

---

# **Untersuchungen zur Esca- Erkrankung von Weinpflanzen: Pilz-Pflanze und antagonistische Interaktionen**

---

Dissertation  
zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von  
Jochen Fischer

geboren am 07.03.1985  
in Kirchheimbolanden

Mainz, 2014

---

Promotionsprüfung:  
05.12.2014

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Mainz, 2014

---

Jochen Fischer

## Abkürzungsverzeichnis

ha	Hektar
Pa	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i> ( <i>Pa. aleophilum</i> )
Pm	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> ( <i>Pm. chlamydospora</i> )
L	Liter
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
nm	Nanometer
El	<i>Eutypa lata</i> ( <i>E. lata</i> )
Fm	<i>Fomitiporia mediterranea</i> ( <i>F. mediterranea</i> )
DIG-11-dUTP	Digoxigenin-11-dUTP
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ATP	Adenosintriphosphat
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
CTP	Cytidintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Esca	Name für eine Krankheitskomplex bei Weinpflanzen, ausgelöst durch mehrere Krankheitserreger (Pa, Pm, Fm, El) siehe Kapitel 1.3
GFLV	Grapevine fanleaf virus (Reisigkrankheit)
ArMV	Arabismosaik-Virus
DAS-ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assays: Double Antibody "Sandwich", antikörperbasiertes Nachweisverfahren
ToBRV	Grape yellow vein virus, Tomatenschwarzringflecken
PKS	Polyketidsynthase
TFA	Trifluoressigsäure
HPLC	'high performance liquid chromatography' Hochdruckflüssigkeits-Chromatografie
HPLC-MS	HPLC mit angeschlossenem Massenspektrometer
WEM	Weinblattextraktmedium
WBWEM	Weißer Burgunder Weinblattextraktmedium
CS	Cabernet Sauvignon 'Kultivar von <i>V. vinifera</i> '
K3G	Kaempferol-3-O-Glykosid
KAE	Kaempferol
KF	Kulturfiltrat, Kulturbrühe nach der Fermentation

---

MY	Myzelextrakt
g	Gramm
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
tsd.	Tausend
kbp	' <i>kilo base pairs</i> ' eintausend Nukleotide
Th	Thomson (m/z), Einheit der Massenspektroskopie
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
BSA	Rinderalbumin (engl. Bovine serum albumin)
PVP	Polyvinylpyrrolidone

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
<b>Abb.1:</b> Fermentationsgrafik von <i>Pm. chlamydospora</i> in 20 L Minimalmedium	<b>56</b>
<b>Abb.2:</b> <i>Vitis vinifera</i> cv. 'Riesling', Blatttropftest	<b>57</b>
<b>Abb.3:</b> Fermentationsgrafik von <i>Pa. aleophilum</i> in 20 L Minimalmedium	<b>58</b>
<b>Abb.4:</b> <i>Vitis vinifera</i> cv. 'Riesling', Blatttropftest	<b>58</b>
<b>Abb.5:</b> Sekundärmetabolitenproduktion von Pm und Pa während der Fermentation	<b>59</b>
<b>Abb.6:</b> Siderophorproduktion von Pm, Pa und den vier Esca Pilzen (Pm, Pa, Fm, El) im Fermentationsgemisch	<b>60</b>
<b>Abb.7:</b> <i>Vitis</i> -Kalluskultur-Fluoreszenzaufnahmen	<b>61</b>
<b>Abb.8:</b> Konzentrationen von Kaempferol und Kaempferol-3-O-Glykosid während der Fermentationsversuche	<b>63</b>
<b>Abb.9:</b> Pflanzeninjektionstest	<b>65</b>
<b>Abb.10:</b> Wachstum der Transformanten unter Stressbedingungen	<b>71</b>
<b>Abb.11:</b> Aufnahmen zur Interaktionsstudie der Esca-assoziierten Pilze	<b>75</b>
<b>Abb.12:</b> Schnittpräparat durch einen mit <i>Pm. chlamydospora</i> (GFP-Transformante) infizierten Weinrebenspross	<b>79</b>
<b>Abb.13:</b> Fermentationsgrafik von IBWF E11228	<b>84</b>
<b>Abb.14:</b> Aufarbeitungsschema für den Pilz IBWF E11228	<b>85</b>
<b>Abb.15:</b> Fermentationsgrafik von IBWF E99121	<b>86</b>
<b>Abb.16:</b> Aufarbeitungsschema für den Pilz IBWF E99121	<b>88</b>
<b>Abb.17:</b> CF Protein-markierte Mutante von Pm nach <i>Vitis-shoot-Assay</i>	<b>90</b>
<b>Abb.18:</b> Aufnahmen von Weinpflanzensegmenten mit Hilfe eine Binokulars	<b>91</b>

## Tabellenverzeichnis

	Seite
<b>Tab.1:</b> Primersequenzen	<b>31</b>
<b>Tab.2:</b> Programmierung einer Standard-PCR	<b>33</b>
<b>Tab.3:</b> Programm für die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	<b>34</b>
<b>Tab.4:</b> Programmierung für eine two-step-PCR mit der Phusion® HF DNA Polymerase	<b>34</b>
<b>Tab.5:</b> Gradient für eine Kieselgel 60 Chromatographie	<b>47</b>
<b>Tab.6:</b> Gradient für die C18-Säulen Chromatographie	<b>47</b>
<b>Tab.7:</b> Standardgradient der analytischen HPLC	<b>48</b>
<b>Tab.8:</b> Standardgradient der analytischen HPLC mit HILIC-Säule	<b>48</b>
<b>Tab.9:</b> Sekundärmetabolitproduktion der ausgewählten Transformanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Stamm	<b>69</b>
<b>Tab.10:</b> Ergebnisse der Weinpflanzeninfektionsstudie	<b>73</b>
<b>Tab.11:</b> Liste der als positiv getesteten <i>Trichoderma</i> spp. Stämme	<b>81</b>
<b>Tab.12:</b> Endophytische Pilze, die als positiv antagonistisch gegen die Esca Pilze getestet wurden	<b>83</b>
<b>Tab.13:</b> Ergebnisse des Auswahlverfahrens nach dem <i>Vitis-shoot-Assay</i>	<b>92</b>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Übersicht über die häufigsten Rebenkrankheiten.....	1
1.1.1 Nematoden und weinpathogene Insekten.....	2
1.2 Pilze.....	3
1.3 Krankheitsbild der Esca-Krankheit bei <i>Vitis vinifera</i> .....	5
1.3.1 <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .....	7
1.3.2 <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	8
1.3.3 <i>Fomitiporia mediterranea</i> .....	9
1.3.4 <i>Eutypa lata</i> .....	11
1.3.5 Bekämpfungsmethode der Esca-assoziierten Pilze.....	12
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	14
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien, Antibiotika und Medienbestandteile.....	15
2.1.2 Enzyme.....	18
2.1.3 Reaktionskits.....	18
2.1.4 Lösungen und Puffer.....	19
2.1.4.1 Lösungen.....	19
2.1.4.2 Puffer.....	20
2.1.5 Kulturmedien.....	22
2.1.6 Organismen.....	26
2.1.6.1 Verwendeter Stamm von <i>Escherichia coli</i> .....	26
2.1.6.2 Verwendeter Stamm von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	26
2.1.6.3 Verwendeter Stamm von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .....	26
2.1.6.4 Verwendeter Stamm von <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	26
2.1.6.5 Verwendeter Stamm von <i>Fomitiporia mediterranea</i> .....	26
2.1.6.6 Verwendeter Stamm von <i>Eutypa lata</i> .....	26
2.1.6.7 Testorganismen für die biologische Charakterisierung.....	26
2.1.6.8 Verwendete Weinpflanzen und Kalluskulturen.....	27
2.1.6.9 Aufbewahrung der Organismen.....	28
2.1.7 Plasmide.....	28
2.1.8 Primer.....	30
2.1.9 Mikroskopie.....	31
2.1.10 Fotografische Digitalisierung.....	32
2.1.11 Software.....	32
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	33
2.2.1.1 PCR zur Amplifizierung von genomischen DNA Sequenzen zu Klonierungszwecken...33	
2.2.1.2 Amplifizierung von DIG-11-dUTP-markierter DNA-Sonden.....	35
2.2.1.3 PCR zur Amplifikation unbekannter gDNA Regionen.....	35
2.2.2 Präparation von Nucleinsäuren.....	36
2.2.2.1 Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	36
2.2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Pilzen.....	36
2.2.2.3 gDNA-Isolation aus Pilzmyzel mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol.....	36
2.2.2.4 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nucleinsäuren.....	37
2.2.3 Gelelektrophorese und Restriktion von Nucleinsäuren.....	37
2.2.3.1 Restriktion von DNA.....	37
2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	38



2.2.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel.....	38
2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	38
2.2.5 Southern Blot-Analyse.....	39
2.2.6 Transformation der Mikroorganismen.....	40
2.2.6.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	40
2.2.6.2 Transformation von <i>Phaeomonniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	41
2.2.6.3 Protoplastentransformation.....	41
2.2.7 Klonierungsstrategien der verwendeten Konstrukte.....	42
2.2.7.1 Konstruktion der Plasmide mit den Fluoreszenzfarbstoffen für <i>Fomitiporia</i> <i>mediterranea</i> .....	42
2.2.7.2 Konstruktion der ΔPKS2-Plasmide für <i>Phaeomonniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	43
2.3 Fermentation.....	44
2.3.1 Fermentation in Schüttelkulturen.....	44
2.3.1.1 Spezialkulturen mit Weinblattextraktmedium / Interaktionsstudien.....	44
2.3.1.2 Fermentationsstudien zur Isolation von Kaempferol-3-O-Glykosid.....	44
2.3.1.3 Fermentationsstudien zur Isolation von Siderophoren.....	45
2.3.1.4 Fermentation der antagonistischen Endophyten- bzw. <i>Trichoderma</i> -Stämme.....	45
2.3.1.5 Fermentation von antagonistischen Bakterienstämmen.....	45
2.3.2 Fermentation im 20 L-Maßstab.....	46
2.4 Isolation von Sekundärmetaboliten.....	46
2.4.1 Herstellung von Rohextrakten aus Kulturfiltrat und Myzel.....	46
2.4.2 Säulenchromatographie.....	47
2.4.3 Bond Elut™ C18-Säule.....	47
2.4.4 HPLC-Analyse von Rohextrakten.....	48
2.4.4.1 Präparative HPLC.....	49
2.4.5 HPLC-MS-Analyse.....	49
2.5 Biologische Testverfahren mit Pflanzen, Pilzen und Bakterien.....	49
2.5.1 Weinpflanzen als Testorganismen.....	49
2.5.1.1 Blatttrondelltest.....	50
2.5.1.2 Pflanzensprühtest.....	50
2.5.1.3 Pflanzeninjektionstest.....	50
2.5.1.4 Kalluskulturtest.....	51
2.5.1.6 <i>Vitis-shoot-Assay</i> .....	51
2.5.1.5 Agardiffusionstest und Bestimmung der cytotoxischen Aktivität.....	51
2.5.1.6 Agarplattenbasierte Stresstests.....	51
2.6 Untersuchungen zur Kaempferolumsetzung.....	52
2.6.1 Kulturfiltrataufarbeitung.....	52
2.6.2 Myzelaufarbeitung.....	52
2.6.3 Kaempferol-Glykosilierungsversuche.....	53
2.7 Auswahlverfahren für antagonistische Organismen.....	53
2.7.1 Endophytenisolation.....	53
2.7.2 Antagonistentest.....	53
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
3.1 Kaempferol und Kaempferol-3-Glykosid.....	55
3.1.1 Fermentation zur Isolation phytopathogener Wirkstoffe aus <i>Phaeomonniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	55
3.1.1.1 Fermentation zur Isolation phytoxischer Sekundärmetabolite aus <i>Phaeomonniella</i> <i>chlamydospora</i> .....	55

3.1.1.2 Fermentation zur Isolation phytotoxischer Sekundärmetabolite aus <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	57
3.1.1.3 Isolierung der biologisch aktiven Sekundärmetabolite aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	59
3.1.2 Isolation von Kaempferol-3-Glykosid.....	62
3.1.2.2 Bioaktivitäts-geführte Isolierung von Kaempferol-3-Glykosid.....	62
3.1.3 <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> in Minimal-Medium mit Kaempferol im Fermentationsversuch.....	62
3.1.4 Enzymisolationsversuche mittels Proteinchromatographie ( <i>in vitro</i> Glykosylierung).....	64
3.1.5 Weinpflanzeninjektionstest.....	65
3.2 Polyketidsynthase-Deletionsmutanten von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	66
3.2.1 Herstellung von Deletionsmutanten.....	66
3.2.1.1 Molekularbiologische Manipulation von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .....	66
3.2.1.2 Molekularbiologische Manipulation von <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	68
3.2.2 Fermentationscharakterisierung und Stresstests.....	69
3.2.3 Weinpflanzeninfektionsstudie.....	72
3.3 Interaktionsstudien.....	73
3.4 Fluoreszenzmarkierte Esca-assoziierte Pilze und <i>in planta</i> -Versuche.....	76
3.4.1 Erstellung einer fluoreszenzmarkierten Mutante von <i>Fomitiporia mediterranea</i> .....	76
3.4.2 Charakterisierung der Esca-Fluoreszenzmutanten mittels Weinpflanzenwachstumsversuchen und Fluoreszenzmikroskopie.....	78
3.5 Auswahlverfahren für Esca-antagonistische Organismen.....	80
3.5.1 Identifikation und Untersuchung antagonistischer <i>Trichoderma</i> Stämmen.....	80
3.5.2 Untersuchung von Endophyten.....	81
3.5.2.1 Fermentation und Wirkstoffisolation aus dem Endophyten IBWF E11228.....	84
3.5.2.2 Fermentation und Wirkstoffisolation aus dem Endophyten IBWF E99121.....	86
3.5.3 <i>Vitis-shoot-Assay</i> .....	89
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>93</b>
4.1 Kaempferol und Kaempferol-3-Glykosid.....	95
4.1.1 Fermentation von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	96
4.1.1.1 Fermentation von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .....	96
4.1.1.2 Fermentation von <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	97
4.1.1.3 Isolation der biologisch aktiven Sekundärmetaboliten aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	97
4.1.2 Isolierung von Kaempferol-3-Glykosid.....	99
4.1.3 Fermentationsversuche mit <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> in Minimal-Medium mit Kaempferol.....	100
4.1.4 Enzymisolationsversuche mittels Proteinchromatographie ( <i>in vitro</i> Glykosylierung).....	101
4.1.5 Weinpflanzeninjektionstest.....	102
4.2 Polyketidsynthase-Deletionsmutanten von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	103
4.2.1 Herstellung von Deletionsmutanten.....	103
4.2.1.1 Genetische Manipulation von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .....	104
4.2.1.2 Genetische Manipulation von <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	105
4.2.2 Fermentationscharakterisierung und Stresstests der Insertionsmutanten.....	105
4.2.3 Weinpflanzeninfektionsstudie.....	108
4.3 Studien zur Erforschung der Interaktion der Esca-assoziierten Pilze.....	109
4.4 Fluoreszenzmarkierte Esca-assoziierte Pilze und <i>in vivo</i> -Versuche.....	112
4.4.1 Einbringung eines Fluoreszenzprotein-codierenden Gens in das Genom von <i>Fomitiporia mediterranea</i> .....	112

---

4.4.2 Charakterisierung der Fluoreszenzmutanten von <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> , <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> und <i>Eutypa lata</i> mittels Weinpflanzenwachstumsversuchen und Fluoreszenzmikroskopie.....	112
4.5 Screening zur Identifikation von antagonistischen Organismen für den biologischen Weinbau .....	114
4.5.1 <i>Trichoderma</i> Stämme für den biologischen Pflanzenschutz im Weinbau.....	114
4.5.2 Endophytische Pilze für den biologischen Pflanzenschutz im Weinbau.....	117
4.5.2.1 Fermentation und Wirkstoffisolation aus dem Endophyten IBWF E11228.....	117
4.5.2.2 Fermentation und Wirkstoffisolation aus dem Endophyten IBWF E99121.....	118
4.5.3 <i>Vitis-shoot-Assay</i> zur erweiterten Analyse Esca-antagonistischer Organismen.....	121
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>124</b>
<b>6 Ausblick.....</b>	<b>125</b>
<b>7 Referenzen.....</b>	<b>127</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>A</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Übersicht über die häufigsten Rebenkrankheiten

Die wichtigsten Pflanzenpathogenen im Weinbau sind Viren. Diese werden meist durch saugende und stechende Insekten oder Nematoden verbreitet. Sie können zu Ernteverlusten von bis zu 30 Prozent führen. Allen voran ist der weltweit anzutreffende *Grapevine Leafroll-3* Virus zu nennen. Alleine in den Bezirken Napa und Sonoma in Kalifornien wurden Verluste zwischen 15.000 und 30.000 € pro befallenem Hektar Weinberg gemeldet (Atallah *et al.*, 2012; Moutinho-Pereira *et al.*, 2012).

Weit weniger Schäden verursachen Insekten. Es ernähren sich zwar eine große Anzahl von Insekten von Weinpflanzen, aber durch das Beute-Jäger-System im Weinberg sind die wirtschaftlichen Auswirkungen meist gering. Einige verursachen, durch Frass, Verletzungen an der Pflanze, diese reduzieren die Produktivität der Pflanze im Allgemeinen aber wenig. Allerdings verursachen einige Schildlausarten weltweit pro Jahr 900 Mio.€ Schäden durch Ernteverluste und Rebenschädigungen (Rakimov *et al.*, 2013).

Nematoden spielen vor allem bei der Virusübertragung eine wichtige Rolle. Durch ihre Eigenschaften als Vektor haben Wurzelstocknematoden in Australien bereits vermehrt zu Ernteverlusten von bis zu 60 Prozent geführt (Quader *et al.*, 2002). Nematoden übertragen zum Teil auch Bakterien, die jedoch nur eine untergeordnete Rolle bei den ökonomischen Verlusten spielen. In Kalifornien wurden die Einbusen, durch die so verbreiteten Bakterien zwischen 1994 und 2000 auf 22 Mio.€ beziffert (Sosnowski und Wicks, 2007).

Eine weitere, ökonomisch sehr wichtige Gruppe der Pflanzenpathogene, neben den Viren und den Nematoden sind die Pilze. Es gibt mehr als 60 verschiedene Pilzkrankungen an Weinpflanzen wovon aber nur wenige weltweit von Bedeutung sind, zu diesen zählen *Botrytis* sp. So werden zur Bekämpfung von *Botrytis* sp. jährlich mehr als 540 Mio.€ investiert, was der Menge von 10 Prozent des ganzen Fungizidmarktes entspricht (UIPP, 2002 Scholefield und Morison, 2010, Dean *et al.*, 2012). Auch der Esca-assoziierte Pilz *Eutypa lata* ist ein wichtiger Weinpathogen. Er verursacht durch die Eutypiose mehr als 190 Mio.€ Schäden pro Jahr in Kalifornien (Siebert, 2001).

In den folgenden Kapiteln (1.1.1-1.3.5) werden nun die wichtigsten Weinpathogene näher dargestellt und ihre Einflüsse auf den Weinbau, ihre Biologie und Bekämpfungsmethoden erläutert.

### 1.1.1 Nematoden und weinpathogene Insekten

Nematoden sind im Weinberg besonders gefürchtet, da sie die Unterlagen der Weinstöcke, d.h. den nicht veredelten, reblausresistenten Wurzelstock anstecken und dabei die Pflanze mit Viren infizieren können. Die Fadenwürmer sind zwischen 2 und 12 mm lang und besitzen einen Mundstachel, mit dem sie verschiedene Proteasen und Amylasen in die Wurzelzellen injizieren und diese im Anschluss aussaugen. Die pflanzenpathogenen Nematoden in Europa gehören vor allem zu den Gattungen *Xiphinema*, *Paralongidorus* und *Longidorus* und die von ihnen übertragenen Viren werden Nepoviren (Nepo = nematodenübertragbare Polyederstrukturen) genannt (Hübschen *et al.*, 2004). Seit 1988 ist in der Europäischen Union der Einsatz von Nematiziden als direkte Bekämpfungsmethode nicht mehr erlaubt. Ein Grund hierfür ist die zu geringe Spezifität der vorher eingesetzten Präparate, die auch nützliche bodenlebende Fadenwürmer abtöten (Altmayer *et al.*, 2010). Wegen des Verbots der Nematizide und des dadurch entstehenden wirtschaftlich unzumutbaren Bracheintervalls von mindestens sieben Jahren, um eine ausreichende Fadenwurmareduktion oder Vernichtung zwischen zwei aufeinanderfolgenden Rebenpflanzungen zu gewährleisten, müssen alternative Nematoden-Management-Strategien entwickelt werden.

Neben den Fadenwürmern, die vor allem durch ihre Vektorfunktion von Bedeutung sind, gibt es einige Insektenpathogene im Weinbau. Dazu zählt unter Anderem die Rebzikade (*Empoasca vitis*, Goethe). Sie pflanzt sich im Sommer auf den Reben fort, während sie den Winter auf Nadelhölzern verbringt. In Frankreich und Spanien ist es dem Insekt möglich, auf Grund der längeren, wärmeren Sommermonate mehrere Generationen pro Saison hervorzubringen (Lozzia und Rigamonti, 2001). In Deutschland ist die Entwicklungszeit auf einen Fortpflanzungszyklus begrenzt. Der Schaden an den Reben entsteht dadurch, dass sowohl die Larven als auch die erwachsenen Rebzikaden an den Weinblättern saugen und diese schädigen. Da im Sommer sehr große Populationen an einer Pflanze auftreten können, entsteht ein erheblicher Stress für die Rebe (Decante und van Helden, 2001). Um *Empoasca vitis* zu bekämpfen gibt es eine Reihe biologischer Möglichkeiten, so kommen z.B. Raubmilben zum Einsatz.

Eine andere Gattung von weinpathogenen Insekten sind die Dickmaulrüssler. Sie ernähren sich von allen grünen Teilen der Rebe und können bei verstärktem Auftreten, durch Knospenfraß beträchtliche Schäden anrichten. Der Blattfraß selbst fällt aber, wenn die Pflanze im Sommer voll entwickelt ist, kaum ins Gewicht. Der gefurchte Dickmaulkäfer (*Otiorhynchus sulcatus*, Fabricius) ist nachtaktiv und bohrt die Knospen an, um sie später auszuhöhlen. Die Larven, die meist durch Jungfernzeugung entstehen und dann alle weiblich sind, fressen nach dem Schlüpfen mehrere Wochen die Wurzeln der Pflanze ab und schlüpfen im Folgejahr aus der Puppe. Die Fraßschäden an den Wurzeln führen zu

Kümmerswuchs und sogar zum Absterben der Rebstöcke (van Tol *et al.*, 2004).

Die Obstbaumspinnmilbe, auch Rote Spinne genannt, da die Weibchen stark rötlich pigmentiert sind, befällt ebenfalls Weinreben. Im Gegensatz zu den Dickmaulrüsslern können sie in heißen Sommern bis zu sieben Generationen im Jahr produzieren. Aus einem Weibchen können so bis zu 100 Millionen Nachkommen pro Jahr hervorgehen (Abbassy *et al.*, 2012). Spinnmilben stechen als saugende Pflanzenpathogene die Blätter der Weinpflanzen an und können bei hohem Befall zu deren Absterben beitragen.

Als Letztes sind noch der Einbindige Traubenwickler (*Eupoecilia ambiguella*, Hübner) und der Bekreuzte Traubenwickler (*Lobesia botrana*, Denis und Schiffermüller) zu nennen. Sie verursachen, wenn sie nicht bekämpft werden, bei Weitem die größten Schäden im Weinbau (INRA, HYPPZ, 1997). Nach jahrzehntelanger Forschung wird seit 1986 die sogenannte Verwirrmethode eingesetzt. Dafür werden Ampullen mit weiblichen Sexuallockstoffen in großer Zahl im Weinberg aufgehängt. Dadurch entsteht eine Pheromonwolke, welche es den Männchen unmöglich macht ein Weibchen zu lokalisieren. Diese Methode wird mit großem Erfolg angewandt und konnte den Befallsdruck stark reduzieren (Witzgall *et al.*, 2012; Schmidt-Büssel *et al.*, 2009).

## 1.2 Pilze

Die drei wichtigsten Pathogene, sowohl echte als auch Scheinpilze, im Weinbau sind *Plasmopara viticola*, der Erreger des Falschen Mehltaus, *Uncinula necator*, welcher zum Echten Mehltau führt und der Grauschimmelerreger *Botrytis cinerea*.

*Plasmopara viticola* (Berk. und Curt.) Berl. & de Toni ist ein heterothallischer Oomycet, der den Falschen Mehltaus bei Weinreben verursacht (Latouche *et al.*, 2013). Durch diese verheerende Krankheit kann es zu vollständigen Ernteausschlägen kommen. Aus diesem Grund werden im Weinbau große Mengen an Fungiziden eingesetzt, um den Befall zu verhindern oder einzugrenzen. *P. viticola* ist ein obligat pathogener Oomycet, der seine Nährstoffe aus infizierten Pflanzenzellen mittels Haustorien erhält (Gan *et al.*, 2012). Bei empfindlichen Kultivaren der Weinrebe, ist die Kompatibilität zwischen Pilz und Pflanze vermutlich dadurch zu erklären, dass die Pflanze nicht in der Lage ist die Infektion zu erkennen. So sind zum Beispiel die europäischen *V. vinifera* Sorten sehr anfällig für *P. viticola*, dahingegen sind mehrere amerikanische (vor allem wilde südamerikanische) und asiatische Rebsorten deutlich resistenter. Inzwischen konnte sogar ein mögliches Resistenzgen zugeordnet werden (Blanc *et al.*, 2012; Miclot *et al.*, 2012). Bemühungen, dieses Gen durch konventionelle Züchtung in kultivierte *V. vinifera* Genotypen einzubringen, waren zudem erfolgreich. Die so generierten Pflanzen sind allerdings noch nicht vollständig resistent. Zusätzlich konnten erste Studien

zeigen, dass eine Aktivierung der pflanzlichen Abwehr durch künstliche Laminarinsulfate, die als Elicitoren dienen, die Synthese von flüchtigen organischen Verbindungen der Pflanze aktivieren. Diese Verbindungen, zum Beispiel verschiedene Terpene, stimulieren die Pflanzenabwehr, versetzen Nachbarpflanzen in eine Art erhöhte Grundabwehr und erschweren dem Pathogen den Befall (Winkler *et al.*, 2013; Vincenot *et al.*, 2011).

Eine weitere wichtige Pilzkrankheit der Weinrebe ist der Echte Mehltau, der in allen Weinanbaugebieten weltweit auftritt. Der Erreger ist der obligat biotrophe Ascomycet *Erysiphe necator* (syn. *Uncinula necator*, Schwein., Burrill). Der Pilz ist in der Lage alle Pflanzenteile der Rebe zu befallen, verursacht aber die meisten Schäden an Trauben und Blättern der Pflanze. Die Ascosporen keimen meist auf der Blattoberseite (im Gegensatz zum Falschen Mehltau, bei dem die Keimung auf der Blattunterseite stattfindet) und entwickeln Hyphen. Diese produzieren Haustorien, welche Nährstoffe aus den epidermalen Zellen der Wirtspflanze aufnehmen. Nach der Infektion bildet sich auf der Blattoberfläche Luftmyzel, auf dem die Konidiophore und Ketten von Konidien zu finden sind. Der Pilz überwintert in den Knospen der Pflanze und erzeugt im Frühjahr auf den neuen Trieben einen dichten Überzug, welcher weiß aus den grünen Teilen der Pflanze heraussticht (Gadoury *et al.*, 2012). Die Blätter, Triebe, Blattadern und reifenden Beeren sind alle anfällig für Infektionen. Ein Befall kann die Weinreben schwächen und zum Verlust von Obstqualität und -quantität führen (Ermini *et al.*, 2010). Um den Mehltau zu bekämpfen, werden bis heute vor allem Schwefelpräparate angewendet. Zur Verhinderung der Ausbreitung im Frühjahr sind jedoch große Mengen Fungizide und eine flächendeckende Behandlung der Pflanzen in kurzen Zeitintervallen nötig. Alleine in kalifornischen Weinbergen wurden im Jahr 2008 mehr als 18.000 Tonnen Schwefel gegen den Echten Mehltau eingesetzt (Riaz *et al.*, 2010). Außerdem schätzt das kalifornische Landwirtschaftsministerium, dass ohne den Einsatz von Fungiziden, die kalifornische Trauben- und Weinproduktion alleine durch den Echten Mehltau Verluste von bis zu 97 % erleiden könnte. *U. necator* ist zudem in der Lage schnell Resistenzen gegen die meisten eingesetzten Fungizide zu generieren (Miller *et al.*, 2004).

Neben Esca tritt besonders häufig der Erreger der Edelfäule bei Weinreben, *Botrytis cinerea* im konventionellen und biologischen Weinbau auf. Dieser Organismus ist jedoch nicht nur ein Pflanzenpathogen, sondern wird im Weinbau auch als Edelfäule sehr geschätzt. Dies führt dazu, dass der Pilz nicht immer bekämpft werden muss, aber dass die Befallsrate in einem sehr engen Rahmen gehalten werden muss. Der Pilz gehört zu den echten Schlauchpilzen (*Pezizomycotina*) und sekretiert Enzyme, welche die Cuticula der Weinbeeren abbauen. Dadurch kann bei trockenem und warmem

Klima Wasser aus den Trauben verdunsten und es werden die öligen und glukosehaltigen Bestandteile konzentriert. Außerdem baut der Pilz beereneigene Säuren ab und verändert so den Geschmack der Früchte. Diese Eigenschaften machen sich die Winzer zur Erzeugung spezieller Edelfäuleweine, die eine hohe Restsüße haben, zu nutze (Landrault *et al.*, 2002). Wenn *Botrytis* an jungen Traubenständen auftritt, an denen der Pilz nicht wünschenswert ist, wird meistens, da eine genaue Befallsvorhersage in Deutschland schwierig ist, relativ viel Fungizid eingesetzt. Leider sind die Kosten einer chemischen Botrytisbekämpfung relativ hoch, so werden pro Hektar behandelte Fläche im Jahr Spritzmittel für ca. 220 Euro verwendet (Kast, 2013). Außerdem wurden erste, gegen konventionelle Fungizide weitgehend resistente, *Botrytis*-Stämme im Süden Deutschlands isoliert. Selbst eine Erhöhung des Spritzmitteleinsatzes führt somit nicht mehr zum gewünschten Erfolg (De Miccolis Angelini *et al.*, 2014). Um einen zu starken Befall der Trauben, der vor allem in feuchten Sommern zu beobachten ist, zu vermeiden, wurden bereits verschiedenste Experimente mit biologischen Antagonisten durchgeführt. Hierbei kamen unter anderem verschiedene *Trichoderma* Arten zum Einsatz (Szandala und Backhouse, 2001).

### **1.3 Krankheitsbild der Esca-Krankheit bei *Vitis vinifera***

Bei Esca handelt es sich um einen Krankheitskomplex der große Zerstörungen in Weinbergen in Europa, Australien, Südafrika und Kalifornien anrichtet. Die beteiligten Pilze sind vor allem im verholzten Teil der Weinpflanzen (*Vitis vinifera* L.) zu finden (Chiarappa, 1959; Dubos und Larignon, 1988, Landi *et al.*, 2012). Die ersten historischen Aufzeichnungen zu dieser Krankheit reichen bis in die Zeit der Römer um Christi Geburt zurück. Diesem Umstand verdankt die Krankheit auch ihren Namen: Esca bedeutet auf lateinisch Zunder. Die befallenen Reben sterben im Verlauf der Krankheit ab, trocknen ein und bilden so eine gute Grundlage zum Entfachen von Feuer (Iriti und Faoro, 2008; Herche, 2009). Bis vor wenigen Jahren war die Krankheit vor allem in den südeuropäischen Weinanbaugebieten, wie in Spanien und Italien, weniger in Deutschland und Nord-Frankreich, zu finden. Im Zuge der Klimaerwärmung und dem damit verbundenen trockeneren und heißeren Klima im Sommer zeigen aber bereits viele Reben auch in Deutschland die typischen Symptome der Krankheit (Deml *et al.*, 2009). Zusätzlich belegen Studien, dass veränderte Anbaubedingungen und der frühe Rebschnitt in Kombination mit kurzen und milden Wintern die Ausbreitung der Krankheit fördern (Hofstetter *et al.*, 2012). Der Krankheitsverlauf tritt in zwei Formen auf: Es gibt einerseits einen chronischen und andererseits einen schweren und schnellen Verlauf der Krankheit, bei dem der befallene Weinstock innerhalb weniger Tage abstirbt und eintrocknet. Bei der chronischen Erkrankung, die wesentlich langsamer zum Zerfall der Pflanze führt, erscheinen die Symptome erst nach Jahren und oft unregelmäßig (Viala, 1926; Arnaud, 1931; Chiarappa, 1959; Baldacci *et al.*, 1962;



Branas, 1974; Galet, 1977; Dubos und Larignon, 1988). Der latente Befall ist vor allem durch verkümmerte Blätter und Triebe im Frühjahr gekennzeichnet. Im späteren Verlauf des Jahres entwickeln sich zwischen den Blattnerve chlorotische, gelbbräunlich verfärbte Flecken, die nachfolgend nekrotisch werden (Hofstetter *et al.*, 2012). Die Trauben setzen nach der Blüte normal an, wachsen aber nicht zu voller Größe heran, welken frühzeitig und verkümmern (Graniti, 1960; Grasso, 1969; Mugnai *et al.*, 1999). Der nekrotische Verlauf der Krankheit ist durch sehr schnell absterbende Pflanzen gekennzeichnet, der gesamte Stock oder dessen grüne Teile trocknen völlig ein. Querschnitte durch den Stamm der befallenen Reben zeigen unterschiedliche Formen schwarzer, ringförmiger Bereiche im Zentrum. (Grasso, 1969; Galet, 1977; Gramaje *et al.*, 2010).

In den frühen Jahren der Bekämpfung von Esca wurden erste Erfolge durch das Spritzen von Natriumarsenit in den Monaten der winterlichen Knospenruhe erzielt. Um effizientere Methoden zu entwickeln, die bei gleicher Effektivität umweltverträglicher sind als Natriumarsenit, müssen zuerst die an der Krankheit beteiligten Mikroorganismen näher charakterisiert werden. Außerdem sollten die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Organismen auf molekularbiologischer Basis analysiert werden. In den vergangenen Jahren wurden aus einer großen Anzahl von infizierten Holzproben, meist vier Pilze isoliert: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Formitiporia mediterranea* und *Eutypa lata*. Ihre Pathogenität wurde im Anschluss auf Holzblöcken und lebenden Weinreben getestet (Larignon und Dubos, 1997). In den folgenden Kapiteln (1.3.1-1.3.4) werden die Pilze näher beschrieben.

Trotz vieler Forschungsansätze wurde bisher keine Methode zur Kontrolle der Krankheit gefunden. Es wurde die mögliche Aktivität von Aluminiumfosetyl in Gewächshausversuchen mit Reben, die künstlich mit *Pm. chlamydospora* (Pm) und *Pa. aleophilum* (Pa) Sporen infiziert wurden, untersucht. So ließ sich eine Reduktion des Wachstums beobachten. In den anschließenden Feldversuchen, die über mehrere Jahre durchgeführt wurden, konnte ebenfalls eine Reduktion der Jahres- und kumulativen Inzidenz der Krankheitssymptome detektiert werden. Die Wirkung durch die Aluminiumfosetyl-Behandlungen auf den Gasaustausch der Blätter und auf die Produktion von Resveratrol und Viniferin wurden ebenfalls untersucht. Es konnten inzwischen auch erste Hypothesen über den Wirkmechanismus von Aluminiumfosetyl gegen Esca aufgestellt werden. So nehmen Di Marco *et al.* (2011) an, dass eine erhöhte Konzentration von Oxygenasen in den Blättern die Wirkung der pilzlichen Toxine verhindert. Die Wirkung in Freilandversuchen muss allerdings noch kontrolliert werden.

Die Abwehrmechanismen in der Pflanze, besonders bei der Pilz-Pflanzen-Interaktion sind bis heute nur unzureichend verstanden. Es konnten einige Rebsorten beobachtet werden, die weniger anfällig für Esca sind als andere. Somit wäre es ein großer Fortschritt, wenn die Grundlage dieser potenziell

stärkeren Abwehrreaktion verstanden werden könnte. Hierzu wurden Studien am weniger sensitiven Kultivar 'Merlot' und an einer anfälligeren Sorte 'Cabernet Sauvignon' durchgeführt (Travadon *et al.*, 2013). Es wurden die Schnittwunden von Weinrebenstecklingen mit Kulturfiltrat von Pm behandelt. Die weniger anfällige Sorte zeigte eine frühere und stärkere Abwehrreaktion als der sensitivere Kultivar. Insbesondere im Hinblick auf die Induktion der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, der Stilben-Synthese verbunden mit einer stärkeren Anreicherung von Stilbenverbindungen und einiger pathogenetisch relevanter Proteine konnten erste Unterschiede bei den Kultivaren beobachtet werden (Lambert *et al.*, 2013).

### 1.3.1 *Phaeomoniella chlamydospora*

Beim Ascomyceten *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pm. chlamydospora*, Pm) (W. Gams, Crous, M. J. Wingf. & Mugnai) wird inzwischen mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen, dass dieser tracheomykotische Pilz einer der Hauptpathogene der Esca Krankheit ist (Crous & W. Gams, 2000, Fleurat-Lessard *et al.*, 2010). Es handelt sich um einen haploiden Deuteromyceten, dessen sexuelle Strukturen bisher nicht bekannt sind. Die genetische Struktur der Population hingegen wurde mit Hilfe der 'random amplified polymorphic' DNA (RAPD) Analyse untersucht. Mit dieser Methode konnte ein genaueres Profil der einzelnen Pm-Populationen erstellt werden. Die untersuchten Teilgruppen von *Pm. chlamydospora* zeigten eine auffällig gleichmäßige Diversität auf lokaler und regionaler Ebene (Larignon und Dubos, 2007; Tello *et al.*, 2010).

Eines der größten Probleme bei der Identifizierung der Esca-assoziierten Pathogene ist, dass die beteiligten Pilze auch aus gesunden Weinpflanzen, die keine Symptome der Krankheit aufweisen, isoliert werden können. Was wiederum die Frage aufwirft, wie das nekrotische Wachstum induziert wird oder was zum Auftreten der Symptome führt und weshalb die Pilze auch mehrere Jahre in der Weinpflanze wachsen können ohne das größere Ernteausfälle oder Krankheitssymptome entstehen (Valtaud *et al.*, 2009). Myzelwachstum wurde bei Temperaturen von 5 bis 37 °C beobachtet, das Optimum liegt aber zwischen 25 °C und 30 °C, wobei eine temperaturinduzierte Pathogenitätsinduktion nicht beobachtet werden konnte (Borie *et al.*, 2002).

Bisher ist noch wenig über den Infektionsmechanismus und die Sporenverbreitung des Pilzes bekannt (Larignon und Dubos, 2000). Die Sporen von *Pm. chlamydospora* sind aber in der Lage verunreinigte Schnittwunden zu befallen (Eskalen *et al.*, 2007; Díaz und Latorre 2013). Nach einer weiteren Theorie könnten die in den Boden eingedrungenen Chlamydosporen über das Wurzelsystem in die Weinrebe eindringen (Mugnai *et al.*, 1999). Der häufigste Verbreitungsweg von *Pm. chlamydospora* dürfte aber wohl das Einbringen neuer, bereits infizierter Reben in einen älteren Bestand sein, weshalb ein

besonderes Augenmerk auf die sorgfältige Auswahl der Rebenstecklinge gelegt werden muss (Aroca *et al.*, 2010). Von diesen Infektionsherden breitet sich der Pilz dann auf benachbarte Pflanzen aus. Ein großes Problem bei diesen Infektionen sind die meist langen Inkubationszeiten, in denen sich die Sporen sukzessive nach dem jährlichen Rebschnitt in der Anlage ausbreiten (Bertelli *et al.*, 1998).

### 1.3.2 *Phaeoacremonium aleophilum*

*Phaeoacremonium* ist eine Gattung von Hyphomyceten. Aus *Vitis* Kultivaren, die Esca-oder 'Petri-Disease'-Symptome zeigen, wurde neben dem oben erwähnten *Phaeoacremonium chlamydospora* auch meistens eine Art von *Phaeoacremonium* isoliert. Im Vergleich zu *Pm* wurden bei *Phaeoacremonium* aber mehrere Arten beschrieben. Aus Reben in der Türkei wurden die Art *Phaeoacremonium scolyti* isoliert (Özben *et al.*, 2012), aus Reben in Spanien wurden neben *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pa. aleophilum*, *Pa.*; W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) noch die Arten *Pa. mortoniae*, *Pa. iranianum* und *Pa. krajdenii* beschrieben (Gramaje *et al.*, 2011; Martín und Martín, 2013). In Neuseeland konnten die Arten *Pa. angustius*, *Pa. parasiticus* und *Pa. venezelense* isoliert werden (Mundy und Manning, 2010). Es handelt sich um haploide Deuteromyceten. Sporen von *Phaeoacremonium* spp. wurden in sehr vielen Weinlagen weltweit eingesammelt, aber bisher konnten weder sexuelle noch asexuelle Fruchtkörper bei Feldversuchen beobachtet werden. Vor fünf Jahren wurde die Zuordnung zum bereits bekannten Teleomorph *Togninia minima* (Tul. & C. Tul.) Berl. durch ITS Sequenz-Vergleiche möglich (Mostert *et al.*, 2003; Rooney-Latham *et al.*, 2005).

Der Infektionszyklus von *Pa. aleophilum* ist noch unbekannt, aber man geht bei diesem Pilz, wie auch bei *Pm. chlamydospora*, von einer Infektion über Schnittwunden aus (Rolshausen *et al.*, 2010). Wie die Sporen überwintern und wie sie verbreitet werden, ist bisher noch Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. *Pa. aleophilum* Sporen wurden in beschnittenen wie auch in unbeschnittenen Weinreben gefunden. Das Beimpfen von Schnittwunden zeigte, dass der Pilz über diese in die Pflanze eindringen kann. Allerdings ist die Effektivität der Infektion abhängig von der Umgebungstemperatur, dem Zeitpunkt des Rückschnitts und dem Alter der Wunde vor der Inokulation. Die Sporen von *Pa. aleophilum* wurden vor allem während der Vegetationsperiode aus der Luft isoliert. Es ist also davon auszugehen, dass es eine Phase der Windübertragung der Sporen im Lebenszyklus des Pilzes gibt (Larignon und Dubos, 2000; Whiting *et al.*, 2001).

