde Citrinin erst nach 10 Tagen nachgewiesen werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass die Sorte Royal Gala höhere Mengen an Pektin enthält. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pektin die gebildete Citrininmengen so lange bindet bis Pektin gesättigt ist und kein Citrinin mehr binden kann. Die in den Abbildungen 88 und 89 dargestellten Citrininmengen, sind offensichtlich die Mengen an Citrinin, die nach der Sättigung des Pektins gebildet wurden. Interessanterweise wurden nach Wachstum von *P. expansum* auf Apfelmedium beider Apfelsorten wesentlich höhere Citrininmengen gemessen als nach Wachstum des Pilzes direkt auf der Apfelmatrix. Hier konnten wesentlich geringere Citrininmengen erst nach längeren Inkubationszeiten gemessen werden. Im Vergleich zur Situation auf Äpfeln, konnte Citrinin auf Apfelmedium auch einige Tage früher nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte wie oben gezeigt, *P. expansum* auf Labormedium über die gesamte Zeitkinetik von Tag 3 bis Tag 10 Citrinin bilden. Dies ist ein Hinweis, dass in der Apfelmatrix eventuell noch weitere Bedingungen, die analytische Nachweisbarkeit von Citrinin beeinflussen. Dies könnte z. B. durch eine Derivatisierung des gebildeten Citrinins geschehen. Eine Möglichkeit wäre eine Degradation des Citrinins durch die reaktiven Wasserstoffradikale (ROS), die von den Äpfeln gebildet werden.

Verstärkung der ROS-Konzentration in den Äpfeln nach der Infektion mit *P. expansum*

Es ist bereits vielfach bekannt, dass die Pflanzen nach erstem Kontakt mit pathogenen Pilzen ihren ROS-Status verstärken (Mittler, 2002). Dies dient dem Schutz der Pflanze gegen die Infektion durch den Pilz. Um zu untersuchen, ob dies während der Infektion von Äpfeln durch *P. expansum* ebenso der Fall ist, wurde *P. expansum* auf Äpfeln angeimpft und danach die ROS-Konzentration in den Äpfeln gemessen. Die Äpfel wurden zuerst mit dieser Pilzart angeimpft und nach 5 Tagen Wachstum bei 25 °C wurde die ROS-Konzentration der Äpfel gemessen. Als Kontrolle wurde die ROS-Konzentration bei intakten Äpfeln derselben Sorte gemessen. Die ROS-Messungen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt.

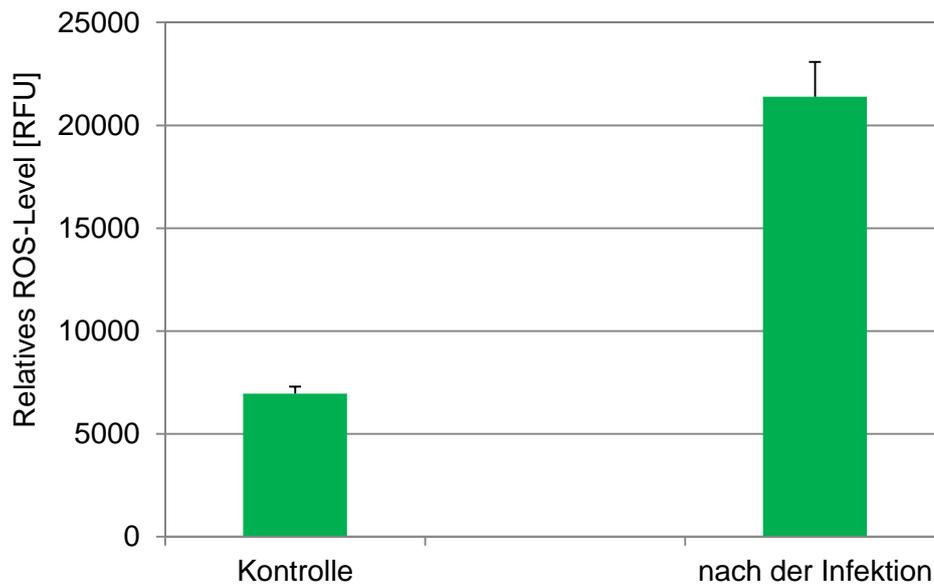


Abb. 90: ROS-Konzentration der Äpfel vor und nach der Infektion durch *P. expansum*. Die Äpfel wurden mit einem sterilen Skalpell leicht angeritzt und mit 5 µl einer Sporensuspension von *P. expansum* (10^4 Sporen/ml) beimpft. Nach 5 Tagen Inkubation bei 25 °C, wurden jeweils 50 mg Proben von den intakten und den infizierten Äpfeln entnommen und darin die ROS-Konzentration bestimmt.

Wie das Ergebnis zeigt, weisen die infizierten Äpfel eine deutlich höhere ROS-Konzentration auf, als die nicht infizierten Äpfel.

Aufgrund dieses Ergebnisses kann man festhalten, dass die Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum*, den ROS-Status der Äpfel, als Schutzmechanismus gegen den Pilzangriff, anhebt. Dies sollte zum einen zu einer Erhöhung der Citrininbiosynthese führen, wie in den vorherigen Experimenten gezeigt, zum anderen sollte die Erhöhung der ROS-Aktivität zu einer Derivatisierung des freien Citrinins führen, wenn Citrinin als Antioxidans wirkt, wie es in der Literatur beschrieben ist (Heider et al., 2006).

Inkubation von Citrinin mit Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid ist eine der bekannten reaktiven Sauerstoffspezies. Um zu überprüfen, ob Citrinin durch die erhöhte ROS-Konzentration abgebaut/derivatisiert wird, wurde Citrinin mit H₂O₂ gemischt. Anschließend wurde Citrinin wieder aus der Mischung extrahiert und der Abbau mittels DC überprüft.

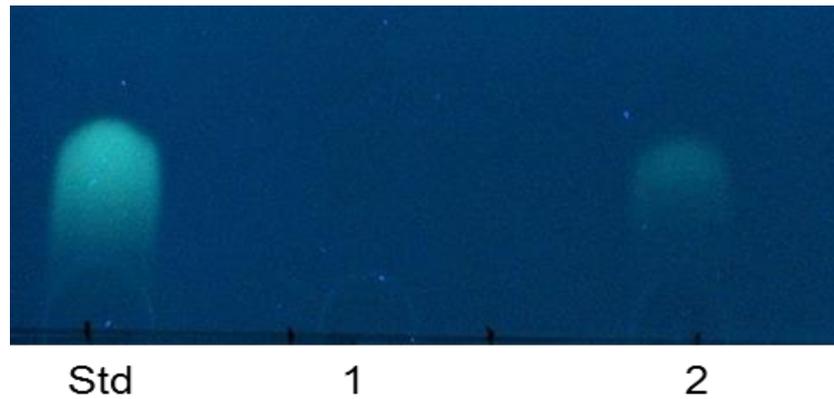


Abb. 91: Mischung von Citrinin mit H_2O_2 . Std: 20 μl Citrinin (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). 1: 20 μl Citrinin wurden mit 20 μl H_2O_2 (35 %) und 100 μl dd H_2O vermisch und für 1 min bei RT inkubiert. Danach wurde mit 500 μl Chloroform für 30 min extrahiert, die Chloroform-Phase in einer Vakuumzentrifuge eingedampft, die Extrakte in 20 μl Methanol resuspendiert und auf eine DC-Platte aufgetragen. 2: 20 μl Citrinin wurden mit 100 μl dd H_2O gemischt und für 1 min bei RT inkubiert. Nach der Extraktion wurde die Chloroform-Phase eingedampft, die Extrakte in 20 μl Methanol aufgelöst und auf eine DC-Platte aufpipettiert.

Wie auf dem DC-Bild deutlich zu erkennen ist, war nach H_2O_2 Behandlung kein Citrinin mehr nachweisbar (Abb. 91, Spur 1). Bei der unbehandelten Kontrolle (Abb. 91, Spur 2), war eine Extraktion von Citrinin, wie erwartet, möglich. Dies deutet darauf hin, dass Citrinin durch H_2O_2 degradiert wird. Die potentielle Derivatisierung/Degradation von Citrinin wurde weiter untersucht. Zum Nachweis der möglichen Degradationsprodukte von Citrinin, wurde die LC-DAD-MS (*liquid chromatography with fotodiode array detection-mass spectrometry*) eingesetzt. Die Messung der Citrinin-Derivate wurde von Dr. Sebastian T. Soukup, MRI, durchgeführt.

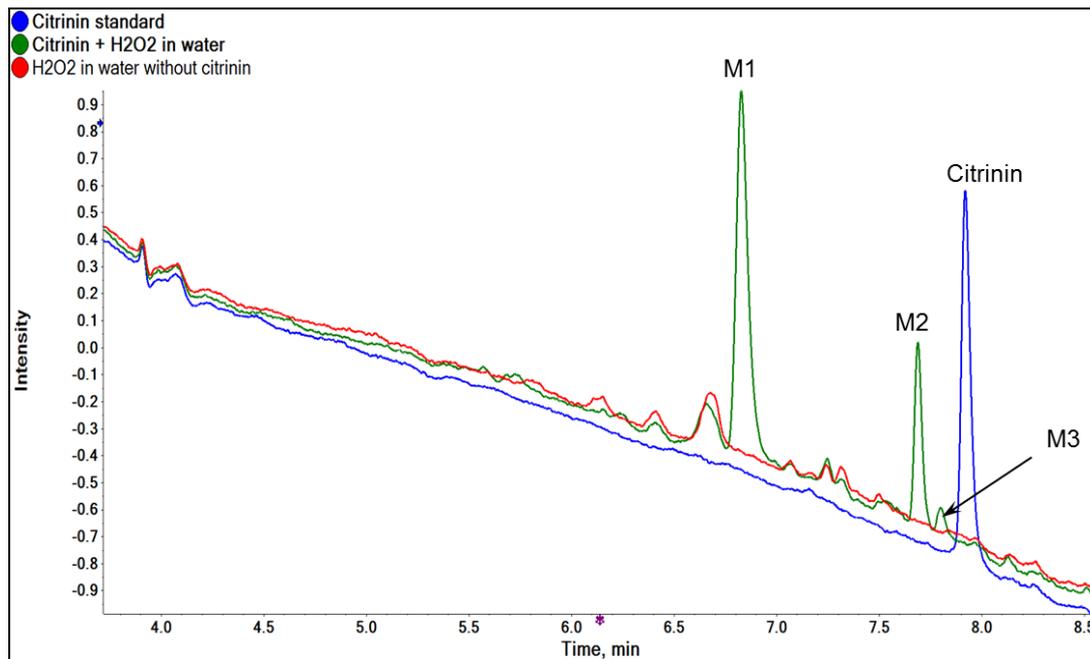


Abb. 92: Abbau von Citrinin durch H_2O_2 . M1, M2 und M3 sind Abbau-Produkte von Citrinin nach der Mischung mit H_2O_2 . Die Degradationsprodukte wurden mit der LC-DAD-MS gemessen.

Wie die Grafik zeigt, konnte in der Mischung mit H_2O_2 kein Citrinin nachgewiesen werden. Statt Citrinin wurden drei Degradationsprodukte (M1-M3) gefunden. Im Kontrollansatz, zu dem kein H_2O_2 zugesetzt wurde, konnte erwartungsgemäß Citrinin nachgewiesen werden. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass Citrinin durch H_2O_2 abgebaut wird. Um zu analysieren, ob Citrinin auch *in vivo* degradiert wird, wurde *P. expansum* auf Äpfel der Sorte Royal Gala angeimpft und während des Wachstum an verschiedenen Tagen Proben aus der Mitte der kontaminierten Apfelstellen (1 g vom Apfelgewebe) entnommen und mit 1 ml Chloroform für 30 min unter starkem Schütteln extrahiert. Danach wurden die Extrakte mit der LC-DAD-MS gemessen. Das Ergebnis ist auf der Abbildung 93 dargestellt.

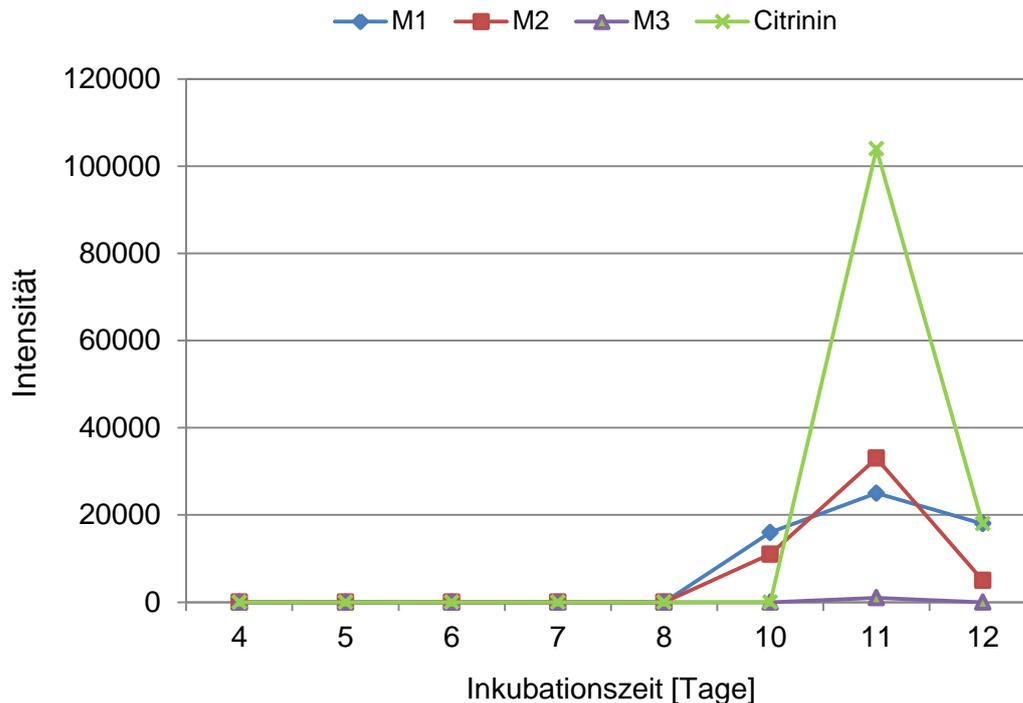


Abb. 93: Abbau von Citrinin in Äpfeln. *P. expansum* BFE1393 wurde auf Äpfel der Sorte Royal Gala angeimpft und bei 25 °C inkubiert. Die Degradationsprodukte von Citrinin M1, M2 und M3 wurden mit der LC-DAD-MS gemessen.

Es ist deutlich zu sehen, dass von Tag 4 bis Tag 8 weder Citrinin noch Citrinin-Derivate nachgewiesen wurden (Bindung an Pektin). Bei längeren Inkubationszeiten (Tag 10, Tag 11 und Tag 12) konnten sowohl Citrinin als auch die Derivate M1 und M2 gefunden werden. An Tag 11 wurden die höchsten Mengen an Citrinin und dessen Derivate gefunden. Das Produkt M3 konnte nur an Tag 11 in kleinen Mengen gemessen werden. Der Nachweis von intaktem Citrinin, neben seinen Abbauprodukten zeigt, dass Citrinin in Äpfeln teilweise abgebaut wird. Die Ergebnisse der LC-DAD-MS stimmen sehr gut mit den HPLC-Messungen überein. Mit der HPLC konnten auch bei längeren Inkubationszeiten nur geringe Mengen an Citrinin nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen jetzt deutlich, dass Citrinin zum Teil an die Bestandteile der Äpfel gebunden wird und zum Teil abgebaut wird. Da auf der Apfelsorte Royal Gala die Expression des *pksCT*-Gens schon ab Tag 4 gemessen werden konnte, wurde Citrinin eventuell auch von Tag 4 bis Tag 8 gebildet aber an das Pektin gebunden bzw. durch ROS Aktivität degradiert. Was dazu führt, dass Citrinin auf Äpfeln, im Gegensatz zu Labormedien, erst spät detektiert werden kann

Einfluss von Citrinin auf die Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum*

Penicillium expansum löst die grüne Fäulnis in vielen Früchten wie Äpfeln, Weintrauben und Birnen aus, eine nach der Ernte auftretende Krankheit, die unter Obst und Gemüse sehr verbreitet ist. Wie schon erwähnt, fördert Patulin die Kolonisierung von *P. expansum* auf Äpfeln (Sanzani et al., 2012; Snini et al., 2016). Um zu wissen, ob Citrinin bei der Infektion von Äpfeln durch *P. expansum* eine Rolle spielt, wurden in dieser Arbeit verschiedene Experimente bezüglich der Pathogenität von *P. expansum* durchgeführt.

Wachstum der *pksCT*- Mutante von *P. expansum* auf Äpfeln

Penicillium expansum Wildtyp und die *pksCT*-Mutante (diese Mutante ist, wie oben gezeigt, nicht in der Lage Citrinin zu bilden) wurden auf den Apfelsorten Braeburn und Granny Smith angeimpft. Nach 4 Tagen Inkubation bei 25 °C wurden die Äpfel fotografiert. Die Abbildung 94 zeigt die Unterschiede in der Kolonisierung der Äpfel zwischen dem Wildtyp und der Citrininmutante.



Abb. 94: Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum*. Links: Sorte Granny Smith. Rechts: Sorte Braeburn. WT: *P. expansum* Wildtyp. $\Delta pksCT$: *pksCT*-Mutante von *P. expansum* T3. Die Äpfel wurden mit einem sterilen Skalpell angeritzt (etwa 5 mm in das Fruchtfleisch) und mit einer Sporensuspension von 10^4 Sporen/ml des Wildtyps bzw. der *pksCT*-Mutante angeimpft. Es wurden jeweils 5 μ l von jeder Sporensuspension angeimpft.

Auf den beiden Apfelsorten konnte der Wildtyp ganz normal und wie erwartet wachsen. Dies ist durch die große Infektionsstelle und das gebildete Myzel auf der Oberfläche der Äpfel deutlich zu erkennen. Im Vergleich zum Wildtyp, ist das Wachstum bei der Citrininmutante sehr reduziert. Wie auf den Bildern zu sehen ist, konnte die Mutante die Äpfel zwar infizieren, aber sie konnte, im Gegensatz zum Wildtyp, nicht weiterwachsen. Dies weist darauf hin, dass Citrinin die Kolonisierung von Äpfeln fördert. Um die Rolle von Citrinin bei der Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum* weiter zu untersuchen, wurde reines Citrinin auf die Infektionsstelle der Citrininmutante von *P. expansum* gegeben. Für diesen Versuch wurde die Apfelsorte Granny Smith ausgewählt. Jeweils drei Äpfel wurden zuerst mit dem Wildtyp und der Mutante angeimpft und bei 25 °C inkubiert. Da das Wachstum der Mutante sehr reduziert war, wurden nach zwei Tagen Inkubation 5 µl reines Citrinin (Konzentration 0,1 µg/µl) auf die Infektionsstellen der Mutante pipettiert und die Äpfel im Dunkeln weiter inkubiert. Nach drei weiteren Inkubationstagen wurde das Wachstum dokumentiert. Als Kontrolle wurden drei Äpfel angeritzt, nur mit 5 µl reinem Citrinin beimpft und ebenfalls inkubiert. Die Abbildung 95 zeigt die positive Wirkung von Citrinin bei der Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum*.

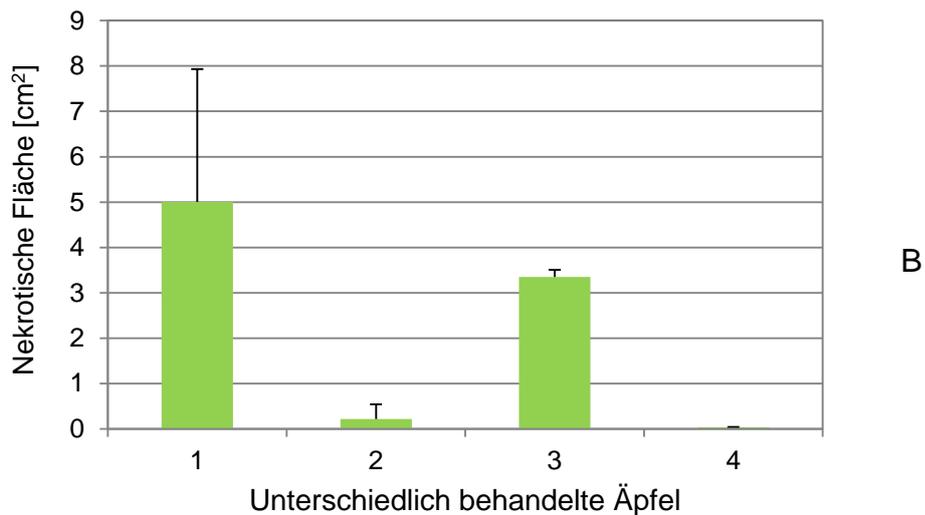
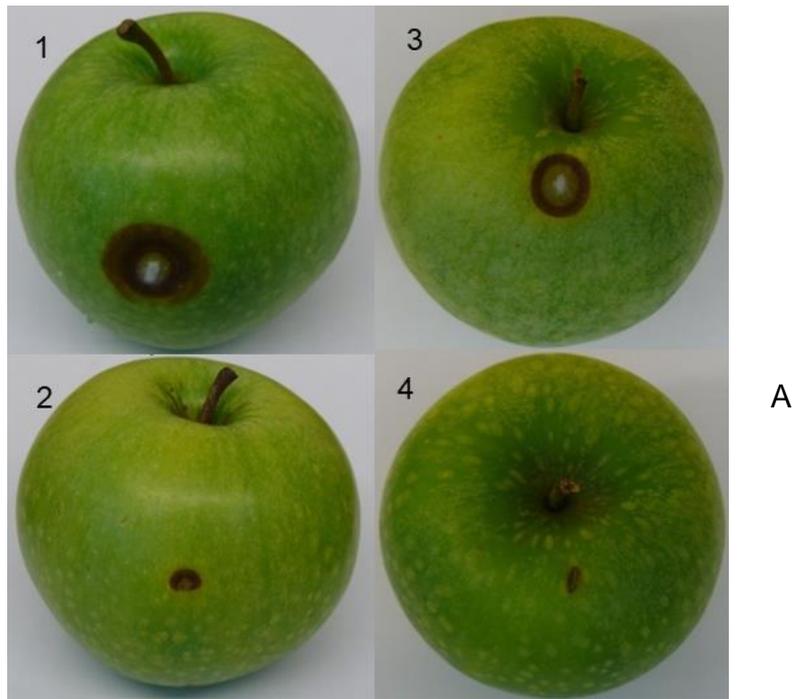


Abb. 95: Einfluss von Citrinin auf die Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum*. 1: Wildtyp. 2: Citrininmutante von *P. expansum*. 3: Citrininmutante nach der Zugabe von 5 µl Citrinin. 4: Kontrolle (nekrotische Wirkung von Citrinin, dafür wurden die Äpfel angeritzt und mit 5 µl Citrinin (0,1 µg/µl) inkubiert). Die gesamten Äpfel wurden bei 25 °C im Dunkeln inkubiert (A). Nach 5 Tagen Inkubation wurden die Äpfel fotografiert. B: Quantitative Messung der nekrotischen Flächen. Repräsentiert ist jeweils der Durchschnittswert von mehreren Äpfeln.