In den vergangenen Jahren wurden einige phytotoxische Sekundärmetabolite nicht nur von *Pa. aleophilum*, sondern auch von *Pm. chlamydospora* isoliert und charakterisiert. Von diesen Substanzen konnten bereits  $\alpha$ -Glukane unterschiedlichster Molekulargewichte und zwei Naphthalin-Pentaketide (Scytalon und Isoscleron) zugeordnet werden (Sparapano und Bruno, 2006a und 2006b). Beide

Substanzen sind Intermediate des Melanin-Biosynthese-Weges. In diesem Zusammenhang wurde bereits postuliert, dass Isoscleron und Scytalon zu den Esca Symptomen an der Pflanze führen (Andolfi *et al.*, 2011). Von anderer pflanzenpathogener Pilze ist bekannt, dass Polyketidsynthasen essentiell sind für die Pathogenität. Die Produktion von Melanin bei *Magnapotha oryzae* und die Produktion des T-Toxins, ebenfalls ein Polyketid durch *Cochliobolus heterostrophus* werden unter anderem durch Polyketidsynthasen katalysiert (Yang *et al.*, 1996; Böhnert *et al.*, 2004; Collemare *et al.*, 2008). Die Synthese von Scytalon und Isoscleron, die ebenfalls Intermediate des Melanin-Biosyntheseweges sind, beruht daher auf der Funktionalität von Polyketidsynthasen. Melanin ist ein wichtiges Molekül der Zellwandsynthese und ist bei einigen Pflanzenpathogenen ein Pathogenitätsfaktor (Abou-Mansour *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2010; Gokce *et al.*, 2012). In einigen Versuchen wurden die isolierten Substanzen auf abgetrennte Weinblätter getropft oder in das holzige Gewebe des Stammes und der Äste injiziert und es zeigten sich bereits bei sehr geringen Dosen, ähnliche Symptome, wie jene, die auch während der Esca Erkrankung zu beobachten sind (Andolfi *et al.*, 2011). Die gleichen Ergebnisse lassen sich auch durch den Einsatz von unterschiedlich langen Pullulanen erzeugen. Pullulane sind natürliche, wasserlösliche lineare Polysaccharide, die aus Maltotriose-Einheiten bestehen (Deshpande *et al.*, 1992; Leathers, 2003). Pullulane sind als Isolate von *Aureobasidium pullulans* beschrieben (Brown und Lindberg, 1967) und werden auch als bioreaktive Substanz gegen *Botrytis cinerea* eingesetzt. Die Pullulane aus dem Xylemsaft infizierter Weinreben waren zwischen 10 und 1500 kDa groß (Sparapano, Bruno und Graniti, 2006).

Das Genom von *Phaeoacremonium aleophilum* wurde 2013 vollständig sequenziert und ist seit einigen Monaten veröffentlicht. Dadurch ist zu erwarten, dass in den kommenden Monaten und Jahren große Fortschritte bei der Erforschung dieses Pilzes gemacht werden (Blanco-Ulate *et al.*, 2013a; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Togninia%20minima; PRJNA188116> ).

### 1.3.3 *Fomitiporia mediterranea*

*Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. 2002 ist ein Basidiomycet aus der Familie der *Hymenochaetaceae*, der aus Reben, die Esca Symptome zeigen, isoliert wurde (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Fischer, 2002). Er ist erst seit etwa 10 Jahren beschrieben, nur der Pilz der gleichen Gattung *F. punctata* ist aus dem Süden Europas schon länger bekannt (Fries 1874 ex P. Karsten 1882; Murrill 1947). Fischer und Kassemeier (2003) konnten aber zeigen, dass es sich bei der nördlich der Alpen anzutreffenden Art um eine eigene handelt. Im Deutschen trägt der Pilz den Namen Mittelmeer Feuerschwamm. Wie bei Basidiomyceten üblich, bildet dieser Pilz holzig-harte Fruchtkörper. Sie sind am Rebholz als 2 cm dicke, ockergelbe Kruste zu erkennen. Die Fruchtkörper sind meist in einer Höhe

zwischen 50 und 100 cm über dem Boden zu finden. Die Farbe der Pyknien und auch das Hymenophor des Pilzes ist bräunlich-gelb. Die Poren von *F. mediterranea* sind rundlich und eher klein, von ihnen sind 5–7 Stück pro mm zu finden (Fischer und Kassemeyer, 2003). Der Pilz verfügt über ca. 15 mm lange Röhren mit dicken Scheidewänden. Das Myzel ist besonders gut nach der Isolation des Pilzes auf Agarplatten zu sehen, watteartig weich und luftig aufgebauscht. Die oberirdischen Hyphen sind eher gelb, mit zunehmendem Alter werden sie braun. Wenn *F. mediterranea* eine Pflanze besiedelt hat, besitzt er ein dimorphes System aus generativen Hyphen und Skeletthyphen. Die goldbraunen Skeletthyphen verleihen dem Fruchtkörper seine Robustheit, sind selten verzweigt und besitzen keine Septen. Bei den Hyphen, die eher durchsichtig und mit dünnen Wänden versehen sind, handelt es sich um generative Hyphen. Sie sind häufig verzweigt, einfach septiert und verfügen im Allgemeinen nicht über Setae. Die Fortpflanzung des Pilzes ist homothallisch. Im Esca Komplex verursacht *F. mediterranea* die sogenannte Weißfäule an der befallenen Pflanze, während *Pm* und *Pa* tracheomykotisch wachsen und nur sehr wenige Holzsubstanz-degradierende Enzyme abgeben. Dabei wird vom Weißfäuleerreger vor allem das Holz der Seitentriebe und des Stamms, in seltenen Fällen des Wurzelstocks, zersetzt. Der Pilz baut hierbei mit Hilfe von Enzymen das Lignin des Holzes ab, wobei diese Enzyme noch nicht näher beschrieben sind (Fischer, 2010). Es ist allerdings bekannt, dass der Pilz Tannasen, Laccasen und Peroxidasen produziert und sekretiert (Bruno und Sparapano, 2006; Abou-Mansour *et al.*, 2009). Das Holz der Pflanze wird brüchig und faserig und nimmt eine schwammige Konsistenz an. Bei Querschnitten durch den Stamm ist zu erkennen, dass der Befall vor allem im Kernbereich zu finden ist. Die Infektion der Rebe durch den Pilz findet im Allgemeinen über die Rückschnittwunden an der Weinpflanze statt, von wo aus der Pilz sich in das Innere des Stocks ausbreitet (Pilotti *et al.*, 2005). Aus dem Zentrum kann er, oft erst nach Jahren, wieder an die Oberfläche des Stammes treten. Der Pilz befällt zwar vor allem die wirtschaftlich wichtigen Reben (*Vitis vinifera*), er wurde aber auch aus Olivenbäumen (*Olea europea*), der Haselnuss (*Corylus avanella*) oder Zitruspflanzen (*Citrus sp.*) isoliert (Surico *et al.*, 2008). Die Weißfäule, die mit der Esca-Krankheit einhergeht, zeigt aber nicht die typischen, durch die beiden Pilze *Pm. chlamydospora* und *Pa. aleophilum* hervorgerufenen Symptome, sondern die Pflanze stirbt nach einigen Jahren durch den Befall und die unterbrochene Nährstoffzufuhr ab. Außerdem wird diskutiert, dass *F. mediterranea* die Pflanze nur opportunistisch befällt (Sparapano und Bruno, 2006a).

Inzwischen wurde das Genom des Pilzes vollständig sequenziert. Damit ergeben sich neue Möglichkeiten um dieses Pathogen molekularbiologisch zu untersuchen (<http://genome.jgi.doe.gov/Fomme1/Fomme1.home.html>). Unter Anderem konnten so schon neue Enzyme erkannt und im Vergleich der genomischen DNA mit andere Hymenochaetales klassifiziert

werden (Morgenstern *et al.*, 2010).

#### 1.3.4 *Eutypa lata*

Ein weiterer Pilz der regelmäßig aus Weinpflanzen, die Symptome der Esca-Krankheit zeigen, isoliert wird ist *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. 1863 (Synonym: *E. armeniaca*, Hansf. und M. V. Carter; Anamorph: *Libertella blepharis*, A. L. Smith; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Auch das Genom dieses weinpathogenen Pilzes wurde inzwischen sequenziert und kann untersucht werden (Blanco-Ulate *et al.*, 2013b). Er gehört zur Familie der *Diatrypaceae* und ist ebenfalls aus dem Phylum der *Ascomycota*. *E. lata* hat ein sehr breites Wirtsspektrum und wurde weltweit aus mehr als 80 Holzpflanzenarten isoliert. Der Pilz kann nur bei ausreichender Feuchtigkeit und durch Schnittwunden die Wirtspflanze infizieren. Die Ascosporen sind nicht in der Lage durch die Pflanzenoberfläche selbst in die Rebe einzudringen. Um einen *E. lata* Befall zu verhindern müssen die Schnittwunden geschützt werden (Sosnowski *et al.*, 2008; Gubler *et al.*, 2009). Die Latenzzeit, bis sich erste Symptome der Krankheit zeigen oder Fruchtkörper auf der Pflanzenoberfläche entstehen, kann mehrere Jahre betragen. Die Stroma mit Perithezien bilden sich meist erst bei genügend hohem Niederschlag an Holz das 2-3 Jahre abgestorben ist. In den Fruchtkörpern entsteht eine sehr große Zahl von Ascosporen (Siegfried und Bolay, 1993). Nach ausreichenden Regenfällen und Temperaturen über dem Gefrierpunkt werden die Ascosporen abgegeben und keimen im Anschluss bei mehr als 20 °C an frischen Schnittwunden aus (Ramos *et al.*, 1975; Muruamendiaraz *et al.*, 2009). Auf diesem nekrotischen Gewebe entstehen Pyknidien mit fädigen Konidien. Sporen, die nicht sofort auskeimen können, überleben meist 2-3 Monate und können mit dem Wind über große Distanzen verbreitet werden (Siegfried und Bolay, 1993). Erst nach einigen Jahren des Befalls lassen sich erste Symptome der Eutypiose ausmachen.

Es unterschiedliche Ansichten bei der Definition und Benennung der einzelnen Krankheiten. Im Allgemeinen wird aber die tracheomykotische Krankheit, welche durch Pm und Pa erzeugt wird und die Weißfäule, generiert durch Fm als Esca-Krankheit zusammengefasst. Die Eutypiose wird durch die Infektion der Rebe mit *Eutypa lata* hervorgerufen (Mugnai *et al.*, 1999; Graniti *et al.*, 2001; Surico *et al.*, 2006; Bertsch *et al.*, 2012). Die Symptome nach der Infektion der Rebe durch *E. lata* sind ein schwaches Wachstum mit kleinen, chlorotischen, am Rand nekrotischen Blättern und kurzen, oft zickzackförmig wachsenden, verkümmerten Trieben (Rolshausen *et al.*, 2011). Nach der Erstinfektion kann der Weinstock mehrere Jahre weiterwachsen bevor er vollständig abstirbt. Am einfachsten ist die Eutypiose während der Reblüte zu erkennen, da der Blühvorgang der infizierten Pflanze häufig gestört ist. Die Blüten öffnen sich meist zu früh und haben eine abnorme, verkleinerte Form. Falls nach der Blüte Trauben entstehen, sind diese sehr klein und sterben in der Regel im Laufe des Sommers ab.

Im Holz zeigen sich bei Längsschnitten lila-braune Verfärbungen, die sich von einer Rückschnitt-Schnittstelle durch den ganzen Stamm ziehen können (Deml *et al.*, 2009).

Aus *E. lata* sind bereits einige Substanzen bekannt, die auch einen Einfluss auf Krankheitssymptome haben können. Neueste Studien zeigen, dass es wohl nicht nur einen *Eutypa*-Stamm gibt, z.B. in Nordamerika wurden mehrere Stämme an der Ostküste beschrieben. Alle gefundenen Stämme produzieren ähnliche Phytotoxine (Rolshausen *et al.*, 2011). Die wichtigste Substanz ist das Eutypin (4-hydroxy-3-(3-methyl-3-buten-1-ynyl)benzaldehyd), es wurde aus allen Stämmen isoliert (Renoud *et al.*, 1989; Amborabé *et al.*, 2001). Es konnte eine biologische Aktivität des Eutypin an der Plasmamembran beobachtet werden. Das Pilztoxin löste eine schnelle dosisabhängige Hyperpolarisation des Membranpotentials der Pulvinarzellen von *Mimosa pudica* aus. Außerdem erhöhte es die Protonenpermeabilität der Zellwand in Pflanzengewebe oder gereinigter Plasmamembranvesikel. Als physiologische Folge behinderte Eutypin die Saccharose- und Valin-Absorption durch Plasmamembranvesikel und durch pflanzliches Gewebe (Amborabé *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde die Substanz 5-Formyl-2-methylvinyl-1-benzofuran, welche eine starke Phytotoxizität zeigte, isoliert. Die Sekundärmetabolite Eutypinol, Quinol und Sicayne (2-(3-Methyl-3-buten-1-ynyl)hydroquinone), die ebenfalls aus Kulturfiltraten von *E. lata* isoliert wurden, weisen keine nennenswerte Aktivität auf (Smith *et al.*, 2003).

### 1.3.5 Bekämpfungsmethode der Esca-assoziierten Pilze

Bis heute ist es nicht möglich die Esca-assoziierten Pilze, nachdem sie den Weinstock befallen haben, zu bekämpfen. Es gibt also, nicht nur im ökologischen Weinbau einen dringenden Bedarf an effizienten therapeutischen Ansätzen.

Man benötigt Fungizide, die sich in der gesamten Pflanze systemisch verbreiten und auch im Xylem und Phloem der Weinrebe eine Dosis erreichen müssten, die für die Pathogene tödlich ist. Im ökologischen Weinbau werden vor allem kupferbasierte Präparate eingesetzt (Regner, 2011). Neueste Studien beobachteten aber auch hier keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Wie das inzwischen verbotene Natriumarsenit konnten die Präparate zwar teilweise auch in die Pflanze, in diesem Fall in die Blätter hineindiffundieren, wirkten dann aber nicht zuverlässig und langanhaltend (di Marco *et al.*, 2010). *Trichoderma harzianum* und *T. atroviride*, die als natürliche Antagonisten isoliert wurden, sind auch nicht konsistent wirksam im Feldeinsatz. Der Hauptgrund hierfür ist wohl das kurze Verbleiben der antagonistischen Pilze auf der Wunde. Der von Totholz isoliert Stamm *T. atroviride* SC1 kolonisiert frische Wunden sehr ausgeprägt und ist ein starker Produzent von hydrolytischen Enzymen. So ist er in der Lage Wunden für mehrere Monate zu besiedeln und die Pflanzen so während der gesamten

Vegetationsperiode zu schützen. Diese Ergebnisse belegen, dass es vielleicht möglich sein wird, im ökologischen Weinbau neue Wege zu gehen und Wildisolate von Pilzen, die ähnliche Nischen wie die Esca-assoziierten Pilze besiedeln, als wirksame „ökologische Fungizide“ einzusetzen (Prodorutti *et al.*, 2012).

Laut Ergebnissen von Platzer und Schweigkofler (2009) haben die meisten konventionellen Fungizide, die bereits im Weinbau zum Einsatz kommen, keine Wirkung auf das Myzelwachstum und die Keimung von *F. mediterranea* und *Pm. chlamydospora*. Aber selbst eine leichte Wirkung der getesteten Produkte konnte dann, sobald Versuche zur Pathogenkontrolle nach der Infektion durchgeführt wurden, nicht weiter beobachtet werden.

Bei erste *In-vitro*-Studien mit *E. lata* waren Flusilazol, Tebuconazol, Benomyl, Fenarimol und Myclobutanil die wirksamsten Fungizide gegen das Myzelwachstum. In zwei Feldversuchen wurden Schnittwunden künstlich mit *E. lata* Sporen infiziert und nach der Fungizidbehandlung und einer Wachstumsperiode von 12 Monaten Proben entnommen, um die Wirksamkeit der eingesetzten Fungizide zu untersuchen. Die Substanzen Flusilazol und Benomyl hemmten die Sporenkeimung am effektivsten. Die Behandlungen der Schnittwunden mit *Trichoderma* T77 verursachte ebenfalls eine signifikante Reduktion der beobachteten *Eutypa lata* Infektionen und anderer mykotischer Krankheitserreger der Weinpflanze (Halleen *et al.*, 2010).



## 1.4 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Projekte in vier Themengebieten zur Erforschung der molekularen Grundlagen der Pilz-Pflanze-Interaktion der Esca Krankheit beitragen.

Als erster Themenkomplex wurde die Interaktion zwischen den Pilz- und Pflanzenspezies untersucht. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Kommunikation zwischen den einzelnen Pathogenen auf der einen Seite und der Interaktion zwischen *Vitis vinifera* und den einzelnen Pilzen auf der anderen Seite gelegt. Es sollten hier vor allem die sekretierten Sekundärmetabolite, die von den einzelnen Organismen synthetisiert werden, detektiert und analysiert werden.

Im zweiten Themenkomplex sollten mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden  $\Delta$ PKS-Deletionsmutanten der Pilze *Pm. chlamydospora* und *Pa. aleophilum* generiert werden, um zu untersuchen ob die Polyketidsynthese und damit Scytalon, Isoscleron und Melanin essentiell für die Pathogenität der Pilze ist. Hierzu wurden im Anschluss Pflanzenassays durchgeführt und ausgewertet.

Im dritten Teilprojekt dieser Arbeit sollten die Pilzextrakte nach bisher unbekanntem phytotoxischen Sekundärmetaboliten untersucht werden. Diese neuen Substanzen sollten im Anschluss in *in-vivo*- als auch *in-vitro*-Versuchen charakterisiert werden. Dadurch können ihre Eigenschaften und ihre Bedeutung für die Progression der Krankheit beleuchtet werden.

Im abschließenden Teilprojekt dieser Arbeit sollte nach geeignete antagonistische Pilze oder deren fungizide Sekundärmetabolite aus der Stammsammlung des Instituts für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung (IBWF, Kaiserslautern) gesucht werden, die im ökologischen und konventionellen Weinbau präventiv oder kurativ gegen die Esca Krankheit eingesetzt werden können. Es sollten Organismen charakterisiert werden, die eine antagonistische Wirkung gegen die Pathogene, als Schutz auf Schnittwunden (wie die bereits genannten *Trichoderma* Arten, siehe Kapitel 1.3.1) zeigen. Im Anschluss daran sollten Analysen der gebildeten Naturstoffe durchgeführt werden. Während dieser Arbeit sollten zudem unterschiedliche Untersuchungs- und Auswahlmethoden etabliert, verwendet und überprüft werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Antibiotika und Medienbestandteile

##### Lösungsmittel *p.a.*

Aceton	J.T. Baker, Deventer, NL
Acetonitril HPLC grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform HPLC grade	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäureethylester	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Isopropanol <i>p.a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol <i>p.a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt

##### Säuren und Laugen

CH <sub>3</sub> COOH (100%)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
HCl <i>p.a.</i> (32%)	Merck KGaA, Darmstadt
KOH	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
NaOH Plättchen	Merck KGaA, Darmstadt
C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

##### Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cefotaxim-Natrium	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Glufosinate-Ammonium	Bayer® CropScience, Monheim am Rhein
Hygromycin B (HygroGold™)	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin G	SERVA/Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Rifampicin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Streptomycinsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Tetracyclinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

**Medienbestandteile für Fest-und Flüssigmedien**

Acetosyringon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bacto™ Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Casamino Acids	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Difco™ Yeast Nitrogen Base	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Gamborg B5 Medium	Duchefa Biochemie B.V., BH Haarlem, Niederlande
Glukose	SHS, Gesellschaft für Klinische Ernährung mbH, Heilbronn
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte
L-Asparagin, Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Thiamindichlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

**Weitere Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

Acrylamid / Bisacrylamid (29:1)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Antibiotika-Testblättchen (4 mm)	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG , Düren
Antibiotika-Testblättchen (10 mm)	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG , Düren
Anti-11-Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth, Stuttgart
Calciumchlorid	Riedel de Haen, Seelze
Desthiobiotin	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
DIG-11-dUTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA Molecular Weight Marker III und VII,	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DIG-labeled (Digoxigenin)	
DTT (Dithiothreitol)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Eisensulfat-Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Elektroporationsküvetten, 1 mm	PeqLab, Erlangen
Filterblättchen, 12 mm	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG , Düren

---

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte
Glyzerin	Merck KGaA, Darmstadt
Kaempferol (analytical standard)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaempferol-3-Glykosid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Di-Kaliumhydroxylphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Ladepuffer (6x Orange Loading Dye)	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte
L-Glutathion reduziert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lysing Enzymes von <i>T. harzianum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magermilchpulver	Sucofin TSI GmbH & Co. KG, Zeven
Maleinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Hydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid-Hydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Mira cloth	Calbiochem, San Diego, USA
di-Natrium-EDTA	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2-Naphthalenessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natrium-Dihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumnitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Nylon-Membran	Biodyne® Pall Corporation, Dreieich
N-Z-Amine® A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Papierrundfilter (160 mm, 120 mm)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Parafilm® M	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
SDS (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Silicagel Orange	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Sterilfilter, Typ FB 30/03	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte
Zellulosenitrat-Filter NC45 ST	Schleicher & Schuell GmbH, Dasseln
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt

## Wasser

Für die wissenschaftlichen Arbeiten standen Wasser mit zwei unterschiedlichen Qualitätsstufen zur Verfügung. Für die Herstellung von Kulturmedien, Lösungen und Puffern wurde entionisiertes Wasser  $H_2O_{\text{deion.}}$  (Seradest, SERAL-Reinstwassersysteme GmbH, Ransbach-Baumbach) verwendet. Für Antibiotika-Lösungen und Puffer für den Einsatz in molekularbiologischen und proteinbiochemischen Reaktionen, sowie für die Analyse von Reinsubstanzen und pilzlichen Extrakten mittels HPLC und HPLC-MS wurde ultrafiltriertes Reinstwasser  $H_2O_{\text{UF}}$  (Milli-Q<sup>®</sup> Synthesis, Quantum<sup>®</sup> EX, Q-Gard<sup>®</sup> 2, Millipore, Merck Chemicals GmbH, Schwalbach) eingesetzt.

### 2.1.2 Enzyme

Folgenden Enzyme wurden für die molekularbiologischen Arbeiten nach Herstellerangaben eingesetzt:

Restriktionsendonukleasen	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte NEB (New England Biolabs Inc.) Ipswich, USA;
FastAP (Shrimp-alkaline-phosphatase)	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte
T4 DNA Ligase	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte
Taq/DreamTaq und HotStartTaq-Polymerase	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte
Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity Polymerase	NEB (New England Biolabs Inc.) Ipswich, USA

### 2.1.3 Reaktionskits

Folgende Reaktionskits wurden für das molekularbiologische Arbeiten nach Herstellervorschrift verwendet:

GeneJET <sup>™</sup> Plant Genomic DNA Purif. Mini Kit	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte
GeneJET <sup>™</sup> Gel Extraction Kit	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector System I	Promega, Mannheim, Deutschland
CloneJET <sup>™</sup> PCR Cloning Kit	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte
Gibson Assembly Kit	NEB (New England Biolabs Inc.) Ipswich, USA

## 2.1.4 Lösungen und Puffer

### 2.1.4.1 Lösungen

Alle Angaben beziehen sich auf ein Endvolumen von 1 L in H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>, sofern nicht anders angegeben.

#### L1: Antibiotikallösung TET

Tetracyclinhydrochlorid	50	mg
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad	10 mL

In Wasser gelöste Antibiotika wurden mit einem Sterilfilter (Typ FB 30/03; Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) filtriert, aliquotiert und anschließend bei -20 °C, gelagert.

#### L2: Antikörperlösung

Anti-Digoxigenin-AP	1,5	µL
Blockingpuffer (P12)	ad	20 mL

#### L3: Denhardt's Lösung (100x)

Ficoll® 400	1	g
Polyvinylpyrrolidone	1	g
BSA, Rinderalbumin	1	g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad	50 mL

#### L4: Lösung 1 zur Alkalischen Lyse (Sol I)

2 M Glukose	1	mL
1 M Tris HCl	1	mL
0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA	0,8	mL
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	37,2	mL

#### L5: Lösung 2 zur Alkalischen Lyse (Sol II)

10 M NaOH	0,8	mL
10 % SDS	4	mL
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	35,2	mL

#### L6: Lösung 3 zur Alkalischen Lyse (Sol III)

5 M CH <sub>3</sub> COOK	30	mL
CH <sub>3</sub> COOH	5,75	mL
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	14,25	mL

#### L7: LysozymLösung

Lysing Enzymes	100	mg
----------------	-----	----

(*T. harzianum*)

P Puffer (P10)	ad	100	mL
----------------	----	-----	----

#### L8: MES-Lösung (1 M)

MES Hydrat	19,5	g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad	100 mL
		pH 5,5

#### L9: NaCl-Lösung (Protoplastentransformation)

NaCl	5,9	g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad	100 mL

Die Lösung wurde autoklaviert und vor dem Einsatz wurden *steril Lysing Enzymes (Trichoderma harzianum)* 20 mg/mL und β-Mercaptoethanol 100 µL/100 mL (Endkonz.) zugesetzt.

#### L10: Nitratsalzlösung (20x)

NaNO <sub>3</sub>	120	g
KCl	10,4	g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10,4	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30,4	g

#### L11: PEG-Lösung

PEG 4000	5	g
KCl	3,8	g
CaCl <sub>2</sub>	5,5	g
Tris-HCl (50 mM, pH 8,0)	ad 50	mL

#### L12: PEG/LiAc-Lösung

PEG 3350	4	g
LiAc	0,7	g
EDTA	2,9	g
Tris/HCl (10 mM, pH 7,5)	ad 10	mL

<b>L13: Saccharoselösung</b>		MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,5	g
Saccharose	10,3 g	Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	5	g
<b>L14: Salzlösung ohne Nitratsalze (20x)</b>		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,15	g
KCl	10,4 g	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,2	g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10,4 g	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 100	mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30,4 g		pH 6,5	
<b>L15: SDS-Lösung (10%)</b>				(1 M KOH)
SDS	100 g	<b>L18: TSS-Lösung</b>		
	pH 7,2	Trypton	1,0	g
	(1 M HCl)	Bacto Yeast Extract	0,5	g
<b>L16: Sorbitol-Lösung (Protoplastentransformation)</b>		NaCl	0,5	g
Sorbitol	18,2 g	PEG	10,0	g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 100 mL	DMSO	5,0	mL
<b>L17: Spurenelementlösung I (1000x)</b>		MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	14,2	g
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,17 g	H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	70	mL
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,16 g	<b>L19: X-Gal-StammLösung</b>		
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g	X-Gal	500	mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,1 g	DMSO	ad 10	mL

#### 2.1.4.2 Puffer

Alle Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, im 1 L Maßstab hergestellt.

##### P1: Bindepuffer (Proteinisolation)

Tris	6,05 g
	pH 7,0 mit HCl einstellen

##### P2: CATB-Puffer

CATB (2%)	10,00 g
Tris	6,06 g
Na <sub>2</sub> EDTA	1,46 g
NaCl	20,50 g
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 500 mL
	pH 8,0 mit HCl einstellen

##### P3: Elutionspuffer (Proteinelution)

NaCl	58,4 g
Bindepuffer (P1)	ad 1 L

##### P4: K-Puffer:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	145 g

##### P5: L-Puffer (Lysepuffer)

Saccharoselösung (L13)	100 mL
autoklavieren und danach folgende Lösungen sterilfiltriert zugeben:	
TES-Puffer (P24)	10 mL
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2,5 %)	1 mL
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (2,5 M)	0,1 mL
CaCl <sub>2</sub> (0,25 M)	1 mL
vor dem Gebrauch des Puffer <i>Lysing Enzymes</i> von <i>Trichoderma harzianum</i> (1 mg/mL, Endkonzentration) zugeben.	

**P6: Maleinsäurepuffer**

Maleinsäure	11,6	g
NaCl	8,8	g
	pH 7,5	
	(10M NaOH)	

**P7: MN-Puffer**

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	30	g
NaCl	15	g

**P8: OCM-Puffer**

Saccharose	218,3	g
CM Medium (M12)	ad	1 l

**P9: OM-Puffer** (sterilfiltriert)

MgSO <sub>4</sub>	13,83	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	37	mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29	mg
Lysing Enzymes	400	mg
<i>(Trichoderma harzianum)</i>		
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad	40 mL

**P10: P Puffer (Protoplasten Puffer)** (Okanishi *et al.*, 1974, Hopwood and Wright, 1978)

Saccharose	103,0	g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25	g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2,02	g
Spurenelementlg. I (L17)	2	mL
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad	800 mL
in 80 mL Einheiten aliquotieren, autoklavieren und vor dem Gebrauch		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 %)	10	mL
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (3,68 %)	10	mL
TES-Puffer (P24)	10	mL

zugeben.

**P11: PTC-Puffer** (sterilfiltriert)

PEG 4000	60	g
CaCl <sub>2</sub>	11	mg
Tris/HCl (10 mM, pH 7,5)	ad	100 mL

**P12: Southern Blot Blockingpuffer**

Magermilchpulver	1,5	g
Maleinsäurepuffer (P6)	100	mL

**P13: Southern Blot Denaturierungspuffer**

NaCl	46,8	g
NaOH	16,0	g

**P14: Southern Blot Detektionspuffer**

NaCl	5,8	g
Tris	12,1	g
	pH 9,5	
	(1 M HCl)	

**P15: Southern Blot Hybridisierungspuffer**

Denhardt's Lösung (L13)	50	mL
SDS-Lösung (10%)	50	mL
SSPE (20x) (P18)	300	mL

**P16: Southern Blot Neutralisierungs-Puffer**

NaCl	87,7	g
Tris	60,6	g
	pH 7,6	
	(1 M HCl)	

**P17: Southern Blot Waschpuffer**

Maleinsäurepuffer (P6)	100	mL
Tween 20	500	µL

**P18: SSPE-Puffer (20x)**

Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	7,4	g
NaCl	210	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	27,6	g
	pH 7,4	
	(10 M NaOH)	

**P19: SSPE-Puffer (0,2x) + 0,1% SDS**

SDS (10 %)	10	mL
SSPE (20x) (P18)	10	mL

**P20: SSPE-Puffer (2x) + 0,1% SDS**

SDS (10 %)	10	mL
SSPE (20x) (P18)	100	mL



<b>P19: STC-Puffer</b>			RNAse A (100 mg/mL)	0,5	mL
Sorbitol	18,2	g	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad	100 mL
CaCl <sub>2</sub>	5,5	g	<b>P24: TES-Puffer</b>		
Tris/HCl (50 mM, pH 8) ad	100	ml	Tris	120	mg
<b>P20: TAE-Puffer (50x)</b>			Na <sub>2</sub> EDTA	38	mg
Tris	242	g	SDS	200	mg
Na <sub>2</sub> EDTA-Lösung (0,5 M)	100	mL	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad	10 mL
CH <sub>3</sub> COOH (100 %)	57,1	mL	<b>P25: T-Puffer (Transformationspuffer)</b>		
<b>P21: TAE-Puffer (1x)</b>			Saccharoselösung (L13)	25,0	mL
TAE-Puffer (50x) (P20)	100	mL	Spurenelementlg. I (L17)	0,2	mL
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 5	l	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2,5%)	1,0	mL
<b>P22: TE-Puffer</b>			H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	75	mL
Tris-HCl pH 8,0 (1 M)	10	mL	autoklavieren und danach zu 9,3 mL der oben beschriebenen Lösung		
EDTA (0,5 M)	2	mL	CaCl <sub>2</sub> (5 M)	0,2	mL
<b>P23: TE+RNAse-Puffer</b>			Maleinsäure Puffer (P6)	0,5	mL
Tris-HCl pH 8,0 (1 M)	1,0	mL	steril zugeben. Direkt vor dem Gebrauch 25 mL H <sub>2</sub> O mit 7,5 g PEG 3000 autoklaviert zusetzen.		
EDTA (0,5 M)	0,2	mL			

### 2.1.5 Kulturmedien

Die Mikroorganismen-Anzuchtmedien wurden für 45 min bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 1,1 bar autoklaviert. Der angegebene pH-Wert wurde zuvor mit 1 M HCl oder 1 M NaOH eingestellt. Zur Erzeugung von Festmedien wurden vor dem Autoklavieren zwei Prozent granulierter Difco™ Agar zugesetzt.

Alle Angaben beziehen sich auf 1 L H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>, sofern kein anderes Volumen angegeben ist.

Medien zur Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und <i>Escherichia coli</i>			Glukose-Lösung (1 M)	5,0	mL
<b>M1: AIM-Medium (Agrobacterium Induktions-Medium)</b>			Glyzerin-Lösung (10 %)	25,0	mL
Zu 900 mL Wasseragar wurde nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C die folgenden Medienbestandteile sterilfiltriert (NYL, Porengröße 0,2 µm; Nalgene) hinzu gegeben. Für AIM-Festmedium wurden zusätzlich 1 mL Acetosyringon-Lösung (100mg/mL) zugesetzt.			MES-Lösung (1 M)	40,0	mL
			NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -Lösung (20 %)	2,5	mL
			Spurenelementlösung I (L42)	5,0	mL
			K-Puffer (P4)	0,8	mL
			MN-Puffer (P7)	20,0	mL
			<b>M2: LB-Medium</b>		
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (1 %)	1,0	mL	Bacto™ Trypton	10,0	g
FeSO <sub>4</sub> -Lösung (0,01 %)	10,0	mL	Bacto™ Yeast Extract	5,0	g

NaCl	5,0	g	Medien zur Kultivierung von Pilzen		
		pH 7,4			
Zu allen Medien, die Antibiotika enthalten, wurden diese nach dem Autoklavieren des Mediums und dem Abkühlen auf 55 °C hinzugegeben.					
<b>M2.1: LB-AIX-Medium</b>			<b>M6: BAF-Medium</b>		
<b>M2</b> LB-Medium	1	L	Maltose	20	g
Ampicillin	100	mg	Glukose	10	g
IPTG-Stammlösung (100 mM)	4	mL	Pepton (papainisch verdaut)	2	g
X-Gal-Stammlösung <b>L19</b>	2	mL	Hefeextrakt	0,2	g
			KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	g
<b>M2.2: LB-AMP-Medium</b>			MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1	g
<b>M2</b> LB-Medium	1	L	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	73,5	mg
Ampicillin	100	mg	FeCl <sub>3</sub>	10	mg
			ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,78	mg
<b>M2.3: LB-KANA-Medium</b>				pH 5,5	
<b>M2</b> LB-Medium	1	L	<b>M7: Czapek-Dox-Medium</b>		
Kanamycin Monosulfat	60	mg	Saccharose	30	g
			NaNO <sub>3</sub>	3	g
<b>M2.4: LB-RIF-Medium</b>			KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	g
<b>M2</b> LB-Medium	1	L	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5	g
Rifampicin	60	mg	KCl	0,5	g
			CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	73,5	mg
<b>M2.5: LB-RIF+KANA-Medium</b>			FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10	mg
<b>M2</b> LB-Medium	1	L		pH 6,3	
Kanamycin Monosulfat	60	mg	<b>M8: DM-Medium (Doppelmalz)</b>		
Rifampicin	60	mg	Malzextrakt	40	g
				pH 5,5	
<b>M2.6: LB-TET-Medium</b>			<b>M9: HA-Medium</b>		
<b>M2</b> LB-Medium	1	L	Malzextrakt	10	g
Tetracyclinhydrochlorid	1	mL	Glukose	4	g
			Hefeextrakt	4	g
<b>M3: Nutrient Broth Medium</b>				pH 5,5	
Nutrient Broth	8	g	<b>M10: HMG-Medium</b>		
		pH 7,5	Malzextrakt	10	g
<b>M4: SOB-Medium</b>			Glukose	10	g
Trypton	20	g	Hefeextrakt	4	g
Bacto Yeast Extract	5	g		pH 5,5	
NaCl	0,5	g			
<b>M5: SOC-Medium</b>					
SOB-Medium ( <b>M4</b> )	100	mL			
Glukoselösung (1 M), sterilfilt.	2	mL			

**M11: MGPH-Medium**

Maltose	20	g
Glukose	10	g
Pepton (papainisch verdaut)	2	g
Hefeextrakt	1	g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	73,5	mg
FeCl <sub>3</sub>	10	mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,78	mg
	pH 5,5	

**M12: Kompletmedium (CM)**

Bacto™ Casamino Acids	1	g
Bacto™ Pepton	2	g
Bacto™ Yeast Extract	1	g
Glukose	10	g
Nitratsalzlösung (20x) (L10)	50	mL
Spurenelementlösung I (L17)	1	mL
	pH 6,5	

**M13: Minimalmedium (MM)**

Glukose	10	g
Biotinlösung (0,01 %)	250	µL
Nitratsalzlösung (20x)(L10)	50	mL
Spurenelementlösung I (L17)	1	mL
Thiamindichloridlösung (1 %)	1	mL
	pH 6,5	

**M14: Minimalmedium (CEFO+STREP+HYG)**

Nach dem Autoklavieren wurde das mit 2 % granuliertem Difco™ Agar versetzte Medium **M13** auf ca. 55 °C abgekühlt. Dann wurden steril zu einem Liter Medium 2 mL Cefotaxim (100mg/mL), 3 mL Streptomycin (100 mg/mL)

1. und für die Kultivierung von Fm und El 0,5 mL Hygromycin (100 mg/mL) gegeben,
2. und für die Kultivierung von Pm und Pa 4 mL Hygromycin (100 mg/mL) gegeben.

**M15: Oatmeal-Medium (Harferflockenmedium)**

Haferflocken	20	g
--------------	----	---

**M16: PDA-Medium (Potato-Dextrose-Medium)**

Potato Dextrose Broth	24	g
-----------------------	----	---

**M17: PDA-Medium (CEFO+STREP+HYG)**

Nach dem Autoklavieren wurde das mit 2 % granuliertem Difco™ Agar versetzte Medium **M13** auf ca. 55 °C abgekühlt. Dann wurden steril zu einem Liter Medium 2 mL Cefotaxim (100mg/mL), 3 mL Streptomycin (100 mg/mL)

1. und für die Kultivierung von Fm und El 0,5 mL Hygromycin (100 mg/mL) gegeben,
2. und für die Kultivierung von Pm und Pa 4 mL Hygromycin (100 mg/mL) gegeben.

**M18: R2YE-Medium**

Saccharose	103	g
Glukose	10	g
Hefeextrakt	5	g
Difco™ Casaminoacids	0,1	g
TES-Puffer (P24)	10,0	mL
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10,12	g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25	g
Spurenelementlg. I (L17)	2,0	mL
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad	1 L

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf 55 °C gekühlt und die folgenden sterilfiltrierten Lösungen zugegeben:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 %)	4	mL
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (5 M)	1,6	mL
L-Prolin (20 %)	6	mL
NaOH (1 N)	2,8	mL

Dann wurden steril zu einem Liter Medium 2 mL Cefotaxim (100mg/mL), 3 mL Streptomycin (100 mg/mL)

1. und für die Kultivierung von Fm und El 0,5 mL Hygromycin (100 mg/mL) gegeben,
2. und für die Kultivierung von Pm und Pa 4 mL der Hygromycin (100 mg/mL) gegeben.

**M19: Regenerationsmedium  
(Protoplastentransformation)**

Saccharose	342,3	g
Hefeextrakt	1	g
Casein	1	g

**M20: Wasseragar**

Difco™ Agar, granuliert	20	g
-------------------------	----	---

**M21: Wasser-Kinetin-Agar**

Kinetin-Stammlösung (1 mg/mL)	200	µL
-------------------------------	-----	----

vor der Zugabe den autoklavierten Wasseragar auf 50 °C im Wasserbad abkühlen lassen.

**M22: Weinblattextraktmedium (WEM)**

Es wurden 10-15 g Weinblätter in ausreichend lauwarmem Wasser gewaschen. Danach wurde das Wasser abtropfen lassen und die Blätter in 100 mL H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gegeben. Anschließend wurde das Blätter-Wasser-Gemisch mit einem Mixer (Laboratory Blender 7011S, Warning® Laboratory Science, Torrington, USA) auf der höchsten Stufe für 30 Sekunden zerkleinert. Die restlichen groben Bestandteile der Emulsion

wurden durch das Filtrieren über einen Tiefenfilter T5500 (Pall Corporation Filtersysteme GmbH, Bad Kreuznach) beseitigt.

Im Anschluss wurde ein Liter Minimalmedium (**M13**) hergestellt, aber nur mit 900 mL H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>, vor dem Autoklavieren wurde das Medium dann mit 100 mL des Weinblattextrakts aufgefüllt.

**M23: G5VIT-Medium**

Gamborg B5 Medium	3,8	g
2-Naphthalenessigsäure	0,1	mg
Kinetin	0,2	mg
Saccharose p.A.	30	g
N-Z-Amine® A	250	mg
Difco™ Agar, granuliert	8	g
		pH 5,5

Dieses Medium muss sehr sorgfältig und genau 20 min bei 121 °C autoklaviert werden, da die Mengen der Hormone im Medium so eingestellt sind, dass nach 20 min genau die richtige Konzentration, welche für die Kultivierung nötig ist, nicht durch das Erhitzen zerstört wird.

## 2.1.6 Organismen

Die folgenden Organismen wurden für die molekularbiologischen Arbeiten verwendet.

### 2.1.6.1 Verwendeter Stamm von *Escherichia coli*

XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987; Stratagene, La Jolla, USA): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIq Z\_M15 Tn10* (Tetr)]

### 2.1.6.2 Verwendeter Stamm von *Agrobacterium tumefaciens*

AGL1 (BAA-101) (ATCC, Manassas, USA): AGL0*recA::bla pTIBo542deltaT Mop+ CbR* [50648]

### 2.1.6.3 Verwendeter Stamm von *Phaeomoniella chlamydospora*

*Phaeomoniella chlamydospora* (BASF Plant Science Company, Limburgerhof)

### 2.1.6.4 Verwendeter Stamm von *Phaeoacremonium aleophilum*

*Phaeoacremonium aleophilum* (BASF Plant Science Company, Limburgerhof)

### 2.1.6.5 Verwendeter Stamm von *Fomitiporia mediterranea*

*Fomitiporia mediterranea* (BASF Plant Science Company, Limburgerhof)

### 2.1.6.6 Verwendeter Stamm von *Eutypa lata*

*Eutypa lata* (BASF Plant Science Company, Limburgerhof)

Während der Arbeiten wurden immer Kulturen der hier genannten Pilze in Agar-Schrägröhrchen unter Paraffinöl (bei 4 °C) und auf Agarplatten (bei 26 °C) kultiviert um ausreichend Sicherheits- und Vorkulturen zu gewährleisten.

### 2.1.6.7 Testorganismen für die biologische Charakterisierung

#### **Bakterien**

*Bacillus brevis* ATCC 9999

*Bacillus subtilis* ATCC 66633

---

<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 381
<i>Enterobacter dissolvens</i>	LMG 2683

**Pilze**

<i>Mucor miehei</i>	TÜ 284
<i>Nematospora coryli</i>	ATCC 10647
<i>Paecilomyces variotii</i>	ETH 114646
<i>Phytophthora infestans</i>	ATCC 208835

**2.1.6.8 Verwendete Weinpflanzen und Kalluskulturen**

Die während dieser Arbeit verwendeten Weinpflanzen für die Blatztropftests, die Injektionstests, die Antagonisten-Sprühversuche und die Versuche zur Charakterisierung von Deletionsmutanten der Esca-assoziierten Pilze waren Kultivare von *Vitis vinifera* 'Riesling', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot' und 'Weißer Burgunder'. Welcher Kultivar für welchen Versuch genutzt wurde, wird an späterer Stelle zu jedem einzelnen Versuch angegeben. Die Reben wurden in 1 Liter Kulturtöpfen nach dreimonatigem Wachstum im Gewächshaus von Frau Prof. Dr. Beate Berkelmann-Löhnertz (Institut für Phytomedizin, Hochschule Geisenheim University, Geisenheim) und Herrn Dr. Andreas Kortekamp (DLR Rheinpfalz, Phytomedizin, Phytomedizin für den Weinbau, Neustadt a.d.W.) zur Verfügung gestellt. Zum weiteren Wachstum wurden die Pflanzen in Sanyo Pflanzenbrutschränken (Panasonic MLR-351H Plant Growth Chamber; Panasonic Biomedical Sales Europe B.V., Hamburg) bei 80 % Luftfeuchtigkeit und 16 h Hellphase wachsen lassen.

Die Kalluskultur von *Vitis vinifera* L. ist die Standardkultur PC-1137 der DSMZ (Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig). Die Kalluskultur wurde auf Gamborg B5 Medium (**M23**) kultiviert, oder in **M23** Flüssigmedium in 500 mL Glaskolben bei 22 °C auf einem Taumelschüttler (Duomax 1030, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach) wachsen lassen.

Um Fermentationsversuche im 5, sowie im 20 L Maßstab mit dem Medium **M22** durchzuführen, wurden im September 2009 15 kg Weinblätter von Rebstöcken abgeschnitten, gewaschen und in 3 kg Portionen in Gefrierbeuteln bei -20 °C gelagert. Die beiden Weinsorten die dafür ausgewählt wurden, sind *Vitis vinifera* 'Weißer Burgunder' und 'Cabernet Sauvignon'. Sie wurden mit freundlicher

Genehmigung beim Weingut *Lauermann & Weyer*, Leininger Ring 79, 67278 Bockenheim an der Weinstraße in zwei Lagen bei Bockenheim gesammelt.

#### 2.1.6.9 Aufbewahrung der Organismen

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden je 500 µL der Flüssigkulturen (*A. tumefaciens*: **M2.5**, *E. coli*: **M2.1-M2.4**, **M2.6**) mit 500 µL steriler Glycerinlösung (50%) gemischt und anschließend bei -80°C gelagert. Um die erzeugten Pilzmutanten zu lagern, wurden beim Überimpfen Antibiotika-Testblättchen (Macherey-Nagel, Düren) auf CM Agarplatten (**M12**) ausgelegt. Nachdem diese überwachsen waren, wurden sie 7 d bei 22 °C mit Hilfe von Silicagel Orange (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) in einem geschlossenen Gefäß getrocknet und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

Die Pilze *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia mediterranea*, *Eutypa lata* sowie ihre Transformanten wurden als Schrägröhrchenkulturen unter Paraffinöl bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

#### 2.1.7 Plasmide

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten und um Transformanten von den unter Kapitel **2.1.6** aufgeführten Organismen herzustellen wurden folgende Plasmide verwendet:

##### **pGEM<sup>®</sup>-T Easy**

Der Klonierungsvektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega, Mannheim) wird eingesetzt um mittel PCR generierte DNA, welche Poly-Adenin-Überhänge an den Enden trägt in *E. coli*-Zellen zu vermehren. Er wird vom Hersteller mit der Restriktionsendonuklease EcoRV linearisiert und trägt dann an beiden Enden die nötigen 3'-Thymidin Überhänge. Auf dem Vektor selbst ist ebenfalls die *lacZ*-Gensequenz, welche für das Protein β-Galaktosidase codiert zu finden. Falls keine Einbau der PCR-generierten DNA in den Vektor stattfindet, kann das *lacZ*-Gen abgelesen werden, β-Galaktosidase wird synthetisiert und diese baut dann X-Gal zu einem blauen Farbstoff ab. Diese Blau/Weiß-Selektion macht man sich neben der vermittelten Ampicillin-Resistenz zur Selektion zu nutze.

##### **pJet1.2/blunt**

Dieser Cloning-Vektor (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) ist 2974 bp groß. Um PCR Produkte aufnehmen zu können, die keine Poly-Adenin-Überhänge besitzen (z.B. Produkte der Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity Polymerase) ist der Vektor mittels EcoRV-Restriktionsendonuklease

linearisiert und enthält keine Überhänge. Das 5'-Ende des Vektors enthält eine Phosphatgruppe. Außerdem vermittelt das Plasmid eine Ampicillin-Resistenz ebenfalls durch die Gensequenz zur Kodierung für eine  $\beta$ -Lactamase (Thornsberry und Kirven, 1974). Eine Positivselektion ist durch das *eco47IR* Gen möglich, was zum Tod der Zellen führt, die einen religierten Vektor aufgenommen haben.

### **pAJF-EFA-GFP**

Das Plasmid wurde für das Arbeiten mit dem Fluoreszenzfarbstoff GFP ('*green fluorescence protein*', Shimomura *et al.*, 1962) freundlicherweise von Herrn Dr. Andrew Foster zur Verfügung gestellt. Es enthält einen Promotor des Elongationsfaktors  $\alpha$  aus *M. oryzae* sowie eine durch  $\beta$ -Lactamase vermittelte Ampicillin-Resistenz. An den Promotor ist die Sequenz für das GF Protein angeschlossen und die Expression dieses Gens wird durch den Promotor in Pilzen, wie z.B. Pm und Pa reguliert.

### **pJF-EFA(Fm)-GFP bzw. Cyan**

Dieser Vektor wurde auf der Grundlage des pAJF-EFA(Fm)-GFP Vektors aufgebaut. Es wurde der Promotor des Elongationsfaktors  $\alpha$  aus *M. oryzae* durch denselben Promotor aus *F. mediterranea* ersetzt. Hierzu wurden die Primer aus Kapitel 2.1.9 verwendet. Zu Beginn wurde der Fluoreszenzfarbstoff von Clontech (Vektoren pAmCyan) mit Hilfe der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolab Inc., Frankfurt am Main) amplifiziert und mit der T4-Ligase in den pJet1.2-Vektor (Fisher Scientific Germany GmbH, Schwerte) ligiert. Im Anschluss wurden die Farbstoffe, über die in den Primer enthaltenen Restriktionsschnittstellen, in den ebenfalls mit Restriktionsendonuklease verdauten pAJF-EFA(Fm)-GFP Plasmid einligiert. Auch diese beiden Vektoren enthalten eine Ampicillin-Resistenz.

### **pCAMBIA-Plasmide**

Die pCAMBIA-Plasmide (CAMBIA, Canberra, Australien) sind Vektoren, die bei der *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation eingesetzt werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF234290>). Der Vektor enthält eine Region mit vielen ausgewählten Restriktionsschnittstellen auf beiden Seiten des pUC8-Polylinkers, dadurch können eigene Promotoren, Selektionsgene, Reporter-Gene usw. eingebracht werden. Die einzigen kodierenden Sequenzen zwischen den T-DNA-Grenzen ('*transfer DNA Borders*'; Chilton *et al.*, 1980) sind die Start-und Stop-Codons und das NOS-poly (A)-Signal. Die anderen zusätzlichen Funktionen des pCAMBIA Rückgrat sind die bakterielle Kanamycin-Resistenz, vermittelt durch die Aminoglykosid-Phosphotransferase (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/7638042>), die hohe Kopienzahl in *E. coli* und die stabile Replikation in *A. tumefaciens*.



**pCAMBIA0380**

Das Plasmid trägt das Kanamycin-Resistenzgen (Aminoglykosid-Phosphotransferase, siehe oben) zur Selektion bakterieller Transformanten. Ein eukaryotischer Resistenzmarker muss für weitere Transformationen allerdings nachträglich eingebracht werden.

**pCAMB-EFA-HPT-GFP**

Das Plasmid ist eine Weiterentwicklung des oben beschriebenen pCAMB0380-Vektors. Es enthält eine Hygromycin-Resistenz für Pro- und Eukaryonten, welche durch eine Kinase vermittelt wird, die das Hygromycin phosphoryliert und damit inaktiviert (Gritz und Davies, 1983). Zusätzlich enthält dieses Plasmid die Sequenz des GF Proteins unter der Regulation des Promotors des Elongationsfaktor  $\alpha$  aus *M. oryzae*. Das Plasmid wurde von Dr. Andrew Foster generiert.

**pCAMB-HPT-EFA-Cyan und pCAMP-HPT-EFA-Yellow**

Diese beiden Plasmide wurden aus pCAMB-EFA-HPT-GFP generiert. Sie enthalten anstelle des GF Proteins einen der beiden Fluoreszenzfarbstoffe AmCyan bzw. ZsYellow (pAmCyan, Best.Nr. 632440, pZsYellow, Best.Nr. 632443; Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich).

**pCAMB-HPT- $\Delta$ PKS2**

Auf der Basis des pCAMB-0380-Vektors wurden jeweils die PKS2-Gensequenzen der Pilze *Pm. chlamydospora* und *Pa. aleophilum*, die durch die HPT-Kassette unterbrochen wurden einligiert. Die Insertion fand mit Hilfe der HindIII bzw. BamHI Schnittstellen statt. Diese Arbeiten wurden von Lena Licht (Bachelorarbeit, 2012), Sabine Schwarz (Diplomarbeit, 2011) Elisabeth Grundmann (Masterarbeit, 2012) und Jean-Philippe Bürckert (Diplomarbeit, 2011) ausgeführt.

**2.1.8 Primer**

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende angegeben. Die 'annealing' Temperaturen der Primer wurden mit Hilfe der Programme der Firma Life Technologies GmbH, Darmstadt (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>; DreamTaq Polymerase), bzw. mit dem Programm der Firma Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>; Phusion<sup>®</sup> Polymerase) errechnet. Die Temperaturen mit nur einer Nachkommastelle beziehen sich auf die Werte der Phusion<sup>®</sup> Polymerase.

**Tab.1:** Primersequenzen, Ta = 'annealing' Temperatur, \* Temperatur nicht unterstrichener Bereich des

## Primers

Name	Sequenz	Länge	Ta
BarSonde_for	GTTCGCCCTTCCTCCCTTTATTTTC	24	64,79
BarSonde_rev	GTTCGATTTCGGCCGTCCAGTC	20	65,95
Bar_Sonde_for	GGCGGCGCTCGAAGTGTGA	19	68,91
Bar_Sonde_rev	TGCGGCTCGGTACGGAAGTTG	21	68,22
HPTtrpC_for	<u>CTTCTTCGTCTCGTCTTCCTTGCTCTGAGCCACAATGAAAAAGC</u>	45	<u>69,44</u> 52,61*
HPTtrpC_rev	<u>TTCCTGAAGCTTGCTCTAAACCTCGTTCAAAAAAACTATTCCCTTT</u>	45	<u>56,06</u> 55,11*
GA_pC-E-C-for1	ccggcgcgccgaattcccCGTGTCCATTTAATACTGCC	38	59,4°C
GA_E-C-t-H-rev1	ccaagcttTGCAGGAATTCTCATGTTTG	28	59,4°C
GA_E-C-t-H-for2	ttcctgcaAAGCTTGCAAGAAATTC	26	57,9°C
GA_t-H-pC-rev2	acactagtcagatctacCTATTCCCTTTGCCCTCGG	35	57,9°C
CPKA-FORA	GGNACNGGNWSNTTYGGNMNG	22	74,0
CPKA-REVA	CNGGNGTNCRCANARNGTCCANG	24	76,4
CPKA-FORB	RATGAARCARGTNGARCANACNAAY	25	65,7
PP1rc	GCCCTATAGTGAGTCGTATTAC	22	51,18
PP2rc	ACCACGCGTGCCCTATAGT	19	59,03
dsREDAfIII	GTCGCCAACATGTCCTCCTCCG	22	68,89
dsREDSpel	CACTAGTGCGGCCGCTACAGGAACAGG	27	73,16
for1_g_PKS	CGCCAGCTATTTAGGTGACACTATAG	26	60,34
rev1_g_PKS	CGACGTCGGGCCCAATC	16	64,44
for2_g_PKS	CTCAAGCTATGCATCCAACGC	21	61,61
rev2_g_PKS	CCAAAGGAGAAGTGAATCGAATTC	24	61,05
trpC_Hind_f	<u>GAAGCTTGGCAAGAAATTGTGAAATGCCTGATG</u>	33	67,13*
trpC_NcoI_r	<u>GCCTAGGTTGTGGCTCAGAGGCAGGGAAGAC</u>	31	68,64*
HPH_BspHI_f	<u>GTCATGAAAAACCCTGAACTCACC</u> CGG	27	68,6*
HPH_Hind_r	<u>CAAGCTTCTATTCCCTTTGCCCTCGGACGAGTG</u>	32	73,0*
SB-red_F	CTACGAGGGCCACAACACCG	19	64,56
SB-red_R	GTGATGTCCAGCTTGGCGTC	19	62,59
for_cyanNcoI	<u>GCCATGGCTCTTTCAAACAAGTTTATCGGAGATG</u>	33	72,0*
rev_cyanBsrGI	<u>CTGTACATCAGAAAGGGACAACAGAGG</u>	27	62,3*
for_fluoreNcoI	<u>CGCCATGGCCGGTACCGGTCGCCACCATG</u>	30	84,1*
forfluo	GGGCCATGGCCTCCTCCGAGAACG	25	78,21
revfluo	GAATTCCTACAGGAACAGGTGGTGGCGGC	29	74,77
HPT_Sonde_for	CTGCCCCGAAGTCCACCTC	19	63,85
HPT_Sonde_rev	GCTTCTGCGGGCGATTTGT	19	64,33

## 2.1.9 Mikroskopie

Die mikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Pilze, welche mit den Genen, die für die Fluoreszenzfarbstoffe kodieren, transformiert wurden, wurden am Mikroskop Axioskop 2 der Firma Zeiss durchgeführt. Um die Fluoreszenz des grünen Farbstoffes zu sehen, wurde ein Filter der Wellenlänge 508 nm in den Strahlengang eingebracht. Zur Aufnahme der Bilder mit dem Fluoreszenzfarbstoff AmCyan wurde ein Filter der Wellenlänge 453 nm und für ZsYellow, bzw. DsRed Filter mit 531 nm in den Strahlengang eingeführt. Zur Beobachtung der Fluoreszenz wurden 20 µL H<sub>2</sub>O und Myzel auf den Objektträger aufgebracht. Die Untersuchungen der infizierten Weinpflanzen wurden ebenfalls mit dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Hierzu wurden die Pflanzen 5 cm

unterhalb der Infektionsstelle aufgeschnitten und ein Präparat vorbereitet. Die Software zur Bildaufnahme bzw. Bearbeitung ist das Programm AxioVision von Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena).

#### 2.1.10 Fotografische Digitalisierung

Um einzelne Versuche während dieser Arbeit fotografisch zu dokumentieren, wurden die Digitalkameras Canon PowerShot G10 und Canon PowerShot A450 genutzt.

Röntgenfilme wurden mit dem Epson Perfection V750 Pro Flachbettscanner digitalisiert. Hierzu wurde die Software Epson Scan 3.920 mit Standardeinstellungen und einer Auflösung von 300 dpi verwendet. Die Geldokumentation von Ethidiumbromid-Agarose-Gelen wurde mit dem QUANTUM Geldokumentationssystem Modell 1100 der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) durchgeführt.

#### 2.1.11 Software

Informationen zur Genomsequenz von *Pa. aleophilum* wurden aus der Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=togninia%20minima>) entnommen. Auch die Sequenz des Genoms von *F. mediterranea* ist mit Hilfe der Datenbank des DOE Joint Genome Instituts zugänglich (<http://genome.jgi.doe.gov/Fomme1/Fomme1.home.html>). Mit diesen Genomsequenzen wurden Homologievergleiche mittels BlastX und BlastP durchgeführt. So war es möglich Primer zur Amplifizierung der Gensequenzen der untersuchten Gene zu synthetisieren (Altschul *et al.*, 1990 und 1997; Quelle: <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

Zur Bearbeitung von DNA-Sequenzen und zum Primerdesign wurden die Programme EditSeq und PrimerSelect aus dem Softwarepaket Lasergene® (DNASTAR, Madison, USA) verwendet. Die grafische Darstellung von DNA erfolgte mit Hilfe des Programms pDRAW32 (Kjeld Olesen, AcaClone Software; <http://www.acaclone.com/>). Um die Primer für den Vektor pCamb-EFA(Fm)-Cyan-trp(Fm)-HPT zu erstellen wurde das Programm NEBuilder der Firma NEB New England Biolabs (Ipswich, MA, USA; <http://nebuilder.neb.com/>) verwendet.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

#### 2.2.1.1 PCR zur Amplifizierung von genomischen DNA Sequenzen zu Klonierungszwecken

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde angewendet, um Fragmente von genomischer DNA, cDNA und Plasmid-DNA für präparative und analytische Zwecke zu amplifizieren. Als Standard wurde die Taq DNA Polymerase (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) sowie das GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) verwendet.

Standard-PCR-Ansatz:

Template-DNA	100	ng
PCR-Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> , 10x	5,0	μL
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	5,0	μL
Primer forward (5 pmol/μL)	2,5	μL
Primer reverse (5 pmol/μL)	2,5	μL
dNTPs, 10 mM	1,0	μL
Taq-Polymerase	1,0	μL
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 50	μL

Das GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt) wurde wie folgt programmiert:

**Tab.2:** Programmierung einer Standard-PCR,  $T_A$  = Primeranlagerungstemperatur,  $T_E$  = Elongationszeit

Initiale Denaturierung 3 min 95 °C

35 Zyklen:

Denaturierung	30 s 95 °C
Annealing	45 s $T_A$
Elongation	$T_E$ (1 min/kb) 72 °C

Terminale Elongation 10 min 72 °C

Die Anlagerungstemperatur  $T_A$  wurde ca. 4 °C niedriger gesetzt als die Schmelztemperatur  $T_M$  des verwendeten Primerpaares (Berechnung der  $T_M$ : MWG Biotech). Die Elongationszeit  $T_E$  bei 72°C richtete sich nach der Produktgröße, wobei die Polymerase je 1 kp pro Minute dupliziert.

Um die Sequenzen für die Fluoreszenzfarbstoffe oder für das Gibson Assembly zu generieren wurde eine Polymerase mit *proof reading* eingesetzt. Diese Polymerase besitzt eine 3'→5'-Exonuklease-

Aktivität, damit ist sie in der Lage zu erkennen, wenn ein falsches Nukleotids eingebaut wurde. Diesen Fehler kann das Enzym wieder entfernen und durch das korrekte Nukleotid ersetzen. Deshalb wurde die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase verwendet.

Ansatz einer PCR mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase:

DNA-Template	100	ng
Phusion HF-Puffer, 5x	10,0	µL
Primer forward (5 pmol/µL)	4,0	µL
Primer reverse (5 pmol/µL)	4,0	µL
dNTPs, 10 mM	1,0	µL
Phusion Polymerase	0,5	µL
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 50	µL

**Tab.3:** Programm für die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase ( $T_A$  = Primeranlagerungstemperatur,  $T_E$  = Elongationszeit), GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt)

Initiale Denaturierung 30 s 98 °C

35 Zyklen

Denaturierung	10 s 98 °C
Annealing	30 s $T_A$
Elongation	$T_E$ (1 min/kb) 72 °C

Terminale Elongation 5 min 72 °C

Die Anlagerungstemperatur  $T_A$  für die verwendeten Primerpaare wurde mit Hilfe des Anlagerungstemperatur-Rechners der Firma Fisher Scientific berechnet (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>), die Elongationszeit  $T_E$  bei 72 °C richtete sich nach der Produktgröße. Die Polymease elongiert je 1000 bp in ca. 15-30 s.

Wenn das Programm eine  $T_A$  der Primer höher als 72 °C errechnet, kann das vom Hersteller empfohlene *two-step* Protokoll verwendet werden. Die Programmierung ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tab.4:** Programmierung für eine *two-step*-PCR mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase,  $T_A$  = Primeranlagerungstemperatur,  $T_E$  = Elongationszeit

Initiale Denaturierung 30 s 98 °C

35 Zyklen

Denaturierung	10 s 98 °C
Annealing und Elongation	$T_E + 15$ s 72 °C

Terminale Elongation 5 min 72 °C

In dieser Programmierung kann auf eine Trennung der *Annealing*-sowie der Elongationszeit verzichtet werden.

### 2.2.1.2 Amplifizierung von DIG-11-dUTP-markierter DNA-Sonden

Zur Amplifizierung von DIG-11-dUTP-markierten DNA-Sonden für Hybridisierungsexperimente wurde die *Taq* DNA Polymerase verwendet. Im Folgenden ist der PCR-Ansatz zu sehen:

Template-DNA	1,0	μL
PCR-Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> , 10x	5,0	μL
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	5,0	μL
dNTPs, 10 mM	1,0	μL
DIG-11-dUTP	1,5	μL
Primer forward (5 pmol/μL)	2,5	μL
Primer reverse (5 pmol/μL)	2,5	μL
<i>Taq</i> Polymerase	1,0	μL
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 50	μL

Die durch DIG-11-dUTP-konjugierte Nukleotide markierte DNA kann bei der Detektion mittels *Southern Blot* Analyse (2.2.5) mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

### 2.2.1.3 PCR zur Amplifikation unbekannter gDNA Regionen

Zu Beginn dieser Methode musste zuerst gDNA aus pilzlichem Myzel gewonnen werden. Hierzu wurde das Genomic DNA Purification Kit (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) nach Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss wurden die gDNA nach den Ansätzen von Zhang und Gurr (2000) restringiert. Als Puffer wurde P2 der Firma NEB eingesetzt (NEB New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

Restriktionsenzyme (1-5):

1.BcuI (SpeI)      2.NheI      3.XbaI      4.XmaI      5.*Ngo*MIV

Bevor die restringierte gDNA zur Ligation verwendet werden konnte, wurde sie wie von Zhang und Gurr (2000) beschrieben aufgearbeitet. Auch die Ligationsansätze wurden wie in der Veröffentlichung beschrieben im GeneAmp PCR System 9700 durchgeführt. Die nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktionen I und II wurden nach Protokollangaben angefertigt.

Im Anschluss an die PCR wurden die Ansätze wie unter 2.2.3.2 erklärt, mit Gelelektrophorese aufgetrennt und dann wie unter 2.2.4 beschrieben in den pGEM-T<sup>®</sup>easy-Vektor ligiert.

## 2.2.2 Präparation von Nukleinsäuren

### 2.2.2.1 Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

Vor der Isolierung von Plasmid-DNA aus einer Kultur von *E. coli*, wurde diese über Nacht inkubiert (5 mL Flüssigmedium (**M2.2** und **M2.3**), 37 °C, 250 rpm). Danach wurden die Zellen mittels alkalischer Lyse (**L4-6**) nach Sambrook *et al.* (2001) aufgearbeitet. Für präparative und analytische Zwecke erfolgte die Isolierung mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kits (Macherey-Nagel, Düren).

### 2.2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Pilzen

Die Isolierung genomischer DNA für die *Southern Blot* Analyse und zur Amplifikation von Gensequenzen erfolgte mit Hilfe des Genomic DNA Purification Kit (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) nach Herstellerangaben. Zuvor wurden die Kulturen in 1 L-Schüttelkolben in 500 mL **M8**-Medium (120 rpm, 26 °C) bis zu einem Glukosegehalts des Mediums von 0.25 % angezogen. Das Myzel aus den Kolbenkulturen wurde durch Filtration über Papierrundfilter vom Medium getrennt. Das Myzel wurde in ein 50 mL-Reagiergefäß überführt, anschließend lyophilisiert und unter flüssigem Stickstoff mittels eines Mörsers zu einem feinen Pulver zerkleinert. Danach erfolgte die Isolation mit oben genanntem DNA-Extraktions-Kit.

### 2.2.2.3 gDNA-Isolation aus Pilzmyzel mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Das Myzel wurde wie im Kapitel **2.2.2.2** beschrieben unter flüssigen Stickstoff zerkleinert. Danach wurden 4 mL CATB-Puffer (**P2**) (65 °C) und 40 µL β-Mercaptoethanol hinzugegeben und homogenisiert. Im Anschluss wurde das Reagiergefäß 30 min bei 65 °C inkubiert und alle 10 min invertiert. Nach der Inkubation wurden 4 mL Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und das Reagiergefäß 2 min offen unter dem Abzug stehen gelassen. Anschließend wurde das Gemisch für 20 min vorsichtig auf einem Wippschüttler (ST5, CAT Scientific Inc., CA, USA) inkubiert. Nachdem das Gefäß zentrifugiert (5 min, 4 °C, 5000 rpm) worden war, konnte die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues steriles 15 mL-Röhrchen (PP-Tube, Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt werden. Im Folgenden wurden die Arbeitsschritte mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol wiederholt. Nachdem der Überstand erneut in ein neues 15 mL-Röhrchen überführt worden war, wurde ein Volumen Chloroform zugegeben und das Gemisch 2 min inkubiert. Wiederum wurde das Reagiergefäß zentrifugiert (5 min, 4 °C, 5000 rpm), die obere Phase isoliert und mit einem Volumen Isopropanol versetzt, invertiert und inkubiert (5 min). Nach der Inkubationsphase wurde das Gemisch

im Festwinkelrotor zentrifugiert (10 min, 4 °C, 10000 rpm, Rotor SS-34, Sorvall RC-6, Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte). Nachdem der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet getrocknet war, wurde die DNA mit 300 µL 1x TE+RNase-Puffer (**P23**) resuspendiert, 10 min inkubiert und die Lösung in ein neues 1,5 mL-Reagiergefäß überführt. Im Folgenden wurden 30 µL 3 M NaAc-Lösung (pH4,8) und 750 µL EtOH (p.A.,-20 °C ) zugegeben und die Fällung der DNA bei-20 °C für mindestens 30 min durchgeführt. Danach wurde das Pellet zweimal mit EtOH (70 %,-20°C) gewaschen zentrifugiert (5 min, 4 °C und 13000 rpm), bevor es in 500 µL H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> aufgenommen wurde (nach Cathala *et al.*, 1983).

#### 2.2.2.4 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mittels UV/Vis Spektroskopie am NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Rocky River, USA) mit je 1,5 µL DNA/RNA-Lösung.

#### 2.2.3 Gelelektrophorese und Restriktion von Nukleinsäuren

##### 2.2.3.1 Restriktion von DNA

Die für diese Arbeit nötigen Restriktionen von bakterieller und pilzlicher DNA wurden nach den allgemeinen Vorschriften von Sambrook *et al.* (2001) durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers verwendet.

Restriktionsansatz zu Analyse Zwecken von generierten Plasmiden:

DNA		1	µL
10x Puffer		2	µL
Restriktionsenzym		1	µL
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad	20	µL

Der Restriktionsansatz wurde für 60 min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Restriktionsansatz zu Klonierungszwecken:

DNA	bis zu	20	µL	(ca. 1-2 µg)
10x Puffer		10	µL	
Restriktionsenzym		3	µL	
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad	100	µL	

Zu Klonierungszwecken wurden jeweils 1-2 µg DNA eingesetzt, die Inkubation erfolgte für zwei



Stunden bei 37 °C im Wasserbad. Restringierte Plasmide wurden vor der Ligation einer Dephosphorylierung mittels der *Fast Alkaline Phosphatase* (FastAP) unterzogen. Dabei wurde 1 µL FastAP je 100 µL Verdau verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 65 °C deaktiviert. Zur weiteren Analyse und Bearbeitung wurde der komplette Ansatz auf ein Agarose-Gel aufgetragen (vgl. Kapitel 2.2.3.2) und die gewünschte Bande aus dem Gel extrahiert (vgl. Kapitel 2.2.3.3).

Restriktionsansatz für *Southern Blot* Analysen:

DNA	bis zu	100	µL	(ca. 10 µg)
10x Puffer		20	µL	
Restriktionsenzym		5	µL	
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad	200	µL	

Die Inkubation erfolgte stets für zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad.

### 2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Nach den Vorschriften von Sambrook *et al.* (2001) wurde die Gelelektrophorese durchgeführt. Als Laufpuffer und zum Lösen der Agarose wurde TAE-Puffer (**P21**) verwendet. Es wurde mit Gelen von 1 % Agarose-Gehalt gearbeitet. Die Proben wurden mit einer entsprechenden Menge Ladepuffer (Ladepuffer 6x) versetzt und in 1x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 60-100 V aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen diente die GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. Zur Dokumentation wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung (ca. 5 µg/mL) 10 s gefärbt, im Wasserbad mindestens 20 min entfärbt, anschließend unter dem QUANTUM Geldokumentationssystem Modell 1100 der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) belichtet und dokumentiert.

### 2.2.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des Gel Extraktion Kits (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) eluiert.

### 2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden mit der T4 DNA-Ligase (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) mit dem zugehörigen Puffer durchgeführt. Jeder Ligationsansatz (20 µL Gesamtvolumen) enthielt ca. 50 ng Vektor und je nach Größe der DNA-Fragmente die zwei-bis dreifache Menge an *Insert*-DNA.

Standard-Ligationsansatz:

Vektor	5	μL
Insert-DNA	10	μL
Puffer (10x)	2	μL
T4-Ligase	1	μL
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 20	μL

Ligationen des pGEM<sup>®</sup>-T Easy Plasmids (Promega, Mannheim) und des pJET1.2/blunt-Plasmids (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte) erfolgten nach Herstellerangaben. Die Ligationen des Gibson Assembly Kits (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) wurden mit Hilfe der Angaben des Programms NEBuilder (<https://www.neb.com/external-links/nebuilder>) durchgeführt.

Ligationen von selbst erstellten Plasmiden wurden mit Hilfe des im Folgenden beschriebenen Programms im GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

Ligationsprogramm im GeneAmp PCR System 9700:

Ligation	22 °C	60 min.
Inaktivierung	65 °C	10 min.
Lagerung	4 °C	

### 2.2.5 Southern Blot-Analyse

Die gDNA Analyse wurde mittels *Southern Blot* auf der Grundlage der Vorschriften von Sambrook *et al.* (2001) durchgeführt.

Die aus den zu untersuchenden Transformanten und den Wildtypen *Pm. chlamydospora*, *Pa. aleophilum*, *E. mediterranea* und *E. lata* isolierte genomische DNA (2.2.2.2) wurde mit Restriktionsendonukleasen geschnitten (2.2.3.1). Danach folgte die Fällung der DNA (200 μL Restriktionsansatz, 400 μL Ethanol, 20 μL 3 M Natriumacetatlösung, -20 °C, 2 h). Im Anschluss wurde die DNA zentrifugiert (30 min, 13.200 rpm, 4 °C; Zentrifuge 5415D, Eppendorf AG, Hamburg). Das, mittels Druckluft getrocknete Pellet wurde in 30 μL H<sub>2</sub>O und 6 μL Loadind Dye (6x) aufgenommen und im Wasserbad bei 37 °C resuspendiert. Es folgte eine elektrophoretische Auftrennung der DNA auf einem 1 %igen Agarosegel bei 100 V. Zur Größenbestimmung der Bande wurde ein DIG-11-dUTP-markierter Marker (DIGIII, Roche, Mannheim) verwendet. Nach der Auftrennung wurde das Gel 10 min auf einem Wipptisch in 0,25 M HCl depuriniert. Darauf folgten zwei Mal 10 min Inkubation in Denaturierungspuffer (P13) und zweimal 10 min in Neutralisationspuffer (P16). Zwischen den Puffern wurde das Gel immer kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> gespült. Der *Blot* wurde dann nach der

Standardvorschrift (Darling und Brickell, 1996) aufgebaut. Nach etwa 12 h konnte die übertragene DNA auf der Membran durch „Crosslinken“ bei UV-Licht fixiert werden (Crosslinker FLX-20.M, Vilber Lourmat, Marne La Vallee, Frankreich).

Die Membran wurde in einer Hybridisierungsröhre in 20 mL Hybridisierungspuffer (**P15**) für 2 h bei 65 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Danach wurde dieser Puffer durch 25 mL Hybridisierungspuffer (**P15**), welchem DIG-11-dUTP-markierte Sonde (40 ng/mL) zugefügt wurde, ersetzt. Die Sonde wurde zuvor für 5 min bei 95 °C denaturiert und für 5 min auf Eis abgekühlt. Die weitere Hybridisierung erfolgte für 2 h bei 65 °C im Hybridisierungssofen. Dann wurde die Membran in der Hybridisierungsröhre zweimal 5 min mit 2x SSPE + 0,1 % SDS und zweimal 5 min mit 0,2x SSPE + 0,1 % SDS bei 65 °C im Hybridisierungssofen gewaschen.

Zur Detektion der Sonde wurde die Membran 1 min in 50 mL Waschpuffer (**P17**) bei 22 °C ebenfalls im Hybridisierungssofen gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 30 min in 100 mL Blockingpuffer (**P12**) inkubiert, der dann durch Antikörperlösung (**L2**) ausgetauscht wurde. Nach 20 min Inkubation wurde die Antikörperlösung verworfen, die Membran zweimal 5 min in 50 mL Waschpuffer gewaschen und anschließend 3 min in 20 mL Detektionspuffer (**P14**) inkubiert. Die Membran wurde nach Abtropfen in eine Kunststoffolie (Verpackungsfolie FO 60) gelegt und an drei Seiten eingeschweißt. Anschließend wurden einige Tropfen CSPD-Lösung (Roche, Mannheim) auf die Membran aufgebracht, so dass diese von einem gleichmäßigen Flüssigkeitsfilm bedeckt war. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgestrichen, die Membran in die Folie eingeschweißt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach diesem Schritt wurde die so behandelte Membran in eine Filmkassette eingelegt, ein Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP, Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) aufgelegt und 30 min bei Raumtemperatur exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte in der CP 1000 Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine (AGFA, Morstel, Belgien).

## 2.2.6 Transformation der Mikroorganismen

### 2.2.6.1 Transformation von *Escherichia coli*

#### **Präparation elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen**

Die elektrokompenten Zellen (*E. coli* XL1 blue; *E. coli* BL21 pLySs DE3) wurden nach dem Protokoll von Ausubel *et al.*, 2002 (Short Protocols in Molecular Biology, 5th Edition) hergestellt und bei -80 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

### **Transformation elektrokompeter *E. coli*-Zellen**

Die Transformation wurde in 1 mm-Elektroporationsküvette (PeqLab, Erlangen) und mit Hilfe des Gene Pulser II (Biorad, München) mit den Einstellungen 25  $\mu$ F, 1,3 kV, 200  $\Omega$  und 12,5 kV/cm nach dem Protokoll von Ausubel *et al.*, 2002 (Short Protocols in Molecular Biology, 5th Edition) durchgeführt.

### **Identifizierung von Transformanten**

Zur Identifizierung von Transformanten wurden einzelne Kolonien ausgewählt und in 5 mL Medium **M2.1**, **M2.2** bzw. **M2.3** in sterilen 14 mL-Röhrchen (PP-Tube, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht) angeimpft und über Nacht im Schüttler (Orbital Shaker, Thermo Forma, Marietta, USA) bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde dann, wie unter **2.2.2.1** beschrieben, Plasmid-DNA isoliert und restringiert.

#### 2.2.6.2 Transformation von *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum*

### **Präparation und Transformation kompetenter Zellen von *Agrobacterium tumefaciens***

Die Präparation und Transformation der kompetenten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen wurde nach dem Protokoll, das Michielse *et al.* 2008 veröffentlicht haben durchgeführt.

### ***A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Pm. chlamydospora* und *Pa. aleophilum***

Die nach der Transformation (Landi *et al.*, 2012) auf dem Selektionsmedium auskeimenden Sporen wurden auf neue MM-Selektionsplatten (**M14**) überführt, erneut bei 26 °C ca. eine Woche inkubiert und nach weiterem ausreichendem Wachstum auf die Anwesenheit von funktionsfähigem GF Protein im Zytosol hin, mit Hilfe des Mikroskop Axioskop 2 der Firma Zeiss untersucht.

#### 2.2.6.3 Protoplastentransformation

### **Gewinnung der Protoplasten**

Um *Eutypa lata* zu transformieren wurde ein weiteres Protokoll verwendet. Drei Wochen alte *E. lata* Agarplatten (26 °C, BAF-Medium **M6**) wurden abgeschwemmt und durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem, San Diego, USA) unter sterilen Bedingungen filtriert. Danach wurden die Konidien sedimentiert (10 min, 4000 rpm, 20 °C, Rotor SLA-1500, Zentrifuge Sorvall-RC-6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Protoplastierung der Konidien erfolgte durch Zugabe von 20 mL 0,7 M NaCl-**(L9)** oder 1 M Sorbitol-Lösung (**L16**) für circa 3 Stunden (Kontrolle durch Mikroskopieren) bei 22 °C auf dem Wippschüttler (ST5, CAT Scientific Inc., CA, USA). Nach der Zentrifugation (10 min, 1000 rpm, 4 °C, Rotor SS-34, Zentrifuge Sorvall-RC-6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden

die Protoplasten in 20 mL STC-Puffer (**P19**) gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 1 mL STC-Puffer (**P19**) aufgenommen.

### **Transformation der Protoplasten**

Je 100 µL der Protoplastenlösung wurde auf Eis in 14 mL-Röhrchen mit Plasmid-DNA (30 µL, 1.5 µg DNA) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 mL PEG-Lösung (**L11**) und eine weitere zwanzigminütige Inkubation bei RT auf dem Wippschüttler. Zu jeder Suspension wurden 5 mL flüssiges, 55 °C warmes Regenerationsmedium (**M19**) gegeben. Der gesamte Ansatz wurde dann zum Übersichten von **M14**-Agarplatten verwendet.

## 2.2.7 Klonierungsstrategien der verwendeten Konstrukte

### 2.2.7.1 Konstruktion der Plasmide mit den Fluoreszenzfarbstoffen für *Fomitiporia mediterranea*

Zur Konstruktion der beiden Vektoren pCAMB-trpC(Fm)-HPT-EFA(Fm)-Cyan bzw. pCAMB-trpC(Fm)-HPT-EFA(Fm)-GFP wurden zwei verschiedene Methoden angewendet.

#### **pCAMB-trpC(Fm)-HPT-EFA(Fm)-GFP**

Der Vektor wurde mit Hilfe der Restriktions- und Ligationsmethode wie in den Kapiteln **2.2.3.1** und **2.2.4** beschrieben hergestellt. Zu Beginn wurde unter Zuhilfenahme der sequenzierten Genomsequenz des Pilzes die Primer zur Amplifikation der beiden Promotorsequenzen trpC (Indolglycerin-Phosphat Synthase, Kagan *et al.*, 2008) und EFA (Elongationsfaktor  $\alpha$ , Odenbach *et al.*, 2007) generiert. Die Sequenzen sind in Kapitel **2.1.9** in Tabelle **1** aufgelistet. Die beiden Promotorsequenzen wurden im Anschluss in pJet1.2/blunt ligiert. Der Promotor EFA wurde durch die eingefügten Schnittstellen ApaI und NcoI in den Vector pAJF-EFA-GFP eingebracht. Dabei wurde er gegen den EFA Promotor aus *M. oryzae* ersetzt. Dann wurde der Promotor (Elongationsfaktor  $\alpha$ ) und der Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe der Restriktionsenzyme XhoI und NotI aus dem Plasmid pAJF-EFA(Fm)-GFP ausgeschnitten und in den ebenfalls so geschnittenen pCAMB-HPT-EFA-GFP ligiert. Die trpC Promotorsequenz von *F. mediterranea* wurde mittels 'Rf-Cloning' (Restriction-free Cloning; Van den Ent und Löwe, 2006) in die HPT Kasette eingebracht. Dadurch wurde die vorherige Promotorsequenz von *Aspergillus nidulans* ersetzt (Yelton *et al.*, 1984; Cullen *et al.*, 1987). Aus dem Vektor pCAMB-HPT-EFA(Fm)-GFP wurde im Anschluss mit Hilfe des Restriktionsenzym HindIII die HPT Kasette entnommen und durch die neue, die den *Fm*-Promotor enthielt ersetzt. Nach der Kontrolle auf die Korrektheit des Plasmids wurde dieses wie unter **2.2.6.2** beschrieben durch in *A. tumefaciens*-Zellen transformiert.

### **pCAMB-trpC(Fm)-HPT-EFA(Fm)-Cyan**

Dieser Vektor wurde mit Hilfe des *Gibson Assembly Systems* erstellt (<http://nebuilder.neb.com/>). Hierfür wurden die Primer aus Kapitel 2.1.9 verwendet. Zuerst wurde der Vektor pAJF-EFA(Fm)-GFP mit den Enzymen NcoI und BsrGI restringiert und die Sequenz Cyan (NcoI, BsrGI) integriert. Die Cyan-Farbstoffgenesequenz stammte aus dem Vektor pAmCyan (Best.Nr. 632440, Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich). Der Grundvektor pCAMB-HPT(HindIII) wurde mit den Restriktionsenzymen SmaI und NcoI verdaut und aufgereinigt. Mit den Primern GA\_E-C-t-H-for2 und GA\_t-H-pC-rev wurde die HPT-Kassette (Fm) vom Vektor pJet1.2-trpC(Fm)-HPT amplifiziert und mit den Primern GA\_pC-E-C-for1 und GA\_E-C-t-H-rev1 die Sequenz EFA(Fm)-Cyan aus dem Vektor pJF-EFA(Fm)-Cyan. Im Anschluss wurden die Teile nach Herstellerangaben (NEB, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.) mit Hilfe des Gibson Assembly® Cloning Kit (E5510S) ligiert und in *E. coli*-Zellen transformiert.

#### 2.2.7.2 Konstruktion der $\Delta$ PKS2-Plasmide für *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum*

Die beiden Plasmide pCAMB-HPT- $\Delta$ PKS2(Pm bzw. Pa) wurden von Lena Licht (Bachelorthesis, 2012) und Elisabeth Grundmann (Masterarbeit, 2012) generiert. Hierzu mussten zuerst die noch unbekannt Sequenzen der Polyketidsynthasegene durch PCR Ansätze amplifiziert werden. Es wurden degenerierte Primer (die mit Hilfe von Sequenzen anderer verwandter Pilze durch das Erzeugen von Konsensus-Sequenzen in hochkonservierten Regionen der PKS-Genesequenz abgeleitet wurden) und das 'step-down-PCR' basierte Verfahren nach Zhang und Gurr (2000) eingesetzt. Die Transformationen der Pilze wurde mit Hilfe der *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformation von Sporen durchgeführt (Figueiredo *et al.*, 2010).

## 2.3 Fermentation

### 2.3.1 Fermentation in Schüttelkulturen

Pilze wurden im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen Varianten fermentiert. Die Kulturgrößen betragen für Schüttelkolben 250 mL Medium im 500 mL-Kolben (eine Schikane), 500 mL Medium im 1 L-Kolben (eine Schikane) und 2,5 L Medium im 5 L-Glaskolben. Das Inokulum bestand entweder aus Sporen, die von 2-3 Wochen alten Agarplatten der zu untersuchenden Stämme *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* und *Eutypa lata* durch Abschwemmen erhalten wurden oder aus 10-25 Myzelstücken (vor allem bei *Fomitiporia mediterranea*, die als Rondelle (ca. Ø 10mm) ausgestochen und dem Medium steril zugegeben wurden. Die Kolben wurden nach dem Inokulieren auf Plattformschüttlern (Orbital Incubator, Sanyo Electric Co., München) bei 120 rpm und 22 °C bzw. 26 °C inkubiert. Alle zwei Tage wurden der Glukosegehalt und der pH-Wert bestimmt. Wenn der Gehalt an freier Glukose im Mediums null Prozent erreicht hatte (DIABUR Test 5000 Teststreifen, 50 St. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), wurde die Fermentation beendet. Dann wurden Myzel- und Kulturfiltrat-Extrakte hergestellt (siehe 2.4.1) und wie unter 2.4.2 beschrieben analysiert. Außerdem wurden Blattaufropftest und Weinpflanzeninjektionsversuche (siehe 2.6) mit *Vitis vinifera* durchgeführt.

#### 2.3.1.1 Spezialkulturen mit Weinblattextraktmedium / Interaktionsstudien

Zu Beginn dieser Versuche wurden jeweils drei 1 L-Erlenmeyerkolben pro Pilz (*Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia mediterranea* und *Eutypa lata*) mit 500 mL WEM (**M22**) oder HMG-Medium (**M10**) gefüllt und die Pilze bei 26 °C bei 120 rpm heranwachsen lassen. Die Inkubationszeit betrug für *F. mediterranea* vier Wochen, für *E. lata* drei Wochen und für *Pm. chlamydospora* bzw. *Pa. aleophilum* eine Woche. Diese Kulturen wurden wie bereits erwähnt weiter zu Extrakten verarbeitet die weiteren Untersuchungen zugeführt wurden oder die Vorkulturen wurden so angesetzt, dass alle Pilze am selben Tag das maximale Myzelgewicht erreichten. Im Anschluss wurden die Kulturen gemischt um zu untersuchen, ob eine veränderte Siderophorproduktion in den Mischkulturen beobachtet werden kann. Dafür wurden die Kulturen wie in den Kapiteln 2.4.1 beschrieben aufgearbeitet.