Wie auf der Abbildung 95 zu sehen ist, hat die Zugabe von Citrinin das Wachstum der Mutante deutlich verbessert. Das Wachstum der Mutante nach der Zugabe von externem Citrinin, ist fast genauso gut, wie das des Wildtyps. Dies ist ein starker Hinweis, dass Citrinin eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum* spielt.

Wachstum der PacC-Mutante von *P. expansum* auf Äpfeln

Wie schon bereits gezeigt, spielt der PACC-Signalweg bei der pH-abhängigen Regulation der Citrininbildung auf Labormedium eine wichtige Rolle. Um die Rolle des PACC-Signalweges bei der Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum* zu untersuchen, wurde die PacC-Mutante auf ihre Fähigkeit der Kolonisierung auf Äpfeln überprüft. Es wurden insgesamt sechs Äpfel mit einem sterilen Skalpell ca. 5 mm tief in das Fruchtfleisch angeritzt. Die Sporensuspensionen des Wildtyps und der PacC-Mutante wurden auf 10^4 Sporen/ml eingestellt. Von der Suspension wurden jeweils 5 μ l angeimpft.



Abb. 96: Einfluss der PacC-Inaktivierung auf die Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum*. WT: Wildtyp. Die Äpfel wurden leicht angeritzt und mit einer Sporensuspension des Wildtyps und der PacC-Mutante von *P. expansum* angeimpft. Nach 5 Tagen Wachstum bei 25 °C, wurden die Äpfel fotografiert.

Der Wildtyp ist auf allen Äpfeln ganz normal gewachsen, während die PacC-Mutante auf keinem Apfel wachsen konnte. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die korrekte Regulierung der Citrininbildung über PACC (wie oben gezeigt) eine wichtige Rolle beim Kolonisierungsprozess spielt. Gerade der pH-Wert spielt als externer Parameter eine wichtige Rolle innerhalb der Apfelmatrix.

Einfluss der Überexpression des Transkriptionsaktivators *ctnR* auf das Wachstum von *P. expansum* auf Äpfeln

Im Vergleich zum Wildtyp hat die Transformante T5, die das heterologe *ctnR*-Gen aus *P. citrinum* enthält, auf PDA-Medium wesentlich höhere Citrininmengen produziert. Weiterhin zeigte sich die Bildung gegenüber Schwankungen des pH-Wertes im Wesentlichen unempfindlich. Wenn die bisherige Theorie stimmt, sollte dieser Phänotyp zu einer, im Vergleich zum *P. expansum* Wildtyp, erhöhten Kolonisierung von Äpfeln führen. Daher wurde das Wachstum der Transformante T5,

die *ctnR* aus *P. citrinum* heterolog exprimiert, auf Äpfeln verfolgt. Diese Transformante wurde auf der Apfelsorte Granny Smith angeimpft und nach 5 Tagen Inkubation bei 25 °C, wurde das Wachstum gemessen. Als Kontrolle wurde der Wildtyp BFE189 mit angeimpft. Parallel dazu wurden in einem anderen Versuch 5 µl reines Citrinin, 2 Tage nach dem Beimpfen, zum Wildtyp gegeben.

Wachstum der *ctnR*-Transformante auf Granny Smith

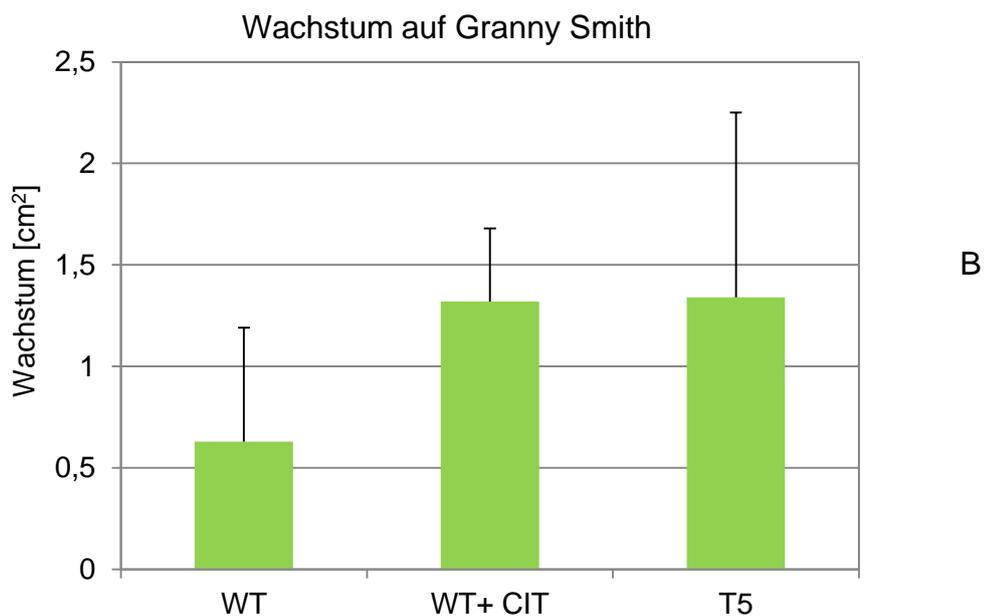


Abb. 97: Einfluss der *ctnR*-Überexpression auf das Wachstum von *P. expansum* auf Äpfeln der Sorte Granny Smith. WT: *P. expansum* BFE189 Wildtyp. T: *ctnR*-Transformante. Die Sporensuspensionen des Wildtyps und der Transformante wurden auf 10^4 Sporen/ml eingestellt. Jeweils 5 µl der Sporensuspension wurden angeimpft. Citrinin wurde mit einer Konzentration von 0,1 µg/µl verwendet. A: Beispiele der Wachstumsbilder. B: Jeweils der Durchschnittswert von mehreren Äpfeln.

Wachstum der *ctnR*-Transformante auf der Sorte Royal Gala

Um das Ergebnis zu bestätigen, wurde derselbe Versuch mit einem der roten Apfelsorten durchgeführt. Genauso wie vorhin beschrieben wurde die *ctnR*-Transformante von *P. expansum* auf der Apfelsorte Royal Gala angeimpft. Als Kontrolle wurde der Wildtyp mit angeimpft.

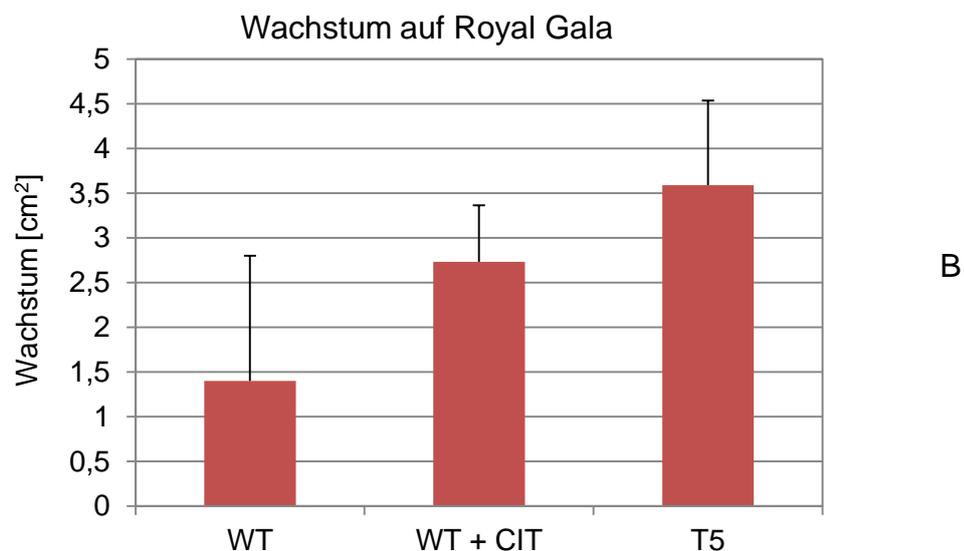
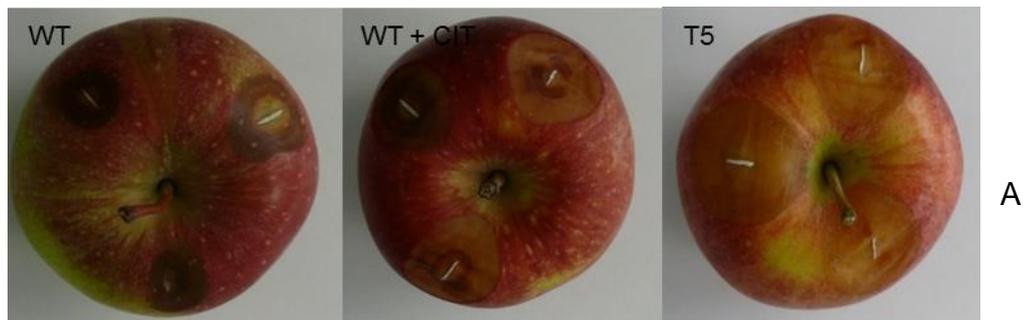


Abb. 98: Einfluss der *ctnR*-Überexpression auf das Wachstum von *P. expansum* auf Äpfeln der Sorte Royal Gala. WT: Wildtyp. T: *ctnR*-Transformante. A: Beispiele der Wachstumsbilder. B: Jeweils der Durchschnittswert von mehreren Äpfeln.

Sowohl auf den Apfelbildern, als auch in der Grafik ist deutlich zu erkennen, dass das Wachstum der Transformante wesentlich stärker ist als das des Wildtyps. Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression des Transkriptionsaktivators einen positiven Effekt auf das Wachstum von *P. expansum* auf Äpfeln hat. Außerdem hat die Zugabe von Citrinin zum Wildtyp das Wachstum deutlich verbessert.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann abgeleitet werden, dass Citrinin eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum* spielt.

Einfluss der Ascorbinsäure auf die Kolonisierung von Äpfeln durch

P. expansum

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Zugabe von H₂O₂ zum Nährmedium zur Verstärkung der Citrininbildung bei *P. expansum* geführt hat. Dies deutet darauf hin, dass Citrinin von dieser Pilzspezies als Schutz gegen oxidativen Stress gebildet wird. Außerdem ist in der Literatur beschrieben, dass Citrinin antioxidative Eigenschaften hat (Heider et al., 2006). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass *P. expansum*, Citrinin als Schutz gegen die reaktiven Sauerstoffradikale, die von den Äpfeln gebildet werden, produziert. Ascorbinsäure wirkt ebenfalls antioxidativ. Um zu untersuchen, ob Ascorbinsäure eine antioxidative Wirkung gegen die ROS Aktivität der Äpfel haben kann, wurden Äpfel der Sorte Jonagold mit *P. expansum* beimpft. Danach wurden 10 µl Ascorbinsäurelösung verschiedener Konzentrationen auf die Infektionsstelle gegeben. Als Kontrolle wurden die Äpfel lediglich mit *P. expansum* angeimpft, ohne Zugabe von Ascorbinsäure (0 mM).

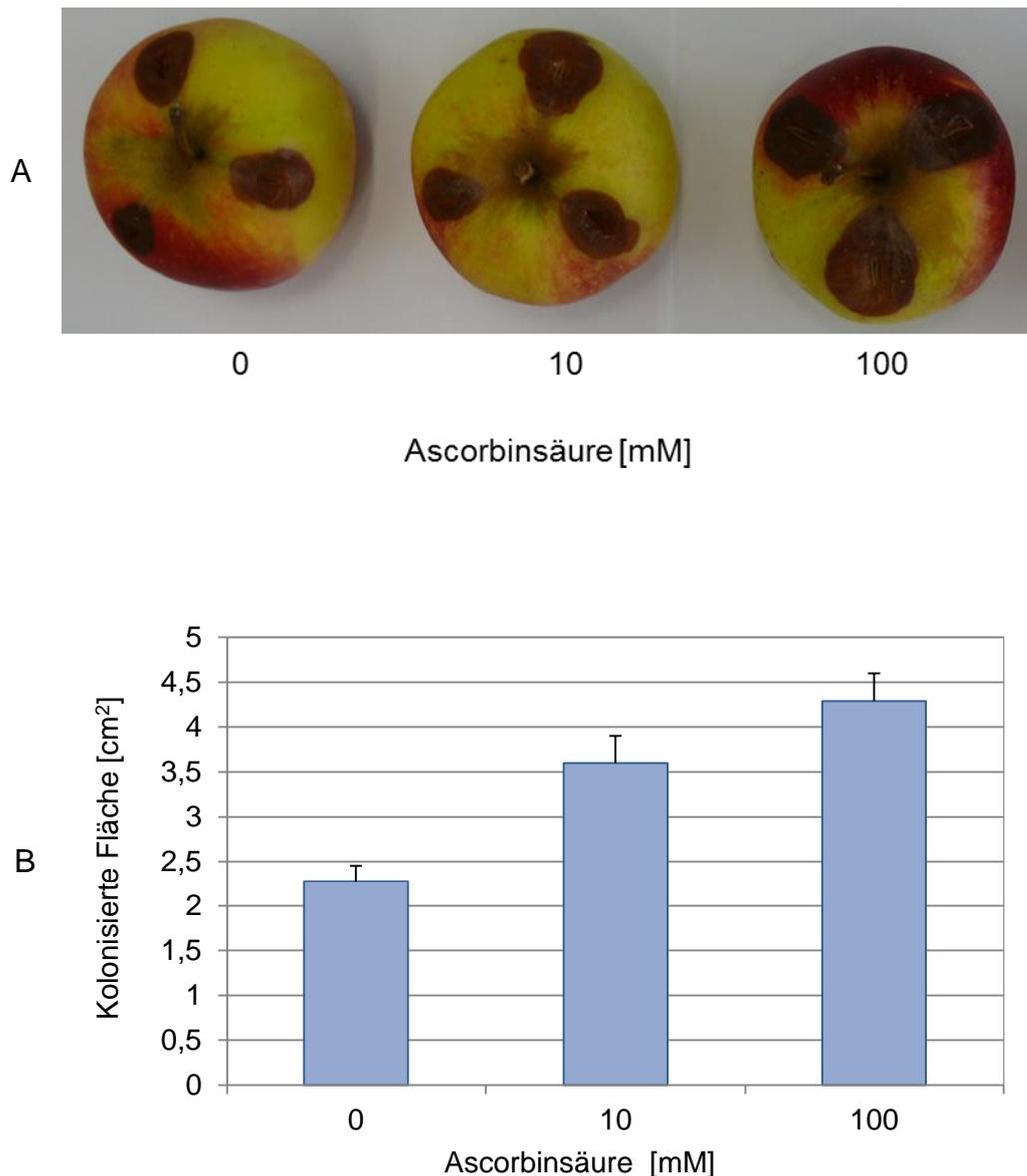


Abb. 99: Einfluss von Ascorbinsäure auf die Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum*. Die Äpfel wurden mit einem Skalpell leicht angeritzt (5 mm in das Apfelgewebe) und mit 5 μ l einer Sporensuspension von 10^4 Sporen/ml angeimpft. Zu den Infektionsstellen wurden 10 μ l von der Ascorbinsäure mit einer Konzentration 10 mM und 100 mM pipettiert. Die Äpfel wurden für 5 Tage bei 25 °C inkubiert. Danach wurden sie fotografiert (A) und die Fläche des Wachstums wurde bestimmt (B).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die kolonisierten Flächen nach Zugabe von 10 mM und 100 mM Ascorbinsäure, deutlich größer sind, als es bei der Kontrolle ohne Ascorbinsäurezugabe der Fall ist.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Erhöhung der Konzentration antioxidativer Substanzen die Kolonisierung von Äpfeln fördert und zeigen weiterhin die Bedeutung der antioxidativen Wirkung von Citrinin für die Infektion.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es Einblicke in die Regulation der Citrininbildung der drei *Penicillium* Spezies zu gewinnen. Die Regulation der Citrininbildung wurde auf Labormedien und auch in Bezug zu bestimmten Lebensmittelprodukten untersucht. *P. citrinum*, *P. expansum* und *P. verrucosum* kommen in unterschiedlichen Habitaten vor. Jedoch können sie gemeinsam auf salzhaltigen Substraten vorkommen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Regulation der Citrininbildung bei diesen drei Spezies untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es zum einen die Bedingungen der Citrininbiosynthese zu verstehen und zum anderen Aussagen über die Etablierung neuer Methoden zur Bekämpfung der Citrininkontamination von Lebensmitteln, zu treffen.

Untersuchung der Biodiversität von *P. expansum*

Da keine systematischen Erkenntnisse über die Variation der Citrininbildung verschiedener *P. expansum* Stämme vorlagen, wurden im Rahmen dieser Arbeit 20 neue *P. expansum* Stämme von kontaminierten Äpfeln verschiedener Sorten isoliert. Die Isolate hatten eine ähnliche Koloniemorphologie. Zur weiteren Charakterisierung der neu isolierten Stämme wurde zuerst die RAPD Methodik eingesetzt. Anhand der entstandenen RAPD-Muster wurde ein Stammbaum erstellt. Die Analyse des erstellten phylogenetischen Stammbaums zeigte, dass die isolierten *P. expansum* Stämme in zwei große Gruppen eingeordnet werden konnten. Die beiden Gruppen besitzen eine genetische Ähnlichkeit von mehr als 60 %. Innerhalb jeder Gruppe zeigten die Stämme hohe Homologie, wobei es Stämme gab, die sogar eine Homologie von 100 % aufwiesen. Die Differenzierung der isolierten Stämme in zwei Gruppen durch die RAPD-Analyse ist ein Hinweis, dass die Population von *P. expansum* heterogen ist. Weiterhin wurden die ITS-Regionen der Stämme sequenziert. Auf Grund der Homologie der ITS-Sequenzen konnten alle isolierten Stämme als *P. expansum* charakterisiert werden. Die Bildung von Citrinin und Patulin ist eine bekannte Eigenschaft von *P. expansum* (Abulhamd, 2009; Anderson et al., 2004; Viñas et al., 1993). Die genetische Variabilität innerhalb von *P. expansum* reflektierte sich in der Variabilität in der Citrinin- und Patulinbildung. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Stämme hinsichtlich der Toxinbildung sehr variabel waren. Trotz des eindeutigen Unterschiedes der beiden *P. expansum* Populationen, die durch die RAPD-Analyse deutlich wurden, konnte keine Korrelation zwischen der

Citrinin- und Patulinbildung bei den Populationen beobachtet werden. Die Variabilität in der Citrinin- und Patulinbildung zwischen den verschiedenen Stämmen von *P. expansum* ist in der Literatur schon beschrieben. Es gibt einige Veröffentlichungen, die zeigen, dass die meisten *P. expansum*-Isolate zwar Citrinin und Patulin bilden können. Die beiden Toxine werden aber nicht konsistent gebildet. (Abulhamd, 2009; Anderson et al., 2004; Viñas et al., 1993).

Die Kinetik der Citrininbildung der drei *Penicillium*-Arten

Die Ergebnisse der Bildungskinetik auf PDA zeigten, dass diese Spezies sehr unterschiedliche Bildungsprofile haben. Citrinin wird von *P. citrinum* über die gesamte Zeitkinetik konsistent und in hohen Mengen gebildet. Gleich zu Beginn der Wachstumsphase wurde eine hohe Bildung beobachtet, die über einen langen Zeitraum erhalten blieb. Laut einigen Studien in der Literatur stellt Citrinin ein Schutzfaktor gegen verschiedene Formen von Stress (Schmidt-Heydt et al., 2015; Størmer et al., 1998). Da *P. citrinum* ubiquitär in der Natur vorkommt, könnte das u. a. durch die hohe Citrininbildung gewährleistet sein. Bei *P. expansum* wurde neben Citrinin auch die Patulinbildung analysiert. Es wurde festgestellt, dass sowohl Citrinin als auch Patulin bereits nach drei Tagen Wachstum gebildet werden. Wie auch bei *P. citrinum* konnte bei *P. expansum* in der frühen Wachstumsphase (Tag 3) Citrinin gemessen werden. Über die gesamte Bildungskinetik wurden bei dieser Spezies unterschiedliche Citrininmengen ermittelt. Jedoch ist die Citrininbildung über die gesamte Kinetik im Gegensatz zu *P. citrinum* viel geringer. Die Schwankungen in der Citrininbildung bei dieser Spezies deuten auf eine starke Regulation hin. Patulin wurde nach drei Tagen Wachstum von *P. expansum* in hohen Mengen gebildet. Diese Mengen reduzierten sich im Verlauf der Kinetik. Die hohen Mengen an Patulin zu Beginn des Wachstums könnten dadurch erklärt werden, dass *P. expansum* Patulin als wichtiger Metabolit für die Kolonisierung von Habitaten benötigt. Patulin wurde als Kolonisierungsfaktor von *P. expansum* für die Kolonisierung von Äpfeln beschrieben (Sanzani et al., 2012; Snini et al., 2016). Die Reduktion der Patulinbildung könnte durch eine Degradation dieses Mykotoxins vom Pilz selbst erklärt werden, da eine potentielle Degradation der Mykotoxine nach ihrer Bildung für verschiedene Mykotoxine in der Literatur beschrieben ist (Abrunhosa et al., 2007; Schmidt-Heydt et al., 2010; Siegmund, 1994). *P. verrucosum* kann Citrinin und Ochratoxin A bilden. Die Untersuchung der Toxinbildung bei dieser Spezies in einer

Kinetik zeigte, dass sie zuerst Ochratoxin A und nach längerer Inkubationszeit Citrinin produziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit einigen Daten in Literatur überein, die zeigen, dass *P. verrucosum* je nach Umweltbedingungen hohe Citrinin- oder Ochratoxinmengen bilden kann (Schmidt-Heydt et al., 2011; Schmidt-Heydt et al., 2015).

Aufgrund der Ergebnisse kann ausgesagt werden, dass die Citrininbildung der verschiedenen *Penicillium* Spezies auf PDA unterschiedlich reguliert ist. Bei *P. citrinum* wird Citrinin nahezu konstitutiv gebildet, während es bei *P. expansum* und *P. verrucosum* stark reguliert ist. Die Kinetik der Citrininbildung bei den letztgenannten Spezies unterscheidet sich stark, was eventuell auf unterschiedliche Adaptionsmechanismen hindeutet.