#### 2.3.1.2 Fermentationsstudien zur Isolation von Kaempferol-3-O-Glykosid

Nachdem bei der Fermentation von *Pm* und *Pa* in WEM (**M22**) eine Weinblatt-phytotoxische Substanz

isoliert werden konnte, die nach der Aufreinigung und Strukturanalyse (Dr. Louis P. Sandjo, Prof. Dr. Till Opatz, Organische Chemie, Universität Mainz) als Kaempferol-3-O-Glykosid identifiziert werden konnte, wurden weitere Studien zur Glykosilierung von Kaempferol durchgeführt. Hierzu wurde der Pilz Pm in 50 mL HMG-Medium (**M10**) für drei Tage fermentiert. Im Anschluss wurde das Myzel in sterilen 50 mL Gefäßen bei 2000 rpm für 10 min pelletiert und danach in 50 mL MM (**M13**) versetzt mit 10 mg/L (bzw. 20 mg/L) Kaempferol (analytical standard, 96353 Fluka, CAS Nummer 520-18-3, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) überführt und fermentiert (4 d, 120 rpm, 22 °C). Der Kulturfiltratextrakt aus 5 mL Medium wurde mit Ethylacetat isoliert und in 50 µL MeOH eluiert. Im Folgenden folgenden wurde der Extrakt mittels HPLC-MS analysiert (Kapitel 2.4).

### 2.3.1.3 Fermentationsstudien zur Isolation von Siderophoren

Auch für diese Fermentation wurden 1 L-Erlenmeyerkolben pro Pilz (*Pm. chlamydospora*, *Pa. aleophilum*, *F. mediterranea* und *E. lata*) mit 500 mL Medium (**M13**) gefüllt und die Pilze bei 26 °C bei 120 rpm heranwachsen lassen. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben.

### 2.3.1.4 Fermentation der antagonistischen Endophyten- bzw. *Trichoderma*-Stämme

Die Fermentation der als antagonistisch gegen die vier Esca-assoziierten Pilze getesteten Endophyten bzw. *Trichoderma* sp.-Stämme wurde in 1 L-Kolben (mit einer Schikane) mit 500 mL Medium (**M9**, **M10**) durchgeführt. Die Pilze wurden bei 120 rpm und 22 °C inkubiert, bis der Gehalt an freier Glukose des Mediums auf null Prozent gefallen war. Es wurden im Anschluss Extrakte aus dem Myzel und dem Kulturfiltrat erstellt und mittels verschiedener biologischer Assays untersucht (siehe Kapitel 2.4-2.6). Während der Arbeiten wurden Pilzkulturen in Agar-Schrägröhrchen unter Paraffinöl (bei 4 °C) und auf Agarplatten (bei 26 °C) kultiviert um ausreichend Sicherheits- und Vorkulturen zu gewährleisten.

### 2.3.1.5 Fermentation von antagonistischen Bakterienstämmen

Bakterienstämme wurden in 1 L-Kolben (mit vier Schikanen) mit 500 mL Medium (**M9**) bei 120 rpm und 22 °C fermentiert. Nach 3 Tagen wurde die Kultur zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 22 °C, Jouan GR 4 22, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und das Zellpellet sowie die Kulturbrühe getrennt aufgearbeitet (siehe 2.3.3).



### 2.3.2 Fermentation im 20 L-Maßstab

Die Fermentation erfolgte nach Standardverfahren (Witter *et al.*, 1998) im 20 L-Fermenter (Typ Biostat A-20, Fa. Braun, Melsungen). Die Rührerdrehzahl betrug 120 rpm und belüftet wurde mit 4-5 Litern Luft pro Minute bei 22 bzw. 26 °C. Der Fermenter wurde mit 500 mL Vorkultur des selben Mediums mit dem jeweiligen Pilzes inokuliert. Während der Fermentation wurden täglich 200 mL Probe steril entnommen. Es wurde der pH-Wert (MP220, Mettler Toledo, Gießen) und der Glukosegehalt (Diabur-Test 5000 Teststreifen) bestimmt. Nach der Trennung von Kulturfiltrat und Myzel wurde das Myzeltrockengewicht ermittelt. Das Kulturfiltrat wurde wie unter **2.4.1** beschrieben extrahiert. Das von der Kulturbrühe getrennte Myzel wurde auf ausgewogenen Filterpapieren (Rundfilter 604, Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) 6 h bei 65 °C getrocknet und so das Myzeltrockengewicht bestimmt.

## 2.4 Isolation von Sekundärmetaboliten

### 2.4.1 Herstellung von Rohextrakten aus Kulturfiltrat und Myzel

Nach dem Beenden der Fermentation wurde das Myzel durch Filtration über einen Büchner-Trichter oder durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 22 °C) vom Kulturfiltrat getrennt. Das Kulturfiltrat wurde dann mit je einem Volumen Ethylacetat mit Hilfe eines Scheidetrichters extrahiert. Das organische Lösungsmittel wurde anschließend über wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt (Rotationsverdampfer Heidolph Laborota 4002; SpeedVac Jouan RC 10.11). Bei den Fermentationen mit Bakterien wurde das Kulturfiltrat mit einem Volumen 2-Propanol versetzt, welches durch die Zugabe von 14 g/L NaCl wieder als Lösungsmittelphase vom wässrigen Filtrat getrennt werden konnte. Das 2-Propanol wurde danach ebenfalls mittels Rotationsverdampfer eingengt und durch zweimaliges Waschen mit MeOH und anschließender Zentrifugation (2 min, 13.200rpm, 22 °C) entsalzt. Entsprechend wurde das Myzel der Tagesproben für 1 h in 100 mL Methanol extrahiert und ebenfalls mittels Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Die so gewonnenen Rohextrakte wurden in 1 mL MeOH gelöst und in 4 mL-Probengläschen bei -20 °C aufbewahrt. Vor der HPLC-Analyse wurden dann 50 µL der Proben zentrifugiert (1 min, 13.200 rpm, 22 °C) um etwaige Schwebstoffe zu pelletieren, bevor der Extrakt in 0,2 mL-HPLC-Gläschen überführt wurde.

Das Kulturfiltrat am Tag der Fermenteraufarbeitung wurde entweder mit einem Volumen Ethylacetat extrahiert oder über einem Polystyroladsorberharz (DIAION-HP 21, Mitsubishi Kasei Corporation, Tokyo, Japan) einer Festphasenextraktion unterzogen. Die Elution erfolgte jeweils in zwei Stufen mit 2 L Methanol und dann mit 2 L Aceton. Im Anschluss wurden die Extrakte mit einem

Rotationsverdampfer eingeengt. und danach chromatographisch an Kieselgel 60 (0,063-0,2 mm) mit Cyclohexan-Ethylacetat- und einem Ethylacetat-Methanol-Gemisch aufgetrennt.

### 2.4.2 Säulenchromatographie

Die Auftrennung des gewonnenen Rohextraktes aus den Fermentationsansätzen erfolgte durch Chromatographie an Kieselgel 60 und Elution mit Cyclohexan-Ethylacetat-Methanol-Gradienten (Gradient siehe **Tab.5**).

**Tab.5:** Gradient für eine Kieselgel 60 Chromatographie (100 g Kieselgel 60, Fraktionsgröße 250 mL)

Fraktion	Cyclohexan [%]	Ethylacetat [%]	Methanol [%]
1	100	0	0
2	80	20	0
3	60	40	0
4	40	60	0
5	20	80	0
6	10	90	0
7	0	100	0
8	0	50	50
9	0	0	100

### 2.4.3 Bond Elut™ C18-Säule

Die Chromabond Säulen C18 ec (Art-Nr: 730141, Chromab. Säulen C18 ec, 6 mL, 2000 mg, Macherey Nagel, Düren) sind mit einem hydrophobem Kieselsäure-basierten Sorbent gefüllt. Es wird allgemein als das unselektivste silikatische Sorbent angesehen, da es die meisten organischen Substanzen aus wässrigen Lösungen auf der Säule zurückhält. Diese Eigenschaft ist vor allem dann von Vorteil, wenn die Verbindungen, die isoliert werden sollen, sehr unterschiedlich sind.

**Tab.6:** Gradient für die C18-Säulen Chromatographie (2 g C18-Silicat-Material, Fraktionsgröße 15 mL)

Fraktion	H <sub>2</sub> O+0,1%TFA [%]	Acetonitril [%]
1	100	0
2	75	25
3	50	50
4	30	70
5	0	100

Es wurde in einem H<sub>2</sub>O (0,1 % Trifluoressigsäure)-Acetonitril-Gemisch (Gradient siehe **Tab.6**) eluiert.

#### 2.4.4 HPLC-Analyse von Rohextrakten

Zur Untersuchung der gewonnenen Rohextrakte wurden HPLC-Analysen durchgeführt (siehe Kapitel 2.3). Es wurde eine mit Dioden-Array-Detektor (DAD) ausgestattete HPLC-Anlage (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Waldbronn) mit RP18-Trennsäule (LiChrospher 100, 125x4 mm, 5  $\mu$ m, Merck, Darmstadt) eingesetzt. Um bekannte Verbindungen in den Extrakten identifizieren zu können, wurden Standard-Laufparameter gewählt, um die Vergleichbarkeit der Retentionszeiten und UV-Spektren mit der vorhandenen Datenbank zu gewährleisten. Als Eluenten wurden  $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$  (+0,1 % TFA) (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) eingesetzt. Die Säule wurde auf 40 °C temperiert, die Flussrate betrug 1 mL/min. Das Injektionsvolumen aller Proben betrug abhängig von deren Konzentration und Absorptionskoeffizienten 2-20  $\mu$ L. Es wurde stets der in **Tab.7** dargestellte Gradient verwendet.

**Tab.7:** Standardgradient der analytischen HPLC, Eluent A =  $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$  (+0,1 % TFA), Eluent B = Acetonitril

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	99	1
20	0	100
24	0	100
25	99	1

Um Extrakte auftrennen zu können, die bereits mit einer Retentionszeit von weniger als zwei Minuten von der Säule eluieren, wurde eine weitere HPLC-Säule eingesetzt (HILIC, Eurospher II, Knauer GmbH, Berlin). Es wurde ein abgewandelter Gradient (siehe **Tab.8**) eingesetzt. Die Säule wurde auf 40 °C temperiert, die Flussrate betrug 1 mL/min.

**Tab.8:** Standardgradient der analytischen HPLC mit HILIC-Säule

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	1	99
20	100	0
24	100	0
25	1	99

Alle von der HPLC-Säule chromatographisch aufgetrennten Substanzen konnten auch mit Hilfe eines Fraktionssammlers in 96-Loch-Platten mit je 15 s Fraktionierung gesammelt werden um ihre Aktivität später in verschiedenen biologischen Testverfahren zu untersuchen. Dieses Verfahren erlaubte es es auch die aufgetrennten Extrakte in 24-Loch-Platten mit einer Fraktionierungszeit von einer Minute abzulegen.

#### 2.4.4.1 Präparative HPLC

Um größere Mengen von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten zu isolieren wurde ein JASCO LC-2000Plus HPLC System (JASCO Labor-und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt) eingesetzt. Mit Hilfe einer SunFire C18 Säule (100 Å, 5 µm, 19 mm x 250 mm, 1/pkg OBD; Best.Nr. 186004027; Waters S.A.S., Saint-Quentin, Frankreich) und einem an die Elutionsbedingungen der jeweiligen Substanz angepassten Gradienten konnten so größere Mengen an Reinsubstanz für weitere Test gewonnen werden. Die Chromatografie wurde bei 22 °C Säulentemperatur mit einem Fluss von 17 mL/min durchgeführt. Der Gradient wurde zuvor im kleinen Maßstab auf der HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn), ebenfalls bei 22 °C Säulentemperatur, optimiert.

#### 2.4.5 HPLC-MS-Analyse

Zur Bestimmung der Molekülmasse (bzw. des m/z-Verhältnisses) der Metabolite erfolgte eine Untersuchung des entsprechenden Extraktes mittels HPLC-MS. Das dabei eingesetzte Gerät (HPLC/MSD-System Series 1100, Hewlett-Packard, Waldbronn) war mit einer RP18-Säule (Superspher 100, 125x2 mm, 4 µm, Merck, Darmstadt) ausgestattet, die auf 40 °C temperiert wurde. Der Gradient, sowie der Eluent B, entsprachen dabei denen der analytischen HPLC (siehe **2.4.4**), allerdings bei einem Fluss von 0,45 mL/min. Als Eluent A wurde H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> mit 0,1 Vol.% HCOOH verwendet. Die Massenspektren wurden mit APCI (chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck) bei Kapillarspannungen von 3.500 V (positiv) bzw. 2.200 V (negativ) aufgenommen. Die Verdampfungstemperatur betrug 400 °C und die Fragmentorspannung 140 V. Auch hier war wiederum ein Datenbankvergleich mittels einer Massenspektrenbibliothek (IBWF, Kaiserslautern) möglich, um bereits bekannte Substanzen zu identifizieren oder um unbekannte Substanzen zu charakterisieren. Zudem wurde, mit Hilfe der ermittelten Molekulargewichte und UV/Vis-Spektren, in externen Bibliotheken nach Übereinstimmungen gesucht (Chapman & Hall, 2005).

### **2.5 Biologische Testverfahren mit Pflanzen, Pilzen und Bakterien**

#### 2.5.1 Weinpflanzen als Testorganismen

Es wurden mehrere Verfahren mit Rebenteilen, ganzen Pflanzen oder Kalluskulturen während dieser Arbeit angewendet.

### 2.5.1.1 Blattrondelltest

Es wurden Wasser-Kinetin-Agarplatten (**M21**) hergestellt und Kulturfiltrat- und Myzel-Extrakte sowie Reinsubstanzen auf die darauf aufgelegten Weinblattrondelle ( $\varnothing$  1cm) aufgetropft. Es wurde verfahren wie von Harm *et al.* 2011 beschrieben. Die aufgebrachten Mengen betragen zwischen 1 und 200  $\mu\text{g}$ . Als Positivkontrolle wurde 5 %ige Phosphorsäure in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$  benutzt. Es wurden Triplets angesetzt und die Blattrondelle wurden 48 Stunden bei 22 °C in einer Feuchtekammer ohne Licht inkubiert. Die Auswertung erfolgte alle 24 h.

### 2.5.1.2 Pflanzensprühtest

Es wurden Weinpflanzenstecklinge cv. 'Riesling' (Herstellung nach Molitor *et al.*, 2012) in 10 L-Zugbeuteln verpackt und mit Sporensuspensionen von Wildtyp- und Deletionsmutanten-Stämmen von *Pm. chlamydospora* und *Pa. aleophilum* besprüht. Es wurden je 5 mL Sporensuspension mit  $1 \times 10^4$  Sporen pro mL aufgebracht. Die Pflanzen wurden dann im Gewächshaus (Herrn Dr. A. Kortekamp, Phytomedizin, Phytomedizin für den Weinbau, DLR Rheinlandpfalz, Neustadt a.d.W.) bei 24 °C und 16 h Tageslicht weitere 4 Wochen wachsen lassen. Danach wurden die Pflanzen auf nektrotische und infizierte Stellen hin untersucht. Außerdem wurde eine Isolation der, sich in der Pflanze befindlichen Pilze, unternommen (**2.7.1**) und diese anschließend mikroskopisch bestimmt. Zur Kontrolle wurden immer GFP-bzw.-CFP-markierte Pilzstämmen auf Kontrollpflanzen aufgebracht um deren Wachstum in und auf der Pflanze mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (siehe **2.1.10**) zu untersuchen.

### 2.5.1.3 Pflanzeninjektionstest

*Vitis vinifera* cv. 'Riesling' Pflanzen, die sechs bis acht Blätter entfaltet hatten, wurden mit einem Injektion Zyklus behandelt. Der Zyklus bestand aus sechs Injektionen mit einer sterilen Spritze in sechs Stunden (eine Injektion pro Stunde) mit in 250  $\mu\text{L}$  MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (50 %) gelösten 100  $\mu\text{g}$  Kaempferol-3-Glykosid (K3G). Es wurden drei verschiedene Injektionsstellen ausgewählt, jedoch nur eine pro Pflanzen. Die K3G-Lösung wurde bei drei Pflanzen in ein Internodium, bei drei Pflanzen in den dritten Sprossachsenknoten und bei drei Pflanzen direkt in den Blattstiel des zweiten Blattes injiziert. Zusätzlich wurden neun Kontrollpflanzen erstellt (gleiche Einstichstellen wie bei K3G, sechs Injektionen mit je 100  $\mu\text{L}$  MeOH in sechs Stunden). Die Pflanzen wurden danach alle zwei Tage gewässert und auf Veränderungen der Blattstruktur und Farbe hin untersucht. Das Experiment wurde zweimal in den Gewächshäusern von Frau Prof. Dr. Beate Berkelmann-Löhnertz (Institut für Phytomedizin, Hochschule Geisenheim University, Geisenheim) durchgeführt.

#### 2.5.1.4 Kalluskulturtest

Die Kalluskultur (Kapitel 2.1.6.8) wurde auf Platten und in Schüttelkulturen kultiviert (Medium **M23**). Es wurden Zellen in 200  $\mu\text{L}$  Medium in 96-Lochplatten-Tests eingesetzt. Diese Platten wurden fünf Tage bei 22 °C und 6 rpm inkubiert und alle 24 Stunden mikroskopisch analysiert. Außerdem wurden das Färbeverfahren von Wildholm (1972) eingesetzt und die Zellen dann mikroskopisch untersucht.

#### 2.5.1.6 *Vitis-shoot-Assay*

Für das *Vitis-shoot-Assay* (Weinpflanzen-Trieb-Test) wurden Wasser-Kinetin-Agarplatten (**M21**) gegossen. Auf diese Platten wurden 5 mm kurze Stücke von verholzten Rebentrieben ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) aufgesetzt. Danach wurden auf die obere Wunde 10  $\mu\text{L}$  Sporensuspension des Esca-assoziierten Pilzes (bei Pm, Pa und El wurden die GFP bzw. CFP markierten Stämme verwendet) getropft ( $10^4$  Sporen/mL) und einwirken lassen. Im Anschluss (nach zwei Minuten) wurden 10  $\mu\text{L}$  Sporensuspension des antagonistischen Pilzes ( $10^4$  Sporen/mL) oder Bakteriums ( $10^5$  Sporen bzw. Zellen/mL) aufgetropft und ebenfalls einwirken lassen. Die Agarplatten wurden dann für sieben bis elf Tage bei 26 °C inkubiert. Die aus dem unteren Ende herauswachsenden Pilze wurden dann fluoreszenzmikroskopisch untersucht (bei Pm, Pa und El). Die Platten, die mit Fm inokuliert worden waren, wurden nur mikroskopisch analysiert. Alle Versuchsansätze erfolgten dreifach. Ansätze die kein Wachstum der Esca-assoziierten Pilze mehr zeigten wurden wiederholt.

#### 2.5.1.5 Agardiffusionstest und Bestimmung der cytotoxischen Aktivität

Dieser Test erfolgte in Anlehnung an Zähler (1965) und ermöglichte den Nachweis antibiotischer Aktivität gegen Pilze und Bakterien. Es wurden die im Kapitel 2.1.6.7 beschriebenen Organismen zu Testzwecken verwendet. Die Organismen wurden auch in 96-Platten-Tests mit je 200  $\mu\text{L}$  Medium (**M9**) pro Loch eingesetzt.

Die Bestimmung der cytotoxischen Aktivität der isolierten Verbindung erfolgte im Cytotoxizitätstest wie bei Schwarz *et al.* (1997) beschrieben.

#### 2.5.1.6 Agarplattenbasierte Stresstests

Um die Deletionsmutanten der Esca-assoziierten Pilze auf ihr Wachstumsverhalten auf Stressmedien hin zu testen, wurden verschiedene Ansätze gewählt. Auf der Basis von Minimalmedium (**M13**) wurden Agarplatten versetzt mit NaCl (0,5; 1,0 und 2,0M), D-Sorbit (0,5; 1,0 und 1,5M) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1; 0,5 und 1mM) gegossen. Auf die Platten wurden Myzelrondelle ( $\varnothing 5 \text{ mm}$ ) von je drei  $\Delta\text{PKS2}$ -

Deletionsmutanten von Pm und Pa sowie deren Wildtyp aufgebracht. Die Platten wurden 7-10 Tage bei 18 °C, 26 °C und 30 °C inkubiert und nach 7 bzw. 10 Tagen wurde der Durchmesser der Kolonie ermittelt. Es wurden Triplets hergestellt und der Versuch wurde zweimal wiederholt.

Diese Tests wurden von Sabine Schwarz (Diplomarbeit, 2011) und Jean-Philippe Bürckert (Diplomarbeit, 2012) mit den Wildtypstämmen und je zwei unterschiedlichen Esca Stämmen auf einer Platte, unter Stress und im Temperaturversuch durchgeführt und waren die ersten Vorversuche zur weiteren Analyse der Interaktionen zwischen den beschriebenen Pilzen.

## **2.6 Untersuchungen zur Kaempferolumsetzung**

Um die Kaempferol-Umsetzung durch *Pm. chlamydospora* zu untersuchen, wurde der Pilz, wie im Kapitel 2.3.1 beschrieben, fermentiert.

### **2.6.1 Kulturfiltrataufarbeitung**

Die durch die Fermentation erhaltenen 500 mL Kulturfiltrat wurden durch Filtration gewonnen und mit 1,5 L Aceton bei 20 °C 18 h gefällt. Das Gemisch wurde im Anschluss zentrifugiert, um die gefällten Proteine zu pelletieren (60 min, 4 °C, 10.000 rpm, Rotor SLA-1500, Zentrifuge Sorvall-RC-6, Thermo Fisher Scientific Waltham, USA). Das Medium-Aceton-Gemisch wurde verworfen, das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 50 mL Bindepuffer (**P1**) aufgenommen und auf Eis gelagert. Die Proteine wurden mit Hilfe der NGC ((NGC™ Quest 10 ml Medium-Pressure Chromatography Systems, Biorad, München) in 18 mL-Fractionen aufgetrennt (Q Sepharose Fast Flow, 45 µm-165 µm, Best.Nr. 17-0510-01, GE Healthcare GmbH, Solingen). Von diesen Fractionen wurden je 250 µL entnommen und mit 10 µL Kaempferol (10mg/ml) versetzt. Nach einer Inkubation von 2 h bei 22 °C wurde das Gemisch mit 250 µL Ethylacetat gemischt. Die ca. 500 µL Gemisch wurden dann in eine 1 mL Pipettenspitze aufgenommen und dort fand die Trennung der beiden Phasen statt. Die wässrige untere Phase wurde verworfen und die Ethylacetatphase wurde eingengt und erneut in 25 µL MeOH aufgenommen. Von diesen 25 µL wurden 10 µL per HPLC-MS auf den Gehalt von K3G hin untersucht (siehe Kapitel 2.4.5).

### **2.6.2 Myzelaufarbeitung**

Das Myzel, welches auf dem Filter (siehe 2.6.1) zurück blieb, wurde mit 100 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen und dann in 50 mL Bindepuffer aufgenommen. Die Zellen wurden danach in einem 50 mL-Reagiergefäß auf Eis gelagert und mit Hilfe eines Ultraschallstabs (Branson Sonifier™ S-450 Digital Ultrasonic Cell

Disruptor/Homogenizer, BRANSON ULTRASCHALL Niederlassung der EMERSON Technologies GmbH & Co. OHG, Dietzenbach) aufgeschlossen. Es wurden folgende Einstellungen verwendet: 6 Pulse, à 10 s, unterbrochen durch je 20 s Pulspause, mit einer Amplitude von 30 %). Im Anschluss wurde die Probe abzentrifugiert um die Zelltrümmer zu sedimentieren (20 min, 16.000 rpm, 4 °C) und der Überstand wurde dann mittels NGC chromatografisch fraktioniert und weiter bearbeitet (siehe **2.6.1**). Danach erfolgten die Untersuchungen zum Umsatz von Kaempferol.

### 2.6.3 Kaempferol-Glykosilierungsversuche

Nach der Auftrennung mittels NGC (Biorad, München) wurden je 100 µL der 26 entstandenen Fraktionen in eine 96-Loch-Platte überführt. Zu dieser Proteinfraction wurden im Folgenden 10 µL KAE-Stammlösung (200 µg/mL), 10 µL UDP-Glukose (100 µg/mL), 10 µL NADP (50 µg/mL) und 70 µL H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> gegeben. Es wurden zehn mal drei Ansätze durchgeführt. Diese drei Ansätze wurden jeweils nach einer, zwei und sechs Stunden beendet und mittels Ethylacetat extrahiert. Im Anschluss erfolgte die Kontrolle des Kaempferolumsatzes mit Hilfe der HPLC-MS (Kapitel **2.4.5**).

## 2.7 Auswahlverfahren für antagonistische Organismen

### 2.7.1 Endophytenisolation

Die Isolation von endophytisch wachsenden Pilzen aus Pflanzenteilen wurde nach den Angaben von Fisher *et al.* (1993) durchgeführt.

### 2.7.2 Antagonistentest

Für die Antagonistentests wurde je ein Rondell aus Pilzmyzel (Ø 10 mm) eines Esca-assoziierter Pilzes an den Rand einer Agarplatte (Pm, Pa, Fm auf **M10** und El auf **M6**) gesetzt und 72 h bei 26 °C inkubiert. Danach wurde auf die andere Seite der Platte ein Rondell eines endophytischen Pilzes, oder eines Pilzes der Gattung *Trichoderma* gesetzt. Im Anschluss wurden die Platten alle zwei Tage kontrolliert und antagonistische Effekte protokolliert. Es wurde registriert, ob ein Pilz den anderen am Wachstum hinderte (Vermessung des Hemmhofdurchmessers) oder überwuchs. Es wurden endophytische Pilze der Jahrgänge 1999 (208 Pilze), 2000 (147 Pilze), 2001 (119 Pilze), 2003 (71 Pilze), 2004 (109 Pilze), 2009 (53 Pilze), 2010 (122 Pilze) und 2011 (212 Pilze) der Stammsammlung des Instituts für Biotechnologie und Wirkstoffe-Forschung getestet.

Wenn ein Pilz eine Substanz ins Medium abgab, die zu einer Hemmung des Wachstums eines Esca-



Pilzes führte wurde der Antagonistentest wiederholt und bei erneuter Hemmung der antagonistische Pilz im 500 mL-Maßstab fermentiert (siehe Kapitel 2.3.1). Danach erfolgte die auf biologische Aktivität-gestützte Isolierung der fungiziden Wirkstoffe (siehe auch Kapitel 2.4). Die biologische Aktivität der Extrakte und Wirkstoffe wurde in 96-Loch-Platten mit Sporen des jeweiligen Esca-assoziierten Pilzes in 200 µL HMG-Medium (72 h, 120 rpm, 26 °C, **M10**) getestet.

## 3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sind die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst. Anhand der im Kapitel 2 genannten Materialien und Methoden wurden Untersuchungen an den vier Esca-assoziierten Pilzen *Pm. chlamydospora*, *Pa. aleophilum*, *F. mediterranea* und *E. lata* durchgeführt. Unter anderem wurden Transformationsversuche der einzelnen Pilze, unter Zuhilfenahme geeigneter Methoden, vorgenommen und Mutanten durch Insertion von Resistenzmarkern in Kandidatengene erstellt. In weiteren Projektteilen wurden mehrere Auswahlverfahren zur Identifizierung antagonistischer Organismen durchgeführt und ausgewählte Pilze aus der Stammsammlung des IBWF bezüglich der Bildung von sekundären Metaboliten und Enzymen analysiert. Im letzten Projektteil sollte die molekularen und biochemischen Grundlagen zur Interaktion der Phytopathogene mit der Wirtspflanze untersucht werden, wobei die Aktivität der bisher wenig beachteten Substanz Kaempferol-3-Glykosid (K3G) in Pflanzentests erforscht wurde. Die Ergebnisse zu diesen Versuchen sind im folgenden Kapitel 3.1 zusammengefasst.

### 3.1 Kaempferol und Kaempferol-3-Glykosid

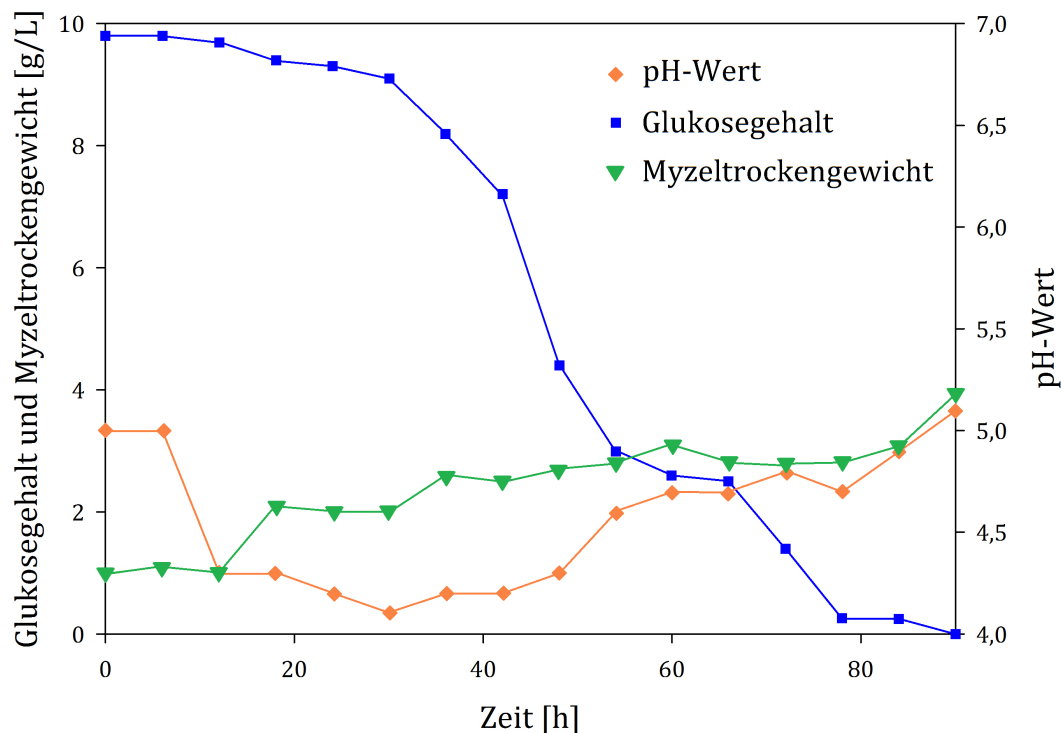
Während der Isolierung und Charakterisierung von Sekundärmetaboliten der Esca-assoziierten Pilze *Pm* und *Pa* wurde der aus Pflanzen bekannte Metabolit Kaempferol-3-Glykosid im Medium detektiert. Zuerst wurde angenommen, dass es sich um eine Verbindung aus dem verwendeten Weinblattextrakt-Medium (**M22**) handelt. Die Substanz konnte aber auch dann noch nachgewiesen werden, wenn *Pm* in Minimalmedium unter Zusatz von Kaempferol fermentiert wurde. Nach mehrfacher Wiederholung des Fermentationsansatzes und der HPLC-MS Analytik, konnte die Glykosylierung von Kaempferol durch *Pm* bestätigt werden. Die Substanz wurde im Anschluss in *Vitis vinifera* cv. 'Riesling' injiziert und verursachte dort Esca-ähnliche Symptome.

#### 3.1.1 Fermentation zur Isolation phytopathogener Wirkstoffe aus *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum*

##### 3.1.1.1 Fermentation zur Isolation phytotoxischer Sekundärmetabolite aus *Phaeoconiella chlamydospora*

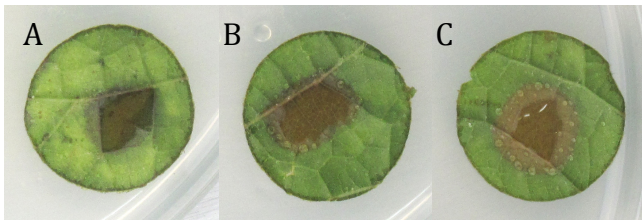
Es wurden während dieser Arbeit Fermentationsansätze mit *Pm. chlamydospora* und *Pa. aleophilum* durchgeführt. Es wurden sowohl Schüttelkulturen in Kolben mit einem Fassungsvermögen zwischen 0,25 und 2,5 L fermentiert, als auch weitere *Upscaling*-Versuche in 20 L Fermentern unternommen. Bei

den Standardfermentationen wurden täglich der pH-Wert, die freie Glukosemenge im Medium und das Myzeltrockengewicht des jeweiligen Pilzes bestimmt. Zusätzlich wurden Kulturfiltrat und Myzel wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, aufgearbeitet. Mit Hilfe der HPLC-MS konnten dann die Metabolite analysiert werden. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich wird, dauerte eine Standardfermentation von *Pm. chlamydospora* in einem Fermenter mit 20 L Minimalmedium ca. 90 Stunden bevor die freie Glukose im Medium aufgebraucht war. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Fermentation beendet. Zu Beginn der Fermentation war eine Latenzphase zu beobachten, in der das Myzeltrockengewicht langsam zu- und der Glukosegehalt des Mediums langsam abnimmt. In dieser ersten Phase, die ca. 40 Stunden anhält sinkt der pH-Wert und erreicht 4,2. Im Anschluss daran steigt die Biomasse stark an. Der Pilz verstoffwechselt die im Medium enthaltene Glukose und der pH-Wert steigt gegen Ende der Fermentation leicht über den Startwert.



**Abb.1:** Fermentationsdiagramm einer Standardfermentation von *Pm. chlamydospora* in 20 L Minimalmedium (M13)

Um etwaige phytotoxische Substanzen zu detektieren, wurden die Extrakte der einzelnen Fermenterproben auf Blattrondelle von *Vitis vinifera* cv. 'Riesling' aufgetropft (siehe Abbildung 2 und Kapitel 2.1.6.8).



**Abb.2:** *Vitis vinifera* cv. 'Riesling', Blatttropftest mit je 100 µg Rohextrakt in MeOH der Fermentationsproben von Pm in Minimalmedium, nach 78 h (A), 84 h (B) und 90 h (C)

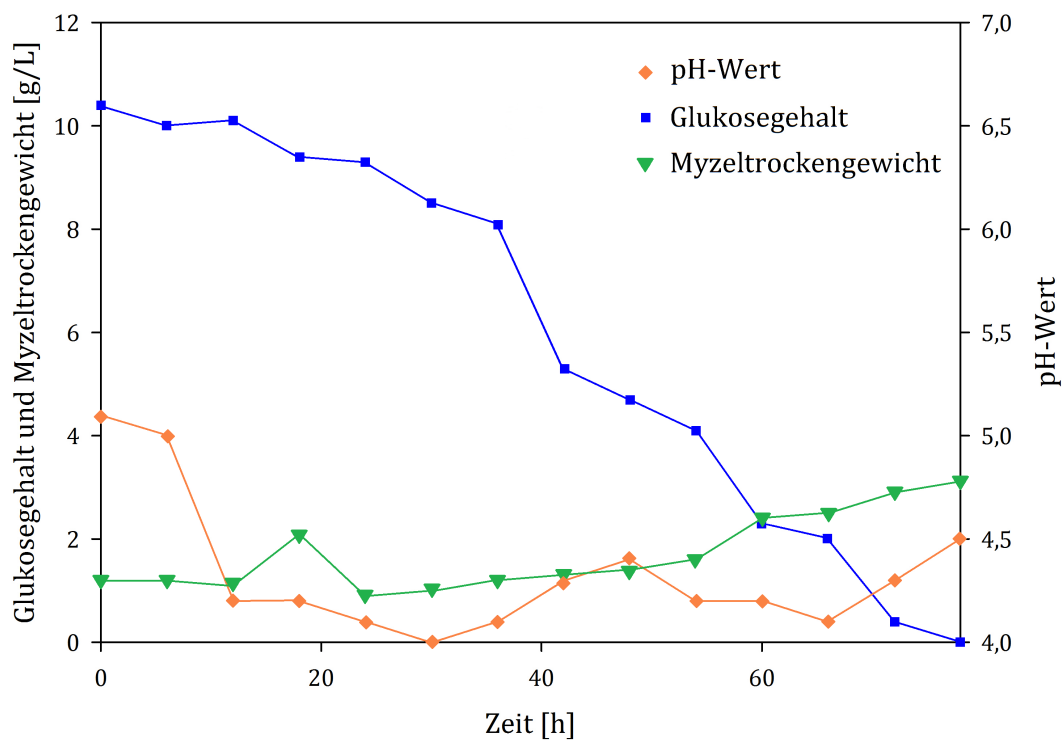
Nekrosen, die durch eine phytotoxische Aktivität der isolierten Extrakte entstehen, sind erst nach ca. 60 Stunden zu beobachten und erreicht eine maximale Ausdehnung bei Extrakten, die am Ende der Fermentation isoliert wurden. Es wurden jeweils 100 µg Extrakt auf die Weinblattsegmente aufgebracht. Extrakte, die aus Proben zu den Zeitpunkten 78, 84 und 90 Stunden angefertigt wurden, bilden die größten Nekrosen aus (Vergleich **Abb.2**). Die Auswertung und fotografische Dokumentation erfolgte 24 Stunden nach der Applikation.

### 3.1.1.2 Fermentation zur Isolation phytotoxischer Sekundärmetabolite aus *Phaeoacremonium aleophilum*

*Phaeoacremonium aleophilum* wurde in Minimalmedium (**M13**) fermentiert und die aus dieser Fermentation gewonnen Extrakte wurden ebenfalls mittels eines Blatttropftests auf ihre phytotoxische Aktivität hin getestet.

Abbildung 3 zeigt die Fermentationsgrafik von Pa. Bei Pa beginnt die Fermentation ebenfalls mit einer Latenzphase, die nach ca. 36 Stunden endet. Nachfolgend steigt das Trockengewicht des Myzels und der pH-Werts an. Dieser Anstieg ist jedoch weniger deutlich als bei *Pm. chlamydospora*. Die freie Glukose ist bereits nach 78 h verbraucht.

Bei allen durchgeführten Fermentationen, unabhängig davon, ob mit Sporen oder einer Vorkultur aus Myzelstücken inokuliert wurde, wächst Pa im gleichen Medium schneller als eine Kultur von Pm. Es wurden auch Fermentationen im Maßstab mit 2,5 L in 5 L Schüttelkolben durchgeführt. Die Peakmuster der HPLC-Chromatogramme, die von allen Extrakten aus Fermentationsproben angefertigt wurden und die Fermentationsdauern (soweit das Inokulum an die Flüssigkeitsmenge angepasst worden war) waren vergleichbar mit der Fermentation im 20 L Fermenter. Jedoch reichten die so gewonnenen Extraktmengen nicht aus um weitere Untersuchungen der isolierten Naturstoffe zu unternehmen.



**Abb.3:** Fermentationsdiagramm einer Standard-Submerskultur von *Pa. aleophilum* in 20 L Minimalmedium (M13)

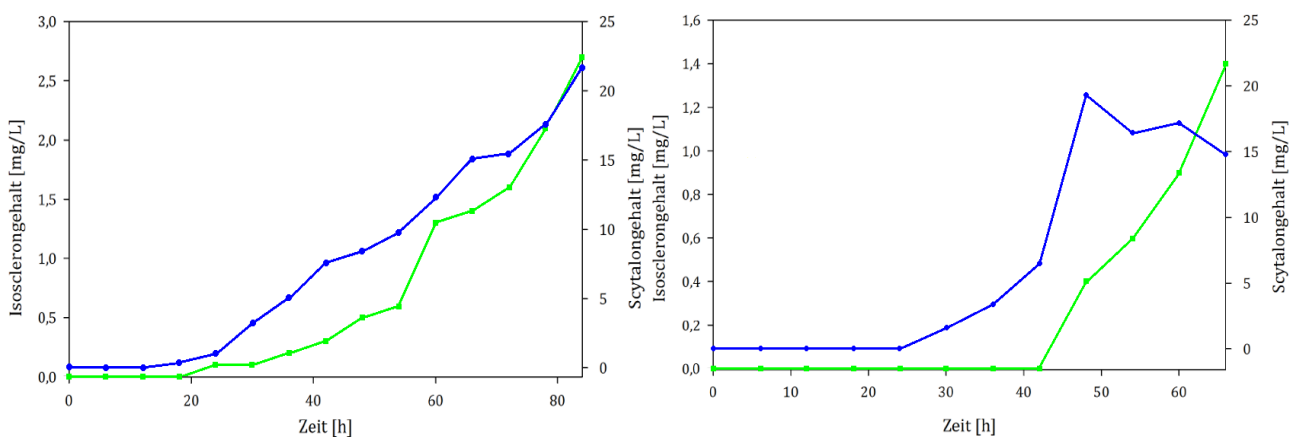
Die Phase, in der biologisch aktive Substanzen im 20 L Fermenter von *Pa* produziert werden, beginnt nach ca. 72 h. Während die phytotoxische Aktivität, im Vergleich zu *Pm*, erst nach 78 h ihr Maximum erreicht. Die produzierte Menge an Sekundärmetaboliten ist bei *Pm* zum Zeitpunkt von 72 h höher als bei *Pa*, was sich auch in der Ausbildung der Nekrosen zeigt. Nach 66 h Stunden also 12 Stunden vor dem Ende der Fermentation ist bei *Pa* im Pflanzentest mit Extrakten im Vergleich zu *Pm* keinerlei Läsion zu beobachten. In den folgenden Untersuchungen sollten die Substanzen isoliert und charakterisiert werden, welche die in **Abb.4** gezeigten Nekrosen induzieren.



**Abb.4:** *Vitis vinifera* cv. 'Riesling', Blatttropftest mit je 100 µg Rohextrakt in MeOH der Fermentation von *Pa* in Minimalmedium (M13), nach 66 h (A), 72 h (B) und 78 h (C)

### 3.1.1.3 Isolierung der biologisch aktiven Sekundärmetabolite aus *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum*

Aus den Pilzen *Pm. chlamydospora* und *Pa. aleophilum* wurden bereits in der Vergangenheit Sekundärmetabolite isoliert und charakterisiert. Diese Substanzen sind Isoscleron und Scytalon (Bruno und Sparapano, 2007a). Die Produktion dieser Metabolite aus dem Jahr 2007 konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Bei der Fermentation der beiden Pilze in Minimal-Medium (**M13**) konnten ebenfalls Isoscleron und Scytalon identifiziert werden. Mit Hilfe einer HPLC-MS Analyse wurden die Konzentrationen der beiden Sekundärmetabolite im Kulturfiltratextrakt bestimmt (**Abb.5**). Die folgende Abbildung zeigt den Gehalt im Verlauf der Fermentationen, gemessen in einem Abstand von 6 h. Der Scytalengehalt des Kulturfiltrats ist etwa zehnmal höher als jener von Isoscleron. Darin unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Pilze kaum. Bei *Pm* beginnt die Sekundärenmetabolitenproduktion jedoch ca. 24 Stunden vorher und erreicht etwas höhere Mengen.

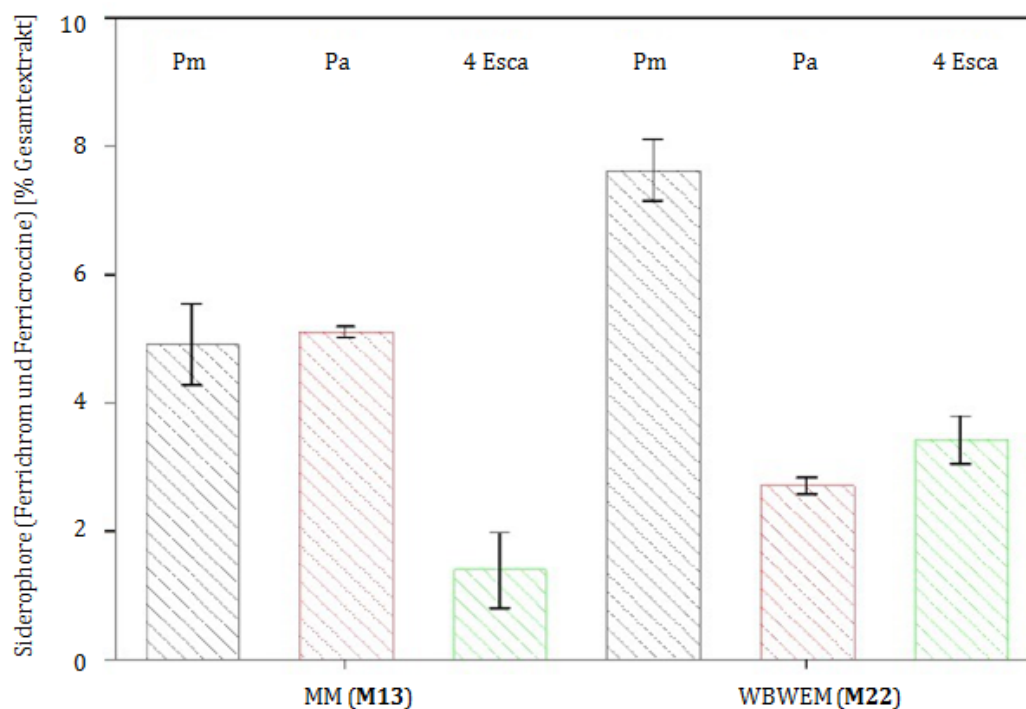


**Abb.5:** Scytalengehalt und Isosclerongehalt in Submerskulturen von *Pm* (links) und *Pa* (rechts), gemessen im Abstand von 6 h

Bei *Pa* sinkt der Scytalengehalt sogar wieder leicht ab, bevor der Glukosegehalt des Mediums 0 g/L erreicht.