Charakterisierung der Citriningencluster in *Penicillium*

Die Mykotoxine gehören den Polyketiden an. Diese werden über einen langen Polyketidweg synthetisiert. Dabei sind zahlreiche Enzyme beteiligt. Seit der Charakterisierung von Citrinin als Mykotoxin und der Entdeckung seiner chemischen Struktur gibt es mehrere Studien, die sich mit den zugrundeliegenden molekularen Eigenschaften seiner Biosynthese auseinandergesetzt haben. Shimizu et al. (2007) konnten einen Citriningencluster bestehend aus fünf Genen in *M. purpureus* identifizieren. Die Gene entsprechen einer Dehydrogenase, einem Regulator, einer Oxygenase, einer Oxidoreduktase, einer Polyketidsynthase und einem Transporter. Die Inaktivierung des Regulatorgens (*ctnR*) führte, nach Aussage der Autoren, zur starken Reduktion der Expression des Polyketidsynthasegens (*pksCT*) und somit zur Reduktion der Citrininbildung. He und Cox (2016) haben den enzymatischen Ablauf der Citrininbildung in *Aspergillus oryzae* beschrieben. Durch eine Reihe von Knockout-Experimenten und Experimenten zur heterologen Genexpression konnten sie die Einzelschritte der Citrininbiosynthese entschlüsseln. Die Genome von *P. citrinum* und *P. verrucosum* wurden in unserer Arbeitsgruppe (Stoll und Schmidt-Heydt) mittels MiSeq-Sequenzierer (Illumina) sequenziert und auf der Webseite von NCBI mit den Zugangsnummern LAKW01000000 für *P. verrucosum* und LKUP00000000.1 für *P. citrinum* hinterlegt, während das Genom von *P. expansum* bereits veröffentlicht war (Ballester et al., 2015). Anhand der Citriningene aus *Monascus* konnte in dieser Arbeit die Citriningencluster in den Genomen der drei *Penicillium* Spezies identifiziert werden. Die Citriningene in *Penicillium* weisen hohe

Ähnlichkeit zu den Genen in *Monascus* auf. Außerdem sind die Struktur und die Organisation der Gene innerhalb des Clusters zwischen den drei untersuchten *Penicillium* Spezies hoch konserviert. In vielen Studien wurde die Rolle des horizontalen Gentransfers (HGT) in der Entwicklung von Genclustern für die Sekundärmetaboliten bei Pilzen erläutert. Viele Mykotoxine werden von vielen Pilzspezies verschiedener Gattungen gebildet. So wird z. B. das Mykotoxin Patulin von ca. 60 Spezies der über 30 Gattungen gebildet (Lai et al., 2000). Zudem gehören die Spezies, die das Mykotoxin Sterigmatocystin bilden, zu verschiedenen Gattungen (Rank et al., 2011). Die Bildung dieser Mykotoxine von verschiedenen Spezies bedeutet, dass die vielen Spezies über die Gencluster für diese Mykotoxine verfügen, was für einen horizontalen Gentransfer spricht (Ropars et al., 2015; Walton, 2000). Der DNA-Austausch wurde in *Penicillium* nachgewiesen. Ein schönes Beispiel wurde von Ropars et al. (2015) beschrieben. *P. roqueforti* ist eine Spezies, die in Käse vorkommt. Bei dieser Spezies wurden von Ropars et al. (2015) zwei DNA-Bereiche beschrieben, die mit anderen Spezies desselben Habitats ausgetauscht werden können. Die transferierbaren DNA-Bereiche wurden Wallaby und CheesyTer genannt. Da die in dieser Arbeit untersuchten *Penicillium* Spezies gemeinsam in salzhaltigen Habitaten vorkommen können, wäre es möglich, dass ein DNA-Austausch zwischen diesen Spezies stattgefunden hat was die hohe Homologie und die identische Organisation der Citrinincluster der drei untersuchten Spezies erklären würde. Obwohl die Citrinincluster in den drei *Penicillium* Spezies ähnlich sind, waren die Citrininbildungsprofile sehr unterschiedlich, was auf den unterschiedlichen Einfluss der Regulationsmechanismen hindeutet.

Rolle der Polyketidsynthase pksCT in der Citrininbiosynthese

Bei der Suche nach den Schlüsselgenen für die Citrininbildung, wurden einige Studien über *M. purpureus* und *M. aurantiacus* durchgeführt. Um die notwendigen Gene zu identifizieren, wurden verschiedene Genexpressionsanalysen sowie Knock-out Experimente durchgeführt. He and Cox (2016) fanden heraus, dass die Oxidoreduktasen für die Citrininbildung von Bedeutung sind. Weiterhin konnten Shimizu et al. (2005) zeigen, dass die Expression des *pksCT*-Gens, das für die Kodierung der Polyketidsynthase verantwortlich ist, in *M. purpureus* mit der Citrininbiosynthese korreliert war. Außerdem haben die letzten Autoren *pksCT*-Mutanten erzeugt, die nicht mehr in der Lage waren, Citrinin zu bilden. Dies

bedeutet, dass die Polyketidsynthese eine wichtige Rolle bei der Citrininbildung in *M. purpureus* spielt. Um das Bild der Citrininregulation zu erweitern, wurde in dieser Arbeit das *pksCT*-Gen in den drei *Penicillium* Spezies ebenfalls ausgeschaltet. Das Ziel der *pksCT*-Inaktivierung war die Aufklärung der Frage ob die *pksCT*-Gene bei den drei Spezies die gleiche Rolle spielen. Mittels Southern Blot und PCR konnte gezeigt werden, dass das *pksCT*-Gen bei den drei Spezies tatsächlich inaktiviert wurde. Die *pksCT*-Inaktivierung führte in allen Fällen zur starken Inhibierung der Citrininbildung. Zudem zeigten die Mutanten einen anderen Phänotyp als der Wildtyp. Die Diameter der Kolonien bei den Mutanten waren im Vergleich zum Wildtyp etwas reduziert. Dies bestätigt, dass die Polyketidsynthese *pksCT* bei der Citrininbildung dieser *Penicillium* Spezies eine wichtige Rolle spielt. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen von Ballester et al. (2015) überein. Die Mykotoxinregulation bei *P. verrucosum* scheint komplex zu sein. Bei *P. verrucosum* wurde durch die *pksCT*-Inaktivierung auch die Ochratoxinbiosynthese bei den *pksCT*-Mutanten gehemmt. Es sind mehrere Transformanten entstanden, die weder Citrinin noch Ochratoxin A bilden konnten. Dies lässt vermuten, dass der Citrinincluster auch für die Ochratoxinbildung notwendig ist. Die Inhibierung der Ochratoxinbiosynthese durch das Ausschalten des *pksCT*-Gens stimmt mit den Ergebnissen von O'Callaghan und seinen Kollegen überein (O'Callaghan et al., 2003).

Einfluss der Umweltfaktoren auf die Citrininbildung

Da die untersuchten *Penicillium*-Arten auf einem breiten Spektrum von Lebensmitteln vorkommen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der wichtigsten Umweltfaktoren auf deren Citrininbildung untersucht. Die in dieser Arbeit untersuchten Umweltfaktoren simulieren die wichtigsten Bedingungen in den natürlichen Habitaten. In Bezug auf die Temperatur konnte bei den drei Spezies gezeigt werden, dass sie nicht in der Lage sind bei niedrigen Temperaturen (15 °C) Citrinin zu bilden. Der optimale Temperaturbereich für die Citrininbildung bei den drei Spezies liegt zwischen 20 °C und 25 °C. Die hohe Citrininbiosynthese bei 30 °C bei *P. verrucosum* und *P. expansum* ist vielleicht eine Reaktion gegen den Temperaturstress. Diese *Penicillium*-Arten kommen in den Klimaregionen mit moderaten Temperaturen vor. Eine Temperatur von 30 °C stellt anscheinend einen Stressfaktor für diese beiden Spezies dar. Daher haben beide Spezies hohe Citrininmengen gebildet.

Das ungebundene Wasser in Lebensmitteln wird von den Mikroorganismen für ihr Wachstum und für unterschiedliche enzymatische Reaktionen beansprucht. Da viele Lebensmittelprodukte, insbesondere Obst- und Gemüseprodukte, viel Wasser enthalten, wurde die Wasseraktivität auf ihren Einfluss auf die Citrininbildung bei den drei *Penicillium*-Spezies überprüft. Die Untersuchung der Citrininbildung erfolgte bei Wasseraktivitäten von 0,9; 0,93; 0,95; 0,98 und 0,99. Dieser a_w -Bereich wurde aufgrund von vorhandenen Daten aus der Literatur über die Wasseraktivität verschiedener Lebensmittelprodukte ausgewählt. Außerdem liegen die Werte der Wasseraktivitäten der meisten Obst- und Gemüseprodukte innerhalb dieses ausgewählten Bereiches. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Wasseraktivität einen starken aber unterschiedlichen Einfluss auf die Citrininbildung bei den drei *Penicillium* Spezies hat. *P. verrucosum* und *P. expansum* waren sensitiver gegenüber Veränderungen des a_w -Wertes als *P. citrinum*. Bei a_w -Werten von unter 0,98 war *P. expansum* nicht in der Lage zu wachsen und damit Citrinin zu bilden. Auch *P. verrucosum* zeigte erst oberhalb eines a_w -Wertes von 0,95 Wachstum und Citrininbildung. *P. citrinum* ist resistenter als *P. expansum* und *P. verrucosum* und konnte auf allen untersuchten a_w -Werten wachsen und hohe Mengen an Citrinin bilden, nur bei einem a_w -Wert von 0,93 war eine geringere Citrininbildung festzustellen. Die Ergebnisse stimmen mit einigen Arbeiten in der Literatur überein. *P. citrinum* wurde schon als xerophil beschrieben, da diese Spezies in der Lage ist auch auf trockenen Substraten zu wachsen (Hocking and Pitt, 1979; Pitt and Christian, 1968). *P. expansum* konnte bei niedrigen a_w -Werten (a_w 0,93 und a_w 0,95) nicht wachsen, da diese Spezies auf solchen Substraten nicht so gut adaptiert ist. Sie kommt in der Regel auf Substraten mit hohem Wassergehalt, z. B. auf Äpfeln vor. Daher war das Wachstum bei a_w -Werten unter 0,98 nicht möglich. Im Gegensatz zu *P. expansum* konnte *P. verrucosum* bei tieferen a_w -Werten bis a_w -Wert 0,95 gut wachsen und Citrinin bilden. *P. verrucosum* ist wasserärmere Substraten besser adaptiert als *P. expansum*, da diese Spezies in der Regel auf Getreide vorkommt. Während die Citrininbildung bei *P. citrinum* bei tiefen a_w -Bedingungen (a_w 0,93) nur etwas herunterreguliert wird, wird es bei *P. expansum* und *P. verrucosum* komplett gehemmt, was wiederum auf die stark unterschiedliche Regulation der Citrininbildung bei den unterschiedlichen Spezies hindeutet.

In der Literatur sind verschiedene Studien zu finden, die sich mit dem Einfluss des pH-Wertes auf die Sekundärmetabolitenbildung befasst haben. Keller et al. (1997)

untersuchten die Wirkung des pH-Wertes auf die Sterigmatocystin- und Aflatoxinbildung bei *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*) und *A. parasiticus*. Beide Mykotoxine werden über denselben Biosyntheseweg von verschiedenen Spezies der Gattung *Aspergillus* gebildet (Keller and Hohn, 1997). Laut diesen Autoren werden beide Mykotoxine in großen Mengen im sauren Bereich bei pH 4 und pH 5 gebildet. Im neutralen und im basischen pH-Bereich werden diese Toxine in geringeren Mengen gebildet. Bezüglich der Wirkung vom pH-Wert auf die Citrininbildung gibt es nur wenige Daten. Darum wurde in dieser Arbeit die Wirkung des pH-Wertes auf die Citrininbiosynthese bei den drei *Penicillium* Spezies untersucht. Bei *P. citrinum* hatte der pH-Wert nur einen sehr geringen Einfluss auf die Citrininbildung. Diese blieb über den pH-Bereich von pH 5 bis pH 9 nahezu unverändert. Im Gegensatz dazu hatte der pH-Wert eine größere Wirkung auf *P. expansum* und *P. verrucosum*, wobei der Einfluss auf *P. expansum* stärker war. Bei *P. expansum* war die Citrininbildung im saurem und alkalischen pH-Wert deutlich reduziert. Das Optimum lag bei *P. verrucosum* bei pH 6 während *P. expansum* ein Optimum zwischen pH 7 und pH 8 besaß.

Rolle des PACC-Signalwegs in der Regulation der Citrininbildung

Bei Veränderungen des pH-Wertes spielt die PacC-Signalkaskade eine wichtige Rolle. Der PacC-Transkriptionsfaktor ist ein Teil der PacC-Signalkaskade und wird bei alkalischen pH aktiviert. PacC-Homologe wurden im Rahmen dieser Arbeit in den drei *Penicillium* Spezies gefunden. Um die Rolle des PacC-Signalwegs in der Citrininregulation aufzuklären, wurde das *pacC*-Gen in *P. expansum* und *P. citrinum* inaktiviert. Die Transformanten wurden mittels Southern Blot überprüft. Das Ergebnis von Southern Blot zeigte, dass es bei den Transformanten nicht zur Integration des Inaktivierungsplasmids in das *pacC*-Gen der Zielspezies kam, sondern offensichtlich das *pacC*-Gen bei den Transformanten deletiert wurde. Die Deletion des *pacC*-Gens deutet auf die erfolgreiche Inaktivierung dieses Gens hin. Die PacC-Mutanten von *P. citrinum* und *P. expansum* unterschieden sich vom Phänotyp her stark vom Wildtyp. Der Wildtyp wuchs normal und war wie immer dunkelgrün gefärbt, während die Mutanten weiß aussahen. Die neu entstandenen Phänotypen weisen darauf hin, dass die Inaktivierung von PacC zu einem pleiotropen Effekt in den Transformanten von *P. expansum* und *P. citrinum* führte. Die Mutanten von *P. expansum* und *P. citrinum* wurden auf PDA mit verschiedenen pH-Werten angeimpft und deren

Citrininbildung untersucht. Die Untersuchung der Citrininbildung bei der Mutante von *P. citrinum* zeigte, dass dieser Stamm im Vergleich zum Wildtyp wesentlich weniger Citrinin bildete. Die Citrininbildung wurde allerdings nicht vollständig gehemmt, sondern nur stark reduziert. Interessanterweise bildete die PacC-Mutante von *P. citrinum* bei pH 8, im Gegensatz zu den anderen pH-Werten etwas mehr Citrinin, obwohl es keinen phänotypischen Unterschied der Koloniemorphologie auf den verschiedenen pH-Werten gab. Dies deutet darauf hin, dass bei *P. citrinum* die PacC-Signalkaskade für die Citrininbildung eine entscheidende Rolle spielt, dass aber noch weitere Faktoren an der Regulation beteiligt sind. Trotz Inaktivierung des PacC konnte *P. citrinum* geringe Mengen an Citrinin bilden, die vermutlich über andere Mechanismen reguliert werden. Solange die relevanten Bildungswege bzw. Regulationskaskaden blockiert oder ausgeschaltet sind, versuchen filamentöse Pilze wichtige Metaboliten über andere Wege zu bilden. Dies könnte der Fall bei der Citrininbildung von *P. citrinum* nach dem Ausschalten des PacC-Signalwegs sein.

Die PacC-Mutante von *P. expansum* hat auf den pH-Werten pH 5, pH 6, pH 7 und pH 9 nur geringe Citrininmengen gebildet. Bei pH 8 hat sie hohe Mengen an Citrinin gebildet. Der PacC-Signalweg spielt bei Veränderungen des pH-Wertes im sauren und im alkalischen Bereich eine wichtige Rolle. Da die PacC-Mutante von *P. expansum* hohe Citrininmenge bei pH 8 bilden konnte, ist das ein Hinweis, dass sie in diesem pH-Bereich kein PACC braucht. Trotz Inaktivierung des PacC war die Citrininbildung bei der Mutante von *P. expansum* bei pH 8 sehr hoch. Dies würde heißen, dass PacC bei *P. expansum* eine regulatorische Funktion hat. Es scheint, dass PacC bei *P. expansum* für die pH-abhängige Regulation der Citrininbildung von Bedeutung ist. Bei *P. citrinum* hat die PacC-Mutante bei pH 8 zwar etwas erhöhte aber geringe Mengen an Citrinin gebildet. Die Untersuchung der Wirkung des pH-Wertes beim *P. citrinum* Wildtyp zeigte, dass der Wildtyp auf den pH-Werten von 4 bis 9 hohe Mengen an Citrinin bilden kann. Dies würde bedeuten, dass PacC bei *P. citrinum* keine regulatorische Rolle spielt, sondern für die konstitutive Citrininbildung insgesamt erforderlich ist. Nach der heterologen Überexpression des Transkriptionsfaktors *ctnR* aus *P. citrinum* in *P. expansum* hat sich die Transformante von *P. expansum* gegenüber Veränderungen des pH-Wertes genauso verhalten wie *P. citrinum* Wildtyp. Die Citrininbildung bei der *ctnR*-Transformante war nach der heterologen Überexpression des *ctnR*-Transkriptionsfaktors nicht mehr pH-abhängig wie der *P. expansum* Wildtyp. Dies

deutet stark darauf hin, dass das Zusammenspiel zwischen PacC und CtnR wichtig für die Regulation der Citrininbildung und die pH-Adaptation ist.

Einfluss des oxidativen Stresses auf die Citrininbildung

Der oxidative Stress wurde durch die Zugabe von verschiedenen Mengen an H₂O₂ zum Nährmedium induziert. Erhöhte H₂O₂-Konzentrationen im Medium führten zu einem erhöhten oxidativen Stress. Bei den drei *Penicillium* Spezies erhöhte sich die Citrininbildung mit größeren H₂O₂-Mengen stark. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits vorhandenen Daten in der Literatur überein. Schmidt-Heydt et al. (2015) haben den Einfluss von oxidativem Stress auf die Mykotoxinbildung bei *P. verrucosum* untersucht. Sie konnten herausfinden, dass erhöhter oxidativer Stress die Citrininbildung bei *P. verrucosum* fördert. Außerdem untersuchten Mahoney et al. (2010) die Wirkung von oxidativem Stress auf die Aflatoxinbildung bei *Aspergillus flavus* (*A. flavus*). Diese Autoren haben herausgefunden, dass durch den oxidativen Stress die Bildung von Aflatoxin induziert wird. Eine Zugabe von Antioxidantien zum Medium, wie Gallotannine, Flavonoide und Phenolsäuren, die in verschiedenen Nussorten vorkommen, führte zur starken Reduktion der Aflatoxinproduktion. Laut diesen Autoren war die Reduktion der Aflatoxinbildung auf die antioxidativen Eigenschaften der oben genannten Verbindungen zurückzuführen. Laut einigen Arbeiten in der Literatur hat Citrinin antioxidative Eigenschaften (Heider et al., 2006; Ishikawa et al., 1988). Da die drei *Penicillium* Spezies ihre Citrininbildung unter oxidativen Stressbedingungen verstärkten, deutet das auf die möglicherweise protektive Wirkung von Citrinin hin. Die protektive Funktion von Citrinin wurde durch die Unfähigkeit der Citrininmutante auf PDA-Medium mit 10 mM H₂O₂ zu wachsen, bestätigt. Während der Wildtyp von *P. citrinum* starkes Wachstum zeigte, war die Citrininmutante nicht in der Lage, unter diesen Bedingungen zu wachsen. Es wird berichtet, dass die Antioxidantien eine Hydroxylgruppe besitzen, mit der sie die Oxidantien reduzieren. Da Citrinin auch eine freie Hydroxylgruppe enthält, wirkt diese vermutlich als Elektronen-Donor bei der Wechselwirkung mit den reaktiven Radikalen und agiert somit als Radikalfänger.

Einfluss des Salzstresses auf die Citrininbildung

Bei erhöhtem Salzgehalt werden filamentöse Pilze, die in diesen Substraten vorkommen, dem Salzstress ausgesetzt. Der Salzstress hat einen großen Einfluss auf die Mykotoxinbildung. Von Schmidt-Heydt et al. (2012) liegen Untersuchungen

vor, die den Einfluss von NaCl auf die Regulation der Ochratoxinbildung bei *P. nordicum* und *P. verrucosum* beschreiben. *P. nordicum* ist durch die Bildung des Mykotoxins Ochratoxin A bekannt. Diese Spezies ist an den salzhaltigen Substraten gut adaptiert und kommt u. a. auf verschiedenen salzhaltigen Käsesorten vor. Die zuvor genannten Autoren fanden heraus, dass NaCl einen starken Effekt auf die Regulation der Ochratoxinbildung bei *P. nordicum* und *P. verrucosum* hat. *P. nordicum* war in der Lage hohe Mengen an Ochratoxin A auf den gesamten untersuchten Medien mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (5-100 g/l) zu bilden. *P. verrucosum* bildete Citrinin bei niedrigen bis moderaten NaCl-Konzentrationen (5-20 g/l). Auf den Medien mit höherem NaCl-Gehalt stellte die Spezies seine Toxinbildung auf Ochratoxin A um. Ochratoxin A besitzt ein Chloridatom. Durch die Bildung und Ausscheidung von Ochratoxin A werden Chloridatomen ständig von den Zellen ausgeschieden. Dies ist ein Mechanismus, mit dem *P. nordicum* und *P. verrucosum* ihre Cl-Homöostase zumindest teilweise sichern können und sind damit in der Lage sich besser an salzhaltige Substrate zu adaptieren (Schmidt-Heydt et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Salzstress auf die Citrininbildung bei *P. citrinum*, *P. expansum* und *P. verrucosum* untersucht. Der Salzstress wurde durch die Zugabe von verschiedenen NaCl-Mengen zum Medium induziert. *P. citrinum* hat sowohl auf niedrigen als auch auf hohen NaCl-Konzentrationen gleiche Mengen an Citrinin gebildet. Außerdem war das Wachstum durch hohe NaCl-Mengen nicht beeinträchtigt. Diese Spezies ist sowohl auf PDA ohne NaCl, als auch auf PDA mit hohen NaCl-Konzentrationen gut gewachsen. Dies deutet wieder auf die allgemein hohe Stressresistenz dieser Spezies hin. Laut Literatur können auch erhöhte NaCl-Konzentrationen im Nährmedium zur Erhöhung der ROS-Bildung und damit zu einem erhöhten oxidativen Stress führen (Petrovic et al., 2006). Wie schon gezeigt, hat *P. citrinum* auf erhöhten H₂O₂-Konzentrationen seine Citrininbildung verstärkt. Die konsistente und hohe Citrininbildung dieser Spezies bei erhöhten NaCl-Konzentrationen ist möglicherweise auf erhöhten oxidativen Stress, der durch hohe NaCl-Mengen im Medium induziert wird, zurückzuführen. Durch die hohe Citrininbildung wird *P. citrinum* vermutlich in die Lage versetzt, sich in salzhaltigen Habitaten besser durchzusetzen. Bei *P. expansum* hat sich die Citrininkonzentration nach anfänglicher Induktion mit steigenden NaCl-Konzentrationen bzw. osmotischem

Stress allmählich wieder reduziert. Die Citrininbildung bei *P. expansum* korrelierte mit dem Wachstum. Das Wachstum ging auf hohen NaCl-Konzentrationen stark zurück. Die Erhöhung der NaCl-Konzentration im Wachstumsmilieu bedeutet eine Reduktion der Wasseraktivität dieses Milieus. Die Abnahme in der Citrininbildung bei *P. expansum* liegt möglicherweise an der Reduktion der Wasseraktivität, wobei in einem vorherigen Versuch gezeigt werden konnte, dass die Reduktion der Wasseraktivität zur kompletten Hemmung des Wachstums von *P. expansum* führte. Bei *P. verrucosum* sind Citrinin- und Ochratoxinbildung unter Salzstressbedingungen mutuell reguliert. Diese Spezies bildet Citrinin bei moderaten NaCl-Mengen. Die Citrininbiosynthese verringert sich mit steigenden NaCl-Konzentrationen. Ab einer bestimmten NaCl-Konzentration wird Ochratoxin A gebildet und steigt mit zunehmenden NaCl-Mengen bzw. unter hyperosmotischen Stressbedingungen an. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen von Schmidt-Heydt et al. (2012) überein.