Weitere Substanzen die in Minimal-Medium (**M13**) in auffallend großen Mengen isoliert werden konnten sind Siderophore. Die Eisenchelatoren konnten anhand ihrer sehr spezifischen UV/Vis Spektren detektiert werden. Sie absorbieren im Gegensatz zu den meisten Substanzen in der Reinsubstanzdatenbank des IBWF bei einer Wellenlänge von 430 nm. Anhand der Kurvenintegration der mittels HPLC detektierten Chromatogramme wurde ein Konzentrationswert von ca. acht Prozent des Gesamtextraktes, der jeweiligen Pilze *Pm* bzw. *Pa* errechnet.

Interessanterweise konnte keine Siderophorproduktion bei *Eutypa lata* und *Fomitiporia mediterranea* detektiert werden. Es wurde weder Ferrichrom A noch Ferricrocin mittels HPLC-MS Analyse identifiziert. Siderophore bilden mit Eisenionen Komplexe und haben ein niedriges Molekulargewicht. Sie werden von Pilzen und Bakterien, welche bei niedrigen Eisenkonzentrationen wachsen, gebildet. Die Rolle dieser Verbindungen ist es Eisen aus der Umgebung einzufangen. Für einige pathogene Organismen sind sie sehr wichtig für die Virulenz (Oide *et al.*, 2006). Aus Abbildung 6 ist zu entnehmen, dass bei den beiden Pilzen Pm und Pa die Produktion von Siderophoren auf verschiedene Medien während der Fermentation sehr unterschiedlich ausfällt. Während Pm einen höheren Gehalt an Ferrichromen im Weinblattextrakt-Medium im Gesamtextrakt produziert, sinkt die Menge an isolierten Siderophoren bei Pa. Die Menge an detektierten Eisenbindemolekülen, wenn alle vier Pilze gemeinsam in einem Ansatz fermentiert werden, ist deutlich reduziert. Da weder Fm noch El selbst in Einzelfermentationen Siderophore produzieren, ist die Menge an diesen, im Verhältnis zum Gesamtextrakt reduziert. Besonders zu beachten ist bei diesem Versuch aber, dass gerade die beiden tracheomycotischen Pilze Siderophore produzieren.



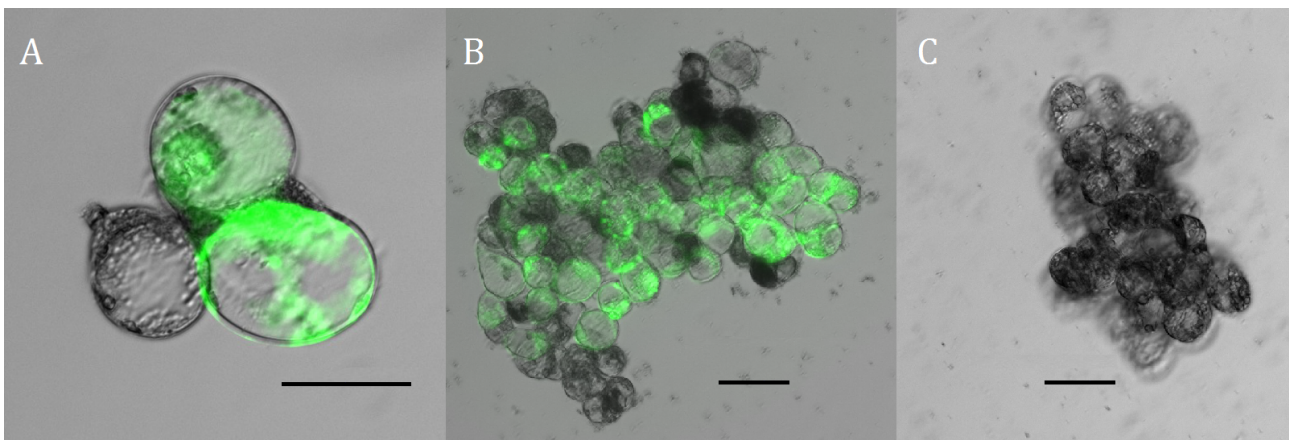
**Abb.6:** Siderophorproduktion von *Pm*, *Pa* und den vier Esca Pilzen (*Pm*, *Pa*, *Fm*, *El*) im Fermentationsgemisch (MM: **M13**, WBWEM: **M22**)

Die geringe Siderophor-Menge, in der gemeinsamen Fermentation der Esca Pilze in **M13**, könnte aus

dem allgemein reduzierten Wachstum der vier Pilze in diesem Medium herrühren. Es wurden im Laufe der Untersuchungen starke Schwankungen der Ausbeuten je nach verwendeten Weinblättern festgestellt. So konnten in allen Fällen mehr Siderophore aus dem Weinblattextrakt-Medium, welches mit 'Weißem Burgunder' angesetzt wurde, isoliert werden, als aus Fermentationen mit Medium auf Basis von 'Cabernet Sauvignon'.

Neben Substanzen, wie Scytalon, Isosclerone und den Siderophoren Ferrichrom und Ferricrocin wurden aus den Submerskulturen im Laufe dieser Arbeit weitere Substanzen isoliert. Zu diesen gehört auch Xylaron und Kaempferol-3-Glukosid.

In einem weiteren Verfahren wurde nach phytotoxischen Substanzen der Pilzextrakte gesucht, die toxisch gegen Zellen von Kallus-Kulturen sind. Mit Hilfe des Kallus-Kultur-Assays wurden phytotoxische Wirkstoffe anhand ihrer Aktivität chromatografisch aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Eluenten der Chromatographie unter Vakuum evaporiert. In die Platten konnten danach 200  $\mu\text{L}$  Kallus-Kultur in Flüssigmedium (**M23**) überführt werden (Kapitel 2.5.1.4). Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops konnten die Zellen nach der Färbung mit Fluorescein-Diacetat auf die Schädigung des Metabolismus hin untersucht werden.



**Abb.7:** Fluoreszenzaufnahmen von *Vitis*-Kalluskultur bei einer Extinktionswellenlänge von 475 nm und einer Emission von 525 nm; A: lebende *Vitis*-Zellen (Nahaufnahme), die Fluorescein im Zytosol angereichert haben; B: Ein ebenfalls noch lebendes Zellkonglomerat; C: abgestorbene Zellen, die nicht fluoreszieren (Maßstab 50  $\mu\text{m}$ )

Mit Hilfe dieses Testverfahrens können aktive Substanzen aus komplexen Stoffgemischen mittels HPLC aufgetrennt und danach analysiert werden. So können phytotoxische Substanzen isoliert und charakterisiert werden (**Abb.7 C**). Zu den Substanzen, die in dieser Arbeit mit Hilfe des genannten Verfahrens detektiert werden konnten, gehören bei Pa, Palitantin, welches bereits durch seine



antibiotische Wirkung aus *Penicillium* sp. bekannt ist (Fuska *et al.*, 1970) und verschiedene Siderophore, sowie die genannten Sekundärmetabolite Xylaron und Isoscleron.

### 3.1.2 Isolation von Kaempferol-3-Glykosid

#### 3.1.2.2 Bioaktivitäts-geführte Isolierung von Kaempferol-3-Glykosid

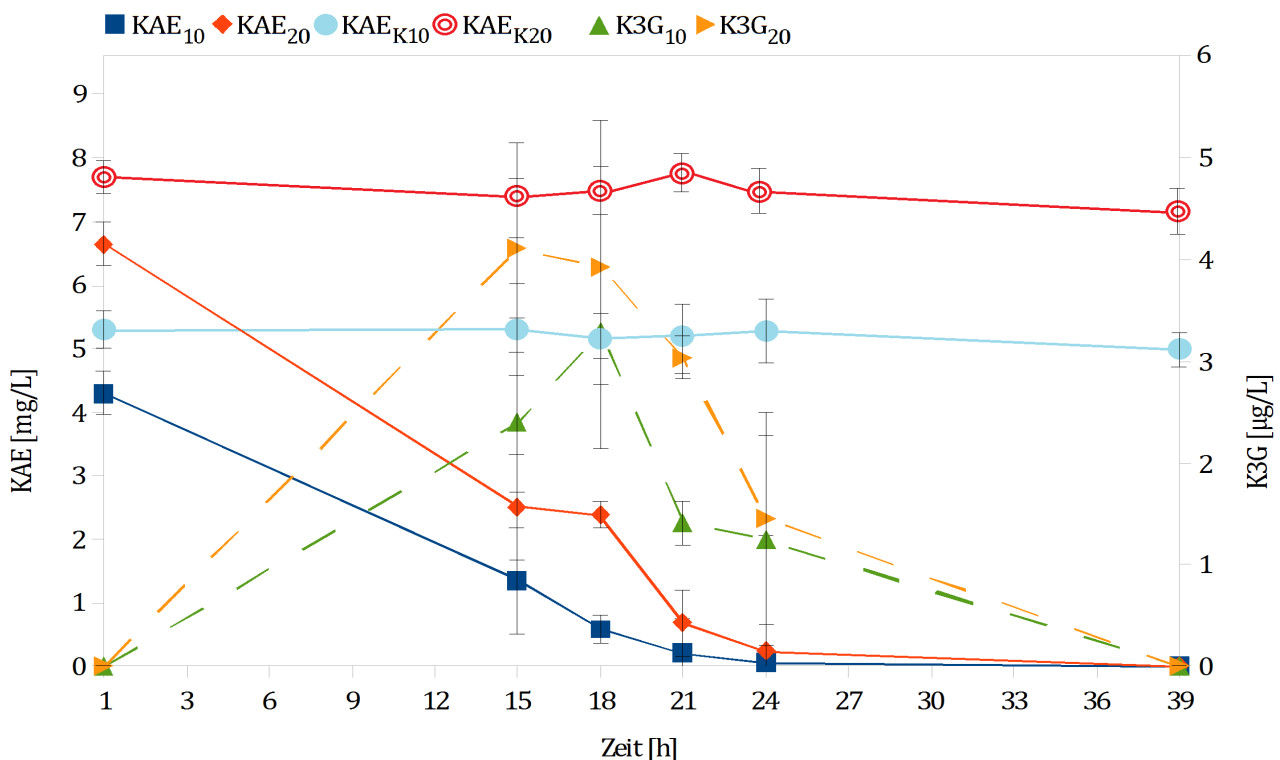
Für die Isolation von Sekundärmetaboliten aus Pm und Pa wurden die Extrakte aus dem jeweiligen Kulturfiltrat bzw. Myzelextrakt mittels HPLC chromatografisch aufgetrennt und in 24-Loch-Platten abgelegt (siehe 2.4.4). Die getrockneten und separierten Extrakte wurden im Folgenden auf Weinblätter aufgetropft. Jedoch wurde die Charakterisierung von phytotoxischen Substanzen während der gesamten Arbeit durch die sehr geringen Ausbeuten an bioaktiven Stoffen behindert. Da die meisten biologischen Verbindungen hoch wirksam sind, werden diese von den Organismen nur in geringer Menge synthetisiert. Wie bereits beschrieben, wurden immer wieder die bekannten Substanzen Isoscleron, Scytalon, sowie Pullulan isoliert, die auch in diesem Versuch zu Nekrosen der Blätter führten (Bruno *et al.*, 2007). Zusätzlich wurden die Sekundärmetabolite Xylaron (Schüffler *et al.*, 2011) und Kaempferol-3-O-Glykosid detektiert (Masuoka *et al.*, 2012).

Kaempferol-3-O-Glykosid wurde bei der optimierten HPLC von Pm Extrakt mit einer Retentionszeit von 11,37 min und dem charakteristischen UV/Vis-Spektrum mit der maximalen Absorption bei 266 nm und 347 nm detektiert. Die massenspektroskopische Analyse mittels HPLC-MS ergab eine Masse von 448 g/mol. Die Arbeitsgruppe von Prof. T. Opatz konnte dann durch die Strukturaufklärung unter Zuhilfenahme des IR-Spektrums (OH-Streckung der aromatischen und aliphatischen Hydroxylgruppen bei 3437  $\text{cm}^{-1}$ , CH-Streckung des Aromaten bei 2927  $\text{cm}^{-1}$ , C=O-Streckschwingung bei 1611  $\text{cm}^{-1}$ , C-O-C-Dehnung bei 1182  $\text{cm}^{-1}$ ) belegen, dass es sich um Kaempferol-3-O-Glykosid (K3G) handelt.

### 3.1.3 *Phaeomoniella chlamydospora* in Minimal-Medium mit Kaempferol im Fermentationsversuch

Um den Nachweis zu erbringen, dass Kaempferol-3-O-Glykoside auch ohne Pflanzenmaterial von Pm produziert wird, wurden Tests mit Minimal-Medium (**M13**) und zugesetztem Kaempferol (KAE) durchgeführt (Kapitel 2.3.1.2). Während des Glykosylierungs-Assays konnten kleine Mengen Kaempferol-3-O-Glykosid (K3G) mittels HPLC-MS Analyse detektiert werden. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Tests zusammengefasst. Es sind die Konzentrationen von KAE und K3G dargestellt, die

mit Hilfe eines externen Standards erfasst wurden.



**Abb.8:** Konzentrationen von Kaempferol und Kaempferol-3-O-Glykosid während der Fermentationsversuche (120 rpm, 22 °C), (grüne unterbrochene Linien (Dreiecke) K3G-Gehalt (10 mg/L Ansatz), orange unterbrochene Linien (Diamanten) K3G-Gehalt (20 mg/L Ansatz), rote Linien (Rauten) mit 20 mg/L KAE im Ansatz, blaue Linien (Quadrate) mit 10 mg/L KAE im Ansatz), Kontrollkolben, rote, unterbrochene Kreise mit 20 mg/L KAE und blaue Kreise mit 10 mg/L KAE ohne Pm im Ansatz, Fehlerbalken (n=3)

Es ist zu erkennen, dass die Abnahme des zugesetzten Kaempferols während der 38-stündigen Fermentation in Minimal-Medium (**M13**) relativ unabhängig von der zuvor eingesetzten Menge an Kaempferol ist. Weiter zeigt sich, dass die Abnahme bei allen drei jeweils angesetzten Experimenten kaum schwankt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass mindestens 10 mg/L KAE eingesetzt werden müssen um das später entstehende K3G detektieren zu können. Jedoch führte der Einsatz von mehr als 20 mg/L KAE zu einer starken Hemmung des Myzelwachstums. Aufgrund dieser beiden Erkenntnisse wurden die hier gezeigten Ansätze ausgewählt.

Eine Stunde nachdem das Myzel in das mit KAE versetzt Minimal-Medium überführt wurde, war noch keine Abnahme von KAE zu beobachten. Außerdem wurden noch keine detektierbaren Mengen von

K3G gebildet. Erst in der Probe nach 15 Stunden zeigte sich eine erste deutliche K3G-Menge, die mit Hilfe der HPLC-MS gemessen werden konnte. Während die Menge an KAE im Zeitraum bis zur Probenahme nach 15 bzw. 24 Stunden stark abnahm, stieg die Substanzmenge an K3G im Medium in diesem Zeitraum auf ein Maximum an. Im Anschluss und nach weiterer Fermentation bis hin zu 39 h waren jedoch beide Substanzen kaum noch nachweisbar. Auch die anderen Sekundärmetabolite, die anhand ihrer UV/Vis-Spektren detektiert werden konnten, wurden zu dieser Zeit wieder abgebaut und die Absorptionsmaxima wurden nicht mehr beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt).

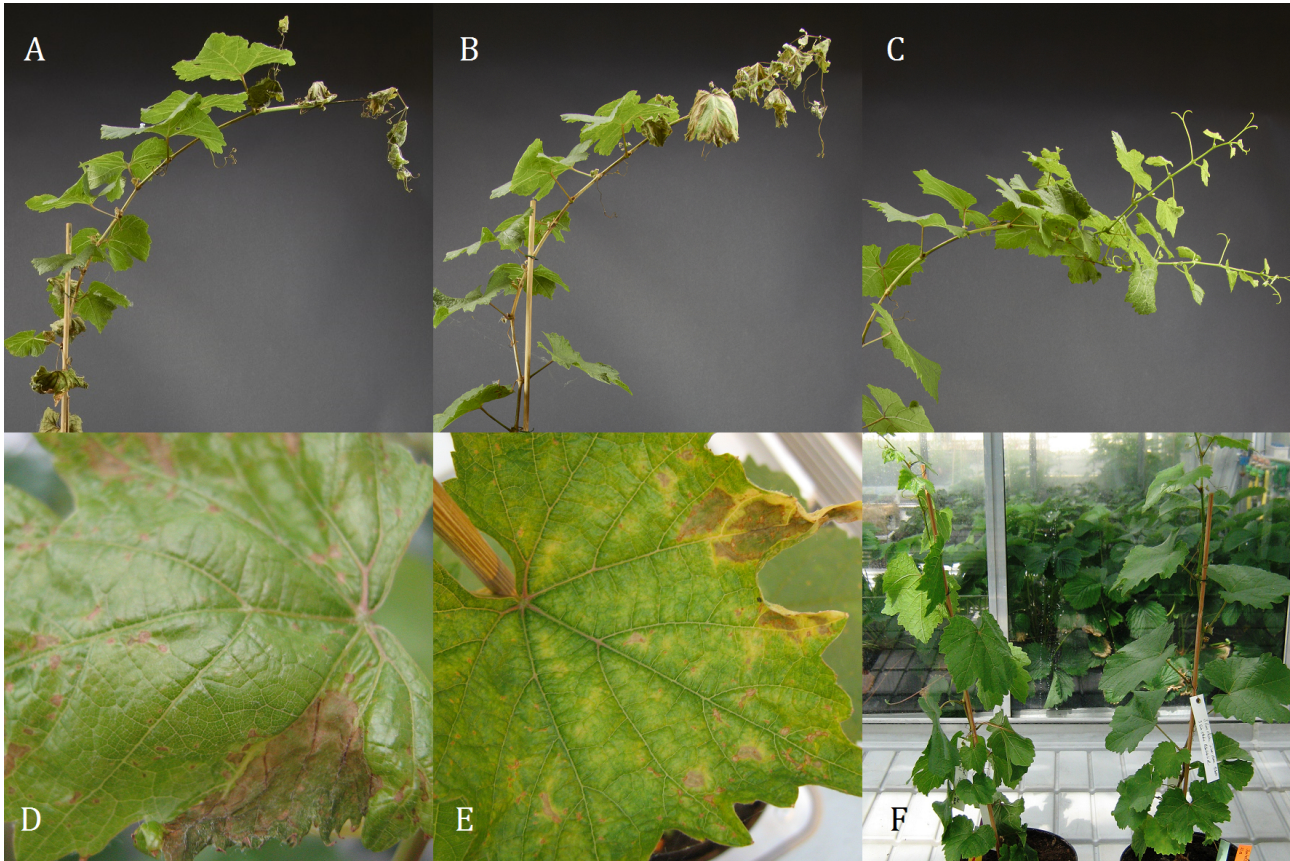
Diese Ergebnisse belegen, dass *Pm* in der Lage ist KAE in Minimal-Medium zu K3G zu glykosylieren. In Kontrollkolben, die parallel inkubiert wurden, in denen sich nur Minimal-Medium und KAE befanden, konnte keine Umsetzung von KAE nachgewiesen werden. Die Menge an KAE blieb während der ersten 24 Stunden konstant und sank dann um etwa 5 Prozent bis zur Stunde 39 ab. Jedoch zeigten sich Schwankungen der K3G- und KAE- Konzentrationen durch das Isolationsverfahren von bis zu 8 Prozent. Man kann in diesem Fall von einer Ungenauigkeit bei der Isolation und beim Nachweisverfahren der Substanzen ausgehen. Die Ergebnisse in Abbildung 8 zeigen dies sehr deutlich, da aus den Kontrollkolben ebenfalls nur geringere Mengen an KAE isoliert werden konnten, als zu Beginn in das Medium gegeben wurden. So sind die Werte an KAE die aus den Kolben ohne Pilz isoliert wurden um ca. 12-13 mg/L (20 mg/L KAE) und ca. 4,5 mg/L (10 mg/L KAE) niedriger als die eingesetzten Mengen, die sich nach der Zugabe im Medium befinden.

### 3.1.4 Enzymisolationsversuche mittels Proteinchromatographie (*in vitro* Glykosylierung)

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob die Möglichkeit besteht KAE *in vitro*, d.h. ohne lebende *Pm. chlamydospora* Zellen zu glykosylieren. Dafür wurde der Versuchsansatz wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben, durchgeführt. In keinem Ansatz konnte eine Umsetzung von KAE zu K3G beobachtet werden. Jedoch ließ sich das KAE reisolieren. Die Verdopplung der angegebenen Mengen an KAE, UDP-Glukose und NADP führte ebenfalls nicht zur Bildung von K3G. Die Veränderungen, die an der Vorfermentation, d.h. Fermentation in HMG-Medium (**M10**), den Extraktionsbedingungen des Myzels, z.B. Verdopplung der Extraktionszeit und Verwendung größerer Methanoldmengen und der proteinchemischen Aufreinigung durchgeführt wurden, führten auch nicht zum Nachweis von K3G. Daher konnte die *in vitro* Synthese von K3G bisher nicht bestätigt werden.

### 3.1.5 Weinpflanzeninjektionstest

Um den Nachweis zu führen, dass K3G in Weinpflanzen auch zu Esca-ähnlichen, nekrotischen Symptomen führt wurde K3G mit Hilfe einer Spritze in Weinpflanzen injiziert (siehe Kapitel 2.5.1.3).



**Abb.9:** Pflanzeninjektionstest, A und B: Pflanzen nach sechsfacher Injektion (von K3G in 6 Stunden, C: Kontrollpflanze (6 Injektionen mit dem verwendeten Lösungsmittel), D und E: Nahaufnahmen der Blattnekrosen einer behandelten Pflanze (100 µg Kaempferol-3-Glykosid in 250 µL MeOH/H<sub>2</sub>O 50:50), F: Vergleich der Kontrollpflanze (rechts) und der Pflanze, die nur einmal behandelt wurde (links), die Dokumentation erfolgte nach 30 Minuten.

Bei den Versuchen im Gewächshaus der Hochschule Geisenheim (Arbeitsgruppe Phytopathologie im Weinbau, Prof. Dr. Beate Berkelmann-Löhnertz) wurde in ersten Vorversuchen nur je eine Injektion pro Pflanze vorgenommen. Bereits nach wenigen Minuten waren Symptome erkennbar. Die Blätter hingen schlaff herab (**Abb.9F**). Jedoch erholten sich die Pflanzen nach ca. 60 Minuten wieder. In einem neuen Experiment wurden alle 60 Minuten und dann sechs Mal Injektionen vorgenommen. Auch in diesem Versuchsteil zeigten die Blätter nach 30 Minuten an den Spitzen des Triebs erste Erschlaffungserscheinungen. Zusätzlich zeigten sich an diesen Pflanzen nach 1-5 Tagen erste

Nekrosen. Das Symptom der hängenden Blätter zu Beginn des Versuches blieb jedoch weitgehend reversibel. Dies zeigte sich auch bei Pflanzen, welche nur zwei Injektionen erhielten. Die Injektionen wurden am dritten Blatt (von den Wurzeln aus gezählt) gesetzt. Die Nekrosen, die nach wenigen Tagen entstanden sind in Abbildung 9 D und E zu sehen.

## **3.2 Polyketidsynthase-Deletionsmutanten von *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum***

### 3.2.1 Herstellung von Deletionsmutanten

#### 3.2.1.1 Molekularbiologische Manipulation von *Phaeoconiella chlamydospora*

Im Jahr 2009 konnte die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation der Pilze *Pm. chlamydospora* und *Pa. aleophilum* zur genetischen Manipulation des filamentösen Ascomyceten etabliert werden (Fischer, 2010). Mit diesem Ansatz können nicht nur die beiden Esca-assoziierten Pilze sondern auch viele andere Pilze genetisch manipuliert werden, wie zum Beispiel der reispfadogene Pilz *Magnaporthe oryzae* (Odenbach *et al.*, 2009).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Sekundärmetaboliten bei der Ausbildung der Esca Krankheitssymptome an Weinpflanzen untersucht. Da bereits vor einigen Jahren postuliert wurde, dass besonders Scytalon und Isoscleron, zwei Intermediate aus der Melaninbiosynthese für die Esca Symptome an den Blättern befallener Rebstöcke verantwortlich sind (Evidente *et al.*, 2000), wurde während dieser Arbeit versucht die Produktion dieser Substanzen durch den Pilz zu verhindern. Hierfür sollten einzelne Polyketidsynthasegene in *Pm* und *Pa* inaktiviert werden. Mit Hilfe dieser Mutanten sollten im Anschluss *in vivo* an *Vitis vinifera* weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Sollten die Mutanten, welche keine Scytalon bzw. Isoscleron produzieren können immer noch Blattsymptome hervorrufen, müssten weitere Faktoren der Pilz-Pflanzen-Interaktion identifiziert werden.

Mit Hilfe der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation wurden die Gensequenzen für das grüne, gelbe, rote und blaue Fluoreszenzgen in das Genom der Pilze integriert. So konnten im Zuge dieser Arbeit Fluoreszenzaufnahmen gemacht werden, bei denen ein Schnitt durch mit Fluoreszenzmutanten infizierte Weinpflanzen aufgenommen wurde.

Im weiteren Verlauf werden Ergebnisse zu den *in vivo* Pflanzentests mit  $\Delta$ PKS2-Mutante gezeigt. Die Mutanten wurden von Elisabeth Grundmann, Sabine Schwarz und Lena Licht generiert (Grundmann, 2012; Schwarz, 2012; Licht 2012).

Zu Beginn der Arbeiten lagen noch keine Genomsequenzen von *Pm. chlamydospora* und *Pa. aleophilum* vor. Deshalb mussten alle Gensequenzen der einzelnen Polyketidsynthasen, die für die Inaktivierung der Gene benötigt wurden, mittels *Primer-walking* nach Zhang und Gurr (2010) isoliert werden.

Im ersten Schritt zur Identifizierung der Nukleotidsequenz der PKS aus *Pm. chlamydospora* wurden degenerierten Primer erstellt. Diese basieren auf dem Vergleich der konservierten Aminosäuresequenz der Ketosynthasedomäne (bzw. Acetyltransferasedomäne) verschiedener Pilze, die mit *Pm* und *Pa* verwandt sind und die bereits sequenziert wurden (Khaldi *et al.*, 2008). Die Pilze, deren Gensequenzen zum Erstellen der degenerierten Primer verwendet wurden, waren *Botryotinia fuckeliana*, *Aspergillus nidulans*, *Neonectria radicularis*, *Fusarium circinatum*, *Neurospora crassa*, *Sordaria macrospora*, *Glomerella cingulata* und *Colletotrichum graminicola*.

Die Primer wurden so erstellt, dass mit ihnen hochkonservierte Bereiche amplifiziert werden können. Bei Polyketidsynthasen sind einige Komponenten obligatorisch und zeigen dadurch nur eine geringe genetische Varianz. Zwei dieser Domänen sind die  $\alpha$ -Ketoacylsynthase bzw. die Acyltransferase.

Um die Polyketidsynthasesequenz 1 zu isolieren, wurde mit Hilfe der oben genannten Primer eine PCR *Step up*-Methode angewandt (Zhang und Gurr, 2010). Die isolierten Sequenzen waren ca. 350 bis 460 bp lang. Um anschließend eine Deletionsmutante zu generieren, wurden neue Primer auf Grundlage der ersten Gensequenzen erstellt. Mit Hilfe des sogenannten '*Primer walkings*' nach Zhang und Gurr (2000) wurden diese kurzen Gensequenzen verlängert. Am Ende konnten so für die PKS Gene 1 und 2 PCR-Produkte der Länge 1600 bp bis 1700 bp aus der genomischen DNA amplifiziert und sequenziert werden. Bei *Pm. chlamydospora* handelte es sich um ein 1609 bp großes Stück einer PKS. Bei *Pa. aleophilum* wurde mit den gleichen degenerierten Primern und unter Anwendung der gleichen Methoden ein 1581 bp großes Fragment eines PKS-Gens beschrieben (Bürckert, 2011).

Die so erhaltenen Genfragmente wurden durch das Einfügen eines bakteriellen Hygromycin-Phosphotransferase-(hpt)-Genes (Staben *et al.*, 1989) unterbrochen. Dieses Gen wurde zusammen mit einem Tryptophan-Biosynthese Promotor zu einer Genkassette zusammengefasst und gehört zu den Standardantibiotikaresistenzen (Hamer und Timberlake, 1987). Es zeigte sich, dass diese Genkassette auch bei den Esca-assoziierten Pilzen *Pm* und *Pa* eingesetzt werden kann. Der *trpC*-Promotor aus *Aspergillus nidulans* (Kalleda *et al.*, 2013) kann auch von den beiden genannten Pilzen genutzt werden, da eine Hygromycin-Resistenz bis zu 400 mg/L bei den hier durchgeführten Transformationsversuchen beobachtet wurde.

Der Nachweis, der erfolgreichen Insertion der rekombinanten Nukleinsäuren erfolgte mittels PCR und *Southern Blot*. Um eine Inaktivierung des PKS-Gens oder einen ektopischen Einbau der Gensequenz

und der Hygromycinkassette zu unterscheiden, wurde die isolierte genomische DNA mittels Restriktionsenzymen geschnitten und danach für den *Southern Blot* gelelektrophoretisch aufgetrennt. So konnten die Bandengrößen des nativen Gens und des integrierten Deletionsfragments unterschieden werden. Die Restriktion erfolgte mit Hilfe der Enzyme *PvuII*, *KpnI* und *SacII*. Das Hybridisierungssignal bei den Insertionsmutanten war um 1191 bp größer als jenes des Wildtyps.

Es konnte bei jedem Transformationsansatz ca. 200 Hygromycin B-resistente Transformanten pro  $1 \times 10^6$  Sporen von *Pm. chlamyospora* erzeugt werden. Eine erfolgreiche Rekombination in etwa 9-15 Prozent der generierten Mutanten wurde durch eine *Southern Blot* Analyse bestätigt. Im Folgenden wurde mit den PKS1 Mutanten 2, 6 und 15 weitergearbeitet.

Bei der zweiten Polyketidsynthesesequenz, die isoliert werden konnte, wurde nun analog als PKS2 bezeichnet. Auch um diese Gensequenz zu amplifizieren wurde zuerst mittels degenerierten Primern ein hoch konservierten Bereich einer PKS amplifiziert. Anschließend erfolgte das oben genannte 'Primer walking' gefolgt von der Insertion der HPT-Kassette. Das korrekte Hybridisierungssignal beim *Southern Blot* sollte bei 2923 bp liegen. Diese Bedingung erfüllten die Transformanten  $\Delta$ PKS2 8 und 11. Nur vier Prozent der Transformanten zeigten kein Hybridisierungssignal der Größe von 1609 bp, welches auf eine ektopische Integration hindeutet. Es entstanden ca. 120 Hygromycin B resistente Transformanten pro  $1 \times 10^6$  Sporen von *Pm. chlamyospora*.

### 3.2.1.2 Molekularbiologische Manipulation von *Phaeoacremonium aleophilum*

Auch bei *Pa. aleophilum* wurden Insertionsmutanten von Polyketidsynthese-Genen generiert. In einigen pflanzenpathogenen Pilzen spielen PKS beim Infektionsverlauf eine entscheidende Rolle (Elliott *et al.*, 2013; Díaz-Sánchez *et al.*, 2012). Die Substanzen Scytalon und Isoscleron, die auch aus den beiden Esca assoziierten Pilzen Pm und Pa isoliert werden konnten sind Intermediate der Melaninbiosynthese. Aus diesem Grund wurde die PKS als essentielles Enzyme der Melaninbiosynthese ausgewählt. Durch Transformation des Integrationsvektors pCAMB\_wPKS\_ko mittels *Agrobacterium tumefaciens* Transformation wurden die Mutanten von Pa generiert (Bürckert, 2012). Die Vektoren für die Transformation von Pa wurden analog zu jenen von Pm erstellt. Die Transformanten wurden ebenfalls mittels PCR und *Southern Blot* analysiert. Auf der Membran wurde mittels der DNA Sonde das erwartete restringierte genomische DNA-Fragment der Transformanten 2, 6, 8, 17, von 4650 bp markiert. Es wurden die Transformanten 2, 6 und 8 für die weiteren Versuche ausgewählt. Die Effizienz der Transformationen lag bei ca. 30 Prozent korrekter Integrationen bei den hygromycinresistenten Transformanten (280 Transformanten bei  $1 \times 10^6$  Sporen). Die Restriktion

erfolgte mit Enzyme *EcoRI*, das zu erwartenden Fragment hat eine Größe von 2028 bp. 60 Prozent der Transformanten zeigten, ein zusätzliches Fragment von ca. 2700 bp.

### 3.2.2 Fermentationscharakterisierung und Stresstests

Um die Unterschiede in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten nach der gelungenen Inaktivierung von PKS2 zu untersuchen, wurden die oben beschriebenen Mutanten und die Wildtyp-Stämme in 500 ml BAF-Medium (**M6**) fermentiert und analysiert. Die Kulturbrühen der  $\Delta$ PKS2-Mutanten von Pm und Pa ist nach fünf Tagen Fermentation im Vergleich zum Wildtyp deutlich heller. Die Mutanten, allen voran die Mutanten 15 bei Pm und die Mutanten 6 und 8 bei Pa bilden weißes Myzel. Dies spricht bereits für eine reduzierte oder gar gestörte Melaninbiosynthese.

Weiter wurden die Extrakte von Myzel und Kulturfiltrat mittels HPLC analysiert. Die Chromatogramme der Fermentationsansätze wurden auf die Quantität phytotoxischer Sekundärmetabolite untersucht. Es wurden die Substanzen Scytalon und Isoscleron quantifiziert. Wie zu erwarten war produzierten die  $\Delta$ PKS2-Mutanten von Pm 2 und 6 eine deutlich geringere Menge an Scytalon und Isoscleron nur die Mutante 15 zeigte sogar eine leichte Produktionssteigerung (**Tab.9**). In *Pa. aleophilum* zeigten alle drei Mutanten eine Reduktion im Sekundärstoffwechsel, wobei Mutante 2 eine ähnliche Produktionsrate im Vergleich zum Wildtyp-Stamm aufweist. Anhand der Chromatogramme der jeweiligen HPLC Läufe lies sich bei den Pm Mutanten 2 und 6 sowie bei den Pa Mutanten 2, 6 und 8 eine reduzierte Metabolitenproduktion nachweisen. Allen Transformanten hatten eine geringere Substanzkonzentration als die Wildtyp-Stämme. Dieser Effekt führte bei den jeweiligen Mutanten Nummer 6 zu einer Reduktion der Sekundärmetabolitproduktion um 52 Prozent (Pm) bzw. 58 Prozent (Pa).

**Tab.9:** Sekundärmetabolitproduktion der ausgewählten Transformanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Stamm (WT immer = 100%)

Transformante	<i>Pm. chlamydospora</i> $\Delta$ PKS			<i>Pa. aleophilum</i> $\Delta$ PKS		
	2	6	15	2	6	8
Scytalone	57,03	37,77	110,44	95,89	50,75	62,93
Isosclerone	35,46	43,40	100,83	72,51	36,82	37,92

In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die  $\Delta$ PKS-Transformanten und die Wildtyp-Stämme erneut in BAF-Medium (**M6**) fermentiert. Nach 3 Tagen in 250 mL Medium in 500 mL Kolben mit einer Schikane konnte bereits ein höheres Myzeltrockengewicht der Wildtypen beobachtet werden. Außerdem war zu diesem Zeitpunkt der Gehalt an freier Glukose im Medium der Transformanten höher. Zusätzlich verfärbte sich das Medium der Wildtypstämme gelblich. Am vierten Fermentationstag konnte bei der



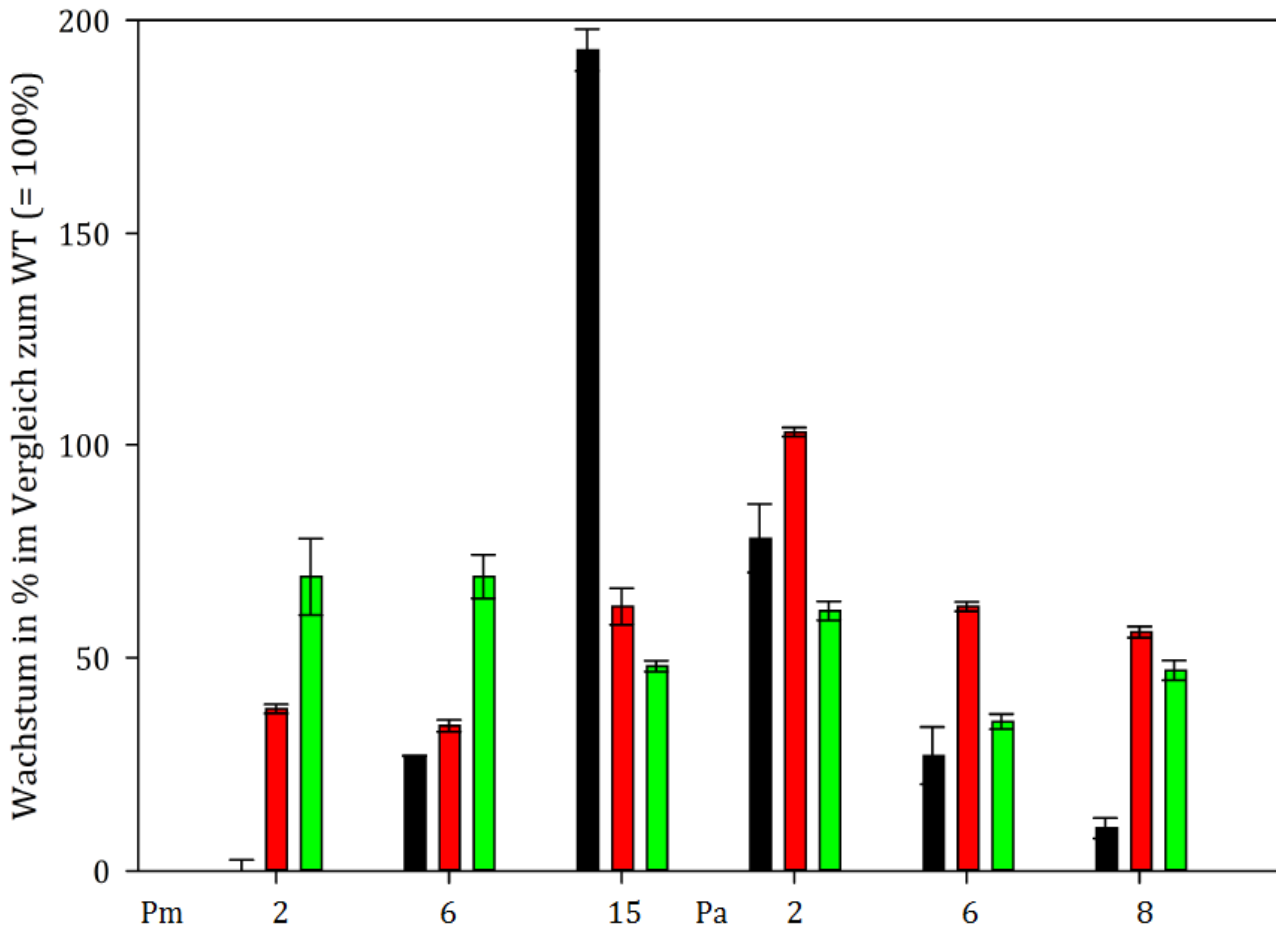
Transformanten 2 (Pa) ein höheres Myzeltrockengewicht im Vergleich zu den beiden anderen Mutanten gemessen werden.

Zusätzlich wurden die Rohextrakte mittels HPLC in 24-Loch-Platten chromatographisch aufgetrennt und analysiert (Kapitel 2.4.4). Die Extrakte aller Mutanten zeigten veränderte Maxima in den Chromatogrammen im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch waren auch signifikante Unterschiede zwischen der Mutante 2 einerseits und den Mutanten 6 und 15 andererseits zu beobachten.

Besonders auffällig war die Ansammlung polarer Sekundärmetaboliten in den Kulturen von der Transformanten. Die Fraktionen wurden im Anschluss im Phytotoxizitätstest untersucht. So konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Extrakten beobachtet werden. Die Transformanten produzierten im Vergleich zum Wildtyp deutlich weniger phytotoxisch-aktive Substanzen. Die phytotoxischen Substanzen in den HPLC-Fraktionen 12 und 13 (d.h. in den Fraktionen nach 12 und 13 Minuten der Chromatographie) wurden jedoch nach wie vor vom Wildtyp und den Transformanten produziert. Weiter produzierte die Mutante 2 von *Pm*, anders als die übrigen Transformanten bisher noch nicht detektierte Substanzen in der Fraktion 21, die Transformante 6 sekretierte ausschließlich die aktiven Substanzen in den Fraktionen 12 und 13 und die Mutante 15 produzierte zusätzlich aktive Substanzen in Fraktion 4 und 6, welche vom Wildtyp nicht produziert wurden. Diese Ergebnisse zeigten sich in allen drei durchgeführten Fermentationen (Licht, 2012).

Zusätzlich zur Untersuchung des Metabolitenspektrums wurden Stresstests mit den oben genannten Transformanten durchgeführt. Bei drei verschiedenen Temperaturen (18, 26 und 32 °C) wurden drei unterschiedliche Chemikalien in Minimal-Medium (**M13**) eingegossen (0,5 M, 1,0 M und 2,0 M NaCl; 0,5 M, 1,0 M und 1,5 M Sorbitol; 0,1 M, 0,5 M und 1,0 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Natriumchlorid wurde eingesetzt um Trockenstress zu simulieren, während es mit Hilfe von Sorbitol möglich ist, den osmotischen Schock ähnlich den Bedingungen in der infizierten Pflanze nachzuahmen. Durch den Einsatz von Wasserstoffperoxid lässt sich eine Ausschüttung von ROS, 'reactive oxygen species' als oxidativer Stress, den die Pflanze zur Verteidigung einsetzt, darstellen (Daudi *et al.*, 2012). Es wurden alle Kombinationen der jeweiligen Mutanten, Medien und Temperaturen in Triplikaten durchgeführt. Zusätzlich wurde der Versuch dreimal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 zusammengefasst. Die einzelnen Mutanten verhalten sich recht unterschiedlich. Während die Transformanten 2 und 6 von *Pm. chlamyospora* eine Steigerung des Wachstums mit ansteigender Temperatur zeigten, aber dabei immer hinter dem Wildtyp-Stamm zurück blieben, wuchs die Mutante 15 am schnellsten bei 18 °C und wächst schlechter bei höheren Temperaturen. Die Teststämme von *Pa. aleophilum* zeigten alle bei 26 °C ihre Wachstumsoptimum. Dies entspricht den Erwartungen, denn

der Pa Wildtyp-Stamm wuchs ebenfalls bei 26 °C am schnellsten. Bei den Mutanten ist Pa  $\Delta PKS1$  2 die am schnellsten wachsende, während Pa  $\Delta PKS1$  6 und 8 um bis zu 50 Prozent langsamer im Vergleich zum Wildtyp, wachsen.



**Abb.10:** Wachstum der Transformanten Pa  $\Delta PKS1$  und Pm  $\Delta PKS1$  unter Stressbedingungen, Aufgetragen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (= 100 %), schwarz bei 18 °C, rot bei 26 °C und grün bei 32 °C, (Fehlerbalken als Mittel n=9)

Da die Produkte, die von Polyketidsynthasen synthetisiert werden, auch bei der Zellwandintegrität eine Rolle spielen, wurden noch andere Versuche mit Chemikalien durchgeführt. So wurde zum Beispiel Nitratstress mittels  $\text{NaNO}_3$  erzeugt oder durch den Einsatz von Algendünger mit hohen Phosphat und Kalisalzteilen Stress hervorgerufen. So sollte der Nährstoffstress, wie er nach extremem Düngen in der Pflanze auftritt simuliert werden. Zusätzlich wurde SDS eingesetzt, um die Zellwandintegrität zu überprüfen. Allerdings konnten bei diesen Versuchen keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zwischen dem Wildtyp-Stamm und den Mutanten beobachtet werden (Grundmann, 2012).

### 3.2.3 Weinpflanzeninfektionsstudie

Für die Weinpflanzeninfektionsstudie wurden im Gewächshaus (DLR Neustadt an der Weinstraße, Arbeitsgruppe um Herrn Dr. A. Kortekamp) die Sporen von je drei Integrationsmutanten, die jeweiligen Wildtyp-Stämme und zwei fluoreszenzmarkierte Stämme von Pm und Pa auf Weinpflanzen aufgesprüht. Zusätzlich wurden Weinpflanzen zur Kontrolle mit Wasser besprüht (siehe Kapitel 2.5.1.2 Pflanzensprühtest). Nach drei Monaten wurden die Pflanzen aus dem Gewächshaus entnommen und eine Endophytenisolation durchgeführt. Auf diesem Wege konnte die Infektionsrate der einzelnen Pilze bestimmt werden. Zusätzlich wurde der Habitus der untersuchten Pflanzen dokumentiert. Die Kontrollen, welche aus Pflanzen bestanden, die mit fluoreszenzmarkierten Pilzen infiziert wurden, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Alle isolierten Pilze wurden im Anschluss mikroskopisch bestimmt und zusätzlich fermentiert. Nach der Fermentation wurde aus allen Endophyten genomische DNA isoliert und eine Kontroll-PCR durchgeführt. Hierzu wurden Primer verwendet, die zum einen an der eingebauten Hygromycin-Kassette und zum anderen an der teildeletierten PKS binden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Bei Pa zeigte sich kein Wachstum beim Wildtyp-Stamm, während die Fluoreszenzmutante reisoliert werden konnte. Der Nachweis erfolgte durch die zu beobachtende blaue Fluoreszenz. Es konnten jedoch auch aus allen angesetzten Pflanzen, die mit den drei Mutanten infiziert worden waren, die jeweiligen Insertionsmutanten isoliert werden. Der Nachweis sowohl morphologisch als auch per PCR waren positiv. Zusätzlich wurden aus den meisten Pflanzen weitere Endophyten isoliert.

Im Fall von Pm konnte keine Fluoreszenzmutante aus der Pflanze isoliert werden. Auch bei der Auswertung durch direkte Schnittpräparate der Pflanze konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden. Jedoch konnte der Wildtyp-Stamm aus der Kontrolle isoliert werden. Bei den Insertionsmutanten konnte lediglich Mutante 2 nicht reisoliert werden. Nach mehrmaliger Isolation und optischer Überprüfung sowie PCR-Kontrolle zeigte sich, dass diese Mutante nicht aus den Pflanzen isoliert werden konnte. Die Mutanten 6 und 15 wurden jedoch wie der Wildtyp reisoliert und in der Pflanze nachgewiesen. Auch bei Pm wurden zusätzliche Endophyten isoliert, die teilweise bei den verschiedenen Pflanzen übereinstimmten.

Alle Pflanzen, welche mit Pm (Wildtyp-Stamm) sowie mit Pm Mutanten infiziert worden waren zeigten nach drei Monaten starke Chlorosen, während die Pflanze, nach der Pa Wildtyp-Infektion keine Symptome aufwies. Dies lässt sich im Nachhinein dadurch erklären, dass der Wildtyp-Stamm die Pflanze nicht infiziert hatte. Diese Beobachtung wurde ebenfalls bei der Mutante 2 (Pm) gemacht, auch hier blieben die Pflanzen ohne Symptome.

**Tab.10:** Ergebnisse der Weinpflanzeninfektionsstudie (Iso.: Isolate, EG: E. Grundmann (2012), LL: L. Licht (2012), Fluoreszenz: Beobachtung, die mittels des Fluoreszenzmikroskops gemacht wurde, + Fluoreszenz, - keine Fluoreszenz; PCR: + die PCR Kontrolle mit den verwendeten HPT-Primern zeigte ein Amplifikat, - kein Amplifikat; Nr. Anzahl der Pilze, die aus einer Pflanze isoliert werden konnte)

Stamm (Pm, Pa)	Isolation	Nr.	Kontrolle (PCR)	Fluoreszenz
Kontrolle	3 Pilze, 2 Hefen, keine Pm/Pa	1	-	-
		2	-	-
		3	-	-
Pa Cyan	2 Pilze, einer Pa	1	+	+
		2	-	-
Pa WT	kein Wachstum			
Pa $\Delta$ PKS2 2(EG)	5 Pilze, 5 Isolate (Iso.) von Pa	1	+	
		2	-	
		3	+	
		4	-	
		5	-	
Pa $\Delta$ PKS2 6(EG)	2 Hefen, 2 Pilze, 2 Iso. von Pa	1	+	
		2	+	
Pa $\Delta$ PKS2 8(EG)	5 Pilze, 5 Iso. Von Pa	1	-	
		2	+	
		3	+	
		4	+	
		5	+	
Pm GFP	kein Wachstum			
Pm WT	1 Pilz	1	-	
Pm $\Delta$ PKS2 2(LL)	2 Pilze, 2 Iso. Von Pm	1	-	
		2	-	
Pm $\Delta$ PKS2 6(LL)	3 Pilze, 3 Iso. Von Pm	1	-	
		2	+	
		3	-	
Pm $\Delta$ PKS2 15(LL)	2 Hefen, 4 Pilze, 4 Iso. Von Pm	1	-	
		2	+	
		3	-	
		4	+	

In der Tabelle **10** sind die Ergebnisse der Weinpflanzeninfektionsstudie zusammengefasst. Mittels der Kontroll-PCR wurde mit spezifischen Primern die HPT-Kassette, welche im Genom der Mutanten integriert ist, amplifiziert. So zeigen die + Zeichen ein Amplifikat auf dem Agarosegel an. Zusätzlich wurden die Fluoreszenzmutanten mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierbei konnte die Cyan-Fluoreszenz der Pa-Mutante beobachtet werden.

### 3.3 Interaktionsstudien

Um die Interaktionen der einzelnen Esca-assoziierten Pilze zueinander besser untersuchen zu können wurden Ansätze auf Agarplatten gewählt, um die gegenseitige Wechselwirkung zu beobachten. Alle vier Esca Pilze wurden jeweils zu zweit auf eine Agarplatte überführt und so lange beobachtet bis entweder eine gegenseitige Hemmung eintrat oder die Pilze zueinander gewachsen waren. Die

Versuche wurden auf Weinblatt-Medium (**M22**), MM (**M13**) und HMG (**M10**) sowie den entsprechenden Sorbitolvarianten (1 M und 2 M) bei 18 °C, 26 °C und 30 °C durchgeführt.

### ***Phaeomoniella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum***

Generell wuchsen die beiden Pilze Pm und Pa sehr gleichmäßig und radial (**Abb.11A**). Allerdings zeigten beide Pilze bei der niedrigsten Temperatur (18 °C) auf Medien mit 2 M Sorbitolgehalt kein Wachstum. Bei 26 °C auf HMG Platten kam es jedoch nach ca. zwei Wochen zu einem Wachstumsstopp beider Pilze und im Medium zeigten sich halbkreisförmige Ablagerungen (**Abb.11F**). Eine Temperaturänderung hin zu höheren Inkubationstemperaturen veränderte nur generelle die Wachstumsgeschwindigkeit. Beispielsweise benötigte eine Auswertung bei 18 °C ca. zwei bis drei Monate, da die Pilze bei dieser niedrigen Temperatur nur sehr langsam wuchsen.

Unter, durch Sorbitol erzeugtem, osmotischen Stress kam es zu auffälligen Veränderungen im Interaktionstest. Bei 18 °C und 1 M Sorbitol in der HMG-Agarplatte wurde Pm von Pa gehemmt, Pa wuchs schneller auf dem Stressmedium. Bei weiterer Erhöhung der Sorbitolkonzentration, wuchsen beide Pilze nicht mehr auf den Platten an.

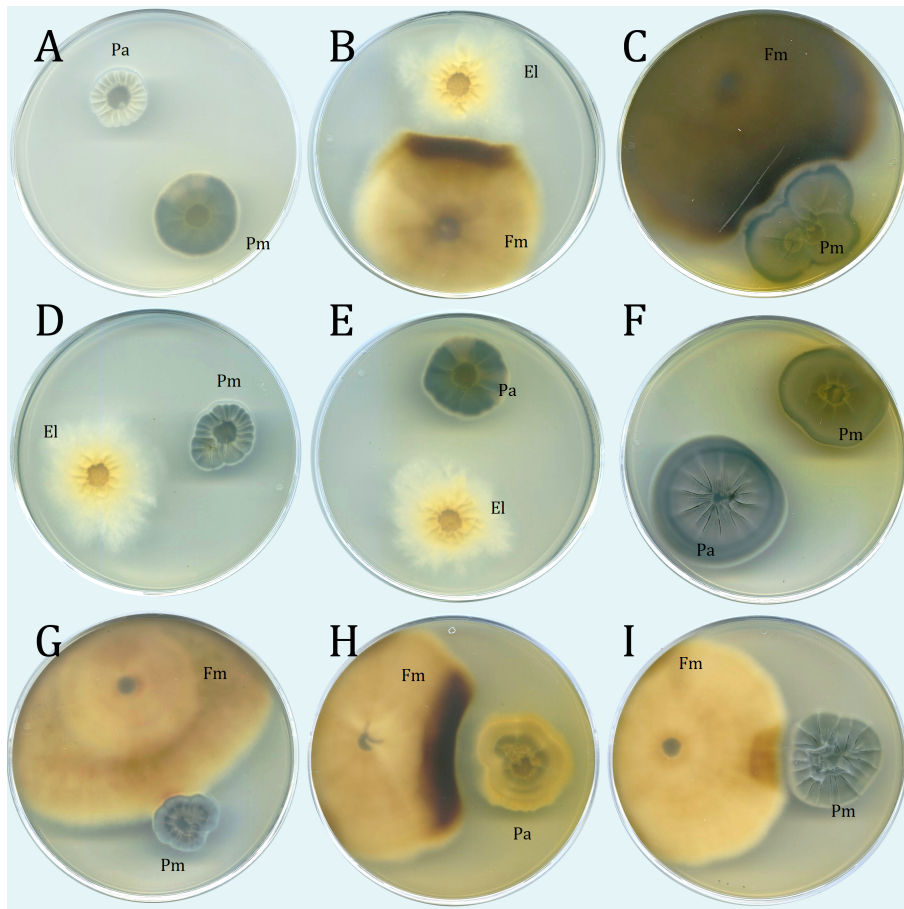
Bei 26 bzw. 30 °C auf 2 M Sorbitol HMG-Medium (**M10**) inhibierten sich die Pilze hingegen nicht mehr gegenseitig, sondern wuchsen unbeeinflusst aufeinander zu. Bei Verwendung von Minimalmedien (**M13**) blieb dieser Effekt aus, die Pilze hemmten sich gegenseitig (s.o.).

### ***Phaeomoniella chlamydospora* und *Fomitiporia mediterranea***

Hier wurden die gleichen Beobachtungen gemacht wie zwischen Pa und Fm. Fm wird auf fast allen Platten durch Pa gehemmt und erwies sich bei den Stresstestplatten als wesentlich sensitiver (**Abb.11C** und **G**).

### ***Phaeomoniella chlamydospora* und *Eutypa lata***

Auch bei diesen Ansätzen zeigte El erneut den Trend besonders bei steigender Temperatur das Wachstum einzustellen. Dadurch wurde sein Einfluss auf Pm bei hohen Temperatur und steigendem Salzstress immer geringer. Bei 30 °C starb El sowohl auf MM als auch HMG Platten ab. Bei der Koinkubation zeigten sich keine besonderen Myzelverfärbungen. Auffällig war jedoch, dass im Gegensatz zu den Tests mit Fm, die beiden Pilze Pa und Pm, wenn sie gegen El wachsen Unterschiede zeigen. Pm und El wuchsen bei 30 °C und hohem Sorbitolstress nicht mehr, während Pa und El diese Platte zusammen besiedeln konnten. Pm hemmte El auf Minimalmedien mit und ohne Sorbitol jeweils stärker als dies bei Pa der Fall war. Die Ausprägung des Hemmhofes war deutlicher zu erkennen und trat schon nach sechs Tagen in Erscheinung (**Abb.11D**).



**Abb.11:** Aufnahmen zur Interaktionsstudie der Esca-assoziierten Pilze Pm, Pa Fm El, A: Pm, Pa (**M13**, kein Sorbitol); B: El, Fm; C: Fm, Pm; D: Pm, El; E: Pa, El; F: Pm, Pa (**M13**, 1 M Sorbitol); G: Fm, Pm (**M13**, 1 M Sorbitol); H: Fm, Pa; I: Fm, Pm (**M13**, 26 °C)

### ***Phaeocremonium aleophilum* und *Fomitiporia mediterranea***

Generell war Pa bei allen Versuchsansätzen in der Lage Fm im Wachstum zu hemmen. Auch diese beiden Pilze wuchsen bei 18 °C am langsamsten und steigerten die Wachstumsgeschwindigkeit mit der steigenden Temperatur. Bei osmotischem Stress von 2 M Sorbitol war auch hier kein Wachstum der Pilze mehr zu beobachten. Auf HMG-Medium verfärbte sich das Myzel von Fm in der Gegenwart von Pa an der Unterseite auffällig braun, grundsätzlich aber nur auf der Interaktionsseite (**Abb.11H**). Diese Verfärbung zeigte sich bei der gesamte Kolonie von Fm unter Sorbitolstress (1 M). Auf Minimal-Medium ist diese Verfärbung nicht zu beobachten. Bei 30 °C wuchs Fm zusätzlich sehr langsam. Dieser Effekt wurde bei Stressbedingungen weiter verstärkt.

### ***Phaeocremonium aleophilum* und *Eutypa lata***

Wenn eine Agarplatte mit El und Pa inokuliert wurden, wurde El durch Pa am Wachstum gehindert, es bildete sich ein Hemmhof. Außerdem zeigte sich El sehr empfindlich bei höheren Temperaturen und

bei osmotischem Stress. Bei 30 °C kam es zu keinem Myzelwachstum von El. Bei niedrigen Temperaturen bildet Pa im Medium ein braunes Pigment, das schon bei Fm beobachtet werden konnte (**Abb.11E**). Eine Myzelfärbung konnte auch hier bei Minimal-Medium nicht beobachtet werden.

### ***Fomitiporia mediterranea* und *Eutypa lata***

Da die beiden Pilze Fm und El sehr unterschiedlich auf die unterschiedlichen Bedingungen, d.h. den Temperaturanstieg und die veränderte Osmolarität der Mediums reagieren, sind die Ergebnisse der einzelnen Platten sehr unterschiedlich und uneinheitlich ausgefallen. El wurde bei niedrigeren Temperaturen von Fm im Wachstum behindert. Lediglich auf 1 M Sorbitolmedium konnte sich El durchsetzen. Osmotischer Stress durch 1 M Sorbitol in Minimal-Medium beeinträchtigte erstaunlicherweise das Wachstum von El bei 30 °C nicht, während dies ohne Sorbitol nicht zu beobachten war. Wenn Fm im Wachstum gehemmt wurde, konnten wieder die bereits erwähnten Verfärbungen des Mediums beobachtet werden (**Abb.11B**).

Es zeigte sich bei diesem Versuchen, dass die vier Esca-assoziierten Pilze sehr unterschiedlich auf einander reagieren und, dass sich die Zusammensetzung der Pilze in der Pflanze möglicherweise durch die Außentemperatur und den osmotischen Stress verändert. Alle vier Pilze haben ein anderes Temperaturoptimum für das Wachstum. Dies könnte eine besondere Rolle spielen, da die Esca-Symptome besonders im Sommer und bei starker Trockenheit auftreten (Bürckert, 2012, Magnin-Robert *et al.*, 2011; Lecomte *et al.*, 2012). Die Ergebnisse dieses Teilprojekts sind, dass sich die Zusammensetzung der Pathogene in der Pflanze abhängig von den abiotischen Einflüssen verändert könnte. Somit sind die trachiomykotischen Pilze Pm und Pa besonders unter hohen Temperaturen und unter erhöhter Osmolarität in der Pflanze im Vorteil gegenüber den anderen Esca-assoziierten Erregern. Dieser Veränderung des Pathogenspektrums könnte für die Entwicklung etwaiger Krankheitssymptome von entscheidender Bedeutung sein.

## **3.4 Fluoreszenzmarkierte Esca-assoziierte Pilze und in planta-Versuche**

### **3.4.1 Erstellung einer fluoreszenzmarkierten Mutante von *Fomitiporia mediterranea***

Die fluoreszenzmarkierten Mutanten von *Pm. chlamydospora*, *Pa. aleophilum* und *E. lata*, die in einige Untersuchungen Verwendung fanden, wurden bereits in einer früheren Arbeit hergestellt (Fischer, 2010). Ein Ziel dieser Arbeit war die Herstellung einer fluoreszenzmarkierte Mutante von *F. mediterranea*. Die Vektoren, die für die Transformation von Pm und Pa mittels *A. tumefaciens* genutzt wurden, entstanden auf der Grundlage eines *M. oryzae* Vektors. Hier kamen der Promotor des Elongationsfaktors  $\alpha$  aus *M. oryzae* und der *trpC* Promotor aus *Aspergillus nidulans* zum Einsatz. Der

trpC Promotor ist in die HPT-Kassette vor der Sequenz der Hygromycin Phosphat Transferase ligiert worden, während der Promotor des Elongationsfaktors  $\alpha$  für die Expression des Fluoreszenzfarbstoffes benötigt wurde. Diese beiden Promotoren können in Pm und Pa, als auch in El genutzt werden. Es gelang jedoch nicht unter Zuhilfenahme der Standard-Transformationsmethoden und angepasster Methoden Transformanten von Fm zu generieren. Es bildeten sich nach einiger Zeit auf den Hygromycin-Minimal-Medium-Agarplatten zwar neues Myzel von Fm, dieses war, nach der Überprüfungen durch PCR oder *Southern Blot* Analyse aber nicht transformiert (Fischer, 2010).

Nachdem die Genomsequenz von Fm (<http://genome.jgi.doe.gov/Fomme1/Fomme1.home.html>) 2012 zugänglich gemacht worden war, konnten die Promotoren (Elongationsfaktors  $\alpha$ , trpC Promotor) von *M. oryzae* und *A. nidulans* mit jenen von Fm verglichen werden. Die Sequenzen zeigten geringe Übereinstimmungen. Aus diesem Grund wurden die Promotoren mit Hilfe von Primern (Kapitel 2.1.8) aus dem Genom von Fm amplifiziert und mittels eingefügten Restriktionsschnittstellen in Vektorvorstufen (pJet1.2-blunt, pGEMT-easy) ligiert. Die weitere Klonierung, um die Promotoren in den bereits eingesetzten pCambia-Vector zu ligieren erfolgt nach Standardmethoden (Kapitel 2.2.2-2.2.4). Es war jedoch nicht möglich die beiden Genkassetten in den Transformationsvektor auf pCAMBIA3080-Basis einzubauen. Aus diesem Grund wurde auf das Klonierungssystem *InPhusion* von Clontech® Laboratories, Inc. (Takara Bio Company, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) zurückgegriffen. Damit war es möglich den Transformationsvektor pCAMB-EFA(Fm)-GFP-trpC(Fm)-HPT zu generieren. Mit diesem Vektor wurden *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformationen von Fm Myzel durchgeführt. Hierfür wurden 50 mg/L Hygromycin in Minimal-Medium eingesetzt. Außerdem wurden Protoplastentransformationen, mit PEG und linearisierter Vector-DNA durchgeführt (Kapitel 2.2.6.2 und 2.2.6.3).

Während der Transformationsversuche wurden neun potentielle Transformanten durch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation und vier durch Protoplasten-Transformation generiert. Diese möglichen Transformanten wurden isoliert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass das Myzel von Fm unter grünem Anregungslicht (395 nm) eine Eigenfluoreszenz besitzt. Bei einer Anregungswellenlänge von 458 nm zeigte sich keine Eigenfluoreszenz des Myzels mehr. Aus diesem Grund wurde der pCambia-Vektor mit dem der '*Cyan Fluorescence Protein*' Sequenz generiert. Hierzu wurde das *Gibson Assembly* der NEB GmbH verwendet.

Alle dreizehn möglichen Mutanten wurden auf neue Minimal-Medium-Agarplatten (**M13**) mit Hygromycin überführt. Es wuchs keines der Myzele erneut an. Das Myzel der Transformanten wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht, es zeigte sich keine Fluoreszenz mit der erwarteten

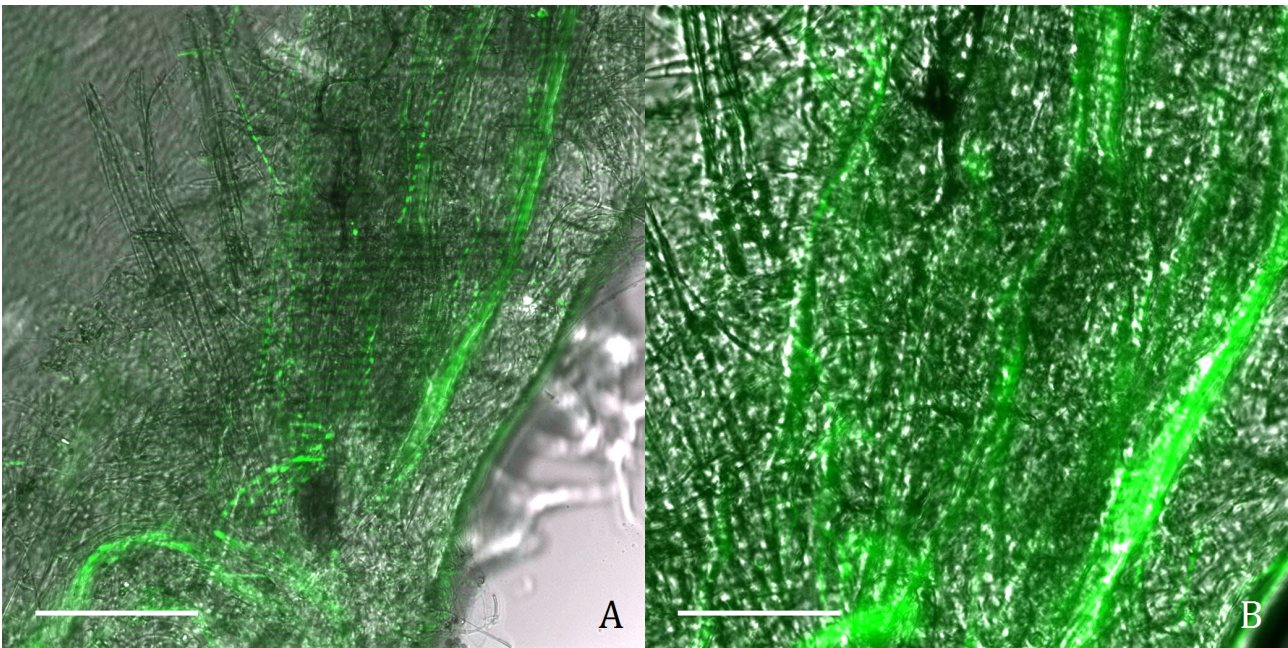


Emissionswellenlänge (489 nm). Auf Grund der oben erwähnten Eigenemission wurden die Transformanten zusätzlich, um etwaige Fehler auszuschließen zu können, in 50 mL HMG-Medium (**M10**) 26 Tage fermentiert und genomische DNA isoliert (Kapitel 2.2.2.3). Die gDNA wurde mittels *Southern Blot* und zweier Sonden, welche zum einen an die transformierte HPT-Kassette und zum anderen an die CFP-Sequenz binden würden, kontrolliert. Es zeigte sich, dass keine der gewachsenen Kulturen die DNA Sequenzen des CFP bzw. der HPT ins Genom integriert hatte. Es konnte bisher keine Mutanten mit Hilfe der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation und der Protoplastentransformation generiert werden. Auch das Einbringen der speziesspezifischen Promotoren führte bisher nicht zum gewünschten Erfolg. Der neu generierte Vektor kann nun aber für weitere Transformationsmethoden als Grundlage verwendet werden um eine genetische Manipulation von *F. mediterranea* zu ermöglichen. Zusätzlich muss hierfür aber auch die Funktionalität des generierten Vektors überprüft werden.

### 3.4.2 Charakterisierung der Esca-Fluoreszenzmutanten mittels

#### Weinpflanzenwachstumsversuchen und Fluoreszenzmikroskopie

Um zu untersuchen in welchem Bereich die, in Schnittwunden eingedrungenen Esca-assoziierten Pilze im Pflanzeninneren wachsen, wurden *V. vinifera* cv. 'Cabernet sauvignon' Pflanzen oberhalb des sechsten Blattes beschnitten und die Schnittwunde mit Sporen von Pm, Pa oder El benetzt. Die Schnittwunden wurden anschließend mit Parafilm bedeckt und dann die Pflanzen bei 26 °C 12 Wochen im Pflanzenbrutschrank zu inkubierten. Während dieser Zeit zeigten sich keine morphologischen Veränderungen an den Pflanzen. Acht der neun infizierten Pflanzen (je drei Pflanzen pro Pilz) trieben an der ersten Blattachsel unterhalb der Schnittwunde neu aus und der sekundäre Trieb überragte nach drei bis vier Wochen die Schnittwunde. Es wurden jedoch in den ersten drei Monaten des Wachstums keine Symptome der Esca-Krankheit beobachtet. Nach der Inkubationszeit wurden die Pflanzen 5 cm unterhalb der Infektionsstelle erneut beschnitten. Es wurden mehrere 1 cm lange Stücke des Triebes mit einem Skalpell entnommen und in der Mitte zerteilt. Von den beiden Hälften wurden im Anschluss Schnittpräparate angefertigt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops analysiert. In Abbildung 12 sind exemplarisch zwei Aufnahmen eines Schnittes zu sehen. Bei der Aufsicht im Bildteil A sind die Myzelfäden von Pm zu erkennen. Sie fluoreszieren bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm mit der grünen Emission des cytosolisch vorhandenen *GF* Proteins. Es ist außerdem zu erkennen, dass sich das Myzel entlang der Leitungsbahnen der Pflanze ausbreitet, einzelne Pflanzenfasern sind im linken oberen Bildteil zu sehen.



**Abb.12:** Schnittpräparat durch einen mit *Pm. chlamydospora* (GFP-Transformante) infizierten Weinrebenspross (A: Maßstab 100 µm; B: Maßstab 50 µm)

In allen drei mit Pm-Sporen infizierten Pflanzen konnte dieses fluoreszierende Myzel beobachtet werden. Auch bei Pa zeigten alle Schnitte die charakteristische Emission. Auch bei diesem Pilz breitete sich das Myzel entlang der Leitungsbahnen der Pflanze aus und der Pilz drang innerhalb von drei Monaten 10 cm in die Pflanze ein. Bei Pm konnte 7 cm unterhalb der Infektionsstelle keine Fluoreszenz mehr beobachtet werden. Die Pflanzen, die mit El infiziert worden waren, zeigten kein einheitliches Bild. Bei zwei der Pflanzen konnte Fluoreszenz beobachtet werden, bei der dritten Pflanze konnte der Pilz nicht eindringen. Bei einer Pflanze konnte anhand des Fluoreszenzsignals das Wachstum des Pilzes nur im oberen Zentimeter direkt unterhalb der Infektionsstelle nachgewiesen werden. Eine der Pflanzen wurde möglicherweise nicht infiziert. Es konnte nach 12 Wochen keine Fluoreszenz festgestellt werden. Auch die Untersuchung der Schnittfläche blieb ohne Nachweis des *GF* Proteins. Da für jede Infektion die gleiche Sporensuspension verwendet wurde, kann ausgeschlossen werden, dass keine transformierten Zellen auf die Schnittwunde aufgebracht worden waren. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass Pm und Pa deutlich schneller in die Pflanze eindringen und eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit innerhalb der Pflanze besitzen. Das Myzel von El ist nur im äußeren Bereich des Sprosses und deutlich näher an der Infektionsstelle anzutreffen.

### 3.5 Auswahlverfahren für *Esca*-antagonistische Organismen

Im Antagonisten-Screening wurden verschiedene Pilze aus der Stammsammlung des IBWF gegen die vier *Esca*-assoziierten Pilze getestet. Es wurden Versuche mit *Trichoderma* spp., endophytischen Pilzen und Bakterienstämmen durchgeführt. Die Tests wurden in Flüssigmedium und auf Agarplatten durchgeführt. Die *Trichoderma*-Stämme wurden vor allem aufgrund der bereits in der Literatur vermerkten positiven Ergebnisse im ökologischen Weinbau analysiert (Di Marco und Osti, 2007; Pellegrini *et al.*, 2012).

#### 3.5.1 Identifikation und Untersuchung antagonistischer *Trichoderma* Stämmen

*Trichoderma* (Teleomorph: *Hypocrea*) ist eine Pilzgattung, deren Spezies in vielen Ökosystemen weltweit zu finden sind. Spezies dieser Gattung sind Bestandteile von mehr als 60 Prozent der registrierten Biofungizide, die global in der Landwirtschaft eingesetzt werden (Verma *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2012). Einige Stämme haben die Fähigkeit, das Ausmaß von Pflanzenkrankheiten durch die Hemmung der verursachenden pilzlichen Pflanzenpathogene zu reduzieren. Diese Stämme zeigen ihr hohes antagonistisches und mykoparasitisches Potential vor allem im Boden oder direkt auf den Pflanzenwurzeln. Sie zeichnen sich zusätzlich durch eine große Bandbreite bei der Wirkung gegen verschiedenste mykologische Krankheitserreger aus.

Um zu untersuchen, ob diese positiven Eigenschaften von Vertretern dieser Gattung auch im Weinbau gegen *Esca*-assoziierte Pilze eingesetzt werden können, wurden die IBWF-eigenen *Trichoderma*-Stämme in Antagonistentests gegen Pm, Pa, Fm und El getestet. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse dieses Tests zusammengefasst und es zeigte sich, dass die untersuchten Stämme ein sehr unterschiedliches Wirkspektrum haben. So waren einige Organismen (z.B. IBWF 008-91) nur gegen einen Pilz (in diesem Fall gegen Pm) aktiv und hemmten auf der Agarplatte dessen Wachstum, während andere (z.B. IBWF 211-05) gegen alle vier getesteten *Esca* Pilze erfolgreich einsetzbar waren. Die Tabelle zeigt außerdem, dass die untersuchten *Esca* Pilze sehr unterschiedlich auf die Koinkubation mit antagonistische Pilze reagieren. Während bei Pa nur fünf der 209 im Versuch eingesetzten *Trichoderma* spp. das Wachstum des Pathogens reduzieren oder verhindern konnten (2,3 %), waren bei Fm 23 Stämme aktiv (11,0 %). Es zeigte sich, dass Pm und Pa häufiger resistent gegen die Substanzen und Enzyme antagonistischer Pilze sind. Um zu untersuchen ob die Hemmhöfen gegen die *Esca*-assoziierten Pilze Pm und Pa auf die Wirkung von Sekundärmetaboliten beruhen wurde zusätzlich untersucht ob das häufig durch *Trichoderma* spp. produzierte Gliotoxin eine fungizide Wirkung auf diese beiden Pilze ausübt. Hier durchgeführte Tests zeigten, dass 20 µg Gliotoxin gerade bei Pm zu einer deutlichen Hemmung der Sporenkeimung beiträgt. Das vegetative

Wachstum reduzierte sich um ca. 60 Prozent. Dieser Effekt war bei Pa in abgeschwächter Form zu sehen. Es keimten nur 25 Prozent der Pilzsporen in den mit Gliotoxin versetzten Proben nicht aus.

Während der Agarplattentests wurden die *Trichoderma* spp. in mehr als 20 Prozent der Fälle von Pm und Pa im Wachstum gehemmt, waren nicht in der Lage diesen zu überwachsen und sind nicht für den biologischen Pflanzenschutz im Bereich der Esca-Krankheit geeignet. Bei Fm war dies nur bei zwei der getesteten Stämme der Fall, bei El in ca. fünf Prozent. Bei Fm und El konnten fast 40 Prozent der *Trichoderma* spp. die Esca-assoziierten Pilze überwachsen und das Myzel der Pathogene lysieren.

**Tab.11:** Liste der als positiv getesteten *Trichoderma* spp. Stämme (Stammsammlung IBWF)

<i>Trichoderma</i> Stamm	Esca Pilze	<i>Trichoderma</i> Stamm	Esca Pilze
211-05	Pm, Pa, Fm, El	364-96	Fm
034-05	Pm, Pa, Fm	079-98	Fm
042-85	Pm, Pa, Fm	205-98	Fm
259-05	Pm, Fm	161-99	Fm
305-86	Fm, El	205-99	Fm
101-92	Fm, El	177-04	Fm
141-94	Fm, El	369-04	Fm
345-95	Fm, El	036-07	Fm
008-91	Pm	211-10	Fm
100-92	Pm	113-84	El
032-05	Pm	209-87	El
161-99	Pa	008-91	El
172-82	Fm	046-91	El
110-84	Fm	283b-95	El
111-85	Fm	305-95	El
045-91	Fm	546-95	El
102-92	Fm	038-05	El
098-96	Fm	104-09	El

*Trichoderma* spp. z.B. die Stämme 259-05 und 211-05, wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen im *Vitis-shoot-Assay* erneut getestet um ihre Aktivität gegen die Esca-assoziierten Pilze direkt auf Schnittwunden zu untersuchen. Die Ergebnisse zu diesen Versuchen sind in Kapitel 3.5.4 zusammengefasst. Alle hier als positiv getesteten Organismen sollten, um mögliche Antagonisten für den Einsatz nach dem Rebschnitt zu erhalten, in weitere Untersuchungen *in vivo* analysiert werden.

### 3.5.2 Untersuchung von Endophyten

Seit der ersten Beschreibung der Symbiose als "das Zusammenleben von unterschiedlichen Organismen" durch Anton De Bary (1879), wurde eine Vielzahl symbiotischer Lebensstile, basierend auf den Fitness-Vorteilen oder den Untersuchungen zum Zusammenspiel von makroskopische und

mikroskopische Organismen beschrieben (Rodriguez *et al.*, 2009; Hoppe und Kutschera, 2010). So ist nach 100 Jahren des Forschens der allgemeine Konsens, dass die meisten, wenn nicht sogar alle Pflanzen in natürlichen Ökosystemen eine Koevolution mit Mykorrhiza-und/oder endophytischen Pilzen durchlaufen haben (Aly *et al.*, 2011). Diese mykotischen Symbionten können tiefgreifende Auswirkungen auf die Ökologie, die Fitness, und die Resistenz der Wirtspflanze haben (Pozo *et al.*, 2010). Zusätzlich haben sie einen starken Einfluss auf die pflanzenumgebende Ökosphäre (Bakterien, Nematoden und Insekten). Fossilien zeigen, dass Pflanzen mit endophytischen und Mykorrhiza-Pilzen seit mehr als 400 Mio. Jahren assoziiert sind. Die Verbindung besteht wohl schon seit die ersten Pflanzen Land besiedelten (Krings *et al.*, 2012; García-Garrido *et al.*, 2009). Anders als Mykorrhiza-Pilze, die Pflanzenwurzeln besiedeln, sind Endophyten im ganz Pflanzengewebe aber auch innerhalb der Wurzeln zu finden (Sikora *et al.*, 2008). Endophytische Pilze werden in zwei Hauptgruppen aufgeteilt, einmal die Endophyten der Familie der *Clavicipitaceae*, die in einigen Gräser zu finden sind und die anderen Endophyten (*Non-Clavicipitaceae*), die aus nicht vaskulären Pflanzen, Farnen, Koniferen und Angiospermen isoliert wurden (Rodriguez *et al.*, 2004; White und Torres, 2010).

Auch die endophytisch wachsenden Pilze wurden gegen die Esca-assoziierten Pilze Pm, Pa, Fm und El auf Agarplatten getestet (Kapitel 2.7.2). Die bei diesem Test gegen die einzelnen Pathogene aktiven Pilze sind in Tabelle **12** zusammengefasst. Wie bei den *Trichoderma* spp. zeigten sich auch hier starke Unterschiede im Wirkspektrum. So war ein Pilz gegen alle vier Esca-Pathogene aktiv (IBWF E99327) und einige Pilze zeigten nur gegen einen der Schadpilze z.B. Pa einen ausreichenden Antagonismus (IBWF E99121). In dieser Liste sind nur diejenigen Pilze aufgeführt, die durch in den Agar abgegebene Substanzen und Enzyme den pathogenen Pilz am Wachstum gehindert haben. Es wurden also nur Pilze, die einen Hemmhof erzeugen berücksichtigt. Während des Versuchs wurden die Hemmhöfe, die nach 5-9 Tagen entstanden vermessen.

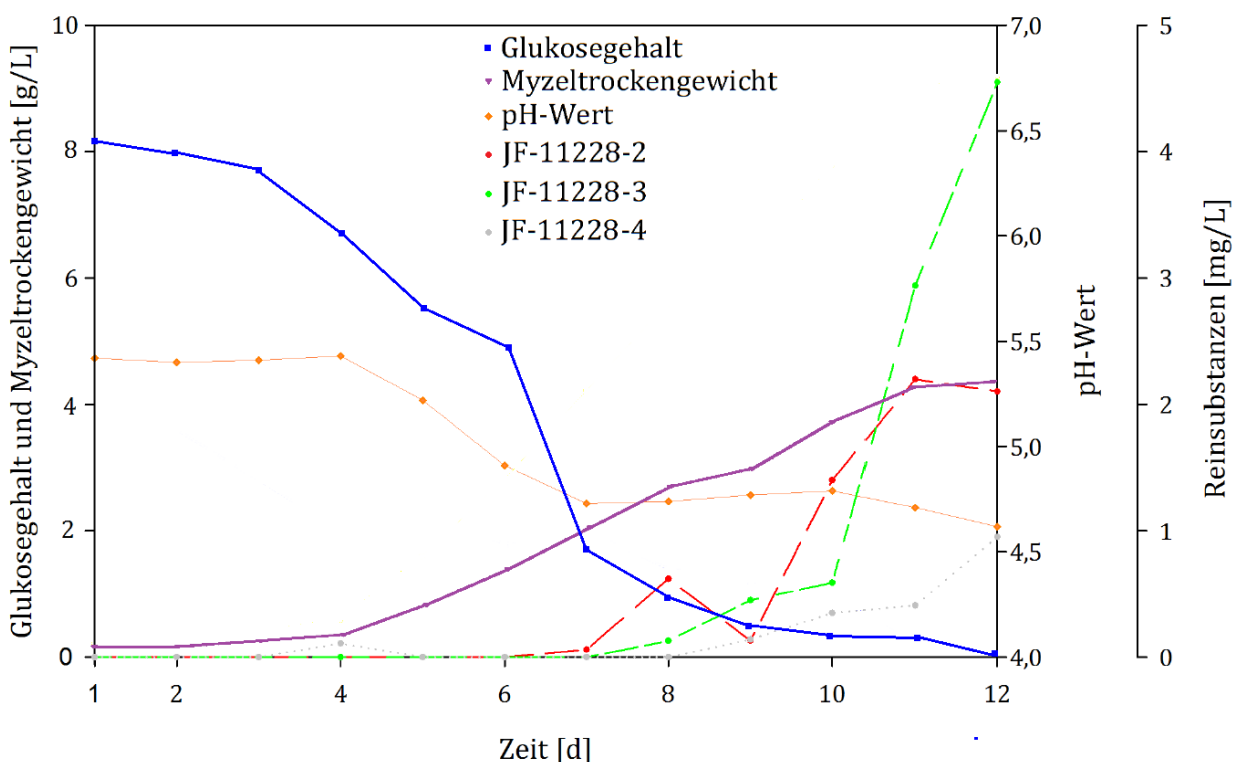
Die Tabelle enthält in diesem Fall auch nur Pilze, die dreimal nachgetestet worden waren, und die einen Hemmhof > 1 cm erzeugten, d.h. das Wachstum der ESCA-assoziierten Pilze deutlich inhibiert haben. Im Schnitt zeigten nur 3,1 Prozent der getesteten Stämme (1041 Pilze) eine ausreichende Aktivität gegen die Esca-assoziierten Pilze, während bei etwa 7,4 Prozent noch eine geringe Hemmung mit einem deutlichen Hemmhof zu erkennen war. Die Pilze IBWF E99121 und IBWF E11228 wurden im Anschluss im 20 L Maßstab fermentiert und auf ihr Wirkspektrum des Sekundärmetabolite hin untersucht.