Die Variabilität in der Citrininbildung innerhalb der drei Spezies deutet auf eine Variabilität in der Adaptation hin. Im Gegensatz zur Spezies *P. citrinum*, die sowohl auf niedrigen als auch auf hohen NaCl-Konzentrationen hohe Citrininmengen gebildet hat, war eine starke Zunahme in der Citrininbildung bei *P. verrucosum* und *P. expansum* nur im Bereich von 5-10 g/l NaCl und danach gingen die gebildeten Citrininmengen allmählich herunter. Parallel dazu hat sich das Wachstum beider Spezies verschlechtert. Dies ist ein starker Hinweis, dass *P. verrucosum* und *P. expansum* nicht so gut an Substrate mit hohen NaCl-Konzentrationen adaptiert sind, wie *P. citrinum*. *P. citrinum* als starker Citrininbildner und *P. nordicum* als starker Ochratoxinbildner können sogar in reinem Salz bzw. Salzseen gefunden werden (Butinar et al., 2011). Und wie oben erwähnt führen erhöhte NaCl-Mengen neben dem osmotischen Stress auch zur Erhöhung des oxidativen Stresses. Citrininbildner sollten daher aufgrund der antioxidativen Eigenschaften einen Wachstumsvorteil unter diesen Bedingungen besitzen. Dies war bei *P. citrinum* deutlich zu beobachten. *P. verrucosum* und *P. expansum* bilden im Gegensatz zu *P. citrinum* geringere Mengen an Citrinin, was mit der Durchsetzungsfähigkeit unter höheren NaCl-Konzentrationen korreliert.

Aufgrund der Ergebnisse über die Umweltfaktoren ist festzustellen, dass Veränderungen dieser Faktoren einen großen Effekt auf die Citrininbildung bei

diesen Spezies haben. Die Umweltfaktoren konnten sogar zur kompletten Inhibierung der Citrininbiosynthese führen. Während bei *P. expansum* und *P. verrucosum* die Umweltfaktoren einen starken Einfluss auf die Citrininbiosynthese ausübten, hatten diese einen geringeren Einfluss auf *P. citrinum*. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Citrininmutante von *P. citrinum* auf PDA mit 10 mM H₂O₂ nicht in der Lage war zu wachsen. Es ist auch bereits beschrieben, dass Citrinin als Schutzfaktor gegen Licht gebildet wird (Størmer et al., 1998). Diese Eigenschaft wurde von Schmidt-Heydt et al. (2015) bestätigt. Die nahezu konstitutive Bildung von Citrinin durch *P. citrinum* deutet darauf hin, dass Citrinin das ubiquitäre Vorkommen dieser Spezies, auch in verschiedenen extremen Habitaten unterstützt. *P. expansum* und *P. verrucosum* kommen in der Regel nur in bestimmten Habitaten vor. Bei beiden Spezies ist die Citrininbildung unterschiedlich und stark reguliert, das sich mit den beschränkteren Habitaten dieser beiden Spezies deckt. Außerdem bilden beide Spezies weitere Mykotoxine, wie Patulin und Ochratoxin A, die eventuell die Adaptation an andere Habitate unterstützen. Im Fall von *P. verrucosum* konnte Stoll et al. (2013) zeigen, dass diese Spezies die Bildung von Ochratoxin A bzw. Citrinin je nach Umweltbedingungen anpassen kann. Unter Bedingungen, in denen hohe Salzkonzentrationen vorkommen, z. B. fermentierte Oliven, bildet *P. verrucosum* hauptsächlich Ochratoxin A. Unter Bedingungen von erhöhtem oxidativen Stress, z. B. bei Kontamination von Getreide unter Feldbedingungen, bildet diese Spezies vermehrt Citrinin.

Rolle des HOG-Signalwegs in der Regulation der Citrininbildung

Die Rolle von HOG-Signalweg in der Ochratoxinbildung bei *P. verrucosum* ist in der Literatur beschrieben (Stoll et al., 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei *P. verrucosum* der Phosphorylierungslevel des Hog1 mit der Erhöhung von NaCl auf YES-Medium korreliert. Außerdem konnte durch die Deletion des *hog1*-Gens gezeigt werden, dass HOG eine wichtige Funktion bei der Regulation der Ochratoxinbiosynthese bei *P. verrucosum* hat (Stoll et al., 2013). Bei der Citrininbildung wurde jedoch kein großer Unterschied zwischen dem Wildtyp und den *hog1*-Mutanten beobachtet. In der Literatur sind auch Studien zu finden, welche die Rolle des HOG-Signalwegs bei der Mykotoxinbiosynthese aufklären konnten. Ochiai et al. (2007) untersuchten die Rolle dieses Signalwegs in der Regulation der Trichothecenbildung in *Fusarium graminearum*. Außerdem konnten Graf et al. (2012)

die Beteiligung des HOG-Signalwegs bei der Alternariolbildung in *Alternaria alternata* (*A. alternata*) nachweisen. Mittels Western Blot stellte sich dabei heraus, dass die Phosphorylierung des Hog1 mit der Alternariolbildung korreliert. Darüber hinaus beschrieben die Autoren eine Hog1-Mutante, die gegenüber dem Wildtyp nicht in der Lage war, Alternariol zu produzieren. Aufgrund dieser Daten wurde vermutet, dass der HOG-Signalweg eventuell für die Citrininregulation eine Rolle spielt. In dieser Arbeit konnten mittels der Blast-Funktion des NCBI und PCR-Reaktionen Homologe des Transkriptionsfaktors Hog1 in *P. citrinum*, *P. expansum* und in *P. verrucosum* gefunden werden. Um die Funktion des HOG-Signalwegs bei der Citrininbildung zu verstehen, wurde in dieser Arbeit das *hog1*-Gen, das für den Transkriptionsfaktor Hog1 codiert, in *P. citrinum* und *P. expansum* ausgeschaltet. Bei *P. citrinum* konnten trotz mehreren Versuchen keine reinen Transformanten, sondern nur heterokaryote Stämme erzeugt werden. Im Vergleich zum Wildtyp bildete das Heterokaryon deutlich geringere Mengen an Citrinin. Außerdem zeigte die Mutante (Heterokaryon) einen anderen Phänotyp als der Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass der HOG-Signalweg bei *P. citrinum* für die Citrininbildung wichtig ist. Bei *P. expansum* scheint es, dass die Citrininregulation über diesen Signalweg anders ist als bei *P. citrinum*. Während bei *P. citrinum* die Hog-Mutante weniger Citrinin bildete, haben die Hog-Mutanten von *P. expansum* ihre Citrininbildung verstärkt. Bei mehreren Transformanten war nach der Hog-Inaktivierung eine Zunahme der Citrininbildung festzustellen. Die Transformanten wurden mittels Southern Blot überprüft und es zeigte sich, dass das *hog1*-Gen durch die Transformation inaktiviert werden konnte. Es scheint, dass der HOG-Signalweg einen negativen Effekt auf die Citrininbiosynthese bei *P. expansum* hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit vorherigen Daten in der Literatur überein. In *A. alternata* haben Graf et al. (2012) gezeigt, dass die Alternariolbildung durch die Inaktivierung des *hog1*-Gens komplett ausgeschaltet war. Die Signalkaskaden haben nicht immer dieselbe Funktion. Eine Signalkaskade kann bei bestimmten Spezies einen positiven Einfluss haben und bei anderen Spezies einen negativen Effekt. Die jeweilige Wirkung der Signalkaskaden hängt von den Spezies und den Wachstumsbedingungen ab (Yin et al., 2017).

Rolle des cAMP-Signalwegs in der Regulation der Citrininbildung

In der Literatur ist beschrieben, dass der cAMP-Signalweg an verschiedenen zellulären Prozessen in filamentösen Pilzen involviert ist. Dabei spielen die

intrazelluläre cAMP-Konzentration, α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins und die PKA eine wichtige Rolle. Die Rolle des cAMP/PKA-Signalwegs in der Mykotoxinbildung wurde in *Aspergillus* spp. weitgehend erforscht (Hicks et al., 1997; Roze et al., 2004; Shimizu et al., 2001). Hicks et al. (1997) konnten herausfinden, dass die Regulation des Wachstums, der Sterigmatocystin- und der Konidienbildung bei *A. nidulans* unter der Kontrolle eines G-Proteins ist. In dieser Arbeit wurde die Beteiligung des cAMP-Signalwegs in der Citrininbildung bei drei *Penicillium* Spezies untersucht. Die Untersuchung der Rolle dieses Signalwegs erfolgte durch die Zugabe vom exogenen cAMP zum Nährmedium. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Citrininbildung bei den drei Spezies durch die Zugabe vom externen cAMP zum Medium verstärkt hat. Je stärker die cAMP-Konzentration war, desto mehr Citrinin wurde von den Pilzspezies gebildet. Wobei der Effekt vom cAMP auf die Citrininbildung bei *P. expansum* und *P. verrucosum* stärker war, als bei *P. citrinum*. Bei *P. citrinum* hat sich die Citrininkonzentration mit erhöhten cAMP-Mengen auch verbessert aber nicht so stark wie bei den anderen Spezies. Die Erhöhung der Citrininbildung auf steigenden cAMP-Konzentrationen deutet auf eine wichtige Rolle dieses Botenstoffs in der Citrininregulation hin. Ein ähnlicher Effekt von cAMP auf die Induktion der Bildung anderer Mykotoxine wurde in einigen Studien beschrieben. In einer Studie wurde gezeigt, dass das Wachstum von *A. parasiticus* auf einem mit cAMP supplementierten Medium zur Verstärkung der Aflatoxinbildung führte (Tice and Buchanan, 1981). Diese positive Wirkung von cAMP wurde weiterhin durch Roze et al. (2004) bestätigt. Diese Autoren versuchten die Funktion von FadA (α -Untereinheit des G-Proteins), cAMP und PKA in der Regulation der Konidien- und Aflatoxinbildung in *A. parasiticus* zu erklären. Sie supplementierten GMS-Agar Medium mit cAMP oder Dibutyryl-cAMP (DcAMP) verschiedener Konzentrationen. Anschließend wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration bei *A. parasiticus* gemessen. Genauso wie die Ergebnisse von Tice und Buchanan (1981) haben diese Autoren herausgefunden, dass die Zugabe von cAMP die Aflatoxin- und die Konidienbildung fördert. Da die Citrininbildung bei den drei *Penicillium* Spezies zugenommen hat, scheint es, dass die durch cAMP aktivierte PKA den Transkriptionsfaktor *ctnR* aktiviert, der im Citrinincluster die Expression der Citriningene aktiviert.

Rolle des globalen Regulators VeA in der Citrininbildung

Bei der Regulation der Biosynthese von Mykotoxinen sind neben den spezifischen Signalkaskaden auch komplexe globale Regulatoren notwendig. Dazu zählt z. B. das VeA Protein der filamentösen Pilze (Myung et al., 2012). Das Protein pendelt zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma. Im Licht lokalisiert VeA im Zytoplasma. Im Dunkeln wird es in den Zellkern via das Protein α -importin KapA transportiert (Stinnett et al., 2007). Dort interagiert VeA mit den Proteinen VelB und LeA und bildet den VelB-VeA-LeA-Komplex. VeA ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Vor allem ist es für die Lichtantwort und die Regulation der Sekundärmetabolitenbildung wichtig. Die Rolle von VeA bei der asexuellen/sexuellen Entwicklung wurde in *A. nidulans* beschrieben. Im Licht führte das aktive VeA zur Reduktion der Bildung von Kleistothecien, den Fruchtkörpern, in denen die Ascosporen gebildet werden. Dadurch dominiert die asexuelle Entwicklung. In Dunkelheit werden die Kleistothecien gebildet und der Pilz entwickelt sich sexuell (Kim et al., 2002). Außerdem konnten Kato et al. (2003) herausfinden, dass VeA für die Regulation der Biosynthese des Mykotoxins Sterigmatocystin und des Antibiotikums Penicillin eine Rolle spielt. Bei der Sterigmatocystinbiosynthese aktiviert VeA die Expression des Transkriptionsaktivators AfIR, der wiederum die Gene für die Bildung von Sterigmatocystin reguliert. Bereits durchgeführte Studien von Spröte and Brakhage (2007) über VeA zeigten, dass VeA die Bildung von Penicillin inhibiert. Dies geschieht durch die Inhibierung der Expression des *acvA*-Gens, das eins der drei Enzyme, die für die Penicillinbildung wichtig sind, kodiert. Aufgrund dieser Daten wurde eine Rolle von VeA bei der Citrininbildung vermutet. Daher wurde VeA in den drei *Penicillium* Spezies ausgeschaltet. Bei *P. expansum* führte die VeA-Inaktivierung zur Hemmung der Citrininbildung. Außerdem wurde bei der VeA-Mutante eine große phänotypische Veränderung gegenüber dem Wildtyp beobachtet. Auch bei *P. verrucosum* und *P. citrinum* konnte der gleiche Effekt beobachtet werden. Die erzeugten *P. verrucosum* Mutanten, waren weder in der Lage Citrinin noch Ochratoxin A zu bilden. Dies deutet stark darauf hin, dass beide Mykotoxine Citrinin und Ochratoxin A über VeA reguliert sind. Bei *P. citrinum* war der Effekt der VeA-Inaktivierung noch stärker. Bei dieser Spezies wurden auch weitere extrahierbare Sekundärmetabolite, die beim Wildtyp mittels DC detektierbar waren, von den VeA-Mutanten nicht mehr gebildet.

Im Gegensatz zu den HOG- und PACC-Signalwegen, die bei den unterschiedlichen Spezies unterschiedliche Wirkungen haben, hat das VeA bei den drei Spezies einen vergleichbaren Einfluss. Bei allen Spezies führte die Inaktivierung von VeA Zur Reduktion der Citrininbildung und zu einer pleiotropen und gleichen Veränderung der Morphologie.

Nach den Inaktivierungsversuchen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, kamen bei der Überprüfung der Transformanten mittels Southern Blot verschiedene Ergebnisse heraus. Neben der Integration des gesamten Inaktivierungskonstruktes, konnte auch eine teilweise Integration festgestellt werden. Außerdem kam es öfter zur Deletion des zu inaktivierenden Gens. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit einigen Daten in der Literatur, die die Entstehung von solchen Fällen erklären (Monfort et al., 2003). Gerade Stämme, die aus der natürlichen Umgebung isoliert wurden, wie die hier bearbeiteten Stämme, können bei integrativen Transformationen zu unerwarteten Ergebnissen führen. Die Entstehung von heterokaryoten Transformanten war ebenfalls zu beobachten. Bei filamentösen Pilzen sind die vegetativen Zellen multinukleat. Es kommen in der Regel mehrere Kerne in einer Zelle vor. Bei Einzelsporkulturen des Wildtyps sind die vielen Kerne genetisch identisch, stellen also ein Homokaryon dar. Während der Transformation werden manche Kerne getroffen und andere nicht. Dies führt zur Entstehung von Heterokaryote Stämme.

Rolle von Citrinin bei der Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum*

Die Äpfel sind durch die Schale gut geschützt und eine Infektion erfolgt an geschädigten oder verletzten Äpfeln. Ein Zusammenhang zwischen der Toxinbildung und der Infektion von Pflanzen durch pathogene Pilze ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In der Literatur gibt es einige Daten über verschiedene Studien, die eine Funktion von Mykotoxinen in der Kolonisierung von bestimmten Habitaten durch filamentöse Pilze angedeutet haben. Desjardins et al. (1992) haben das *Tox5*-Gen, das für die Polyketidsynthese für die Trichothecenbiosynthese, in *Gibberella pulicaris* inaktiviert. Die *Tox5*-Inaktivierung führte zur starken Reduktion der Kolonisierung von Pastinakenwurzeln. Ein solcher Effekt wurde auch bei der Infektion von Äpfeln durch *P. expansum* beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Patulin die Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum* unterstützt. Die vorhandenen Daten über die Rolle von Patulin in der Infektion von Äpfeln sind jedoch nicht einheitlich. Sanzani und

Mitarbeiter (2012) beschrieben, dass Patulin ein Pathogenitätsfaktor für die Kolonisierung von Äpfeln darstellt. Sie inaktivierten das *patK*-Gen, das die Patulinpolyketidsynthase kodiert (6-methyl-Salisylsäuresynthase). Dieses Enzym ist für den ersten Schritt bei der Patulinbiosynthese, die Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA Molekülen, notwendig. Trotz *patK*-Inaktivierung waren die Mutanten in der Lage niedrige Mengen an Patulin zu bilden. Außerdem impften die Autoren die charakterisierten Mutanten und den Wildtyp auf Äpfeln an. Der Wildtyp konnte normal infizieren während die Mutanten eine reduzierte Infektion zeigten. Nach der Komplementation des *patK*-Gens bei den Mutanten wurde die normale Infektionsfähigkeit zurückerhalten. Die Rolle von Patulin in der Kolonisierung von Äpfeln wurde auch von Barad et al. (2014) untersucht. Die Inaktivierung des *IDH*-Gen, das für die Patulinbiosynthese eine Rolle spielt, führte zur großen Reduktion der Patulinbildung. Die *IDH*-Mutanten waren auch in der Apfelpathogenität sehr reduziert. Auch Ballester et al. (2015) inaktivierten die Polyketidsynthase für die Patulinbiosynthese (*PatK*). Es gelang ihnen Mutanten zu erzeugen, die kein Patulin produzieren konnten. Jedoch konnten sie keinen Zusammenhang zwischen der Patulinbildung und der Infektion von Äpfeln zeigen. Durchgeführte Pathogenitätsversuche dieser Autoren zeigten, dass die Patulinmutanten Äpfel genauso wie der Wildtyp infizieren konnten. Eine neue Studie wurde von Snini et al. (2016) veröffentlicht. Diese Autoren konnten zeigen, dass Patulin zwar ein Kolonisierungsfaktor ist, jedoch seine Pathogenitätswirkung stark von den jeweils infizierten Apfelsorten abhängt (Snini et al., 2016). In dieser Arbeit wurde die Patulinbildung bei *P. expansum* auf verschiedenen Apfelsorten in einer Kinetik untersucht. Es zeigte sich, dass Patulin durch *P. expansum* auf allen untersuchten Sorten in hohen Mengen gebildet wird. Zudem konnte die Patulinbildung schon früh, ab dem dritten Tag der Wachstumskinetik nachgewiesen werden. Ferner wurde die Expression des *patK*-Gens in der ganzen Wachstumsphase auf den verschiedenen Apfelsorten gemessen. Es erwies sich, dass das *patK*-Gen während der gesamten Kinetik hoch exprimiert wird. Allerdings unterschied sich die Tendenz der Bildung sowie der *patK*-Expression zwischen den verschiedenen Apfelsorten. Diese Daten sprechen für eine wichtige Rolle von Patulin bei *P. expansum* auf Äpfeln. Die frühe Bildung von Patulin deutet darauf hin, dass Patulin vermutlich für die erste Phase der Infektion von Bedeutung ist. Dennoch scheint es, dass die Patulinregulation stark von den unterschiedlichen Apfelsorten abhängt, was die Ergebnisse von Snini et al.

(2016) bestätigt. Während die Rolle von Patulin auf Äpfeln weitgehend aufgeklärt werden konnte, wurden bisher keine Studien über die biologische Bedeutung von Citrinin bei der Kolonisierung von Äpfeln durchgeführt. Da *P. expansum* auch das Mykotoxin Citrinin bilden kann, war die Arbeitshypothese dieser Arbeit, dass Citrinin bei der Kolonisierung von Äpfeln durch *P. expansum* eine biologische Rolle spielt. Daher erfolgten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Versuche auf Äpfeln. Die Untersuchung der Kinetik der Citrininbildung auf Äpfeln durch *P. expansum* ergab, dass Citrinin erst nach längeren Inkubationszeiten in geringer Menge nachgewiesen werden konnte, obwohl die *pksCT*-Expression schon früh, d. h. nach drei Tagen Wachstum des Pilzes auf Äpfeln induziert wurde. Dies ist im starken Gegensatz zur Citrininbildung auf Labormedien. Die Untersuchung der Citrininbildung bei *P. expansum* auf PDA-Medium zeigte, dass Citrinin über die gesamte Zeitkinetik gebildet wird. Dies ist in Übereinstimmung mit einigen Daten in der Literatur, die zeigen, dass Citrinin auf Äpfeln mit den analytischen Methoden nur in geringen Mengen nachgewiesen werden kann, während die entsprechenden Stämme auf Labormedien hohe Mengen an Citrinin bilden (Dietrich et al., 2001; Martins et al., 2002; Pepeljnjak et al., 2002). Die späte Nachweisbarkeit von Citrinin auf Äpfeln trotz der hohen und frühen Expression des *pksCT*-Gens kann auf verschiedene Gründe zurückgeführt werden. Es besteht z. B. die Möglichkeit einer posttranskriptionellen Regulation, die zu einer Verzögerung der Bildung des Citrinins führen könnte. Die erzielten Ergebnisse zeigen aber, dass zwei andere Mechanismen für die verzögerte analytische Nachweisbarkeit von Citrinin in der Apfelmatrix eine Rolle spielen. Eine Möglichkeit, die die Nachweisbarkeit von Citrinin verhindert, ist die Bindung an Bestandteile der Apfelmatrix. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass das Pektin eine starke Bindung mit Citrinin eingehen kann und Citrinin auf diese Weise dem Nachweis entziehen kann. Als eine andere Ursache für die verzögerte Detektion von Citrinin auf Äpfeln wurde eine Degradation dieses Toxins durch die ROS, die von den Äpfeln während der Infektion vermehrt gebildet werden, vermutet. Durch die Messung der Abbauprodukte des Citrinins mit der LC-DAD-MS konnte gezeigt werden, dass bei späteren Inkubationszeiten von *P. expansum* auf Äpfeln neben kleineren Mengen an Citrinin auch drei Citrininderivate gefunden werden können. Die Ergebnisse bestätigen, dass Citrinin von *P. expansum* offensichtlich während des Wachstums auf Äpfeln produziert wird, es aber während der frühen Wachstumsphase teilweise durch Pektin gebunden oder durch die inhärente ROS-

Aktivität degradiert wird. Offensichtlich kann Citrinin erst nach Sättigung des Pektins, bzw. nach Reduktion der ROS-Aktivität durch seine antioxidative Wirkung, d. h. in der späten Wachstumsphase in nachweisbaren Mengen gebildet werden. Patulin besitzt diese Eigenschaften offensichtlich nicht, da es schon früh in der Wachstumsphase in großen Mengen nachgewiesen werden kann. Um zu untersuchen welche Rolle Citrinin bei der Infektion von Äpfeln spielt, wurde der *P. expansum* Wildtyp und eine der charakterisierten *pksCT*-Mutanten auf Äpfeln der Sorten Granny Smith und Braeburn angeimpft und deren Wachstum untersucht. Während der Wildtyp auf Äpfeln der beiden Sorten normal wachsen konnte, war die Mutante nicht in der Lage normal zu wachsen. Das Wachstum der Mutante war sehr reduziert. Sie konnte zwar infizieren, jedoch nicht normal weiterwachsen. Die Zugabe von Citrinin zur Infektionsstelle verstärkte das Wachstum der *pksCT*-Mutante. Ascorbinsäure zählt zu den bekanntesten Antioxidantien und ist durch ihre antioxidativen Wirkung bekannt. Die Infektion der Äpfel durch *P. expansum* war nach der Zugabe von Ascorbinsäure deutlich verbessert. Die Verbesserung der Kolonisierung deutet stark darauf hin, dass die Stärke der Infektion auf antioxidative Eigenschaften von Ascorbinsäure zurückzuführen ist. Da Citrinin auch antioxidativ wirkt, ist das ein weiterer Beweis, dass Citrinin bei der Infektion von Äpfeln bei *P. expansum* eine wichtige Rolle spielt (Heider et al., 2006; Touhami et al., 2018). Die bisherige Situation zeigt, dass Citrinin eine Rolle bei der Kolonisierung von Äpfeln bei *P. expansum* spielt. Dies steht im Einklang mit einigen Daten in der Literatur, die zeigen, dass Mykotoxine als Pathogenitätsfaktoren agieren können. Graf et al. (2012) konnten zeigen, dass Alternariol, ein Mykotoxin, das u. a. von *A. alternata* gebildet wird, für die Infektion von Tomaten durch diese Spezies wichtig ist. Derselbe Effekt wurde auch von Geisen et al. (2016) beschrieben.