**Tab.12:** Endophytische Pilze (Stammsammlung IBWF e.V.), die als positiv antagonistisch gegen die Esca Pilze getestet wurden

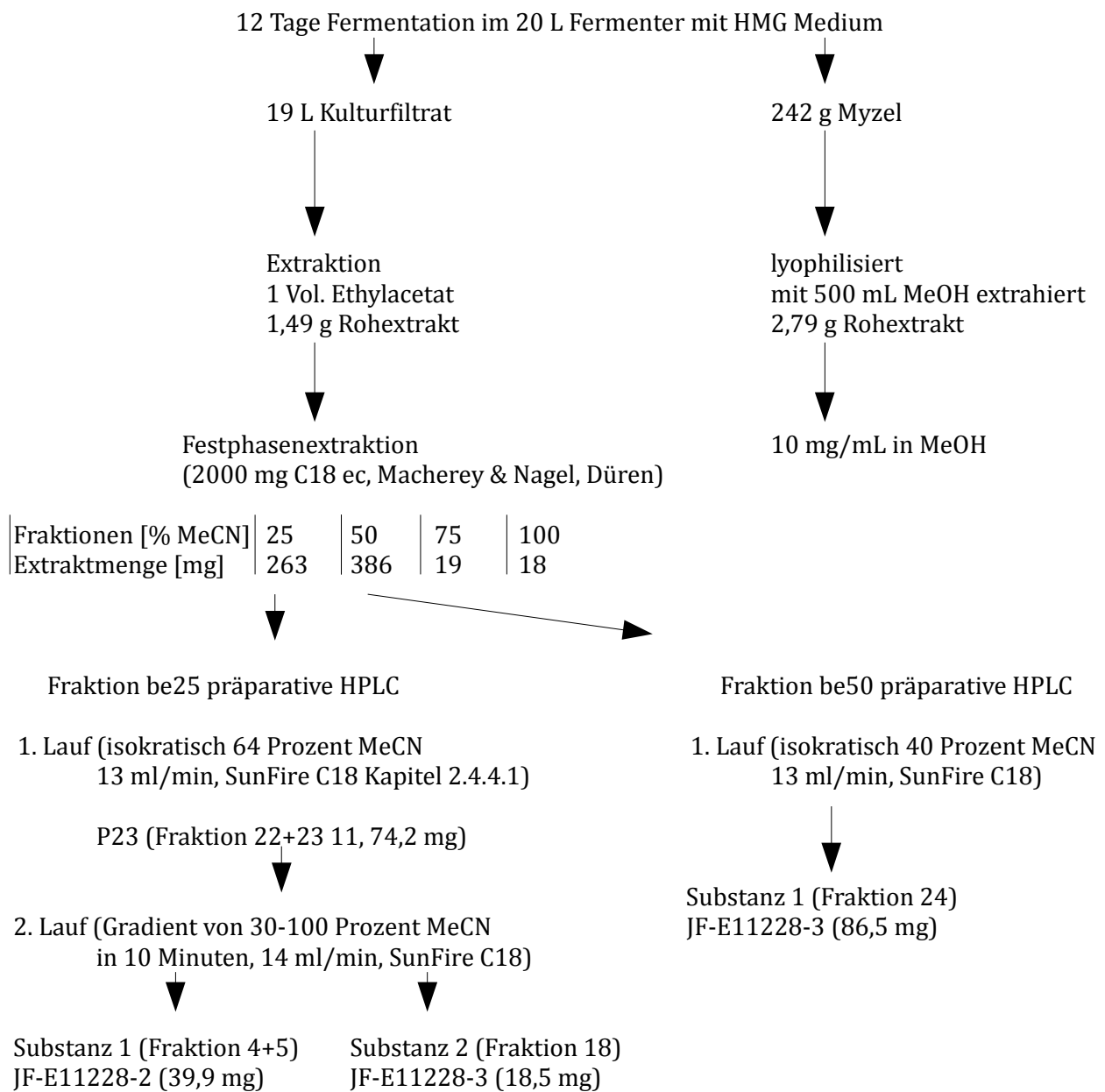
Esca Pilze	Esca Pilze	Esca Pilze	Esca Pilze
E99309	Pm, Pa, Fm	E04031	Pa
E99327	Pm, Pa, Fm, El	E04060	Pa
E10087	Pm, Pa, El	E04061	Pa
E11215	Pm, Pa, Fm	E04093	Pa
E11223	Pm, Pa, El	E10133	Pa
E11228	Pa, Fm, El	E11226	Pa
E11262	Pm, Pa, Fm	E99093	Fm
E11308	Pa, Fm, El	E99136	Fm
E99124	Pm, Pa	E99160	Fm
E99266	Pm, Pa	E99202	Fm
E99268	Pm, Pa	E99280	Fm
E04039	Pm, Pa	E99341	Fm
E04056	Pm, Pa	E99361	Fm
E04059	Pm, Pa	E09001	Fm
E04062	Pm, Pa	E10067	Fm
E10090	Pm, Pa	E11211	Fm
E10102	Pm, Pa	E11213	Fm
E10114	Pm, Fm	E11232	Fm
E10139	Pm, Pa	E11290	Fm
E11230	Pm, Pa	E11311	Fm
E11257	Pm, Pa	E11334	Fm
E11297	Pm, Pa	E99043	El
E99127	Fm, El	E99115	El
E99134	Fm, El	E99156	El
E99336	Fm, El	E99185	El
E04096	Fm, El	E99222	El
E09006	Fm, El	E99225	El
E09032	Fm, El	E99228	El
E99104	Pm	E99299	El
E99260	Pm	E99320	El
E99261	Pm	E99352	El
E99276	Pm	E99365	El
E99321	Pm	E00090	El
E99349	Pm	E00093	El
E99350	Pm	E00111	El
E01022	Pm	E00116	El
E04025	Pm	E01033	El
E04058	Pm	E01046	El
E99104	Pa	E09002	El
E99121	Pa	E09018	El
E99259	Pa	E11216	El
E99330	Pa	E11270	El
E00084	Pa	E11290	El

### 3.5.2.1 Fermentation und Wirkstoffisolation aus dem Endophyten IBWF E11228

Der Endophyt IBWF E11228 wurde aufgrund seiner Aktivität gegen Pa, Fm und El ausgewählt. Nachdem durch den beim Platten-Antagonistentest entstandenen Hemmhof gezeigt werden konnte, dass der Pilz eine oder mehrere Substanzen in das Medium abgibt, die die anderen Pilze am Wachstum hindern, wurde der Pilz im 20 L Maßstab in HMG Medium fermentiert. Zusätzlich wurde genomische DNA aus dem Pilzmyzel isoliert und eine ITS Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenzierung ergab, dass es sich um einen Pilz der Gattung *Xylaria* handelt. Es konnte eine 97 prozentige Übereinstimmung mit den 587 Basen zu einem Stamm *Xylaria* sp. 1 des ICMP nachgewiesen werden (GenBank: JN225909.1). In Abbildung 13 ist eine Fermentationsgrafik dargestellt. Die Fermentation dauerte, nachdem der Fermenter mit 250 mL einer 6 Tage alten Vorkultur inokuliert worden war, 12 Tage. Zu diesem Zeitpunkt war die Menge der freien Glukose im Medium auf 0 g/L gesunken. Zusätzlich nahm die Konzentration der Substanz JF-E11228-2 bereits wieder ab. Die maximale Menge der Verbindungen wurden am Tag 11 gemessen. Zudem ist zu erkennen, dass die Metabolite JF-E11228-3 und -4 besonders in den letzten 48 Stunden produziert werden und sich im Medium anreichern.



**Abb.13:** Fermentationsgrafik von E11228 (IBWF) in 5 x 2 L HMG-Medium (blau (Quadrate), Glukosegehalt [g/L]; (lila Dreiecke) Myzeltrockengewicht [g/L]; (orange Rauten) pH-Wert; Reinsubstanzen: JF-E11228-2 (rote lange unterbrochene Linie), JF-E11228-3 (grüne kurze unterbrochene Linie) und JF-E11228-4 (graue gepunktete Linie).



**Abb.14:** Aufarbeitungsschema für die biologisch aktiven Substanzen aus dem Pilz IBWF E11228

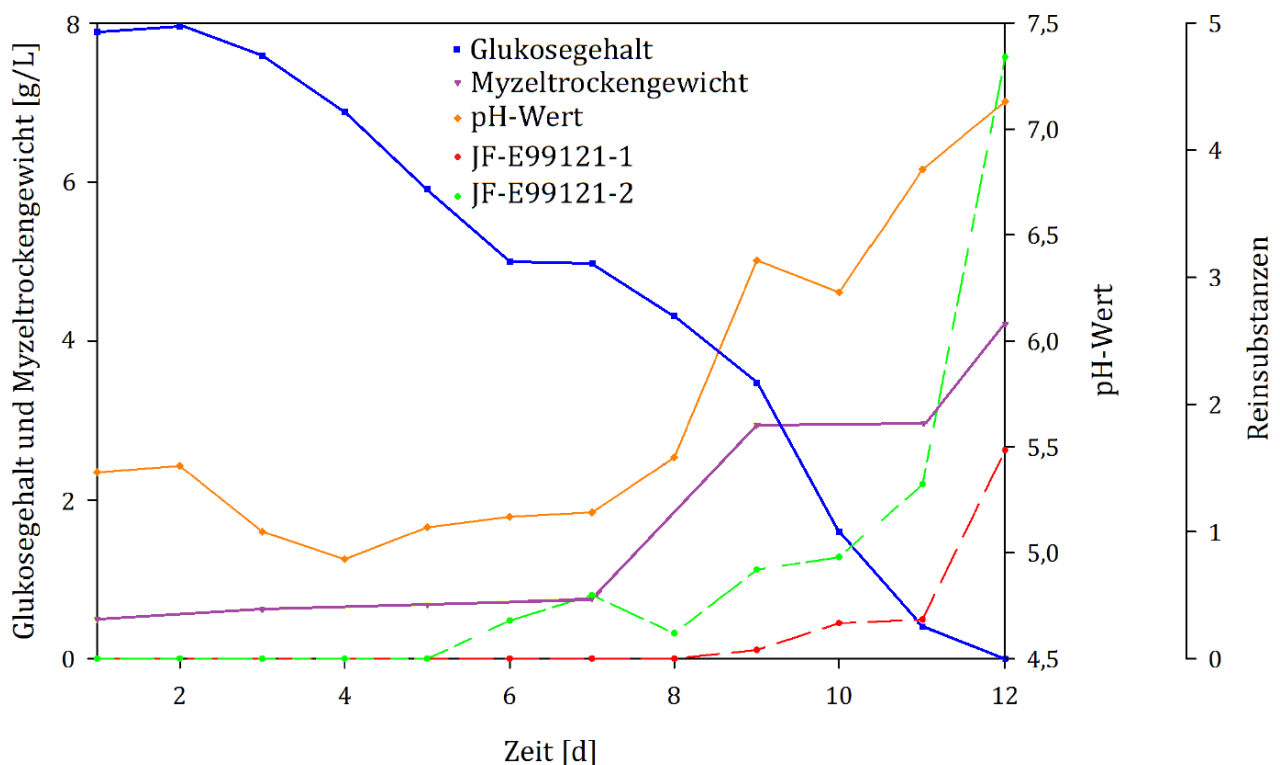
Nach dem Ende der Fermentation wurden das Myzel von der Kulturbrühe durch Filtration getrennt und wie in der Abbildung 14 zusammengefasst, weiter verarbeitet. Die Aktivität des Myzelextrakts wurde gegen Pa, Fm und El bis zu einer Konzentration von 500 µg Extrakt im Agardiffusionstest getestet. Es wurde keine Aktivität festgestellt. Daher wurde nur mit dem Kulturfiltrat, welches im Agardiffusionstest aktiv war, weitergearbeitet. Nach der Ethylacetat-Extraktion, der Festphasenextraktion mittels 2000 mg C18 (Bond-Elut C18, Macherey-Nagel) und der Auftrennung mit Hilfe der präparativen HPLC (Kapitel 2.4.4.1) wurden drei Substanzen aus dem Kulturfiltratextrakt isoliert.



Es zeigte sich, dass die Substanz JF-E11228-4 keine Aktivität bis zu einer Substanzmenge von 500 µg gegen Pa, Fm und El im Agardiffusionstest aufweist. Durch die antimykotische Wirkung der beiden Substanzen JF-E11228-2 und -3 entstehen bei Fm und El jeweils bei 50 µg Substanz pro Antibiotikatestplättchen im Agardiffusionstests Hemmhöfe. Substanz 2 war zusätzlich bei Pa, jedoch erst bei einer Wirkstoffmenge von 100 µg im Agardiffusionstest aktiv. Der Hemmhofdurchmesser betrug in diesem Fall zwischen 1,6 und 1,9 cm. Es ist jedoch zu beachten, dass die extrahierten Substanzen eine weit weniger starke Wirkung im Agardiffusionstest aufweisen, als der im Test eingesetzte Gesamtorganismus. Der Hemmhofdurchmesser bei den vorher durchgeführten Agardiffusionstests lag bei mehr als 2,5 cm.

### 3.5.2.2 Fermentation und Wirkstoffisolation aus dem Endophyten IBWF E99121

Ein weiterer Endophyt, der im Agarplattentest durch seine ins Medium abgegebenen Sekundärmetabolite oder Enzyme einen Hemmhof bei Pa erzeugte ist IBWF E99121. Dieser Pilz wurde aufgrund des besonders ausgeprägten Hemmhofs (>3 cm) ausgewählt. Es sollte untersucht werden, ob dieser Stamm ein sehr potentes Fungizid produziert.



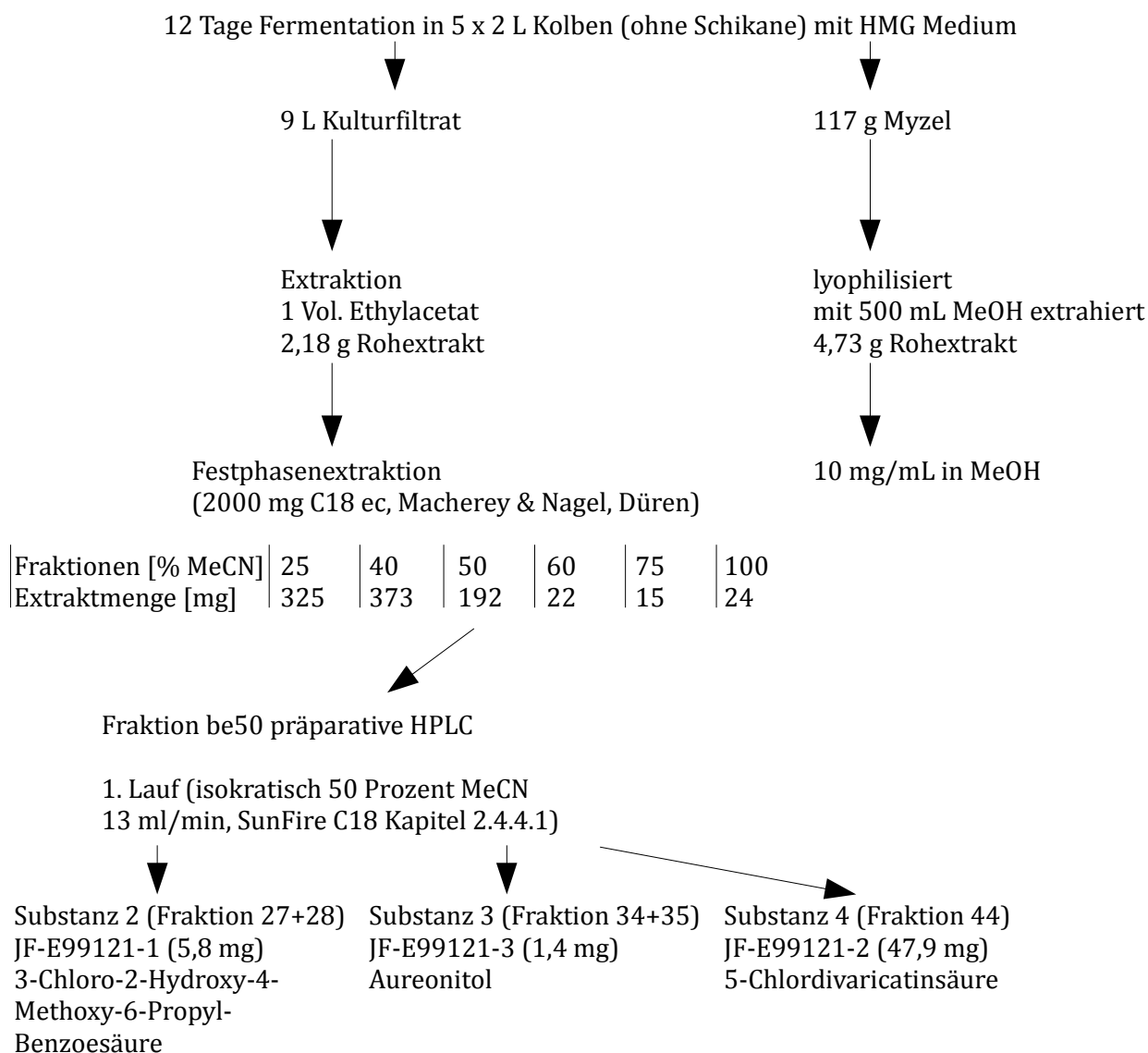
**Abb.15:** Fermentationsgrafik von E99121 (IBWF) in 20 L HMG-Medium (blau (Quadrate), Glukosegehalt [g/L]; (lila Dreiecke) Myzeltrockengewicht [g/L]; (orange Rauten) pH-Wert; Reinsubstanzen: JF-E99121-1 (rote lange unterbrochene Linie) und JF-E99121-2 (grüne kurze unterbrochene Linie)

Eine ITS Sequenzierung und der anschließende Sequenzvergleich ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) ergaben eine 99 prozentige Übereinstimmung (568 Basen) mit dem Stamm *Chaetomium globosum* (CBS 418.80A; GenBank: JN209914.1). Der Pilz wurde zunächst, wie in Kapitel 3.5.2.1 beschrieben, im 20 L-Maßstab fermentiert. Nach der Extraktion des Kulturfiltrats und des lyophilisierten Myzels konnte allerdings keine fungizide Wirkung im Agardiffusionstest gegen Pa beobachtet werden.

Aus diesem Grund wurde der Pilz 12 Tage bei 22 °C und 120 rpm in Kolben fermentiert (5 x 2 L HMG-Medium, **M10**) und die Extrakte der Tagesproben zeigten eine Aktivität gegen Pa, wenn 400 µg im 96-Loch-Platten-Test eingesetzt wurden. Der Fermentationsverlauf ist in Abbildung **15** zu sehen. Bei dieser Fermentation ist gut zu erkennen, dass nach sechs Tagen der pH-Wert stark ansteigt und dass im gleichen Zeitraum die Produktion der Sekundärmetabolite beginnt. Der Glukosegehalt des Mediums sinkt nur sehr langsam, auch nachdem das Myzeltrockengewicht ab Tag 7 deutlich zunimmt. Zu diesem Zeitpunkt korrelieren das Myzelwachstum und der pH-Wert Anstieg.

Nach der Fermentation wurden die drei Substanzen JF-E-99121-1, -2 und -3 nach dem in Abbildung **16** zusammengefassten Aufreinigungsschema isoliert. Auch beim Endophyten IBWF E99121 war der Myzelextrakt nicht gegen die Esca-assoziierten Pilze im Agardiffusionstest biologisch aktiv, daher wurde nur das Kulturfiltrat weiter analysiert. Es wurde auf eine Aufreinigung mittels Kieselgelsäule verzichtet und der Rohextrakt direkt mit Hilfe einer Festphasenextraktion (Chromabond C18 ec, 2000 mg, Macherey & Nagel, Düren) mit einem MeCN-H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub>-Gradienten getrennt. Von den so erhaltenen sechs Fraktionen zeigte nur die Fraktion, die mit 50 Prozent MeCN eluiert wurde eine biologische Wirkung im 96-Loch-Platten-Test gegen Pa Sporen. In dieser Probe befanden sich mindestens elf Substanzen, die anhand ihres UV/Vis-Spektrums unterschieden werden konnten. Nach der Optimierung der Trennung mit Hilfe einer präparativen HPLC-Säule (Kapitel 2.4.4.1) konnten diese elf Naturstoffe durch einen isokratischen Lauf mit 50 Prozent MeCN in 28 Minuten getrennt werden.

Nachdem die 192 mg Extrakt durch vier identische Läufe fraktioniert worden waren zeigten die Fraktionen 37+38 sowie 44 eine biologische Aktivität gegen Pa im Agardiffusionstest. JF-E-99121-1 generierte bei 100 µg und JF-E-99121-2 bereits bei 75 µg einen Hemmhof. Die beiden Substanzen wurden zur Strukturaufklärung an die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. T. Opatz (Institut für Organische Chemie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) geschickt. Die Analyse der Substanzen ergab, dass es sich bei der Substanz JF-E99121-1 um 3-Chloro-2-Hydroxy-4-Methoxy-6-Propyl-Benzoessäure handelt.



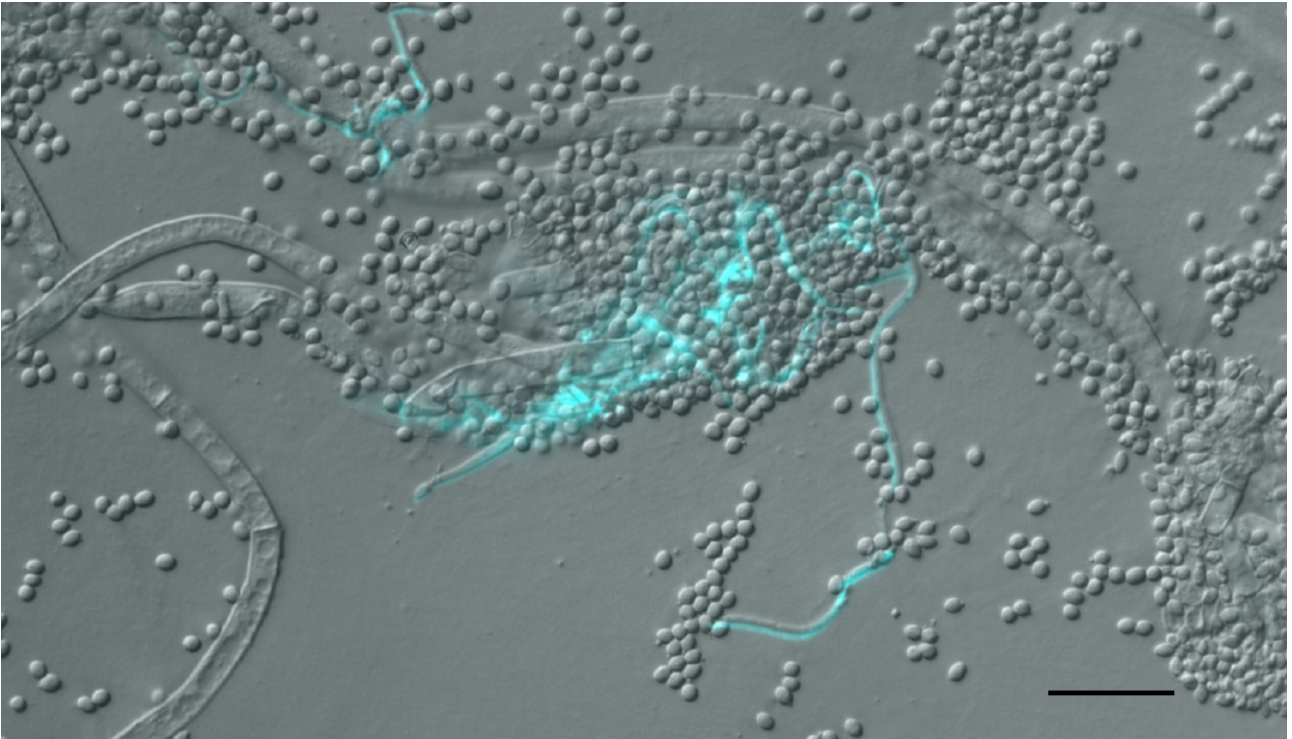
**Abb.16:** Aufarbeitungsschema für den Pilz IBWF E99121

Die Substanz JF-E-99121-2 wurde als 5-Chlordivaricacinsäure strukturaufgeklärt. Die Substanz JF-E99121-3 konnte mit Hilfe der UV/Vis-Datenbank und der Masse bereits zuvor als Aureonitol charakterisiert werden. Die restlichen Substanzen zeigten keine biologische Aktivität gegen Pa. Von

der Substanz-1 konnten bisher 5,8 mg von der Substanz-2 sogar 47,9 mg isoliert werden. Die beiden Substanzen wurden ebenfalls im *Vitis-shoot-Assay* (Kapitel 3.5.3) getestet, konnten in diesem jedoch das Wachstum von Pa nicht verhindern. Die Fluoreszenz-markierte Mutante von Pa wurde im Agar unter dem *Vitis*-Spross detektiert. Auch gegen die anderen drei Esca-assoziierten Pilze zeigte sich in diesem Versuch, wie zu erwarten war, keine fungizide Wirkung.

### 3.5.3 *Vitis-shoot-Assay*

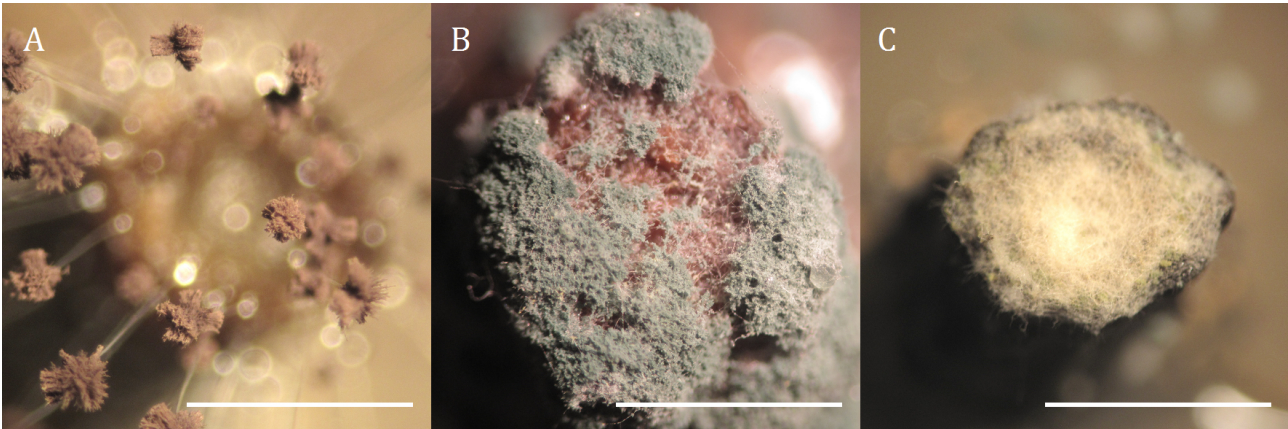
Das *Vitis-shoot-Assay* wurde entwickelt um eine Möglichkeit zu haben, die bei den Vorversuchen entdeckten endophytischen Pilze, *Trichoderma* spp. und Bakterien-Stämme direkt auf Schnittwunden von Weinpflanzen zu testen. Mit diesem Versuchsaufbau ist es möglich zu untersuchen ob die Antagonisten in der Lage sind die Esca-assoziierten Pilze daran zu hindern in die Schnittwunde einzudringen (Sofia *et al.*, 2005). Mehrere Studien haben inzwischen gezeigt, dass die Esca-assoziierten Pilze wohl vor allem über Schnittwunden in die Pflanze eindringen (Surico *et al.*, 2006; Landi *et al.*, 2012, Kapitel 1.3). Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle **13** zusammengefasst. Es ist zu sehen, dass nicht alle Antagonisten, die in den Agarplattentests eine Aktivität zeigten, diese auch im *Vitis-shoot-Assay* noch aufwiesen. Besonders in der Kombination mit den Pm-Sporen zeigten sich deutliche Defizite. Pm konnte nach der Inkubationszeit aus fast 50 Prozent der Agarproben isoliert werden. Ein Beispiel der zu beobachteten Fluoreszenz nach dem das Myzel der aus dem Agarmedium unterhalb des Weinpflanzensegments isoliert wurde, ist in Abbildung **17** zu sehen. Ebenfalls gut sichtbar ist ein weiterer Pilz in dieser Aufnahme.



**Abb.17:** *CF* Protein-markierte Mutante von *Pm* nach *Vitis-shoot-Assay*, Mehrdimensionale Bildaufnahme mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Maßstab 100 µm; *CF* Protein-Fluoreszenz, Extinktion:458 nm, Emission:489 nm)

Es handelt sich um einen Endophyten, der in fast allen Proben, die mit den Weinpflanzen angesetzt wurde, zu finden war. Dieser Pilz wuchs auch aus nicht infizierten Weinstücken. Zusätzlich sind auch die Sporen dieses Pilzes zu sehen. Der Nachweis von *Pm* erfolgte mittels *CF* Protein-Fluoreszenz und von *Pa* bzw. *El* mittels *GF* Protein-Fluoreszenz. Das Wachstum von *Fm* wurde lichtmikroskopisch beobachtet und im Falle von Wachstum im Agar bestimmt.

Neben der Analyse des Pilzwachstums im Agar unterhalb des *Vitis*-Sprosses wurden alle Schnittstellen mit dem Binokular untersucht. In Abbildung **18** sind exemplarisch drei Schnittwunden als Fotografien gezeigt. Im Bildausschnitt B ist eine Schnittwunde, auf der ein *Trichoderma* sp. wächst zu sehen. Das Hyphengeflecht hat die gesamte Schnittstelle überzogen.



**Abb.18:** Aufnahmen von Weinpflanzensegmenten mit Hilfe eines Binokulars; A: *Aspergillus* sp., B: *Trichoderma* sp., C: *Pm. chlamydospora* (Maßstab 5 mm)

Es handelt sich um IBWF 211-05, dieser Stamm war in der Lage die jeweilige Schnittstelle vor allen vier Esca-assoziierten Pilzen zu schützen und das Eindringen in die Pflanze zu verhindern. Im Bildausschnitt C ist eine Schnittwunde zu sehen, die mit *Pm* Sporen und 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> benetzt worden war. Der Pilz zeigte sein normales Wachstum, da er durch keinen Antagonisten behindert wurde. Bei den Negativkontrollen waren alle vier Pilze in die Pflanzen eingedrungen und in den unteren Agar eingewachsen. Die Positivkontrolle durch das Fungizid Glufosinat-Ammonium konnte die Pilze inhibieren und verhinderte ihr Wachstum vollständig. Die Substanz Glufosinat-Ammonium ist auch als Herbizid unter dem Markennamen Basta® (Bayer CropScience, Deutschland) bekannt. Es wurden aber schon bei verschiedenen Transformationen auch bei Pilzen mit der Glufosinat-Ammonium-Resistenz (erzeugt durch die Integration des Phosphinothricin-Acetyltransferase Gens aus *Streptomyces hygroscopicus*) genutzt. Glufosinat inhibiert, ebenso wie bei Pflanzen die Glutamin Synthetase und kann so als Selektionsmarker eingesetzt werden (De Block *et al.*, 1987; Bello *et al.*, 2013).

Die Stämme aus Tabelle 13, welche aller vier Esca Pilze daran hindern konnten in die Schnittwunde einzudringen, können in einem nächsten Schritt an ganzen *Vitis*-Pflanzen getestet werden. Hierzu müssen Weinpflanzen im 8-Blatt-Stadium zurückgeschnitten und die Schnittwunden mit den jeweiligen Antagonisten-Sporensuspensionen benetzt werden.

**Tab.13:** Ergebnisse des Auswahlverfahrens nach dem *Vitis-shoot-Assay* (Bakterien, Sekundärmetabolite aus Zellen isoliert; B2-Iso: Isolation aus Bakterienkulturfiltrat; Positivkontrolle: 100 µg/mL Glufosinat-Ammonium; Negativkontrolle: 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>; -: keine Detektion von Pilzmyzel (ausgenommen endophytische Pilze aus *V. vinifera*); W: Wachstum des Pilzes in die Agarplatte; (n = 3)

Pilze	Pm			Pa			Fm			El		
D01022	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-
085-99	W	W	W	-	-	-	-	W	-	W	-	-
111-99	W	W	W	-	-	-	-	-	-	W	-	-
116-04	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-
211-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
186-99	W	W	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-
360-04	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
189-04	-	W	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104-09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
063-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97139	W	W	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2-Zellen	W	W	W	W	W	-	W	-	-	-	-	-
B2-Iso	W	W	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A28-90	W	W	W	W	W	-	-	-	-	W	-	-
A04-91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E99327	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A32-91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A20-2000	W	W	W	-	-	-	W	-	-	-	-	-
A21-2006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
259-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	W	-
JF-E99121-1	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
JF-E99121-2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
Positivkontr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Negativkontr.	W	W	W	W	-	W	W	W	W	W	W	W

Es ist notwendig Präparate der infizierten Pflanzen anzufertigen und das fluoreszierende Myzel mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops nachzuweisen (Kapitel 3.4.2). Zusätzlich ist es in so einem Testsystem möglich den Einfluss der Antagonisten auf die Pflanze zu untersuchen. Antagonistische Pilze, die selbst weinpathogen sind, würden in diesem Versuch zur Infektion der Pflanze und Krankheitssymptomen führen, die mit dem *Vitis-shoot-Assay* nicht nachzuweisen sind. Außerdem können ganze Pflanzen die infiziert wurden, leichter über mehrere Monate beobachtet werden, um Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der Antagonisten und ihre Schutzdauer der Schnittstellen analysieren zu können. Des Weiteren lassen sich Versuche mit Mehrfachinfektionen oder der Einsatz von verschiedenen Antagonisten oder Schutzwiederholungen durchführen um mögliche Verfahren für einen ganzen Wachstumszyklus der Pflanzen zu etablieren.

## 4 Diskussion

Die Symptome der Esca Krankheit wurden bereits durch die Römer der Antike beschrieben und seit Beginn des 19. Jahrhunderts wird die Krankheit wissenschaftlich erforscht. Die starke Ausbreitung der Symptomatik wird allerdings erst seit etwa 30 Jahren beobachtet (Valtaud *et al.*, 2009). Es sind zwei Krankheitsverläufe beschrieben worden: ein schwerer apoplektischer und ein chronischer Verlauf. Beim sogenannten apoplektischen Verlauf stirbt die Pflanze, meist ohne vorher Symptome gezeigt zu haben innerhalb weniger Tage von den Triebspitzen her ab. Während des chronischen Verlaufs können die Pflanzen mehrere Jahre Anzeichen der Krankheit an den Blättern und Beeren zeigen, die Schwächung der Rebe führt allerdings nicht zum sofortigen Verlust der Vitalität (Letousey *et al.*, 2010). Aus Weinpflanzen, die typische Esca Symptome zeigen, werden meist die vier Pilze *Phaeomoniella chlamydospora* (Pm), *Phaeoacremonium aleophilum* (Pa), *Fomitiporia mediterranea* (Fm) und *Eutypa lata* (El) isoliert. Letzterer kann auch alleine die Rebkrankheit Eutypiose auslösen (Luque *et al.*, 2009). Die beschriebenen Symptome sind chlorotische und gelb-braune Nekrosen an den Blättern. Zudem finden sich braune Verfärbungen des Holzes im Querschnitt und es bilden sich braune, punktförmige Verfärbungen auf den Schalen der Trauben (Mugnai *et al.*, 1999). Neuere Studien lassen vermuten, dass viele Faktoren einen Einfluss auf die zunehmende Verbreitung der Esca Krankheit haben. Effekte, wie klimatische Veränderungen, durch heiße und trockene Sommer mit kurzen und heftigen Regenfällen, neue Weinbaumethoden bei der Pflege von Setzlingen und beim Weinbergsmanagement, die Einführung neuer Weinrebenkultivare und Wurzelstöcke und der unzureichenden Schutz von Schnittwunden, haben zur raschen Ausbreitung der Krankheit in den letzten 15 Jahren geführt (Hofstetter *et al.*, 2012). Seit 2001 Natriumarsenit wegen seiner hohen Toxizität für Mensch und Umwelt verboten wurde, sind die Esca Symptome in Weinbergen in ganz Europa vermehrt beobachtet worden. Die Anzahl der Berichte steigt in Deutschland, Portugal, Ungarn, Italien und Frankreich stetig (Surico *et al.*, 2008).

Die größte Herausforderung bei der Erforschung des Esca Krankheitskomplexes ist die noch schwer zu fassende Ätiologie (Crous und Gams, 2006). Da mehrere Pilze als Esca Krankheitserreger diskutiert werden, die molekularen Grundlagen der Pilz Pflanze Interaktion noch ungeklärt sind und da die typischen Esca Symptome, welche auf den Blättern sichtbar werden noch nicht in unterschiedlichsten Versuchsansätzen rekonstruiert werden konnten, sind viele Grundlagen der Krankheit noch zu analysieren (Larignon und Dubos, 1997). Eine weitere ungeklärte Frage betrifft die Symptome, die nicht regelmäßig in jedem Jahr an den infizierten Reben auftreten und sichtbar werden (Calzarano und Di Marco, 2007; Guerin-Dubrana *et al.*, 2013).



Der Einfluss der beiden tracheomycotischen Pilze Pm und Pa gilt inzwischen jedoch als wissenschaftlich gesichert (Surico *et al.*, 2008). Außerdem sind einige Enzyme aus dem Kulturfiltrat von Fm isoliert worden, die für die Reduktion von Zellulose und Lignin in der Weinrebe und für die Weißfäule in der letzten Stufe der Esca Infektion verantwortlich sind (Fischer, 2010b). Bis heute sind jedoch die Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Pilze unklar. Außerdem gibt es große Unterschiede in der Definition der Krankheit, da die befallene Pflanzen ein breites Spektrum von Symptomen zeigen (Kuntzmann *et al.*, 2010). Hinzu kommt, dass Versuche unter Feldbedingungen deutlich komplexer sind, da saisonale Einflüsse, biotische und abiotische Einflüsse, die nicht durch die Pathogene induziert werden und das langsame Wachstum berücksichtigt werden müssen (Bertsch *et al.*, 2012).

Die meisten wissenschaftlichen Studien über Esca, die sich mit den Symptomen und ihrer Entstehung beschäftigen, legen den Fokus auf die Isolation von phenolischen Sekundärmetaboliten, z.B. Isoscleron und Scytalon oder anderer aromatischer Verbindungen, die aus den Extrakten der Erreger isoliert werden können. Der Großteil, der so gefunden Substanzen ist zwar in Zellkulturen oder in Blattpfropftests phytotoxisch, zeigt aber bei Injektion in die Pflanze keine Symptome (Bruno und Sparapano, 2006 a,b).

Während dieser Arbeit wurden aus den oben genannten Gründen drei Schwerpunkte zur Erforschung des Esca Krankheitskomplexes gesetzt:

Ersten sollte eine systematische Suche nach neuen, noch unbekanntem phytotoxischen Substanzen (mit Hilfe verschiedener Testsysteme) unter anderem auf der Basis von *Vitis* sp.- Kalluskulturen durchgeführt werden. Diese Sekundärmetabolite sollten im Anschluss auf ihre Wirkung *in vivo* getestet und charakterisiert werden. Die Ergebnisse zu diesem Teil der Arbeit werden im Kapitel 4.1 diskutiert.

Zweitens sollten die molekularen Grundlagen der Interaktionen zwischen den Pilzen untereinander und zwischen den Pathogenen und der Wirtspflanze analysiert werden. Es sollten GFP-exprimierende Stämme generiert werden um das Wachstum der Pilze *in vivo* in der Pflanze analysieren zu können. Des Weiteren sollten die Pilze in ihrer gegenseitigen Wechselwirkung unter Stressbedingungen untersucht werden. Die unterschiedlichen Versuchsansätze die zur Aufklärung wichtiger Fragen in der Esca Forschung durchgeführt wurden, werden in den Kapiteln 4.2 bis 4.4 diskutiert.

Im dritten Projektteil dieser Arbeit sollten neue Antagonisten der vier Esca-assoziierten Pilze identifiziert und ihre Wirkungsweise bzw. die Produktion fungizider Substanzen charakterisiert werden. Zusätzlich wurden erste Versuche unternommen um ein Testsystem zu etablieren, mit dem

die antagonistische Wirkung der selektierten Pilze und Substanzen analysieren werden kann. Inwieweit diese Systeme in der Zukunft für weitere Forschungen zum Einsatz kommen könnten, wird in den letzten Kapiteln der Diskussion (Kapitel 4.4 Folgende) resümiert.

#### **4.1 Kaempferol und Kaempferol-3-Glykosid**

Ein Naturstoff, der bei Experimenten zur Identifizierung von Phytotoxinen detektiert werden konnte, ist Kaempferol-3-Glykosid (K3G).

K3G ist ein Flavonol-Glukosid, das auch aus der Schale und dem Saft der Trauben isoliert werden kann (Castillo-Muñoz *et al.*, 2008). Es werden von der Pflanze jedoch nur etwa zehn Prozent der Menge K3G im Vergleich zu Quercetin-3-Glukosid produziert (Mulero *et al.*, 2010). Wie andere Flavonoide besitzt Kaempferol eine Diphenylpropan-Struktur (C6-C3-C6). Die Flavonoide, zu denen auch Quercetin zählt, gehen in pflanzlichen Geweben oft hydrophile Zuckerverbindungen ein, sodass dann Flavonoid-Glykoside entstehen. Kaempferol und das korrespondierende Glykosid konnten auch aus 'Riesling' und 'Sauvignon blanc' isoliert werden (Castillo-Munoz *et al.*, 2007; Calderon-Montano *et al.*, 2011).

Studien, in denen bisher mit Kaempferol gearbeitet wurde, beziehen sich meist auf seine Wirkung bei der Proliferation von Makrophagen. Wenn die Flavonole Quercetin und Kaempferol in die Kulturüberständen gegeben werden, hemmen sie die Makrophasenproliferation signifikant (Comalada *et al.*, 2006). In Pflanzen übernehmen Flavonole, wie Quercetin und Kaempferol, die Rolle der Radikalfänger und schützen die Zellen dadurch auch gegen UV-Strahlen. Es wurde in Studien, auch an Weinpflanzen gezeigt, dass die Synthese dieser Substanzen durch UV-Strahlen induziert wird (Kolb *et al.*, 2003). Die biologische Aktivität der Flavonole Kaempferol und Quercetin wurden in früheren Versuchen bereits gegen zwei Krankheitserreger von Reis getestet. Kaempferol zeigten eine signifikante Hemmung der Sporenkeimung von *Pyricularia oryzae* (Padmavati *et al.*, 1997). Lambert *et al.* (2012) testeten Kaempferol gegen die vier Esca-assoziierten Pilze und konnten die deutlichste Hemmung des Wachstum bei *Pa. aleophilum* feststellen. Es zeigte sich in den hier durchgeführten Versuchen, dass Kaempferol-3-O-Glukosid keine hemmende Wirkung gegen die genannten Pilze besitzt. Damit ist die Möglichkeit der beiden Pilze Pa und vor allem Pm Kaempferol zu glykosylieren eine entscheidender Vorteil gegenüber der pflanzlichen Abwehr, die auf den Einsatz von Phytoalexinen aufbaut.

#### 4.1.1 Fermentation von *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum*

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind bereits einige Publikationen zur Produktion von Sekundärmetaboliten der beiden Esca-assoziierten Pilze Pm und Pa veröffentlicht worden (Bruno und Sparapano, 2007a). Es ist beobachtet worden, dass diese beiden tracheomycotischen Pathogene, Scytalon, Isoscleron und Pullulan sowohl in Flüssigkultur als auch im Myzel auf Agarplatten produzieren (Andolfi *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurden die beiden Pathogene in verschiedenen Medien und Volumina fermentiert, um das Spektrum an Sekundärmetaboliten zu untersuchen. Außerdem wurden Studien zur Veränderung des Metabolitenspektrums unter Stressbedingungen durchgeführt.

##### 4.1.1.1 Fermentation von *Phaeoconiella chlamydospora*

Die Fermentation von Pm wurde im 20 L Bioreaktor durchgeführt. Die Fermentationsdauer betrug ca. 90 Stunden, also etwa 4 Tage, danach war die freie Glukose im Medium verbraucht und die Fermentation wurde beendet. Die Fermentation im Schüttelkolben bei 120 rpm und 22 °C Umgebungstemperatur dauerte sogar meist nur drei oder vier Tage, je nachdem ob der Kolben mit einer Sporensuspension oder Myzelstücken von einer Agarplatte angeimpft wurde.

Die hier beobachtete Fermentationsdauer ist im Vergleich zu den Literaturdaten sehr kurz. Bei der Fermentation durch Santos *et al.* (2006) in Czapek-Dox Medium sind Kulturzeiten bis zur vollständigen Verstoffwechslung der C-Quellen von 15 Tagen beobachtet worden. Da die Esca-assoziierten Pilze jedoch erstmals in Schüttelkulturen fermentiert wurden und nicht in Standkulturen wuchsen ist ein Vergleich zu den Literaturdaten nur schwer zu ziehen.

In einer Untersuchung der Sekundärmetabolite von Pm durch die Arbeitsgruppe um Bruno und Sparapano (2002) wurden die isolierten Extrakte des Kulturfiltrats an Weinblättern getestet. Bei dieser Studie wurden die Blätter in das Filtrat gestellt, bis sie dieses aufgesaugt hatten. Es zeigte sich, dass sowohl das Kulturfiltrat als auch reines Scytalon bzw. Isoscleron nach 6-8 Stunden zu Esca-ähnlichen Symptomen führten.

In dieser Arbeit wurde ein verändertes Verfahren angewendet. So konnte gezeigt werden, dass die Applikation des Extraktes nach etwa 24 Stunden zur Nekrosenbildung bei Weinblättern führt (Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.2, **Abb. 1** und **2**). Wie in der genannten Studie wurden die Blattscheiben nach weiterer Wartezeit nekrotisch. Die behandelten Blattscheiben zeigten eine Art Welke mit starken Vertrocknungserscheinungen, wie sie auch durch Bruno und Sparapano (2002), nachdem die Blätter

die Kulturfiltrate und getesteten Reinsubstanzen absorbiert hatten, beobachtet werden konnten.