Eine reduzierte Infektion der Äpfel wurde auch bei der PacC-Mutante von *P. expansum* beobachtet. Wobei der Effekt bei der PacC-Mutante auf die Infektion noch stärker, als der Effekt bei der *pksCT*-Mutante war. Während die *pksCT*-Mutante geringfügig infizieren konnte, war die PacC-Mutante nicht dazu in der Lage. Dies deutet darauf hin, dass bei der Infektion von Äpfeln neben Patulin und Citrinin auch andere durch den PacC-Transkriptionsfaktor regulierte Gene eine wichtige Rolle spielen. Verschiedene Studien zeigten, dass der pH-Wert der von *P. expansum* kolonisierten Äpfel mit Zunahme der Infektion stark sinkt. Zudem wurde herausgefunden, dass bei der Infektion *P. expansum* hohe Mengen an Aminosäuren,

Zitronensäure und Kohlensäure bildet (Pruskey et al., 2004). Außerdem konnte die Infektion von Äpfeln durch *P. expansum* durch die Behandlung von Äpfeln mit exogener Citronen- und Kohlensäure verstärkt werden. Die Veränderung des pH-Wertes in Wirtspflanzen wurde auch bei anderen pathogenen Pilzen nachgewiesen. Im Jahre 2001 stellten Rollins und Dickmann einen solchen Effekt fest. Sklerotinia, auch Weißstängeligkeit genannt, ist eine weit verbreitete Pflanzenkrankheit und wird von dem Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* verursacht. Während der Entwicklung der Krankheit wurden hohe Mengen an Oxalsäure gemessen. Die Bildung von Oxalsäure in den Wirtspflanzen verschiebt den pH-Wert in Richtung tieferer Säurewerte. Dieser Vorgang ist wichtig für die Funktion von hydrolytischen Enzymen, wie die Polygalacturonase (Bateman et al., 1976; Lumsden, 1976). Laut diesen Daten ist festzustellen, dass die Azidifizierung der Wirtspflanzen für die Infektion notwendig ist. Bei dieser Säureregulation spielt wahrscheinlich der PACC-Signalweg eine Rolle, wie auch die hier vorgestellten Arbeiten gezeigt haben. In den hier vorgestellten Arbeiten wurde weiterhin gezeigt, dass PACC, neben den oben genannten Einflüssen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Citrininbildung spielt. Die PacC-Mutante von *P. expansum* konnte, im Gegensatz zum Wildtyp, bei tiefen pH-Werten nahezu kein Citrinin bilden. Citrinin ist aber, wie oben diskutiert, für die Kolonisierung förderlich. Dies zeigt die Bedeutung der PacC-Regulation der Citrininbildung, besonders im sauren Milieu der Apfelmatrix.

Abschließend kann die Bedeutung der Citrininbildung in der folgenden Tabelle zusammengefasst werden.

Tab. 1: Biologische Bedeutung der Citrininbildung.

Spezies	Habitat	Citrinin	Mögliche biologische Funktion
<i>P. verrucosum</i>	Getreide und in salzhaltigen Habitaten	regulierte, moderate Citrininbildung; mutuell reguliert im Verhältnis zu Ochratoxin A; die Bildung hängt stark von den Umweltbedingungen ab	Citrininbildung unter oxidativen Stressbedingungen (z. B. Wachstum im Feld/Getreide/Licht); Ochratoxinbildung unter osmotischen Stressbedingungen und im Dunkeln (Silo/Lagerung)
<i>P. expansum</i>	Früchte (Äpfel) und in salzhaltigen Habitaten	regulierte, moderate Citrininbildung; stark abhängig von Umweltbedingungen; unabhängig, bzw. parallel zur Patulinbildung	Citrininbildung reguliert durch PACC; Schutz gegen ROS bei der Infektion von Äpfeln; wichtig für die Etablierung der Kolonisierung
<i>P. citrinum</i>	ubiquitär, Früchte, Nüsse und in salzhaltigen Habitaten	hohe Citrininmengen; nahezu konstitutive Bildung	fördert das ubiquitäre Vorkommen; hohe Resistenz gegen oxidativen Stress

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die drei Spezies unterschiedliche Habitate besiedeln. Aufgrund der erzielten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die gebildeten Mykotoxine die Adaptation an die verschiedenen Habitate unterstützen.

5 Material und Methoden

5.1 Pilzstämme

In dieser Arbeit wurden folgende Pilzstämme verwendet:

P. expansum BFE189 und BFE1393: Beide Stämme wurden aus kolonisierten Äpfeln isoliert.

P. verrucosum BFE808: Dieser Stamm wurde aus Getreide isoliert.

P. citrinum BFES12: Dieser Stamm wurde aus fermentierten Fleischprodukten isoliert.

5.2 Materialien

Tab. 2: Verwendete Primer.

Name	Sequenz	Tm [°C]
Aristo 1	5'-CAG GAC GAA CTC GAT GGA TAC -3'	51
OTApks 1 rev	5'-TAC GGC CAT CTT GAG CAA CGG CAC TGC C -3'	71
OTApks 2 for	5'-ATG CCT TTC TGG GTC CGA TA -3'	57,3
For_orf_MP	5'-CAG CAG CCA GAA TCC TAG AAG-3'	59,8
Rev_orf_MP	5'-CCG ATG TGT GTC GTC TCG TC-3'	61,4
For_ctnR_MP	5'-ACC CAT TGT CAA CTC CCC TG-3'	59,4
Rev_ctnR_MP	5'-AAC ACT GTA TTG CTG AGC GTG A-3'	58,4
For_ctnA_MP	5'-AGT GGT GGT TGT GCG CTC-3'	58,2
Rev_ctnA_MP	5'-ATG CCC ATC TCA ACC AAG TC-3'	57,3
For_ctnB_MP	5'-CAG ACA GGG CTT CGC TCA C-3'	61
Rev_ctnB_MP	5'-ATC TGA TAC GCA ACG AGC GA-3'	57,3
For_ctnC_MP	5'-TAA AGC GAC TCA AAG CCC G-3'	56,7
Rev_ctnC_MP	5'-CGC GAT TGC CAT CTC TTT AT-3'	55,3
For_ctnR	5'-CTC TGA TGG ACA GCG GGA AT-3'	59,4
Rev_ctnR	5'-AGC GAT CTG CTG CTC TCT ACT-3'	59,8
Patk_P.exp_for	5'-ATA TCC GCC ATC GCA GGC GT-3'	61,4
Patk_P.exp_rev	5'-CTC GGC ACT AGG AAG GTT GAC A-3'	62,1
Patk_int_for	5'-CTG CGT GAG TGG ATG ACT GC-3'	61,4
Patk_int_rev	5'-GCT GCT CGG TGA TCAT GAT GA-3'	59,8

PacC_P.exp_for	5'-CTC TTC TGC GGA GAA ACC CCC A-3'	64
PacC_P.exp_rev	5'-TGC AAG TGC CCC ACT GGC AG-3'	63,5
pksCT_P.exp_for	5'-AAG TTT GCC GAC TGC ATT ACT-3'	55,9
pksCT_P.exp_rev	5'-AGC GAG ATT CCC CTG ACC TT-3'	59,4
pksCT_int_for	5'-AAG TTT GCC GAC TGC ATT ACT-3'	51
pksCT_int_rev	5'-GAG ATT TGG CAT AGA CGT CAG TC-3'	52
P.S_pksCT_for	5'-CAT GGC CTC AGG CAC TAT CA-3'	53
P.S_pksCT_rev	5'-CCC GAC CAT GCT CCA TGC TC-3'	56
VeA_for	5'-ATG GCC AAC AGA CCA CCC AT-3'	59,4
VeA_rev	5'- AGG TGC GAT TGA TAT GAG GGT G-3'	60,3
P.S_VeA_for	5'-GGC CAA CAG ACC ACC CAT C-3'	55
P.S_VeA_rev	5'-CCC TGC TCA GCA ATG ATA CG-3'	53
PV_bentaq_for	5'-CTA GGC CAG CGG TGA CAA GT-3'	61,4
PV_bentaq_rev	5'-CAT GGT ACC GGG CTC CAA-3'	58,2
ITS 1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	61
ITS 4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	55,3

Die gesamten Primer wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert.

Nährmedien

Tab. 3: Verwendete Nährmedien.

Nährmedium	Zusammensetzung pro Liter
Acetamid-Minimalagar	5 g Glucose 3,75 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g MgSO ₄ 0,1 g NaCl 0,1 g CaCl ₂ 0,75 g KOH 0,59 g Acetamid 218,6 g Sorbitol 2,1 g CsCl 15 g Agar
Acetamid-Minimal-Weichagar	5 g Glucose 3,75 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g MgSO ₄

	0,1 g NaCl 0,1 g CaCl ₂ 0,75 g KOH 0,59 g Acetamid 218,6 g Sorbitol 2,1 g CsCl Weichagar wird auf 200 ml-Kolben verteilt und jeweils 1,6 g Agar dazu eingewogen. Nach dem Autoklavieren wird dieses Medium aufbewahrt und erst bei Gebrauch in der Mikrowelle aufgekocht.
LB-Agar	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 16 g Agar pH 7,5
LB-Bouillon	5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 10 g Trypton
MG-Agar	1 l MG-Bouillon 15 g Agar
MG-Bouillon	17 g Malzextrakt 5 g Glucose
YES-Medium (<i>Yeast extract sucrose</i>)	1000 ml YES-Bouillon 20 g Agar
YES-Bouillon	20 g Hefeextrakt 150 g Saccharose
YES-Sorbitol-Bouillon	1000 ml YES-Bouillon 218,6 g Sorbitol
Kartoffel-Agar (PDA)	4 g Kartoffelextrakt 20 g Glucose 16 g Agar

Tab. 4: Verwendete Lösungen.

Lösungen	Zusammensetzung
20x SSC-Puffer	175,2 g NaCl 88,23 g Trinatriumcitrat Auf 1000 ml mit ddH ₂ O auffüllen
Ampicillin-Stammlösung	100 mg Ampicillin 1 ml H ₂ O bei -20°C lagern
Blockierungslösung für Southern Blot	20 g Blocking Reagenz 200 ml Maleinsäurepuffer 1h bei 60°C lösen, bei 4°C lagern
Denaturierungslösung	48,8 g NaCl 10 g NaOH Auf 500 ml mit ddH ₂ O auffüllen
Depurinierungslösung	12,5 ml 37% HCl Auf 500 ml mit ddH ₂ O
Detektionspuffer	12,1 g Tris 5,8 g NaCl Auf 1l mit ddH ₂ O
IPTG	0,24 g IPTG Auf 10 ml ddH ₂ O Bei -20°C lagern
Maleinsäure-Puffer	11,6 g Maleinsäure 8,8 g NaCl auf 1 l mit ddH ₂ O pH 7,5
Neutralisierungslösung	87,6 g NaCl 30,3 g Tris auf 500 ml mit ddH ₂ O pH 7,5
Prähybridisierungslösung	50 ml 20x SSC-Puffer 150 ml H ₂ O 0,2 g N-Lauroylsarcosin 0,04 g SDS 2 g Blocking Reagenz Lösung 1h bei 60°C lösen, bei -20°C aufbewahren. Nicht Autoklavieren

Waschlösung I	0,5 g SDS 50 ml 20x SSC-Puffer Auf 500 ml H ₂ O auffüllen
Waschlösung II	0,5 g SDS 2,5 ml 20x SSC-Puffer auf 500 ml H ₂ O
Waschpuffer	11,6 g Maleinsäure 8,8 g NaCl 3 ml Tween-20 Auf 1l mit ddH ₂ O pH 7,5 (mit NaOH-Plätzchen einstellen)
X-Gal Lösung	0,015 g X-Gal 500 µl Dimethylformamid Bei -20°C lagern, Lösung im Dunkeln lagern

Tab. 5: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
Acetamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agar	Serva, Heidelberg, Deutschland
Agarose Serva	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim, Deutschland
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cäsiumchlorid	Renner, Dannstadt, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Digoxigenin	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Lysing Enzyme von Trichoderma harzianum</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Maleinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Malzextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-Lauroylsarcosin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ochratoxin A	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Sorbitol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Toluol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trinatriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20/Tween 80	Serva, Heidelberg, Deutschland
Xylencyanol	Genaxxon, Biberach, Deutschland
β -Glucuronidase von <i>Helix pomatia</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 35%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 6: Verwendete Kits.

Kits	Hersteller
Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
iQ SYBR Green Supermix	BioRad, München, Deutschland
JustSpin-Columns	Genaxxon, Biberach, Deutschland
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
OxiSelect In Vitro ROS/RNS Assay Kits	Cell Biolabs, San Diego, Deutschland
PCR DIG Labeling Mix	Roche, Mannheim, Deutschland
pGEM-T Easy Vector System-I	Promega, Mannheim, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR PeqGold kit	Peqlab Erlangen, Deutschland

Tab. 7: Verwendete Geräte.

Geräte	Hersteller
ChemiDoc XRS System	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophoresekammern	Peqlab, Erlangen, Deutschland
iQ5 Real-Time PCR detection system	Bio-Rad, München, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
NanoDrop 1000 Spektrophotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Spectrafluor-Plus Fluorescence and Absorbance Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Thermocycler	Bio-Rad, München, Deutschland
TLC Scanner und Visualizer	CAMAG, Muttenz, Deutschland
UV-Crosslinker	GE Healthcare, München, Deutschland
Vakuumentrifuge SpeedVac	Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA
HPLC Systems	LaChrom, Merk/Hitachi, VWR, Darmstadt, Deutschland
FastPrep-24™ 5G Homogenisator	MP Biochemicals, Santa Ana, USA

Puffer für die Pilz-Transformation

STC-Puffer

Für 200 ml:

43,8 g Sorbitol

0,24 g TRIS

0,29 g CaCl₂

auf 200 ml auffüllen

pH 7,5

KCl-Puffer (1,2 M)

Für 100 ml:

89,4 g KCl und auf 100 ml auffüllen

pH 7

PEG-Puffer

Zuerst wird die Lösung A hergestellt und dann die Lösung B.

Lösung A

0,12 g Tris

0,15 g CaCl₂

auf 100 ml mit ddH₂O

Lösung B

12 g PEG mit Lösung A auf 200 ml auffüllen

pH 7,5

5.3 Methoden

5.3.1 DNA-Isolierung

Die hier in dieser Arbeit ausgewählten Methoden sind für die DNA-Isolation aus filamentösen Pilzen geeignet. Zunächst wurde von einer frischen Vorkultur eine Sporensuspension hergestellt und davon wurden 500 µl in 250 ml MG-Bouillon in einem Erlenmeyerkolben angeimpft und für 6 Tage bei 25 °C bei 135 UPM geschüttelt. Danach wurde das Myzel mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Entscheidend für die Auswahl einer bestimmten Methode war die gewünschte DNA-Konzentration. DNA für PCR-Experimente wurde mittels DNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Für Southern Blot sollte die DNA in größeren Konzentrationen vorliegen. Aus diesem Grund wurde die DNA-Isolierung nach einem anderen Protokoll durchgeführt. Zuerst wurde das Myzel mit dem FastPrep-24TM 5G Homogenisator aufgebrochen. Hierfür wurden 200 mg vom Myzel in speziellen Säulen abgewogen und mit 600 µl von 50 mM Lysepuffer gemischt und in dem Homogenisator mit Hilfe von Metallkügelchen gut gemörsert.

Dann wurden die DNA-Proben bei 65 °C für 15 min im Heizblock inkubiert, um die Lyse zu verbessern. Nach 20 min Zentrifugation bei 13000 UPM, wurde der Überstand in neue Eppis überführt und mit 80 µl 4 M Natriumacetatlösung (NaOAc) gemischt. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis, wurde für 20 min bei 13000 UPM zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde in neue Eppis gegeben und mit 60 µl von der 3 M NaOAc-Lösung und 1500 µl vom eiskalten absoluten Ethanol gemischt. Die Proben wurden über Nacht bei -20 °C gefällt. Als Nächstes wurde für 15 min bei 13000 UPM zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde ca. 20 min in einer Vakuumzentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA) getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 200 µl 10 mM Tris-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde bei 13000 UPM zentrifugiert und der Überstand in neue Eppis gegeben. Die DNA wurde sofort weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren.

Nach der Extraktion wurde die DNA überprüft. In dieser Arbeit wurde die Konzentration sowie die Reinheit der DNA mittels Nanodrop 1000 Spektrophotometer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) gemessen.

5.3.2 PCR

Die PCR wurde in dieser Arbeit mit dem PeqGold Kit (Peqlab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde ein iCycler der Firma Bio-Rad verwendet (Bio-Rad, München, Deutschland). In dieser Arbeit wurde die PCR auf 40 Zyklen festgelegt.

Tab. 8: Reaktionsansatz für die PCR.

23,5 µl	ddH ₂ O
10 µl	5x Enhancer Solution P
5 µl	10x Reaktionspuffer S
2,5 µl	Forwärts-Primer (5 pmol/µl)
2,5 µl	Reverse-Primer (5 pmol/µl)
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
0,5 µl	Taq DNA-Polymerase (5 units/µl)
5 µl	DNA

Tab. 9: Reaktionsschritte der PCR.

Zyklen	Schritte	Zeit	Temperatur [°C]
Zyklus 1 (1x)	Schritt 1	3 min	95 °C
	Schritt 1	30 Sek	95 °C
Zyklus 2 (40x)	Schritt 2	40 Sek	∞
	Schritt 3	1 min 30 Sek	72 C
Zyklus 3 (1x)	Schritt 1	3 min	72 °C
Zyklus 4 (1x)	Schritt 1	∞	8 °C

* Die Annealingtemperatur hängt von der Zusammensetzung der Primer ab.

5.3.3 RAPD

Zur Bestimmung der Genotypen der neu isolierten *P. expansum* Stämme wurde die RAPD verwendet. Zuerst wurde die DNA aus den Stämmen mittels DNeasy Plant Mini Kit isoliert. Die PCR wurde mit dem PeqGold Kit (Peqlab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

Tab. 10: Reaktionsansatz für die RAPD.

27 µl	ddH ₂ O
10 µl	5x Enhancer Solution P
5 µl	10x Reaktionspuffer S
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1,5 µl	Aristo 1 Primer (Konzentration 100 pmol/µl)
0,5 µl	Taq Polymerase (5 units/µl)
5 µl	DNA

Tab. 11: Reaktionsschritte der RAPD.

Zyklen	Schritte	Temperatur [°C]	Zeit
Zyklus 1(1x)	Schritt 1	95 °C	2 min 50 Sek
	Schritt 1	95 °C	1 min
Zyklus 2 (45x)	Schritt 2	36 °C	1 min
	Schritt 3	72 °C	4 min
Zyklus 3 (1x)	Schritt 1	72 °C	4 min
Zyklus 4 (1x)	Schritt 1	8 °C	∞

5.3.4 Gelelektrophorese

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde zuerst das Gel vorbereitet. Für ein 1 %iges Agarosegel wurde die entsprechende Menge an Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und in 1x TBE-Puffer in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht bis sich Agarose vollständig gelöst hat. Dann wurde der Farbstoff peqGREEN (Peqlab, Erlangen, Deutschland) zum Anfärben der Nukleinsäuren hinzugegeben und gut vermischt. Die Gellösung wurde in die schon vorbereitete Gelvorrichtung gegossen, ein Kamm wurde eingesetzt und das Gel wurde für etwa 30 Minuten erstarren gelassen. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die DNA-Proben in die Geltaschen aufgetragen. Hierfür wurden 9 µl der zu analysierenden DNA-Proben mit 1,5 µl DNA-Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen eingebracht. Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurden 5 µl vom 2-Log DNA-Größenmarker mitaufgetragen. Für Southern Blot erfolgte die Auftrennung bei einer Spannung von 90 V. Bei allen anderen Gelen erfolgte die Auftrennung bei 130 V. Nach dem Laufen wurde das Gel mit dem Bio-RAD ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad, München, Deutschland) dokumentiert.

Tab. 12: Zusammensetzung des TBE-Puffers.

10x TBE-Puffer		
Stoff	Molmasse	Einzuwiegende Menge
Tris Base	121,1 g/mol	107,8 g [0,89 M]
Borsäure	61,8 g/mol	55 g [0,89 M]
EDTA	380,17 g/mol	7,4 g [0,02 M]

Die Komponenten wurden in einer Laborglasflasche eingewogen und auf 1000 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert von 8,3 ergibt sich automatisch.

Tab. 13: Zusammensetzung des DNA-Probenpuffers.

10x DNA-Probenpuffer	60 % Saccharose 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol 0,1 % Orange G 10 x TBE-Puffer
-----------------------------	---

Tab. 14: Zusammensetzung des DNA-Markers.

2-Log DNA Marker	400 µl H ₂ O 100 µl 2-Log Ladder 100 µl 6x Blue Loading Dye
-------------------------	--

5.3.5 Southern Blot

In dieser Arbeit wurde Southern Blot mehrmals durchgeführt, um die putativen Knockout-Transformanten zu überprüfen. Zunächst wurde die DNA aus dem Wildtyp und den Transformanten isoliert und mit dem *EcoRI*-Restriktionsenzym geschnitten.

Restriktionsverdau

Zum Verdau der DNA wurden 140 µl DNA, 20 µl 10x *EcoRI*-NEBuffer, 1 µl RNase (9,063 units/mg), 2 µl *EcoRI*-Reaktionsenzym (20 units/ml) zusammen pipettiert und

mit 37 µl sterilem Wasser auf 200 µl aufgefüllt. DNA des Wildtyps wurde in der Regel als Kontrolle mitgeführt. Vor dem Restriktionsverdau wurde die DNA-Konzentration bei allen Proben auf dieselbe Konzentration eingestellt. Die DNA wurde für 6 Stunden bei 37 °C verdaut. Als Nächstes wurden 20 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 500 µl Ethanol hinzupipettiert und über Nacht bei -20 °C mit eiskaltem Ethanol gefällt, um die verdaute DNA aufzureinigen. Nach 20 min Zentrifugation bei 13000 UPM, wurde der wässrige Überstand verworfen und die Proben für 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das erhaltene Pellet wurde in 10 µl 10 mM Tris-Lösung aufgenommen und dann mittels Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt. Im nächsten Schritt wurde das Gel behandelt. Das Gel wurde für 30 Minuten in 0,25 M HCl bei Raumtemperatur (RT) depuriniert, 30 Minuten in einer 0,5 M NaOH-Lösung denaturiert und anschließend für wiederum 30 Minuten in einer 1,5 M NaCl-Lösung neutralisiert. Nach der Neutralisierung wurde mit ddH₂O gewaschen und 5 min mit 20x SSC inkubiert. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran wurde entsprechend dem Aufbau auf der folgenden Abb. 100 durchgeführt

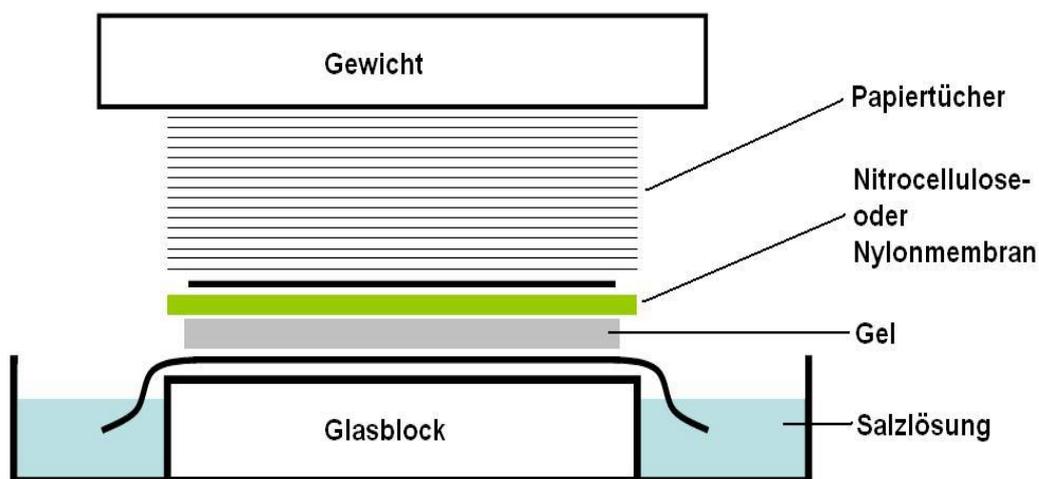


Abb. 100: Aufbau von Southern Blot. Der Aufbau wurde, wie auf dem Bild gezeigt ist, durchgeführt. Dabei wurde immer geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran bilden. Der Transfer erfolgte über Nacht bei RT. Nach dem Aufbau wurde das Ganze mit einem Gewicht von 500 g beschwert.

Im Anschluss an den Transfer wurde die Nylon-Membran 30 min luftgetrocknet. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde zweimal 3 min mit UV-Licht mittels eines UV-Crosslinkers (GE Healthcare, München, Deutschland) Crossgelinkt: DNA-Seite zuerst nach oben dann nach unten. Durch das Crosslinken bleibt die DNA auf der

Membran fixiert. Die Membran wurde mit 10 ml Prähybridisierungslösung in einem Hybridisierungsröhrchen mit der DNA-Seite nach innen zeigend gegeben und für 6 Stunden bei 65 °C inkubiert. Nach diesem Vorgang wurde die Prähybridisierungslösung verworfen. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der gesuchten DNA-Sequenz mit einer komplementären und Digoxigenin (DIG) markierten DNA-Sonde. Zur Hybridisierung wurde die Sonden-Lösung zunächst 10 Minuten bei 95 °C erhitzt, um die Doppelstränge aufzulösen und sofort 3 Minuten im Eisbad abgekühlt, um die Hybridisierung der Einzelstränge zu verhindern. Danach wurde die Membran in einem Glasröhrchen unter Rotation über Nacht in einem Ofen bei 65 C° inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sonden-Lösung entfernt und die Membran mit einer Salzlösung gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden-Teile zu entfernen. Hierfür wurde die Membran zweimal 5 min mit 10 ml Waschlösung 1 bei RT inkubiert. Die Waschlösung 1 wurde verworfen und die Membran zweimal für 15 Minuten bei 65 °C mit 10 ml Waschlösung 2 inkubiert.

Aktivierung der Lumineszenz

In dieser Arbeit wurde die Sonde über Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Nach den vorherigen Waschrissen wurde die Membran für 5 min mit 10 ml Waschpuffer in einem Hybridisierungsröhrchen inkubiert. Danach wurde sie für 30 min bei RT mit 10 ml der 1-fachen Blockierungslösung inkubiert. Als Nächstes wurde sie für 30 min bei RT mit 10 ml der 1-fachen Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AP) unter Schütteln inkubiert. Der Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt und bindet spezifisch an Digoxigenin, das in der DNA-Sonde eingebaut ist. Danach wurde die Membran zweimal für 15 min bei RT mit 10 ml Waschpuffer inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran zweimal für 5 min bei RT mit 10 ml Detektionspuffer inkubiert. Die Detektion gebundener Oligonukleotide erfolgte durch Inkubation der Membran mit einer frisch angesetzten CSPD-Lösung (10 µl CSPD wurden mit 1 ml des 10-fachen Detektionspuffers gemischt). Hierfür wurde die Membran in einem Plastikbeutel gelegt, die CSPD-Lösung darauf aufgetragen und dann luftblasenfrei abgedeckt. Nach 5 min Inkubation bei RT, wurde die Flüssigkeit Herausgedrückt, die Tüte zugeschweißt und die Membran für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die CSPD-Lösung enthält CSPD-Moleküle, die von der alkalischen Phosphatase des Antikörpers dephosphoryliert werden. Es entsteht ein metastabiles Phenolanion. Bei Anregung mit UV-Licht wird

ein Lumineszenz Licht gesendet, das von einer Kamera des BIO-RAD ChemiDoc™ XRS+ Imaging Systems detektiert wird.

5.3.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Vor der Durchführung der Klonierung wurde zunächst eine PCR durchgeführt, um das zu ligierende Fragment zu amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden danach auf einem Agarosegel überprüft, das entsprechende Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Die für die Ligation gebrauchten Komponenten wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße zusammen pipettiert. Für die Ligationsreaktion wurden 3 µl vom PCR-Produkt, 5 µl vom 2-fachen Rapid Ligation Puffer mit 1 µl pGEM-T Easy Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) gemischt. Dann wurde 1 µl von der T4-DNA Ligase hinzupipettiert. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tab. 15: Reaktionsansatz der Ligation.

2-facher Rapid Ligation Buffer	5 µl
pGEM-T Easy Vektor (50 ng/µl)	1 µl
PCR-Produkt	3 µl
T4- DNA Ligase (3 units/µl)	1 µl

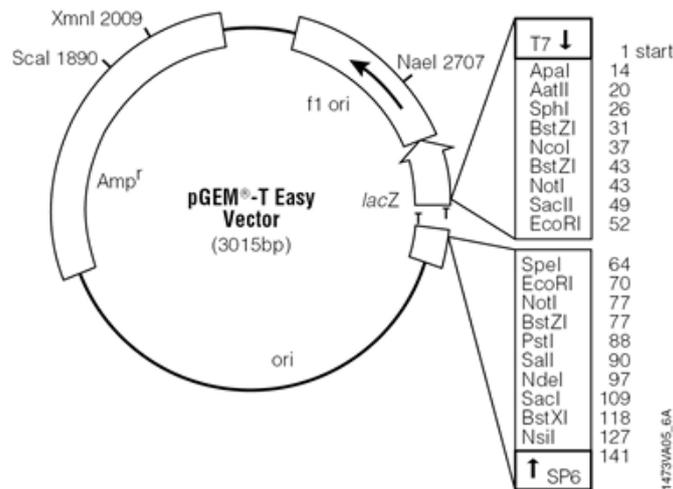


Abb. 101: pGEM-T Easy Vektor.

5.3.7 Transformation von Bakterienzellen

Zur Transformation wurden 5 µl vom Ligationsansatz mit 15 µl 10 mM Tris-Lösung und 100 µl *E. coli* DH5αTH kompetente Zellen in 1,5 ml Eppis versetzt. Die Eppis wurden dann für 30 min auf Eis inkubiert. Als Nächstes erfolgte eine 2-minütige Inkubation bei 42 °C. Anschließend wurden die Proben wieder für 2 min auf Eis gestellt. Danach wurde 1 ml LB-Bouillon dazu pipettiert, gut vermischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 min bei 13000 UPM abzentrifugiert und 800 µl vom Überstand abpipettiert. Der Rest wurde gut aufgeschüttelt und 100 µl davon mit 40 µl X-Gal (20 µg/µl) und 20 µl IPTG auf eine LB-Platte mit Ampicillin mit der Konzentration 100 mg/ml pipettiert und mit einem Trigalski-Spatel ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht, mit dem Deckel nach unten, inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine weiße alleinstehende Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze abgepickt und in ein 10 ml LB-Röhrchen mit 10 µl Ampicillin (100 mg/ml) gegeben. Die LB-Röhrchen mit den Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C und 220 UPM geschüttelt.

Nachdem die Zellen in LB-Röhrchen gewachsen waren, wurde daraus das Plasmid isoliert. Für die Plasmidisolierung wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Isolation wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

5.3.8 Animpfen der Pilzstämmе

Vor dem Animpfen der Pilzstämmе wurden frische Sporensuspensionen hergestellt. Tween ermöglicht eine gleichmäßige Verteilung der Sporen in der Suspension und dadurch wird vermieden, dass die Sporen nur auf der Suspensionsoberfläche schwimmen. Die Sporensuspension wurde durch Abschwemmen der Sporen mittels einer Impfföse von einer frischen Kultur von einer MG-Platte in Tween-80/NaCl hergestellt. Danach wurde die Sporenkonzentration bestimmt.

Sporenauszählung

Um die verschiedenen Spezies miteinander vergleichen zu können, wurde im Laufe dieser Arbeit vor jedem Versuch die Sporenanzahl bestimmt. Die Anzahl der Sporen wurde mittels der Thoma-Zählkammer (Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland; 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm² Fläche) quantifiziert. Von der Sporensuspension wurden 10 µl in die Zählkammer pipettiert, unter dem Mikroskop die Sporen in 5 Großquadraten ausgezählt und ein Mittelwert daraus berechnet. Für die Bestimmung der Sporenanzahl pro ml wurde der berechnete Mittelwert mit dem Faktor 250.000 multipliziert.

Inokulation von Äpfeln

Die Äpfel, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden aus lokalen Märkten in Karlsruhe gekauft. Die Äpfel wurden zuerst mit 70 % Ethanol gesprüht, mit destilliertem Wasser richtig gewaschen und mit Filterpapier getrocknet. Zum Animpfen wurden die Äpfel unter der Sterilbank mit einem sterilen Skalpell leicht angeritzt (ca. 5 mm in die Apfelfrucht) und 5 µl von einer Sporensuspension von *P. expansum* mit der Konzentration 10⁴ Sporen/ml in die geschnittene Stelle pipettiert.

5.3.9 Bestimmung der ROS-Konzentration in Äpfeln

Der intrazelluläre oxidative Stress wurde mittels OxiSelect in vitro ROS/RNS Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, USA) bestimmt. Die Messung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die Bestimmung der gesamten freien Radikale wurden 50 mg vom Apfelgewebe in 1 ml der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) mit dem FastPrep-24™ 5G Homogenisator (MP Biochemicals, Santa Ana, USA) zerkleinert. Die weiteren Schritte wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

5.3.10 Knock-out von Genen in *Penicillium*

Konstruktion eines Inaktivierungsvektors

Um ein Inaktivierungsplasmid herzustellen wurde ein Fragment des zu inaktivierenden Gens mittels PCR amplifiziert und in den pGEM-T Easy Vektor kloniert. Danach wurde der Vektor in *E. coli* DH5 α TH amplifiziert. Das Plasmid wurde wieder aus dem Bakterium isoliert und mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten. Durch den *EcoRI*-Verdau wurde überprüft, ob das Plasmid das gewünschte Gen-Fragment enthält.

Protoplastengewinnung

Zur Transformation müssen aus den Pilzmyzelien Protoplasten hergestellt werden. Im ersten Schritt wurde der zu transformierende Stamm in 500 ml YES-Bouillon mit 1,2 M Sorbitol in einem Kolben angeimpft und für ca. 39 Stunden bei 25 °C bei 135 UPM geschüttelt. Danach wurde das Myzel mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe abfiltriert. Anschließend wurden 100 mg *Lysing Enzyme* (Sigma, Steinheim, Deutschland) in 1 ml von 1,2 M KCl-Puffer aufgelöst und mit 75 μ l von der β -Glucuronidase (Sigma, Steinheim, Deutschland) gemischt. Diese Mischung wurde in einem sterilen Erlenmyerkölbchen mit 3,925 ml vorgelegtes 1,2 M KCl-Puffers mit 1 g des filtrierten Myzels vermischt. Das Kölbchen wurde danach für die Protoplastierung bei 27 °C inkubiert. Die Dauer der Protoplastierung ist stammabhängig. Bei *P. citrinum* bilden sich nach einer Stunde sehr viele Protoplasten. Bei *P. expansum* und *P. verrucosum* dauert hingegen die Protoplastierung viel länger. Daher wurden die letzten Stämme bis zu 3 Stunden inkubiert. Die Protoplastenbildung wurde mit dem Lichtmikroskop kontrolliert. Sobald sich genügend Protoplasten gebildet haben,

wurden sie mit steriler Glaswolle in einem Erlenmeyerkolben abfiltriert. Die erhaltene Protoplastensuspension wurde in 2 ml Eppis verteilt (jeweils 800 µl der Suspension pro Eppy). Zu den Eppis wurden 800 µl STC-Puffer pipettiert und diese anschließend durch Kippen vorsichtig gemischt. Nach 5 min Zentrifugation bei 4000 UPM, wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet wieder in 250 µl STC-Puffer resuspendiert und 5 min bei 4000 UPM zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand abpipettiert und die Pellets wurden jeweils in 25 µl STC-Puffer ganz vorsichtig resuspendiert und in einem 2 ml Eppy zusammenpipettiert.

Co-transformation von *Penicillium*

Die Protoplasten wurden in dieser Arbeit mit der PEG-Methode transformiert. Die Co-transformation ist die Transformation mit zwei unterschiedlichen Vektoren. Zur Transformation wurden 100 µl Protoplastensuspension (10^6 Protoplasten/ml) mit 10 µl P3SR2-Plasmid (Hynes et al., 1983) und 10 µl von einem anderen Plasmid (Inaktivierungskonstrukt) zusammenpipettiert und vorsichtig gut gemischt. Die Mischung wurde 45 min bei RT leicht geschüttelt. Dann wurden 800 µl PEG-Puffer dazu pipettiert. Die Suspension wurde nochmal 45 min unter ständigem Mischen bei RT inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 8000 UPM, wurde der Überstand abpipettiert und verworfen, das Protoplastenpellet in 500 µl temperiertem Weich-Agar resuspendiert und dann in den restlichen Weich-Agar überführt. Durch leichtes Schwenken des Kolbens wurden die Protoplasten im Weich-Agar verteilt, sofort auf Minimalmedium-Agar-Platten mit Acetamid gegossen und bei 25 °C inkubiert. Nachdem die Kolonien gewachsen waren, wurden die großen Kolonien auf YES-Platten überimpft, damit sie schneller wachsen. Die Platten wurden wieder bei 25 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der Wildtyp mit angeimpft. Nach 7 Tagen Wachstum auf YES-Platten wurde die Toxinbildung bei den Transformanten mit der DC/HPLC analysiert.

5.3.11 Analyse der Mykotoxinbildung

In dieser Arbeit wurden die Mykotoxine mit Chloroform extrahiert. Die Toxine wurden entweder aus Pilzmyzel auf Agarplatten oder von Äpfeln direkt isoliert. Um die Toxine von Agarplatten zu extrahieren, wurden 2 Agarblöckchen aus der Mitte der Pilzkultur mit Hilfe eines Korkbohrers (Diameter von 8 mm) ausgestochen und in ein 2 ml Eppy überführt. Um die Mykotoxine aus den Äpfeln zu extrahieren wurde 1 g von der Mitte

der kolonisierten Apfelfläche mit einem sterilen Korkbohrer (Diameter von 8 mm) entnommen. Zu den Proben wurde 1 ml Chloroform pipettiert und 30 min auf einem Schüttler bei RT stark geschüttelt. Dann wurden Die Agarblöckchen oder das Apfelfewebe mit einer abgeflamnten Pinzette entfernt. Danach wurde die Toxinhaltige Lösung in einer Vakuumzentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA) für ca. 30 min eingedampft. Anschließend wurde eine DC mit den Proben durchgeführt.

5.3.12 Dünnschichtchromatographie

Zur Durchführung der DC wurden die schon eingedampften Proben in 60 µl Methanol resuspendiert und jeweils 10 µl davon auf eine Kieselgel-Platte aufgetragen. Als Referenz wurden 5 µl von einem Toxin-Standard mit aufgetragen. Zur Entwicklung der DC-Platte wurde die Glaskammer mit dem entsprechenden Fließmittelgemisch gefüllt und die DC-Platte hineingestellt. Nachdem die Laufmittelfront den oberen Rand der DC-Folie bis auf ca. 1 cm erreicht hatte, wurden die Platten aus der Entwicklungskammer genommen und unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurden die Platten unter UV-Licht bestrahlt. Die gebildeten Toxine wurden über mitgelaufene Toxin-Standards identifiziert. Für die Detektion von Citrinin und Ochtaroxin A wurden die DC-Fertigfolien POLYGRAM^R SIL G verwendet (Machery-Nagel & Co. KG, Düren, Deutschland). Für Patulin wurden die DC-Fertigfolien ALUGRAM^R SIL G/UV₂₅₄ derselben Firma verwendet.

Tab. 16: Zusammensetzung des Fließmittels.

Zusammensetzung für 100 ml

90 ml Toluol
5 ml Methanol
5 ml Eisessig

Tab. 17: Verwendete Standardkonzentrationen.

Toxin Standards	Verwendungskonzentration
Citrinin Standard	0,1 µg/µl
OTA Standard	83,5 ng/µl
Patulin Standard	1 mg/ml

Die Toxine wurden von der Firma Sigma-Aldrich gekauft und in Methanol aufgelöst. Danach wurden sie in Methanol auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.

5.3.13 HPLC

Zur Quantifizierung der Mykotoxinmengen wurde die HPLC eingesetzt. Nach der Extraktion wurden die getrockneten Toxin-Extrakte zuerst in 150 µl Methanol aufgenommen. Mit einem Autoinjektor wurden von jeder Probe 10 µl durch einen Filter aus Polytetrafluorethylen (PTFE) in die Pumpe des HPLC-Systems (LaChrom, Merk/Hitachi, VWR, Darmstadt, Deutschland) hineingebracht. Das Lösemittelgemisch setzte sich aus Methanol und Phosphorsäure zusammen. Durch den Säulenofen wurde die Temperatur während der Messungen immer auf 40 °C eingestellt. Für die Citrininanalyse wurden eine Nukleodur C18 Pyramid 3 µm, 150/3 Säule verwendet (Machery-Nagel, Düren, Deutschland). Für die Patulinanalyse wurde eine andere Säule der Firma Agilent in Waldbronn verwendet (XDB C18 4,6x150/5). Die Toxine wurden mittels eines Spektrophotometers (Citrinin bei 330 nm und Patulin bei 276 nm) gemessen und deren Konzentrationen mit externen Toxin Standards quantifiziert. Für die Auswertung der Daten wurde die EZ-Chrom Elite Software benutzt.

5.3.14 Analyse der Genexpression

In dieser Arbeit wurde die Genexpression mittels Real Time PCR analysiert.

RNA-Extraktion aus filamentösen Pilzen

In dieser Arbeit wurde die RNA mittels RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die RNA Isolation erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Zunächst wurden die Myzelzellen in 700 µl RLC-Puffer mit dem FastPrep-24 TM 5G Homogenisator aufgeschlossen. Dann wurden 7 µl

β-Mercaptoethanol dazu pipettiert. Nach 3 min Inkubation bei 56 °C (um die Lyse zu forcieren), wurden die Proben direkt auf QIAshredder Spin Säulen geladen. Die Proben wurden dann 2 min bei 13000 UPM zentrifugiert. Der Durchfluss in die Sammeltube wurde vorsichtig und zügig in ein frisches Eppendorfgefäß mit 350 µl absolutem Ethanol überführt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Danach wurde das homogenisierte Lysat mit dem Präzipitat auf RNeasy mini Säulen geladen. Die Gesamt-RNA bindet an die Säule und die anderen Kontaminanten werden gewaschen. Nach 1 min Zentrifugation bei 11000 UPM wurde der Durchfluss verworfen und die auf der RNeasy mini Säulen gebundene RNA wurde weiterhin mit RNase freier DNase behandelt.

DNase Behandlung

Um die eventuell vorhandene DNA zu eliminieren, wurden die RNeasy Säulen mit der DNase behandelt. Zu den RNA-Proben wurden 350 µl RW1-Puffer pipettiert, 1 min bei 11000 UPM zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. In einem separaten Eppendorfgefäß wurden 10 µl DNase I Stocklösung mit 70 µl RDD-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemischt, auf die Silica-Gelmembran der RNeasy mini Säulen pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 350 µl RW1-Puffer wurde 1 min bei 11000 UPM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen wurden in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden geschlossen und für 2 min bei 11000 UPM zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Danach wurden die Säulen in geleerte Eppis gesteckt und 1 min bei 13000 UPM zentrifugiert. Zum Eluieren wurden die Säulen in 1,5 µl Eppis überführt, 100 µl RNase freies Wasser direkt auf die Säulen pipettiert und 1 min bei 11000 UPM zentrifugiert. Die RNA wurde entweder sofort verwendet oder bei -20°C eingefroren.

Reverse Transkription

Im Anschluss an die RNA-Isolation, wurde die RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels Omniskript reverse Transkriptase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), einer RNA spezifischen DNA-Polymerase, die ausgehend von RNA die DNA synthetisiert. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die cDNA wurde für die RT-PCR verwendet.

Tab. 18: Reaktionsansatz für die reverse Transkription.

RNA	12 µl
10 x RT Puffer	2 µl
dNTP-Mix (5 mM je Nukleotid)	2 µl
Oligo dT Primer (10 pmol/µl)	2 µl
Omniskript reverse Transkriptase (4 units/µl)	2 µl

Bestimmung der Kopienzahl eines PCR-Amplikons

Nach dem folgenden Beispiel wird gezeigt wie die Kopienzahl eines Amplikons bestimmt werden.

Im Fall von *patK*-Gen betrug die Konzentration des PCR-Produktes nach der Aufreinigung 119,4 ng/µl (0,1194 g/l). Im Durchschnitt hat ein Nukleotid eine molare Masse von 300 g/mol. Ein Basenpaar hat die molare Masse von 600 g/mol. Die Länge des *patK*-Amplikons ist 1050 bp. Die Molarität des Gesamtamplikons wäre 630.000 g/mol/l.

630000 g entsprechen 1 mol entspricht 1l

0,1194 g entsprechen x mol entspricht 1l

X= $1,89 \times 10^{-7}$ mol entspricht 1l

1 mol entspricht $6,025 \times 10^{23}$ Teilchen (Avogadro-Konstante)

$1,89 \times 10^{-7}$ mol entspricht $1,14 \times 10^{17}$ Teilchen

$1,14 \times 10^{17}$ Teilchen entsprechen 1l

$1,14 \times 10^{11}$ Teilchen entsprechen 1 µl

Für die Standardreihe wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{11} bis 10^2 durchgeführt.

Real Time PCR

Um die Expression der Gene, die für die Mykotoxinbildung verantwortlich sind, zu analysieren, wurde die RT-PCR eingesetzt. In dieser Arbeit wurden mehrere RT-PCR Versuche durchgeführt, um die Expression der Polyketidsynthasegene für die Citrinin- und Patulinbildung (*pksCT* und *patK*) bei *P. expansum* zu analysieren. Vor der Durchführung der RT-PCR wurde ein DNA-Standard erstellt. Dieser DNA-Standard bekannter Konzentration wird bei der RT-PCR für die Erstellung einer

Standardreihe und somit zur Bestimmung unbekannter DNA-Konzentration benötigt. Dafür wurde jeweils ein DNA-Fragment aus dem *pksCT*- und *patK*-Gen mit den Primerpaaren *pksCT_P.exp_for*, *pksCT_P.exp_rev* und *patK_P.exp_for*, *patK_P.exp_rev* amplifiziert, mit dem MinElute PCR Purification Kit aufgereinigt, die Konzentration mittels eines Spektrophotometers (NanoDrop 1000) gemessen und die Kopienzahl des Amplikons bestimmt. Danach wurde die RT-PCR durchgeführt. Für die Amplifizierung des *pksCT*-Gen wurde das Primerpaar *pksCT_int_for* und *pksCT_int_rev* verwendet. Für das *patK*-Gen wurde das Primerpaar *patK_int_for* und *patK_int_rev* eingesetzt. Die Ergebnisse der RT-PCR wurden mit dem β -Akin-Gen normalisiert. Hierfür wurde eine RT-PCR Reaktion mit dem Primerpaar *PV_bentaq_for* und *PV_bentaq_rev* durchgeführt

Tab. 19: Reaktionsansatz für die RT-PCR.

iQ™ SYBR Green Supermix	12,5 μ l
Forwärts Primer (20 pmol)	1 μ l
Rückwärts Primer (20 pmol)	1 μ l
cDNA	1 μ l
Steriles bidest. Wasser	9,5 μ l

Tab. 20: Reaktionsschritte der RT-PCR.

Zyklen	Schritte	Temperatur [°C]	Zeit
Zyklus 1(1x)	Schritt 1	50 °C	2 min
	Schritt 2	95 °C	10 min
Zyklus 2 (40x)	Schritt 1	95 °C	20 Sek
	Schritt 2	58 °C	40 Sek
	Schritt 3	72 °C	1 min
Zyklus 3 (85x)	Schritt 1	53 °C	10 Sek
Zyklus 4 (1x)	Schritt 1	8 °C	∞

5.3.15 Einstellen der Wasseraktivität des Mediums

Die Wasseraktivität im Medium wurde durch die Zugabe von verschiedenen Mengen an Glycerol eingestellt. Die folgende Tabelle 21 zeigt wie man die Wasseraktivität im Medium mit Glycerol einstellen kann.

Tab. 21: Einstellen der Wasseraktivität im Medium.

Wasseraktivität (a_w -Wert)	Benötigte Glycerinmenge für 250 ml
1	0
0,99	27
0,98	32,75
0,95	49,75
0,93	61,25
0,90	78,25

Die Glycerolmengen wurden abgemessen und jeweils auf 250 ml mit PDA-Medium aufgefüllt. Nach dem Einstellen der Wasseraktivität wurden die Medien autoklaviert, für 20 min bei 120 °C und anschließend in Petrischalen unter der Sterilbank gegossen.

6 Literaturverzeichnis

Abrunhosa, L., Venancio, A., 2007. Isolation and purification of an enzyme hydrolysing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. Biotechnol. Lett. 29, 1909–1914.

Abulhamd, A.T., 2009. Molecular and secondary metabolite profiles interrelationships among *Penicillium expansum* strains. J. Appl. Sci. Res. 5, 1335–1343.

Aiko, V., Mehta, A., 2013. Inhibitory effect of clove (*Syzygium Aromaticum*) on the growth of *Penicillium citrinum* and citrinin Production. J. Food Saf. 33, 440–444.

Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Prior, B.A., 1994. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. Mol. Cell. Biol. 14, 4135–4144.

Andersen, B., Smedsgaard, J., Frisvad, J.C., 2004. *Penicillium expansum*: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. J. Agric. Food Chem. 52, 2421–2428.

Artigot, M.P., Loiseau, N., Laffitte, J., Mas-Reguierg, L., Tadrist, S., Oswald, P.I., Puel, O., 2009. Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. Microbiolgy 155, 1738–1747.

Asefa, D.T., Gjerde, R.O., Sidhu, M.S., Langsrud, S., Kure, C.F., Nesbakken, T., Skaar, I., 2009. Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products. Int. J. Food Microbiol. 128, 435–439.

Baba, S., Kinoshita, H., Nihira, T., 2012. Identification and characterization of *Penicillium citrinum* VeA and LaeA as global regulators for ML-236B production. Curr. Genet. 58, 1–11.

Ballester, A.R., Marcet-Houben, M., Levin, E., Sela, N., Selma-Lázaro, C., Carmona, L., Wisniewski, M., Droby, S., González-Candelas, L., Gabaldón, T., 2015. Genome, transcriptome, and functional analyses of *Penicillium expansum* provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity. MPMI 28, 232–248.

Bailly, J.D., Querin, A., le Bars-Bailly, S., Benard, G., Guerre, P., 2002. Citrinin production and stability in cheese. J. Food Protect. 65 (8), 1317–1321.

Barad, S., Horowitz, S.B, Kobiler, I., Sherman, A., and Prusky, D., 2014. Accumulation of the mycotoxin patulin in the presence of gluconic acid contributes to pathogenicity of *Penicillium expansum*. *MPMI* 27, 66–77.

Bardwell, L., 2005. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 26, 339–350.

Bateman, D.F., Basham, H.G., 1976. Degradation of Plant Cell Walls and Membranes by Microbial Enzymes. In: Heitefuss, R., Williams, P.H. (Eds.), *Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*, vol. 4. Springer, Berlin, Heidelberg.

Battilani, P., Pietri, A., Giorni, P., Formenti, S., Bertuzzi, T., Toscani, T., Virgili, R., Kozakiewicz, Z., 2007. *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants. *J. Food Protect.* 70, 975–980.

Blanc, P.J., Laussac, J.P., Le Bars, J., Le Bars, P., Loret, M.O., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J.C., Santerre, A.L., Goma, G., 1995 a. Characterization of monascidin A from *Monascus* as Citrinin. *Int. J. Food Microbiol.* 27, 201–213.

Blanc, P.J., Loret, M.O., Goma, G., 1995 b. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol. Lett.* 17, 291–294.

Blomberg, A., Adler, L., 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171, 1087–1092.

Bonerba, E., Ceci, E., Conte, R., Tantillo, G., 2010. Survey of the presence of patulin in fruit juices. *Food Addit. Contam.* 3, 114–119.

Bok, J.W, Balajee, S.A, Marr, K.A, Andes, D., Nielsen, K.F, Frisvad, J.C, Keller, N.P., 2005. LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot. Cell* 4, 1574–1582.

Bok, J.W., Keller, N.P., 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* 3, 527–535.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J., 2008. Low occurrence of patulin- and citrinin-producing species isolated from grapes. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 286–289.

Breitholtz-Emanuelsson, A., Fuchs, R., Hult, K., 1995. Toxicokinetics of ochratoxin A in rat following intratracheal administration. *Nat. Toxins* 3, 101–103.

Brown, D.W., Yu, J.H., Kelkar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., Adams, T.H., Leonard, T.J., 1996. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1418–1422.

Butchko, R.A.E, Brown, D.W., Busman, M., Tudzynski, B., Wiemann, P., 2012. Lae1 regulates expression of multiple secondary metabolite gene clusters in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 602–612.

Butinar, L., Frisvad, J.C., Gunde-Cimerman, N., 2011. Hypersaline waters - a potential source of foodborne toxigenic *Aspergilli* and *Penicillia*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 186–199.

Caddick, M.X., Brownlee, A.G., Arst, H.N., 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 203, 346–353.

Calvo, A.M., 2008. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1053–1061.

Cappellini, R.A., Ceponis, M.J., Lightner, G.W., 1987. Disorders in apple and pear shipments to the New York market, 1972–1984. *Plant Dis.* 71, 9.

Cheng, Y.Q., Tang, G.L., Shen, B., 2002. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *PNAS* 100, 3149–3154.

Comerio, R., Pinto, V.E.F., Vaamonde, G., 1998. Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 219–223.

Comi, G., Orlic, S., Redzepovic, S., Urso, R., Lacumin, L., 2004. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 29–34.

Desjardins, A.E, Hohn, T.M, McCormick, S.P., 1992. Effect of gene disruption of trichodiene synthase on the virulence of *Gibberella pulicaris*. *MPMI* 5, 214–222.

Dietrich, R., Schmid, A., Märtlbauer, E., 2001. Citrinin in fruit juices. *Mycotoxin. Res.* 17, 156–159.

Dutta, T., Sahoo, R., Sengupta, R., Ray, S.S., Bhattacharjee A., Ghosh, S., 2008. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 275–282.

El-dessouki, S., 1992. Ochratoxin A in Bier. D. L. R 1, 354–355.

Elmholt, S., Hestbjerg, H., 1999. Field ecology of the ochratoxin A-Producing *Penicillium verrucosum*: Survival and resource colonization in soil. Mycopathologia 147, 67–81.

Elmholt, S., Labouriau, R., Hestbjerg, H., Nielsen, J.M., 1999. Detection and estimation of conidial abundance of *Penicillium verrucosum* in soil by dilution plating on a selective and diagnostic medium (DYSG). Mycol. Res. 103, 887–895.

Escoula, L., Bourdio, D., Linas, M.D., Recco, P., Seguela, J.P., 1988. Enhancing resistance and modulation of humoral immune response to experimental *Candida albicans* infection by patulin. Mycopathologia 103, 153–156.

Escoula, L., Thomsen, M., Bourdiol, D., Pipy, B., Peuriere, S., Roubinet, F., 1988. Patulin immunotoxicology: Effects on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits. Int. J. Immunopharmacol. 10, 983–989.

Espeso, E.A., Arst, H.N., 2000. On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid expressed gene. Mol. Cell. Biol. 20, 3355–3363.

Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H., Silver, P.A., 1998. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. EMBO J. 17, 5606–5614.

Filttenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U., 1996. Moulds in food spoilage. Int. J. Food Microbiol. 33, 85–102.

Fonzi, W.A., 1999. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. J. Bacteriol. 181, 7070–7079.

Frisvad, J.C., Filttenborg, O., 1983. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 46, 1301–1310.

Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. Stud. Mycol. 49, 1–147.

Gareis, M., Scheuer, R., 2000. Ochratoxin A in meat and meat products. Arch. Lebensmittelhyg. 51, 102–103.

Geisen, R., Graf, E., Schmidt-Heydt, M., 2016. HogA and pacC regulated alternariol biosynthesis by *Alternaria alternata* is important for substrate colonization. Acta Hortic. 1144, 141–148.

Georgianna, D.R., Fedorova, N.D., Burroughs, J.L., Dolezal, A.L., Bok, J., Horowitz-Brown, S., Woloshuk, C.P., Yu, J., Keller, N.P., Payne, A.G., 2010. Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. Mol. Plant Pathol. 11, 213–226.

Georgianna, D.R., Payne, G.A., 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. Fungal Genet. Biol. 46, 113–125.

Graf, E., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., 2012. HOG MAP kinase regulation of alternariol biosynthesis in *Alternaria alternata* is important for substrate colonization. Int. J. Food Microbiol. 157, 353–359.

Grimm, A., Madduri, K., Ali, A., Hutchinson, C.R., 1994. Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC-29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. Gene 151, 1–10.

Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., Davenport, K., 1998. MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1264–1300.

Harris, J.P., Mantle, P.G., 2001. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. Phytochemistry 58, 709–716.

Harwig, J., Chen, Y.K., Kennedy, B.P.C., Scott, P.M., 1973. Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 6, 22–25.

He, Y., Cox, R.J., 2016. The molecular steps of citrinin biosynthesis in fungi. Chem. Sci. 7, 2119–2127.

Heider, E.M., Harper, J.K., Grant, D.M., Hoffman, A., Dugan, F., Tomer, D.P., O'Neill, K.L., 2006. Exploring unusual antioxidant activity in a benzoic acid derivative: a proposed mechanism for citrinin. Tetrahedron 62, 1199–1208.

Heperkan, D., Dazkir, G.S., Kansu, D.Z., Güler, F.K., 2009. Influence of temperature on citrinin accumulation by *Penicillium citrinum* and *Penicillium verrucosum* in black table olives. *Toxin Rev.* 28, 180–186.

Heperkan, D., Meriç, B.E., Sismanoglu, G., Dalkiliç, G., Güler, F.K., 2006. Mycobiota, mycotoxigenic fungi and citrinin production in black olives. *Adv. Exp. Med. Biol.* 571, 203–210.

Hetherington, A.C., Raistrick, H., 1931. Studies on biochemistry of microorganisms. Part XIV. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Phil. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, 220, 269–296.

Hicks, J.K., Yu, J.H., Keller, N.P., Adams, T.H., 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G α protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.* 16, 4916–4923.

Hocking, A.D., Pitt, J.I., 1979. Water relations of some *Penicillium* species at 25 °C. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 73, 141–145.

Hohmann, S., 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300–372.

Hohn, T.M., McCormick, S.P., and Desjardins, A.E., 1993. Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichiodes*. *Curr. Genet.* 24, 291–295.

Hynes, M.J., Corrick, C.M., King, J.A., 1983. Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1430–1439.

IARC (International Agency for Research on Cancer), 1993. Ochratoxin A. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 56. IARC Press, Lyon, pp. 489–521.

Ishikawa, Y., Morimoto, K., Hamasaki, T., 1988. Citrinin as a potent antioxidant compound from *Penicillium* species. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 37, 51–53.

Jain, R., Rivera, M.C., Lake, J.A., 1999. Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3801–3806.

Jiang, J., Liu, X., Yin, Y., Ma, Z., 2011. Involvement of a Velvet Protein FgVeA in the Regulation of Asexual Development, Lipid and Secondary Metabolisms and Virulence in *Fusarium graminearum*. PLoS ONE 6 (11), e28291.

Jurick, W.M., Janisiewicz, W.J., Saftner, R.A., Vico, I., Gaskins, V.L., Park, E., Forsline, P.L., Fazio, G., Conway, W.S. 2011. Identification of wild apple germplasm (*Malus* spp.) accessions with resistance to the postharvest decay pathogens *Penicillium expansum* and *Colletotrichum acutatum*. Plant Breeding 130, 481–486.

Kale, S.P., Milde, L., Trapp, M.K., Frisvad, J.C., Keller, N.P., Bok, J.W., 2008. Requirement of LaeA for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. Fungal Genet. Biol. 45, 1422–1429.

Kato, N., Brooks, W., Calvo, A.M., 2003. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by veA, a gene required for sexual development. Eukaryot. Cell 2, 1178–1186.

Kavanagh, F., 1947. Activities of 22 antibacterial substances against nine species of bacteria. J. Bacteriol. 54, 761–766.

Keller, N.P., Hohn, T.M., 1997. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. Fungal Genet. Biol. 21, 17–29.

Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W., 2005. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. Nature Rev. Microbiol. 3, 937–947.

Khan, S.A., Hamayun, M., Yoon, H., Kim, H.Y., Suh, S.J., Hwang, S.K., Kim, J.M., Lee, I.J., Choo, Y.S., Yoon, U.H., Kong, W.S., Lee, B.M., Kim, J.G., 2008. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. BMC Microbiol. 8, 231.

Khosravi, A.R., Sheikhsarami, M., Shokri, H., Sabokbar, A., 2012. Genetic variability of citrinin-producing *Penicillium citrinum* strains as occupational health hazards in northern Iran. Arch. Ind. Hyg. Toxicol. 63, 489–496.

Kim, H.S., Han, K.Y., Kim, K.J., Han, D.M., Jahng, K.Y., Chae, K.S., 2002. The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. 37, 72–80.

Kiser, J.S., Zellert, J.S., 1945. Antibiotics, other than penicillin, produced by Penicillia. Trans. N. Y. Acad. Sci. 7, 210–219.

Kohut, G., Ádám, A.L., Fazekas, B., Hornok, L., 2009. N-starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 65–69.

Kosalkova, K., Garcia-Estrada, C., Ullan, R.V., Godio, R.P., Feltrer, R., Teijeira, F., Mauriz, E., Martín, J.F., 2009. The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie* 91, 214–225.

Lai, C.L., Fuh, Y.M., Shih, D.Y.C, 2000. Detection of mycotoxin patulin in apple Juice. *J. Food Drug Anal.* 8, 85–96.

Lamb, T.M., Xu, W., Diamond, A., Mitchel, A.P., 2001. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 1850–1856.

Larsen, T.O., Svendsen, A., Smedsgaard, J., 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3630–3635.

Lindblad, M., Johnsson, P., Jonsson, N., Lindqvist, R., Olsen, M., 2004. Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts. *J. Appl. Microbiol.* 97, 609–616.

Lumsden, R.D., 1976. Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their localization in infected bean. *Can. J. Bot.* 54, 2630–2641.

Lund, F., Frisvad, J.C., 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1117–1123.

Magan, N., Cayley, G.R., Lacey, J., 1984. Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria Alternata* in culture and on wheat grain. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1113–1117.

Mahmoud, A.L.E., 2000. Mycotoxin-producing potential of fungi associated with qat (*Catha edulis*) leaves in Yemen. *Folia Microbiol.* 45, 452–456.

Mahoney, N., Molyneux, R.J., Kim, J.H., Campbell, B.C., Waiss, A.C., Hagerman, A.E., 2010. Aflatoxigenesis induced in *Aspergillus flavus* by oxidative stress and reduction by phenolic antioxidants from tree nuts. *World Mycotox. J.* 3, 49–57.

- Monfort, A., Cordero, L., Maicas, S., Polaina, J., 2003. Transformation of *Mucor miehei* results in plasmid deletion and phenotypic instability. *FEMS Microbiol. Lett.* 224, 101–106.
- Martins, M.L., Gimeno, A., Martins, H.M., Bernardo, F., 2002. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Addit. Contam.* 19, 568–574.
- Mayer, A.M., Staples, R.C., Gil-ad, N.L., 2001. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response, *Phytochemistry* 58, 33–41.
- Mazumder, P.M., Mazumder, R., Mazumder, A., Sasmal, D.S., 2002. Antimicrobial activity of the mycotoxin citrinin obtained from the fungus *Penicillium citrinum*. *Anc. Sci. Life* 21, 191–197.
- McCallum, J.L., Tsao, R., Zhou, T., 2002. Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. *J. Food Prot.* 65, 1937–1942.
- Mehdy, M.C., 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105, 467–472.
- Merhej, J., Richard-Forget, F., Barreau, C., 2011. The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* 48, 275–284.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Moake, M.M., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W., 2005. Comprehensive Review of Patulin control Methods in Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1, 8–21.
- Myung, K., Zitomer, N.C., Duvall, M., Glenn, A.E., Riley, R.T., Calvo, A.M., 2012. The conserved global regulator VeA is necessary for symptom production and mycotoxin synthesis in Maize seedlings by *Fusarium verticillioides*. *Plant Pathol.* 61, 152–160.
- Neves, S.R., Ram, P.T., Iyengar, R., 2002. G protein pathways. *Science* 296, 1636–1639.
- Nicholson, T.P., Rudd, B.A., Dawson, M., Lazarus, C.M., Simpson, T.J., Cox, R.J., 2001. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chem. Biol.* 8, 157–178.

Norbeck, J., Pahlman, A.K., Akhtar, N., Blomberg, A., Adler, L., 1996. Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271, 13875–13881.

Núñez, F., Rodríguez, M.M., Bermúdez, M.E., Córdoba, J.J., Asensio, M.A., 1996. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 185–197.

O'Callaghan, J., Caddick, M.X., Dobson, A.D.W., 2003. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 149, 3485–3491.

O'Callaghan, J., Coghlan, A., Abbas, A., García-Estrada, C., Martín, J.F., Dobson A.D.W., 2013. Functional characterization of the polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium verrucosum*. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 172–181.

Ochiai, N., Tokai, T., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M., Kimura, M., 2007. Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 639–644.

Oliver, R.P., Slomon, P.S., 2008. Recent fungal diseases of crop plants: is lateral gene transfer a common theme? *MPMI* 21, 287–293.

Orejas, M., Espeso, E.A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H.N., Peñalva, M.A., 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* 9, 1622–1632.

Peñalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E., Arst, H. N., 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *TIM* 16, 291–300.

Pestka, J.J., Dong, W., 1994. Progressive serum IgE elevation in the B6C3F1 mouse following withdrawal of dietary vomitoxin deoxynivalenol. *Fundamen. Appl. Toxicol.* 22, 314–316.

Pepeljnjak, S., Segvic, M., Ozegovic, L., 2002. Citrininotoxinogenicity of *Penicillium* spp. isolated from decaying apples. *Braz. J. Microbiol.* 33, 134–137.

Petrovič, U., 2006. Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Res.* 6, 816–822.

Phillips, R.D., Hayes, A.W., Berndt, W.O., Williams, W.L., 1980. Effects of citrinin on renal function and structure. *Toxicology* 16, 123–137.

Pitt, J.I., Christian, J.H.B., 1968. Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. *Appl. Microbiol.* 16, 1853–1858.

Pohland, A.E., Nesheim, S., Friedman, L., 1992. Ochratoxin A: A review. *Pure Appl. Chem.* 64, 1029–1046.

Posada, F., Aime, M.C., Peterson, S.W., Rehner, S.A., Vega, F.E., 2007. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycol. Res.* 111, 748–757.

Posas, F., Saito, H., 1998. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.* 17, 1385–1394.

Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Pinto, V.F., 2010. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 348–353.

Prusky, D., McEvoy, J.L., Saftner, R., Conway, W.S., Jones, R., 2004. Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology* 94, 44–51.

Puel, O., Galtier, P., Oswald, I., 2010. Biosynthesis and toxicological effects of Patulin. *Toxins* 2, 613–631.

Rank, C., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., Varga, J., Samson, R.A., Frisvad, J.C., 2011. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol.* 115, 406–420.

Rollins, J.A., Dickman, M.B., 2001. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of *pacC*/RIM1 homolog. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 75–81.

Ropars, J., Rodríguez de la Vega, R.C., López-Villavicencio, M., Gouzy, J., Sallet, B., Dumas, E., Lacoste, S., Debuchy, R., Dupont, J., Branca, A., Giraud, F., 2015. Adaptive horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi. *Curr. Biol.* 25, 2562–2569.

Roze, L.V., Beaudry, R.M., Keller, N.P., Linz, J.E., 2004. Regulation of aflatoxin synthesis by FadA/cAMP/protein kinase A signaling in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 158, 219–232.

Sanzani, S.M., Reverberi, M., Punelli, M., Ippolito, A., Fanelli, C., 2012. Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 323–331.

Schmidt-Heydt, M., Bode, H., Raupp, F., Geisen, R., 2010. Influence of light on ochratoxin biosynthesis by *Penicillium*. *Mycotoxin. Res.* 26, 1–8.

Schmidt-Heydt, M., Magan, N., Geisen, R., 2008. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiol. Lett.* 284, 142–149.

Schmidt-Heydt, M., Graf, E., Stoll, D., Geisen, R., 2012. The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 233–241.

Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., Schütz, P., Geisen, R., 2015. Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *Int. J. Food Microbiol.* 192, 1–6.

Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Raupp, F., Bruchmann, A., Perrone, G., Geisen, R., 2011. Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 229–237.

Shetty, N.P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G.H.J., Collinge, D.B., Jørgensen, H.J.L., 2007. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytol.* 174, 637–647.

Shimizu, K., Keller, N.P., 2001. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 157, 591–600.

Shimizu, T., Kinoshita, H., Ishihara, S., Sakai, K., Nagai, S., Nihira, T., 2005. Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3453–3457.

Shimizu, T., Kinoshita, H., and Nihira, T., 2007. Identification and in vivo functional analysis by gene disruption of *ctnA*, an activator gene involved in citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5097–5103.

Singh, Y., Sumbali, G., 2008. Patulin and citrinin production in apple and pear fruits by *Penicillium expansum* strains collected from Jammu markets. *Ind. Phytopath.* 61, 471–477.

Siegmund, D., 1994. Oscillatory penicillin formation in carbon-limited batch fermentations of *Penicillium chrysogenum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40, 888–891.

Snini, S.P., Tadriss, S., Laffitte, J., Jamin, E.L., Oswald, I.P., Puel, O., 2014. The gene *PatG* involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase. Int. J. Food Microbiol. 171, 77–83.

Snini, S.P., Tannous, J., Heuillard, P., Bailly, S., Lippi, Y., Zehraoui, J., Barreau, C., Oswald, I.P., 2016. Patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favouring the colonization of apples by *Penicillium expansum*. Mol. Plant Pathol. 17, 920–930.

Somorin, Y., Akinyemi, A., Bertuzzi, T., Pietri, A., 2016. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and citrinin in “egusi” melon (*Colocynthis citrullus* L.) seeds consumed in Ireland and the United Kingdom. Food Addit. Contam. 9 Part (B), 230–235.

Spröte, P., Brakhage, A.A., 2007. The light-dependent regulator velvet A of *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis. Arch. Microbiol. 188, 69–79.

Stinnett, S.M., Espeso, E.A., Cobeno, L., Araujo-Bazan, L., Calvo, A.M., 2007. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin α carrier and on the light. Mol. Microbiol. 63, 242–255.

Stoll, D., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., 2013. Differences in the regulation of ochratoxin A by the HOG pathway in *Penicillium* and *Aspergillus* in response to high osmolar environments. Toxins 5, 1282–1298.

Stott, W.T., Bullerman, L.B. 1975. Patulin: A mycotoxin of potential concern in foods. J. Milk Food Technol. 38, 695–705.

Størmer, F.C., Sandven, P., Huitfeldt, S., Eduard, W., Skogstad, A., 1998. Does the mycotoxin citrinin function as a sun protectant in conidia from *Penicillium verrucosum*? Mycopathologia 142, 43–47.

Stutzman-Engwall, K.J., Hutchinson, C.R., 1989. Multigene families for anthracycline antibiotic production in *Streptomyces peucetius*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3135–3139.

Thurston, J.R., Richard, J.L., Peden, W.M., 1986. Immunomodulation in mycotoxicoses other than aflatoxicosis. In: Richard, J.L., Thurston, J.R. (Eds.), Diagnosis of Mycotoxicoses. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, vol. 33. Springer, Dordrecht.

Tannous, J., El Khoury, R., Snini, S.P., Lippi, Y., El Khoury, A., Atoui, A., Lteif, R., Oswald, I.P., Puel, O., 2014. Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 51–60.

Tice, G., Buchanan, R.L., 1981. Regulation of aflatoxin biosynthesis: Effect of exogenously supplied cyclic nucleotides. *J. Food Sci.* 47, 153–157.

Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M.A., Arst, H.N., 1995. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates Regulation of both acid- and alkaline- expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14, 779–790.

Touhami, N., Soukup, S.T., Schmidt-Heydt, M., Kulling, S.E. and Geisen, R., 2018. Citrinin as an accessory establishment factor of *Penicillium expansum* for the colonization of apples. *Int. J. Food Microbiol.* 266, 224–233.

Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., 1965. The constitution of Ochratoxin A, B and C metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. *J. Chem. Soc. Perkin1*, 7083–7088.

Varga, J., Rigo, K., Teren, J., Mesterhazy, A., 2001. Recent advances in ochratoxin research. I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. *Cereal Res. Commun.* 29, 85–92.

Viñas, I., Dadon, J., Sanchis, V., 1993. Citrinin-producing capacity of *Penicillium expansum* strains from apple packinghouses of Lerida (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 19, 153–156.

Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 78, 343–371.

Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R., Märtlbauer, E., 2000. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2483–2488.

Walton, J.D., 2000. Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. *Fungal Genet. Biol.* 30, 167–171.

Warmka, J., Hanneman, J., Lee, J., Amin, D., OTA, I., 2001. Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol. Cell. Biol.* 21, 51–60.

Watanabe, M., 2008. Production of mycotoxins by *Penicillium expansum* inoculated into apples. J. Food Prot. 71, 1714–1719.

Xu, B.J., Jia, X.Q., Gu, L.J., Sung, C.K., 2006. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. Food Control 17, 271–285.

Yin, Z., Bi, W., Mi, O., Kang, Z., Liu, C., Yang, J., Luo, Y., 2017. Conserved and divergent roles of the HOG1 kinase of *Alternaria longipes* in mycelial and conidial development, multi-stress responses, melanin production and pathogenicity. Eur. J. Plant Pathol. 147, 415–430.

Yu, J.H., Keller, N., 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 43, 437–458.

Publikationen, die im Rahmen dieser Arbeit veröffentlicht wurden

Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., Touhami, N., 2018. Aspects of the occurrence, genetics and regulation of biosynthesis of the three Food relevant *Penicillium* mycotoxins: Ochratoxin A, Citrinin and Patulin. In: The Mycota XV: Physiology and Genetics, 2nd Edition, Eds. T. Anke and A. Schlüßler, Springer, Cham, 413–433.

Touhami, N., Soukup, S.T., Schmidt-Heydt, M., Kulling, S.E., Geisen, R., 2018. Citrinin as an accessory establishment factor of *Penicillium expansum* for the colonization of apples. Int. J. Food Microbiol. 266, 224–233.

Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Touhami, N., Himmelsbach, A., 2018. New aspects of ochratoxin and citrinin biosynthesis in *Penicillium*. Curr. Opin. Food Sci. eingereicht.

Geisen, R., Touhami, N., Schmidt-Heydt, M., 2017. Mycotoxins as adaptation factors to food related environments. Curr. Opin. Food Sci. 17, 1–8.

Touhami, N., Buhl, K., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., 2016. Arginine acts as an inhibitor of the biosynthesis of several mycotoxins. Int. J. Food Microbiol. 235, 46–52.

Tagungsbeiträge:

Posterbeiträge

Link, D., Touhami, N., Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Walte, H.G., Nkonge, C., Gachagua, M., Muchiri, S., Schwake-Anduschus, C., 2017. Networking on Aflatoxin Reduction in the Food Value Chain-Aflanet. Tropentag, Universität Bonn.

Touhami, N., Schmidt-Heydt, M., Walte, H.G., Schwake-Anduschus, C., Geisen, R., 2017. Application of a droplet digital PCR method to monitor growth and aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus flavus* in maize. 39th Mycotoxin Workshop, Bydgoszcz (Polen).

Touhami, N., Stoll, D., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., 2016. De-regulating citrinin biosynthesis of *Penicillium expansum* by heterologous expression of the *ctnR* gene of *Penicillium citrinum*. International Committee of Food Mycology Meeting, Freising, 12–15. Juni 2016.

Stoll, D., Touhami, N., Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., 2016. WGS Sequencing of the citrinin producer *Penicillium citrinum* and subsequent characterization of the citrinin gene cluster. 38th Mycotoxin Workshop, Berlin.

Touhami, N., Stoll, D., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., 2014. Influence of a serin peptidase on the regulation of the amount of ochratoxin A produced by *Penicillium nordicum*. 36th Mykotoxin Workshop, Göttingen-Deutschland.

Vorträge

Touhami, N., Stoll, D., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., 2016. De-regulating citrinin biosynthesis of *Penicillium expansum* by heterologous expression of the *ctrR* gene of *Penicillium citrinum*. ICFM Workshop, International Commission on Food Mycology Workshop, Freising, 13–15. Juni.

Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Touhami, N., 2017. Understanding in situ regulation of mycotoxin biosynthesis to improve food safety. Deutsch-chinesischer Workshop Food Security and Food Safety. Guangzhou/Shanghai, 10–13. April.

Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., Touhami, N., 2015. Ochratoxin A: Toxicogenic fungi. 37th Mycotoxin Workshop, Bratislava – Slovakia, 1–3. Juni.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von Citrinin	6
Abb. 2: Strukturformel von Ochratoxin A	7
Abb. 3: Strukturformel von Patulin	8
Abb. 4: Schematische Darstellung von <i>Penicillium</i> -Konidienträgern.	10
Abb. 5: Getreide und Getreideprodukte, das wichtigste Habitat von <i>P. verrucosum</i>	11
Abb. 6: Beispiele der natürlichen Habitats von <i>P. expansum</i>	12
Abb. 7: Vereinfachte schematische Darstellung des HOG-Signalwegs.	15
Abb. 8: Vereinfachtes Schema der pH-Regulation durch PACC-Signalweg.	16
Abb. 9: Vereinfachtes Schema der G-Proteinsignaltransduktion.	17
Abb. 10: Citriningencluster in <i>M. purpureus</i>	19
Abb. 11: Phylogenetischer Stammbaum mit den neu isolierten <i>P. expansum</i> Stämmen.	22
Abb. 12: Citrinin- und Patulinbildung bei verschiedenen <i>P. expansum</i> -Stämmen.	23
Abb. 13: Kinetik der OchratoxinA- und Citrininbildung bei <i>P. verrucosum</i> BFE808 auf PDA.	25
Abb. 14: Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei <i>P. expansum</i> BFE189 auf PDA.	26
Abb. 15: Kinetik der Citrininbildung bei <i>P. citrinum</i> BFES12 auf PDA.	27
Abb. 16: Architektur der Gencluster der Citrininbildung in <i>Penicillium</i>	28
Abb. 17: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der pksCT-Transformanten von <i>P. verrucosum</i> BFE808.	29
Abb. 18: Überprüfung der pksCT-Transformanten von <i>P. verrucosum</i> mittels PCR.	30
Abb. 19: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der pksCT-Transformanten von <i>P. expansum</i> BFE189.	31
Abb. 20: Southern Blot Hybridisierung mit den pksCT-Mutanten von <i>P. expansum</i> BFE189.	32
Abb. 21: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der pksCT-Transformanten von <i>P. citrinum</i> BFES12.	33
Abb. 22: Southern Blot Hybridisierung mit den pksCT-Transformanten von <i>P. citrinum</i>	34
Abb. 23: Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von <i>P. verrucosum</i> BFE808.	36
Abb. 24: Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von <i>P. expansum</i> BFE189.	37
Abb. 25: Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von <i>P. citrinum</i> BFES12.	38
Abb. 26: Einfluss der Temperatur auf die Citrininbildung bei <i>P. verrucosum</i> BFE808.	39
Abb. 27: Einfluss der Temperatur auf die Citrininbildung bei <i>P. expansum</i> BFE189.	39
Abb. 28: Einfluss der Temperatur auf die Citrininbildung bei <i>P. citrinum</i> BFES12.	40
Abb. 29: Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei <i>P. verrucosum</i> BFE808 auf PDA.	41

Abb. 30: Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei <i>P. expansum</i> BFE189 auf PDA.....	42
Abb. 31: Einfluss der Wasseraktivität auf die Citrininbildung bei <i>P. citrinum</i> auf PDA.	42
Abb. 32: Einfluss des Salzstress auf die Citrinin- und Ochratoxin A-Bildung bei <i>P. verrucosum</i> BFE808 auf PDA.	44
Abb. 33: Einfluss des Salzstress auf die Citrininbildung bei <i>P. expansum</i> auf PDA.	45
Abb. 34: Einfluss des Salzstress auf die Citrininbildung bei <i>P. citrinum</i> auf PDA.	46
Abb. 35: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Hog1-Transformanten von <i>P. expansum</i>	47
Abb. 36: Überprüfung der Hog1-Transformanten von <i>P. expansum</i> mittels Southern Blot.	48
Abb. 37: Einfluss der Hog1-Inaktivierung auf die Citrininbildung bei <i>P. citrinum</i>	49
Abb. 38: Überprüfung der Hog1-Transformante von <i>P. citrinum</i> mittels Southern Blot.	49
Abb. 39: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei <i>P. verrucosum</i> BFE808.	51
Abb. 40: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei <i>P. expansum</i> BFE189.	51
Abb. 41: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei <i>P. citrinum</i> BFES12.	52
Abb. 42: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei <i>P. expansum</i>	53
Abb. 43: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei der PacC-Transformante von <i>P. expansum</i>	54
Abb. 44: Bestimmung der Citrininbildung bei der PacC-Transformante von <i>P. expansum</i> mittels HPLC.	54
Abb. 45: Überprüfung der PacC-Transformante von <i>P. expansum</i> mittels Southern Blot.	55
Abb. 46: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der PacC-Transformanten von <i>P. citrinum</i>	56
Abb. 47: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei der PacC-Mutante von <i>P. citrinum</i>	56
Abb. 48: Überprüfung der PacC-Mutante von <i>P. citrinum</i> mittels Southern Blot.	57
Abb. 49: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Citrininbildung bei den ctnR-Transformanten von <i>P. expansum</i> BFE189.	58
Abb. 50: Bestimmung der Citrininbildung bei den ctnR-Transformanten von <i>P. expansum</i> BFE189 mittels HPLC.	59
Abb. 51: Überprüfung der ctnR-Überexpression mittels PCR.	59
Abb. 52: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Wirkung des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei <i>P. citrinum</i>	60
Abb. 53: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Wirkung des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei <i>P. expansum</i> BFE189.	61
Abb. 54: Einfluss des pH-Wertes auf die Citrininbildung bei der ctnR-Transformante von <i>P. expansum</i> BFE189.	61
Abb. 55: Einfluss von H ₂ O ₂ auf das Wachstum von <i>P. verrucosum</i> BFE808.	63

Abb. 56: Einfluss von H ₂ O ₂ auf die Citrininbildung bei <i>P. verrucosum</i> BFE808.....	63
Abb. 57: Einfluss von H ₂ O ₂ auf das Wachstum von <i>P. expansum</i> BFE189.....	64
Abb. 58: Einfluss von H ₂ O ₂ auf die Citrininbildung bei <i>P. expansum</i> BFE189.....	65
Abb. 59: Einfluss von H ₂ O ₂ auf das Wachstum von <i>P. citrinum</i> BFES12.....	65
Abb. 60: Einfluss von H ₂ O ₂ auf die Citrininbildung bei <i>P. citrinum</i> BFES12.....	66
Abb. 61: Einfluss von externem cAMP auf die Citrininbildung bei <i>P. verrucosum</i> BFE808....	67
Abb. 62: Einfluss von externem cAMP auf die Citrininbildung bei <i>P. expansum</i> BFE189.....	67
Abb. 63: Einfluss von externem cAMP auf die Citrininbildung bei <i>P. citrinum</i> BFES12.....	68
Abb. 64: Einfluss von H ₂ O ₂ auf das Wachstum von <i>P. citrinum</i> BFES12 auf PDA.....	69
Abb. 65: Einfluss von H ₂ O ₂ auf das Wachstum der Citrininmutante von <i>P. citrinum</i> BFES12.	69
Abb. 66: Einfluss von H ₂ O ₂ auf das Wachstum von <i>P. nordicum</i> BFE487.....	70
Abb. 67: Überprüfung der Toxinbildung bei den VeA-Transformanten von <i>P. verrucosum</i> . ..	71
Abb. 68: Einfluss der VeA-Inaktivierung auf das Wachstum von <i>P. verrucosum</i>	72
Abb. 69: Überprüfung der VeA-Transformanten von <i>P. verrucosum</i> BFE808 mittels Southern Blot.....	73
Abb. 70: Einfluss der VeA-Inaktivierung auf die Citrininbildung bei <i>P. expansum</i> BFE189....	73
Abb. 71: Einfluss der VeA-Inaktivierung auf Wachstum von <i>P. expansum</i> BFE189.....	74
Abb. 72: Überprüfung der VeA-Transformante von <i>P. expansum</i> mittels Southern Blot.....	74
Abb. 73: Einfluss der Inaktivierung von VeA auf die Citrininbildung bei <i>P. citrinum</i>	75
Abb. 74: Einfluss der VeA-Inaktivierung auf das Wachstum bei <i>P. citrinum</i>	76
Abb. 75: Überprüfung der VeA-Transformante von <i>P. citrinum</i> mittels Southern Blot.	76
Abb. 76: Wachstum von <i>P. expansum</i> BFE1393 auf verschiedenen Apfelsorten.....	78
Abb. 77: Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei <i>P. expansum</i> BFE1393 auf der Apfelsorte Granny Smith.	79
Abb. 78: Kinetik der <i>pksCT</i> - und <i>patK</i> -Expression von <i>P. expansum</i> BFE1393 nach Kolonisierung von Äpfeln (Granny Smith).	80
Abb. 79: Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei <i>P. expansum</i> auf Golden Delicious.	81
Abb. 80: Kinetik der <i>pksCT</i> - und <i>patK</i> -Expression nach Wachstum von <i>P. expansum</i> BFE1393 auf der Apfelsorte Golden Delicious.....	81
Abb. 81: Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei <i>P. expansum</i> BFE1393 auf Jonagold...82	
Abb. 82: Kinetik der <i>pksCT</i> - und <i>patK</i> -Expression bei <i>P. expansum</i> BFE1393 auf Jonagold.	83
Abb. 83: Kinetik der Citrinin- und Patulinbildung bei <i>P. expansum</i> BFE1393 auf Royal Gala.	84

Abb. 84: Kinetik der <i>pksCT</i> -und <i>patK</i> -Expression bei <i>P. expansum</i> BFE1393 auf Royal Gala.	85
Abb. 85: Überprüfung der Citrininbindung an Apfelbestandteile.....	86
Abb. 86: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Bindung von Citrinin an Pektin.....	87
Abb. 87: Wiedergewinnung von Citrinin nach dem Pektinabbau.....	88
Abb. 88: Kinetik der Citrininbildung bei <i>P. expansum</i> BFE1393 auf Apfelmedium der Sorte Golden Delicious.	89
Abb. 89: Kinetik der Citrininbildung bei <i>P. expansum</i> BFE1393 auf Apfelmedium der Sorte Golden Delicious.	89
Abb. 90: ROS-Konzentration der Äpfel vor und nach der Infektion durch <i>P. expansum</i>	91
Abb. 91: Mischung von Citrinin mit H ₂ O ₂	92
Abb. 92: Abbau von Citrinin durch H ₂ O ₂	93
Abb. 93: Abbau von Citrinin in Äpfeln.	94
Abb. 94: Kolonisierung von Äpfeln durch <i>P. expansum</i>	95
Abb. 95: Einfluss von Citrinin auf die Kolonisierung von Äpfeln durch <i>P. expansum</i> BFE1393.....	97
Abb. 96: Einfluss der PacC-Inaktivierung auf die Kolonisierung von Äpfeln durch <i>P. expansum</i>	98
Abb. 97: Einfluss der <i>ctnR</i> -Überexpression auf das Wachstum von <i>P. expansum</i> auf Äpfeln der Sorte Granny Smith.....	99
Abb. 98: Einfluss der <i>ctnR</i> -Überexpression auf das Wachstum von <i>P. expansum</i> auf Äpfeln der Sorte Royal Gala.....	100
Abb. 99: Einfluss von Ascorbinsäure auf die Kolonisierung von Äpfeln durch <i>P. expansum</i>	102
Abb. 100: Aufbau von Southern Blot.....	137
Abb. 101: pGEM-T Easy Vektor.....	140

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Biologische Bedeutung der Citrininbildung.	123
Tab. 2: Verwendete Primer.....	124
Tab. 3: Verwendete Nährmedien.....	125
Tab. 4: Verwendete Lösungen.....	127
Tab. 5: Verwendete Chemikalien.....	128
Tab. 6: Verwendete Kits.	130
Tab. 7: Verwendete Geräte.	131
Tab. 8: Reaktionsansatz für die PCR.....	133
Tab. 9: Reaktionsschritte der PCR.	134
Tab. 10: Reaktionsansatz für die RAPD.	134
Tab. 11: Reaktionsschritte der RAPD.	135
Tab. 12: Zusammensetzung des TBE-Puffers.	136
Tab. 13: Zusammensetzung des DNA-Probenpuffers.....	136
Tab. 14: Zusammensetzung des DNA-Markers.	136
Tab. 15: Reaktionsansatz der Ligation.	139
Tab. 16: Zusammensetzung des Fließmittels.	144
Tab. 17: Verwendete Standardkonzentrationen.....	145
Tab. 18: Reaktionsansatz für die reverse Transkription.....	147
Tab. 19: Reaktionsansatz für die RT-PCR.....	148
Tab. 20: Reaktionsschritte der RT-PCR.	148
Tab. 21: Einstellen der Wasseraktivität im Medium.	149