#### 4.1.1.2 Fermentation von *Phaeoacremonium aleophilum*

Die Fermentation von Pa erfolgte wie in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben. Ebenso wie bei Pm zeigte sich eine Fermentationsdauer, die deutlich kürzer war als jene, die für axenische Kulturen dieses Pilzes in der Literatur beschrieben ist. Obwohl die Medien mit denen bisher gearbeitet wurde stark variieren und während dieser Arbeit meist in HMG Medium (**M10**) fermentiert wurde, sind Unterschiede von über 15 Tagen in der Fermentationsdauer zu beobachten (Reátegui *et al.*, 2006). Allerdings wurden die meisten Substanzenanalysen mit Extrakten aus Myzel, dass auf festen Medien und nicht in Submerskulturen fermentiert wurde durchgeführt. Die Arbeitsgruppe um Evidente *et al.* (2000) verwendete Standkulturen mit einer Wachstumsdauer von 28 Tagen. Neben den Angaben zum Wachstum des Pilzes auf Agarplatten sind bisher keine Information zur Fermentation im Bioreaktor publiziert. Es sind also kaum möglich Vergleiche zwischen den bisher veröffentlichten Ergebnissen und den hier durchgeführten Fermentationen zu ziehen. Auffällig ist jedoch, dass das Spektrum der aus Pa nach einer solchen Fermentation isolierten Substanzen, sehr ähnlich zu jenem von Pm ist (Andolfi *et al.*, 2011).

#### 4.1.1.3 Isolation der biologisch aktiven Sekundärmetaboliten aus *Phaeomoniella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum*

Mit Hilfe der Fermentation im Bioreaktor sollten größere Mengen der produzierten Sekundärmetabolite isoliert werden, um eine weitere Charakterisierung zu ermöglichen. Durch eine HPLC-MS Analyse konnten die Massen anderer Stoffwechselprodukte detektiert werden. Diese Substanzen konnten jedoch nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Sie gehören verschiedene Gruppen von Naturstoffen an. Die Massen und UV/Vis-Spektren von 1,3,8-Trihydroxynaphtalen, cis-4-Hydroxy-Scytalon, 2,4,8-Trihydroxytetralone und 3,4,8-Trihydroxytetralone konnten nachgewiesen werden. Diese Substanzen konnten nach dem Massenabgleich mittels HPLC-MS detektiert werden und wurden auch aus Isolaten von Pm und Pa Kulturen, die auf Agarplatten gewachsen waren, isoliert. Die hier dargestellte Analyse liefert fast identische Ergebnisse zu Andolfi *et al.* (2011). Es zeigt sich also, dass keine großen Unterschiede beim Metabolitenspektrum zwischen den Fermentationsweisen zu beobachten waren (Evidente *et al.*, 2000).

Allerdings wird nach einer Fermentation von ca. vier Tagen in einer Schüttelkultur eine ähnliche Substanzmenge wie in vierwöchigen Standkulturen produziert. In Submerskultur ist eine deutlich

schnelleren Produktion von Sekundärmetaboliten mit einer höheren Ausbeute pro Zeit zu beobachten. Des Weiteren wurden bei den durchgeführten Blatttropftests ähnliche phytotoxische Eigenschaften und Symptome nachgewiesen, wie jene, die durch bereits beschriebene Experimente mit Saugtests von Extrakten der Pilze durch *Vitis* Blätter, beobachtet werden konnten (Evidente *et al.*, 2000; Bruno und Sparapano, 2006b). In den Blatttropftests zeigten sich die Symptome allerdings erst nach etwa 24 Stunden und damit später als bei den Saugtests. Dies könnte daran liegen, dass durch die Aufnahme der Substanzen ins Xylem und dem anschließenden Transport der Substanzen in die Blätter, entlang der Leitungsbahnen eine schnelle Verteilung möglich war. Wenn die Substanzen auf die Blattoberfläche aufgebracht werden, müssen sie zuerst durch die lipophile Cuticula diffundieren.

In weiteren Experimenten in denen die beiden Esca-assoziierten Pilze in Minimalmedium (**M13**) fermentiert wurden, konnten auffallend große Mengen an Siderophoren detektiert werden.

Siderophore sind niedermolekulare, Eisenchelatoren, die von fast allen Mikroorganismen gebildet werden (Höfte, 1993). Besonders Pilze synthetisieren eine Vielzahl von Siderophoren, diese funktionieren vor allem als Eisentransportverbindungen und ihre Expression und Biosynthese werden durch die interne Eisenkonzentrationen geregelt. Der Transport der Siderophore durch die Zellmembran ist ein energieabhängiger Prozess und stereoselektiv, da sich die molekulinterne Geometrie mit dem jeweiligen Metallion, das transportiert wird, ändert (Hider und Kong, 2010). Neben dem Transport von Eisen haben die Komplexbildner weitere Funktionen und Wirkungen. Es konnte gezeigt werden, dass einige Pilze Siderophore zur Steigerung der Virulenz bilden. Sie wirken als intrazelluläre Eisenspeicher und unterdrücken das Wachstum von anderen Mikroorganismen in der Wirtspflanze (Renshaw *et al.*, 2002; Brakhage, 2005). Intrazellulär freies Eisen führt zu einer cytotoxischen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, weshalb der Eisentransport bzw. die Lagerung in allen Zellen strikt reguliert ist (Philpott, 2006). Oide *et al.* (2006) konnten zeigen, dass extrazelluläre Siderophore Virulenzfaktoren sind. Eine Deletion eines Siderophorsyntheseenzym (*NRPS6*) führte nicht nur zu einer reduzierten Virulenz von *Cochliobolus heterostrophus* gegen die Wirtspflanze *Oryzae sativa*, sondern auch zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und einer verringerten asexuellen Sporenbildung in allen ebenfalls untersuchten Spezies. Das *Magnaporthe grisea* SSM1 Gen, welches für die intrazelluläre Biosynthese von Eisenkomplexbildnern erforderlich ist, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Pathogenität gegen Reis (Hof *et al.*, 2007). Auch hier zeigte sich eine erhöhte Empfindlichkeit der Mutanten gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies (Haas *et al.*, 2008). Unter dem Aspekt, dass inzwischen einige Pilze bekannt sind, bei denen die Produktion von Siderophoren eine wichtige Rolle bei der Pathogenität gegen ihre jeweilige

Wirtspflanze spielen, ist es besonders interessant, dass die beiden tracheomycotischen Pilze Pm und Pa bis zu 5 mg pro 100 mg Extrakt an Siderophoren bilden. Der Nachweis der Eisenchaletorenproduktion in der Pflanze ist allerdings wissenschaftlich noch zu erbringen (Lee *et al.*, 2005).

In den hier beschriebenen Versuchen wurden gerade dann besonders viele Eisenkomplexbildnern von Pm produziert, wenn Medium unter Zugabe von Weinblattextrakt (**M22**) fermentiert wurde (Kapitel 3.1.1.3). Die Siderophore wurden mit Hilfe einer HPLC-MS Analyse und ihren charakteristischen UV/Vis-Spektren detektiert. So konnte belegt werden, dass diese auch in Submerskulturen von Pm und Pa produziert werden.

In der Literatur wurde die Siderophorproduktion nur für Standkulturen beschrieben (Di Marco *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde bereits das zelluloseabbauende System dieser beiden Pilze untersucht und es zeigte sich, dass weder Pm noch Pa in der Lage sind, kristalline Zellulose abzubauen. Durch die mit Hilfe von Eisen gebildeten Hydroxylradikale wurde die Zellulosematrix angegriffen. Eine Steigerung der Siderophorproduktion durch Pm und Pa im Weinblattextrakt-Medium, wie sie hier dargestellt ist, ist somit nachvollziehbar (Osti und Di Marco, 2010).

Eine weitere Substanz, die besonders im Kulturfiltrat von Pa detektiert werden konnte, war Xylaron (Licht, 2012). Bei diesem Sekundärmetabolit handelt es sich um ein  $\alpha$ -Pyrone (McGlacken und Fairlamb, 2005). Vertreter der Stoffklasse der Pyrone wurde schon aus mehreren Mikroorganismen, darunter auch Pilzen isoliert. Zu diesen Pilzen gehören *Gyrostoma missouriensis* und *Trichoderma harzianum*, welche verschiedene Pyronderivate synthetisieren (Dickinson *et al.*, 1995). Xylaron selbst wurde bisher aber nur aus *Xylaria hypoxylon* isoliert und als schwach cytotoxisch gegenüber humanen Krebszelllinien beschrieben (Schüffler *et al.*, 2007). Eine phytotoxische Wirkung im Weinblatttropftest gegen *Vitis* sp. Blätter wurde demnach zum ersten Mal im Zuge dieser Arbeit beschrieben. Eine phytotoxische Wirkung anderer  $\alpha$ -Pyrone gegen *Brassica* sp. (Kohl) wurde aber bereits publiziert (Soledade *et al.*, 1994).

#### 4.1.2 Isolierung von Kaempferol-3-Glykosid

Es ist schon seit vielen Jahrzehnten bekannt, dass Kaempferol und Kaempferol-3-Glykosid, sowie andere Flavonole, zum Beispiel Quercetin, von Pflanzen als Sekundärmetabolite gebildet werden (Seigler und Price, 1976). Untersuchungen an wilden und transgenen *Petunia* Stämmen konnten zeigen, wie sich der Verlust oder die Steigerung der Flavonolproduktion auf das Verhalten der Pflanzen durch Bestrahlung mit natürlichem und UV-B angereichertem Licht auswirkt. Dabei wurde gezeigt, dass eine Reduktion der sich im Blatt befindenden Flavonole zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber UV-B Strahlung führt (Ryan *et al.*, 1998). Die Enzyme, die an der Biosynthese von

Kaempferol beteiligt sind, sind relativ häufig im Pflanzenreich anzutreffen (Miean und Mohamed, 2001). Zusätzlich werden Zucker, wie Glukose, Rhamnose, Galaktose und Rutinose häufig an Kaempferol gebunden und es bilden sich Glykoside. Einige dieser Glykoside von Kaempferol, wie zum Beispiel K3G, sind sehr häufig in der Natur zu finden. Daher sind auch die Enzyme, die zu ihrer Biosynthese benötigt werden weit verbreitet (z.B. die Flavonol-3-O-Glucosyltransferase, EC 2.4.1.91). Andere Glykoside (z.B. Kaempferol-3-p-Coumaroyltriglykosid) sind deutlich seltener und die für ihre Biosynthese nötigen Enzyme sind damit auch weniger häufig bei Pflanzen anzutreffen (Hrazdina *et al.*, 1982).

Kaempferol-3-Glykosid wurde durch Sánchez-Rabaneda (*et al.*, 2003) ebenfalls mit einem Massenspektrographen in *Theobroma cacao* nachgewiesen. Die phytotoxische Wirkung, die in Studien im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde, anhand derer das Glykosid isoliert wurde, konnte nach dem Auftropfen der Proben im *Vitis* Blatttropftest beobachtet werden (Kapitel 3.1.2.2).

Die Gruppe um Esposito *et al.* (2008) konnte ebenfalls beobachten, dass Kaempferol-Derivate eine moderate inhibitorische Wirkung auf *Prosopis velutina* und *Dactylis hispanica*, insbesondere auf das Streckungswachstum der Wurzel hatten. Im Gegensatz dazu wurden die Wurzeln von *Pleurocladus subulatum* nicht beeinträchtigt, oder sogar positiv im Wachstum stimuliert. Dies gibt erste Hinweise darauf, dass Flavonole auch phytotoxische Eigenschaften besitzen können.

Um zu validieren, ob die Glykosylierung und damit Detoxifizierung auch ohne Weinblattextrakt im Minimalmedium (**M13**) möglich ist, wurde Pm in Minimalmedium unter dem Zusatz von Kaempferol fermentiert.

#### 4.1.3 Fermentationsversuche mit *Phaeoemoniella chlamydospora* in Minimal-Medium mit Kaempferol

Zu Beginn der Versuche wurde Pm in HMG Medium (**M10**) Kolben 72 Stunden angezogen und das Myzel dann in MM (**M13**) Kolben überführt. Vortests zeigten, dass eine zu hohe Konzentration an Kaempferol (mehr als 25 mg/L) toxisch für den Pilz war; die Biomasse erhöhte sich nicht. Es mussten aber, um die Isolierung des Kaempferols und des Kaempferol-3-Glukosids detektierbare Mengen zu erhalten, mindestens 10 mg/L Kaempferol ins Medium zugesetzt werden.

Eine Studie konnte zeigen, dass Quercetin und Quercetin-3-O-Glukosid einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *Phytophthora sojae* Myzel haben. Im selben Test zeigte sich aber keine fungizide Wirkung beim Einsatz von Kaempferol (Rivera-Vargas *et al.*, 1993). Eine weitere Publikation kommt zu dem Schluss, dass die fungizide Wirkung der *Fabaceae Pithecellobium dulce*, die in Mexiko heimisch ist,

gegen die Pflanzenpathogene *Botrytris cinerea*, *Penicillium digitatum* und *Rhizopus stolonifer*, auf dem hohen Kaempferolgehalt der Pflanze beruht (Bautista-Baños *et al.*, 2003). Eine starke antifungische Aktivität von Kaempferol im Pflanzenextrakt, der aus der arabischen Gummi-Akazie (*Vachellia nilotica*) isoliert worden ist, zeigte sich beim Einsatz gegen Pilze, die vor allem Lagerungsschäden, d. h. Schäden während der Lagerung von Gemüse und Früchten nach der Ernte, hervorrufen (Tripathi *et al.*, 2002 und 2004). Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sind für die untersuchten Organismen und ihre Empfindlichkeit gegenüber Kaempferol sehr divers. Eine fungizide Wirkung von Kaempferol bei mehr als 25 mg/L gegen Pm wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen.

Ob Pm durch die Glykosylierung einen Weg gefunden hat, das in der Weinpflanze vorkommende Kaempferol zu neutralisieren, bleibt allerdings weiter Bestandteil der Forschung. Die Glykosylierung hat allerdings den Vorteil für den Pilz, das K3G in Mengen von bis zu 50 mg/L keinen negativen Einfluss auf das Wachstum des Pilzes hat. Es konnte anhand der HPLC-MS Analysen nachgewiesen werden, dass Pm in einem synthetischen Medium ohne den Zusatz von Pflanzenextrakt einen Teil der zugegebenen Menge an Kaempferol in Kaempferol-3-Glukosids umwandeln kann. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass keine Umwandlung der Substanz im Medium ohne Zugabe des Pilzes stattfand und, dass erst nach ca. 15 stündiger Inkubation eine messbare Menge Kaempferol-3-Glukosids vorhanden ist.

In diesem Zusammenhang wurden bereits Ergebnisse publiziert, die zeigen, dass andere Pilze in der Lage sind, diese Reaktion durchzuführen. Slana *et al.* (2011) beobachtete, dass *Rhizopus nigricans* Flavonoide in ihre glykosylierten Produkte umwandeln kann. Zusätzlich konnte bei diesem Pilz eine Steigerung der Transkriptmenge einer Glukosyltransferasen beobachtet werden.

Um nähere Erkenntnis über die Glykosylierung von Kaempferol durch Pm zu erhalten, wurden Enzymisolationsversuche durchgeführt.

#### 4.1.4 Enzymisolationsversuche mittels Proteinchromatographie (*in vitro* Glykosylierung)

Um einen *in vitro* Nachweis der Glykosylierung durch Pm eigene Enzyme von Kaempferol zu erbringen, wurden Myzelzellen des Pilzes mittels eines Ultraschallstabs aufgeschlossen und die isolierte Proteinfraktion mit Hilfe einer Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt (Kapitel 3.1.4). Die erhaltenen Fraktionen wurden mit Kaempferol und UDP-Glukose versetzt und inkubiert. Leider konnte nach verschiedenen Ansätzen, zum Beispiel mit vorinkubiertem Myzel, dass Kaempferol ausgesetzt wurde und weiteren veränderten Inkubationsbedingungen kein Kaempferol-3-Glukosid nachgewiesen



werden. Es lies sich auch kein Nachweis für eine Glykosyltransferase im Kulturfiltrat erbringen. Auch die gefällte und in Puffer resuspendierte Proteinfraaktion des Zellüberstands wies keine Glykosyltransferaseaktivität auf. Der Nachweis einer Glykosylierung *in vitro* lies sich bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht erbringen, eine Glykosylierung *in vivo* konnte jedoch mittels HPLC-MS Messung bestätigt werden (Kapitel 3.1.3).

Aus der Literatur sind zwar bereits einige UDP-Glykosyltransferasen aus Pilzen bekannt, diese spielen aber meist eine Rolle bei der Zellwandbiosynthese (Chang *et al.*, 2003). Somit steht die Bestätigung einer Flavonoid-Glykosyltransferase aus Pm noch aus.

#### 4.1.5 Weinpflanzeninjektionstest

Um zu untersuchen, ob in Weinpflanzen injiziertes Kaempferol-3-Glukosid zu Esca-ähnlichen Symptomen führt, wurde die Substanz mit Hilfe von sterilen Spritzen in die Stämme und Blattstiele von *Vitis vinifera* cv. 'Riesling' gespritzt.

Diese Versuche wurden auf Grundlage von bereits publizierten Ergebnissen zur Konvektion in Stämmen von Bäumen von 1970 durchgeführt. In diesen Studien wurde allerdings die Transpiration von Bäumen untersucht. Die dort gesammelten Ergebnisse zeigen aber, dass Substanzen in einen Stamm injiziert nach einiger Zeit, abhängig von der Pflanze, in den Blättern nachgewiesen werden können (Kline *et al.*, 1970; Robbins, 1981). Außerdem ist es allgemeiner Konsens, dass die beiden Esca-assoziierten Pilze Pm und Pa besonders häufig in den Leitungsbahnen der Weinpflanzen zu finden sind, weshalb sie auch als tracheomykotische Pilze bezeichnet werden (Valtaud *et al.*, 2009; Amalfitano *et al.*, 2011; Landi *et al.*, 2012). Daher ist es naheliegend, dass die von diesen beiden Pilzen produzierten Substanzen durch passiven Transport in die Blätter gelangen (Andolfi *et al.*, 2009).

Die ersten Experimente mit nur einer Injektion je Pflanze zeigten, dass die Pflanzen durch die Injektionen von K3G beeinflusst wurden. Es entstanden vorübergehende Welkeerscheinungen. Die Symptome blieben aber nur weniger als eine Stunde sichtbar. Die Kontrollpflanzen blieben ohne solche Effekte. Bei der Wiederholung der Versuche und mehrfacher Injektion zeigten sich bei den Pflanzen, die mit K3G behandelt wurden ebenfalls Welkesymptome und nach 1-5 Tagen erste Verfärbungen und Nekrosen der Blätter.

Es wurden bereits durch die Arbeitsgruppe um Bais *et al.* (2003) Versuche zur Phytotoxizität von einigen Flavonol-Verbindungen und ihren Zwischenprodukte durchgeführt. Dafür wurden Catechin, Naringenin, Kaempferol, Quercetin, Epicatechin und Dihydroquercetin auf ihre Wirkung auf die phänotypische Reaktion in den Bereichen von Spross- und Wurzeldifferenzierung sowie der Keimkraft

verschiedener Pflanzen untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass ab einer Konzentration von 250 µg/mL alle getesteten Flavonoide eine deutlich hemmende Wirkung zeigten. Generell waren die phytotoxische Wirkung und die Hemmung der Keimung bei rund 25 µg/mL bereits sehr deutlich zu sehen. Nur bei Catechin zeigte sich die Inhibition der Samenaktivität erst bei 50 µg/mL. Zusätzlich zeigten alle Pflanzen, mit Ausnahme der Flockenblume (*Centaurea maculosa*) nach 14 Tagen Inkubationszeit, nach der Zugabe von KAE eine erhöhte Sterblichkeit (Bais *et al.*, 2003).

Weitere Experimente mit K3G oder anderen Flavonoid-Glukosiden an Weinpflanzen, oder an Kalluskulturen könnten möglicherweise klären, welche Prozesse nach der Applikation der Substanzen in der Pflanze ablaufen. In wie weit die beobachteten Symptome mit K3G im Zusammenhang stehen und welche Prozesse in der Zelle ablaufen, könnte mit Kallus-Kulturen möglicherweise deutlich einfacher untersucht werden.

## **4.2 Polyketidsynthase-Deletionsmutanten von *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium aleophilum***

Untersuchungen bei weiteren pflanzenpathogenen Pilzen haben gezeigt, dass Polyketidsynthasen eine wichtige Rolle für die Pathogenität spielen können. Die Produktion von Melanin bei *Magnaportha oryzae* und die Produktion des T-Toxins, ebenfalls ein Polyketid durch *Cochliobolus heterostrophus* werden unter anderem durch Polyketidsynthasen katalysiert (Yang *et al.*, 1996; Böhnert *et al.*, 2004; Collemare *et al.*, 2008). Die Synthese der Substanzen Scytalon und Isoscleron, die ebenfalls Intermediate des Melanin-Biosyntheseweges sind, beruht daher auf der Funktionalität von Polyketidsynthasen. Die beiden Substanzen werden als essentiell bei der Genese der Esca typischen Symptome diskutiert (Abou-Mansour *et al.*, 2004; Bruno und Sparapano, 2006a, b). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Produktion dieser Substanzen und die Pathogenität der beiden Esca-assoziierten Pilze Pm und Pa nach einer Insertion in Polyketidsynthase-Gensequenzen verändern.

### **4.2.1 Herstellung von Deletionsmutanten**

Um die Deletionsmutanten der beiden Esca-assoziierten Pilze Pm und Pa zu erstellen wurde auf die Transformationsmethode mittels *Agrobacterium tumefaciens* und den Einbau der genetisch veränderten DNA durch homologe Rekombination nach Bundock *et al.* (1995) und de Groot *et al.* (1998) zurückgegriffen.

Nachdem die Transformation der beiden Pathogene durch die genannte Methode mit den Konstrukten für die Expression Fluoreszenzfarbstoffe gelungen war, sollte im nächsten Schritt untersucht werden,

ob auch eine gerichtete Transformation der Pilze möglich ist (Fischer, 2010a). In der hier vorgelegten Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen eine gerichtete Insertion in das Genom von Pm und Pa vorzunehmen. Es konnten jeweils zwei Sequenzen von putativen Polyketidsynthasen durch den Einbau des Markergens unterbrochen werden. Um den Leserahmen des Gens mit einer hohen Sicherheit zu unterbrechen wurden jeweils mindestens 300 bp der PKS durch die Hygromycin-Phosphotransferase-Sequenz ersetzt.

In den bisher veröffentlichten Publikationen wurde der Pilz Pm mittels Protoplastentransformation mit rekombinanter DNA transformiert, allerdings wurde auch in diesen Versuchen lediglich die Sequenz des *GF* Proteins ungerichtet in das Genom integriert (Bradshaw *et al.*, 2005; McLean *et al.*, 2009).

#### 4.2.1.1 Genetische Manipulation von *Phaeomoniella chlamydospora*

Polyketide sind eine wichtige Stoffklasse des Sekundärmetabolismus bei Pilzen (Keller *et al.*, 2005). Da diese Klasse der Naturstoffe bei einigen Pilze Virulenzfaktoren enthält, wurden bereits Studien mit Enzymen der beteiligten Stoffwechselwege als Targets für Fungizide durchgeführt (Schümann und Hertweck, 2006; Turgeon und Baker, 2007). Auch für den Esca-assoziierten Pilz Pm wurden inzwischen erste putativ pathogenitätsrelevante Polyketide beschrieben; so ist zum Beispiel für die Synthese von Scytalon eine Polyketidsynthase erforderlich (Bruno und Sparapano, 2006b). Aus diesen Gründen wurden zum Beginn dieser Arbeit Polyketidsynthasen ausgewählt um die ersten Insertionsversuche durchzuführen. Zusätzlich eigneten sich diese Enzyme besonders gut, da das Genom von Pm nicht sequenziert war und Polyketidsynthasen hochkonservierte Bereiche in ihrer Gensequenz aufweisen, die sich gut mit degenerierten Primer amplifizieren lassen (Nicholson *et al.*, 2001). Die genannten Primer wurden mit Hilfe von bereits beschriebenen Sequenzen mittels eines Literaturvergleichs erstellt (Bingle *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 2008). Mit dem generierten Vektor konnte die Transformation von Pm Sporen erstmals mittels *Agrobacterium*-vermittelter Transformation erfolgreich durchgeführt werden (Schwarz, 2011). Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwei der generierten Mutanten einen veränderten Melaninstoffwechsel nach der Insertion aufweisen. Es zeigte sich nämlich, dass diese Mutanten ein weiß-grünes Luftmyzel bilden. Diese Veränderung der Pigmentierung lässt den Verlust einer für die Melaninbiosynthese essentiellen Polyketidsynthase vermuten. Der Verlust der Melaninbiosynthese nach der Deletion einer PKS bei *Ceratocystis resinifera* konnte durch Tanguay *et al.* (2006) beobachtet werden. Scytalon ist eine Vorstufe von DHN-Melanin. Es wurden also im folgenden Verlauf der Untersuchungen Fermentationen mit diesen wenig oder nicht pigmentierten Mutanten durchgeführt (Yurlova *et al.*, 2008). Eine Insertionsmutante, die nicht mehr in der Lage ist Scytalon zu produzieren könnte zur Überprüfung der

These, dass es sich bei diesem Sekundärmetabolit neben Isoscleron und Pullulan um jene Substanzen handelt, die für die Blattsymptome bei der Infektion durch die beiden tracheomycotischen Pilze Pm und Pa verantwortlich sind, verwendet werden (Abou-Mansour *et al.*, 2004).

#### 4.2.1.2 Genetische Manipulation von *Phaeoacremonium aleophilum*

Mit dem Deletionsvektor pCAMB\_wPKS\_ko konnte bei dem Esca-assoziierten Pilz Pa eine Transformation durchgeführt werden (Bürckert, 2012; Grundmann, 2012). Auch bei dieser Transformation konnte die Insertion des Hygromycin-Phosphotransferase Gens ins Genom an der Stelle des nativen PKS2-Gens, mit Hilfe einer *Southern Blot* Analyse, bestätigt werden. Auch bei Pa konnten Mutanten mit einer veränderten Pigmentierung isoliert werden. Die Charakterisierung erfolgte wie bereits bei Pm beschrieben und im Kapitel 4.2.2 diskutiert. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation rekombinanter DNA oder durch die Protoplastierung des Myzels dieses Pilzes ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht veröffentlicht worden. Ebenso gibt es keine Publikationen zur erfolgreichen gezielten Insertionsmutagenese dieses Pilzes. Die seit kurzem publizierte Genomsequenz von Pa wird die weitere molekularbiologische Analyse etwaiger Angriffspunkte für Fungizide und die Erforschung der Pathogenese des Pilzes aber erheblich beschleunigen. Bereits die Sequenzierungen anderer pflanzenpathogener Pilze, wie *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea* und *Sclerotinia sclerotiorum* führten zu einer verbesserten Erforschung ihrer Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren und konnte somit zur Fungizidsuche beitragen (Dean *et al.*, 2005; Amselem *et al.*, 2011; Goodwin *et al.*, 2011).

#### 4.2.2 Fermentationscharakterisierung und Stresstests der Insertionsmutanten

Die durch die Inaktivierung des Gens entstandenen Insertionsmutanten zeigten eine stark reduzierte Pigmentierung des Luftmyzels.

Diese Beobachtung konnte auch schon bei *Colletotrichum lagenarium* Mutanten gemacht werden, deren PKS1 Gen deletiert worden war. In Mutanten konnten neben der stark reduzierten Pigmentierung auch der Verlust der Pathogenität beobachtet werden (Takano *et al.*, 1995). Der Pilz *Grosmannia clavigera*, ein Pathogen der nordamerikanischen Bergkiefer, wuchs als Albino-Mutante und produzierte kein Scytalon, nachdem eine PKS Gen mittels einer Resistenzgenkassette unterbrochen worden war (Wang *et al.*, 2010).

Um zu untersuchen, ob auch die Produktion der beiden Substanzen Scytalon und Isoscleron bei den drei ausgewählten Mutanten von Pm bzw. von Pa durch den Verlust der Polyketidsynthasefunktion

reduziert wird, wurden die Kulturfiltratextrakte der Pilze mittels HPLC analysiert. Analog zu Wang *et al.* (2010), der eine Unterbrechung einer Polyketidsynthase in *Grosmannia clavigera* vornahm, konnte bei den Mutanten 2 und 6 (Pm) und den Mutanten 6 und 8 (Pa) eine geringere Substanzmenge dieser beiden Metabolite (Scytalon und Isoscleron) beobachtet werden. Die Insertionsmutanten produzierten teilweise 60 Prozent weniger Scytalon und Isoscleron im Vergleich zum untersuchten Wildtyp-Stamm. Weshalb die Produktion der beiden Substanzen nicht gänzlich verloren ging ist allerdings noch zu untersuchen.

Wang untersuchte in seiner Dissertation 2002 einen Erreger der Blaufäule der Monterey-Kiefer, *Ophiostoma floccosum*. Er konnte feststellen, dass die Inaktivierung einer Scytalon Dehydratase zum Verlust der Melanin-Biosynthese dieses Pilzes führte. Die Umwandlung von 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin (1,3,6,8-THN) zu Scytalon wurde in diesem Fall unterbrochen. Allerdings zeigte sich, dass die THN1 Reduktase aus der Vorstufe 1,3,6,8-THN Vermelon produzierte und die Pigmentierung teilweise wieder hergestellt werden konnte (Wang, 2002). Vermelon ist wie Scytalon eine Intermediat der Melaninbiosynthese (Bell *et al.*, 1976).

Wie anhand von Weinpflanzen-Blatttropftests gezeigt werden konnte, ist die Produktion an phytotoxischen Sekundärmetaboliten bei allen Mutanten sowohl bei Pm als auch bei Pa reduziert. Nach der Auftrennung mittels HPLC ergaben sich außerdem leicht veränderte Aktivitätsmuster im Weinpflanzen-Blatttropftest (Licht, 2012).

Nielsen *et al.* (2011) konnte zeigen, dass durch die Inaktivierung aller 32 putativen Polyketidsynthase-Gene in *Aspergillus nidulans* die Biosynthese von Sekundärmetaboliten stark verändert wird. Allerdings konnte ebenfalls beobachtet werden, dass nur eine der 32 Mutanten nicht in der Lage war zu sporulieren, keine der Deletionen war letal. Auch in *Gibberella zeae* konnte eine Veränderung der Menge der Mycotoxine Zearalenon, Aurofusarin und Fusarin C nach der Inaktivierung einzelner PKS beobachtet werden. Zusätzlich wurde nach der Inaktivierung des Gens *PGL1* die Produktion des charakteristischen Pigments in den Perithezien unterbrochen (Gaffoor *et al.*, 2005). Auch bei *Colletotrichum lagenarium* konnte eine veränderte Pathogenität durch den Verlust der Melanin-Biosynthese durch die Deletion der PKS 1 beobachtet werden, allerdings wurde nicht analysiert in wie weit sich das Spektrum der anderen Metabolite und möglicher Vorstufen verändert (Takano *et al.*, 1995).

In einer weiteren hier diskutierten Untersuchung wurden die ausgewählten Insertionsmutanten auf Stressmedien und unter wechselnden Temperaturen inkubiert. Natriumchlorid wurde eingesetzt um Trockenstress zu simulieren und mit Hilfe von Sorbitol ist es möglich den osmotischen Schock wie in

der infizierten Pflanze nachzuahmen. Mit Hilfe von Wasserstoffperoxid lässt sich ein eine Ausschüttung von ROS 'reactive oxygen species' als oxidativer Stress, den die Pflanze zur Verteidigung einsetzt, darstellen (Daudi *et al.*, 2012). Da sich bei einigen halophilen Pilzen je nach Salzkonzentration des Mediums der Melanisierungsgrad der Zellwand ändert und die Zellwandintegrität bei der Salztoleranz eine große Rolle spielt, sollten Mutanten mit einer stark reduzierten Pigmentierung stärker auf die Anreicherung von NaCl im Medium, reagieren als dies für die Wildtyp-Stämme der Fall ist (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009). Auch durch den Einsatz von Wasserstoffperoxid im Medium kann untersucht werden, in wie weit die Zellwandstabilität bei den Insertionsmutanten beeinträchtigt ist. Bei *Aspergillus fumigatus* konnte ebenfalls eine stark erhöhte Empfindlichkeit gegen Wasserstoffperoxid der Mutanten mit gestörter Pigmentierung der Zellwand, beobachtet werden (Jahn *et al.*, 1997).

Die starken Unterschiede bei der Reaktion der einzelnen Mutanten auf die Stresstests sind besonders ausgeprägt bei den Transformanten von Pm. Während Mutante 15 eine um fast 100 Prozent erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp-Stamm hat, konnte bei der Mutante 2 bei 18 °C kein Wachstum beobachtet werden. Bei Pa zeigte sich die Mutante 8 deutlich sensitiver als Mutante 2 bei den gegebenen Stressbedingungen. Die starken Abweichungen der Ergebnisse spiegeln sich zum Teil im korrelierenden Pigmentierungsgrad der einzelnen Mutanten wieder. Gerade die Mutanten mit einer starken Reduktion der Sekundärstoffproduktion, in Bezug auf die beiden analysierten Substanzen, reagierten besonders empfindlich auf externen Stress und wuchsen deutlich verlangsamt.

Pihet *et al.* (2009) konnten bereits bestätigen, dass Melanin für die Zellwandstruktur von *Aspergillus fumigatus* wichtig ist. Bei *Glarea lozoyensis*, dem Produzenten von Pneumocandinen, von denen einige semisynthetische Derivate als Fungizide in der Humanmedizin eingesetzt werden, führte die Deletion der PKS1, die für eine Tetrahydroxynaphthalin Synthase codiert, ebenfalls zum Verlust der Melanisierung (Zhang *et al.*, 2003).

Da die Insertionsmutanten von Pm bzw. Pa noch in der Lage sind Scytalon und Isoscleron zu produzieren und nur bei einer Mutante der vollständige Verlust der Melanin-Biosynthese beobachtet werden konnte, sollten in folgenden Studien, im Anschluss an diese Arbeit weitere Gene des Melanin-Biosynthese-Weges inaktiviert werden. Besonders interessant wäre die Inaktivierung der 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin Reduktase, deren Gensequenz für Pa (*Togninia minima*) bereits online einsehbar ist (<http://genome.jgi.doe.gov/cgi-bin/dispGeneModel?db=Phaal1&id=1202>, Blanco-Ulate *et al.*, 2013a).

### 4.2.3 Weinpflanzeninfektionsstudie

Um zu untersuchen in wie weit die Polyketidsynthase-Insertionsmutanten bezüglich Pathogenität und Virulenz gestört sind, wurde eine Weinpflanzeninfektionsstudie im Gewächshaus des DLR, Arbeitsbereich „Mykologie im Weinbau“ von Dr. Andreas Kortekamp durchgeführt. Als Kontrollen wurden sowohl Wildtyp-Stämme der beiden Pilze Pm und Pa, sowie zwei fluoreszenzmarkierte Mutanten eingesetzt. Von den Insertionsmutanten wurden jeweils drei verschiedene Mutanten je Pilz (Pm bzw. Pa) untersucht. Es handelte sich um die gleichen Mutanten, die fermentiert und in Stresstests untersucht worden waren (Kapitel 3.2.2 und 3.3.2). Aus den nicht infizierten Kontrollpflanzen konnten weder Pm noch Pa nach der Inkubationszeit isoliert werden. Es wurden lediglich drei endophytische Pilze und zwei Hefen auf den Isolationsplatten identifiziert. Aus fast allen anderen Pflanzen wurden neben den Insertionsmutanten und den Wildtypstämmen, die ebenfalls durch eine künstliche Infektion eingebracht worden waren, endophytische Pilze isoliert und charakterisiert. Es zeigte sich, dass aus vier der Weinpflanzen zwei identische und aus fünf Pflanzen ein identischer Pilz isoliert werden konnten. Bei zwei der isolierten Stämme handelt es sich um *Aureobasidium* sp. und *Trichoderma* sp., die regelmäßig aus Weinpflanzen isoliert werden können (González und Tello, 2011).

Im Fall von Pm konnte nur der Wildtyp reisoliert werden, wohingegen die Fluoreszenzmutante nicht wieder anhand ihrer Morphologie, der Fluoreszenz und der PCR Kontrolle detektiert werden konnte. Bei Pa wurde die Fluoreszenzmutante isoliert, nicht aber der Wildtyp. Da diese Kontrollen jedoch miteinander verglichen werden können, da die Fluoreszenzmutanten und die Wildtyp-Stämme keine Unterschiede im Wachstum und im Stressverhalten zeigten, wurde je auf nur eine Kontrolle zurückgegriffen.

McLean *et al.* (2009) konnten ebenfalls zeigen, dass keine Unterschiede in der Pathogenität zwischen denen, von seiner Arbeitsgruppe erstellten Fluoreszenzmutanten und dem Wildtyp-Stamm von Pm zu beobachten sind. Auch die Arbeitsgruppe um Landi *et al.* (2012) konnte zeigen, dass mittels Protoplastentransformation erstellte Mutanten die verwendeten Pflanzenteile kolonisierten und in das Pflanzengewebe bis zu 30 cm einwachsen.

Es gibt inzwischen einige Studien, die zeigen, dass Polyketidsynthasen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von pflanzeninfizierenden Pilzen spielen. Ein Indiz ist die Anzahl an Polyketidsynthasegenen, die in pathogenen Pilzen viel häufiger im Genom zu finden sind, als bei nahe verwandten, apathogenen Arten (Yoder und Turgeon, 2001; Idnurm und Howlett, 2001; Yu und Keller, 2005).

Bei Versuchen von Maier *et al.* (2005) konnte eine *Fusarium* sp. Mutante isoliert werden, deren Myzel

deutlich schwächer pigmentiert war, als jenes des Wildtyp-Stamms. Die Ausprägung dieses Phänotyps war jedoch nicht bei allen Mutanten gleich stark. Diese Ergebnisse stützen somit die hier dargestellten Resultate.

Eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit des Myzels der hier generierten Pm und Pa Mutanten auf den Agarplatten konnte ebenfalls beobachtet werden. Nach der Deletion der PKS war das radiale Wachstum der Mutanten bis zu 68 Prozent geringer. Diesen Effekt zeigten aber nicht alle Esca-Mutanten im gleichen Maße. Gaffoor *et al.* (2005) konnten bei *Fusarium* sp. zeigen, dass durch die Deletion einer PKS die Wachstumsgeschwindigkeit deutlich abnahm.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich aber, im Gegensatz zu anderen Pilzen, die Polyketidsynthasen als Pathogenitätsfaktor aufweisen, zum Beispiel *Magnaporthe oryzae* (Chumley und Valent, 1990) und *Bipolaris oryzae* (Moriwaki *et al.*, 2004), dass die hier unterbrochenen Gene keinen Einfluss auf die Pathogenität von Pm und Pa haben. Lediglich die Mutante von Pm  $\Delta$ PKS2 2(LL) konnte nicht reisoliert werden und ist somit nicht in die Pflanze eingedrungen.

Da im Genom von pathogenen Pilzen häufig mehr als 10 putative Polyketidsynthasegene detektiert werden können (Dean *et al.*, 2005), ist mit diesem Versuch aber noch nicht bewiesen, dass Polyketidsynthasen keine Rolle bei der Pathogenität der beiden tracheomycotischen Pilze Pm und Pa spielen. Zusätzliche weitere Insertionsmutanten könnten hier aufschlussreich sein.

Eine Analyse des inzwischen sequenzierten Pilzes Pa zeigt 14 putative Gensequenzen, die Polyketidsynthase-Domänen aufweisen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=Togninia+minima+polyketide+synthase>). Diese 14 Genomabschnitte könnten in weiteren Analysen ebenfalls inaktiviert werden, um ihren Einfluss auf den Phänotyp, die Pathogenese und das Sekundärmetaboliten Spektrum zu untersuchen. Erste Versuche weitere Insertionsvektoren zu erstellen, werden bereits am IBWF durchgeführt (Adams, 2014).

### **4.3 Studien zur Erforschung der Interaktion der Esca-assoziierten Pilze**

In den letzten Jahren der Esca Forschung wurden einige Untersuchungen zur Interaktion zwischen den einzelnen Pilzen und der Pflanze vorgenommen, um die bis heute schlecht untersuchten Grundlagen der Wirt-Pathogen-Interaktion der assoziierten Pilze und die Entstehung der Symptome aufzuklären (Larignon und Dubos, 1997; Mugnai *et al.*, 1999; Bruno und Sparapano, 2006a und b). Es wurde versucht die Krankheitssymptome *in vitro* zu generieren (Cortesi *et al.*, 2000) und die rasante Ausbreitung der Krankheit in Folge des Klimawandels und als Produkt eines verfehlten Weinbergmanagements zu beleuchtet (Hofstetter, 2012). Die Untersuchungen haben bisher leider nur



wenig zum besseren Verständnis der Interaktion der Pilze und der Wirtspflanze, während des Krankheitsverlaufs beigetragen. Es ist bekannt, dass Fm Weißfäule in *Vitis* sp. auslöst und dass dieser Pilz die dafür nötigen Enzyme produziert und sekretiert (Fischer, 2010b). Die Infektion durch diesen Pilz findet wohl vor allem über Schnittwunden statt. *Eutypa* führt durch seine Infektion zur Eutypiose und sekretiert die Substanz Eutypin (4-hydroxy-3-(3-methyl-3-butene-1-ynyl)benzaldehyde; Tabacchi *et al.*, 2000), die durch ihre protonophore Wirkung die Struktur und Funktion der Mitochondrien negativ beeinflusst und phytoxisch ist (Camps *et al.*, 2010). Dieser Pilz ist in seiner Ätiologie am besten charakterisiert und es sind bereits einige biologische Bekämpfungsmethoden beschrieben (siehe Kapitel 4.5.3). Aber besonders über die Grundlagen der Pilz-Pflanze-Interaktion der beiden tracheomycotischen Pilze Pm und Pa ist bis heute nur sehr wenig bekannt. Es wird lediglich von einer Infektion über Schnittwunden ausgegangen (di Marco und Osti, 2007). Aus diesem Grund beschäftigten sich einige Studien damit, die Schnittwunden mit Hilfe von biologischen und chemischen Fungiziden besser gegen die Esca-Erreger zu schützen (Halleen *et al.*, 2010; Rolshausen *et al.*, 2010). Die Ergebnisse diese Versuche sind bisher jedoch noch nicht zufriedenstellend und bedürfen der Verbesserung der Wirksamkeit der eingesetzten Produkte (Bester *et al.*, 2007).

Der hier durchgeführte Versuch sollte neue Erkenntnisse bringen, in wie weit sich die Interaktion und das Wachstum der einzelnen Esca-assoziierten Pilze auf Agarplatten verändert, wenn verschiedene Stressbedingungen simuliert werden; so zum Beispiel Hitzestress, osmotischer Stress oder Salzstress. Denn es konnte auch gezeigt werden, dass die individuellen Pilze unterschiedlich auf sich verändernde Temperaturen und Trockenstress reagieren. So sind Pm und Pa weitgehend gut angepasst an erhöhte Temperaturen und wachsen selbst bei 30 °C fast optimal. Die Ergebnisse von Whiting *et al.* (2001) konnten somit durch diese Arbeit bestätigt werden.

Es bleibt aber die Frage, was zum Ausbruch der Esca Krankheit führt? Dies vor allem unter dem Aspekt, dass die Symptome nicht jedes Jahr an der gleichen Pflanze zu finden sind, und dass zwischen chlorotischem oder apoplektischem Verlauf unterschieden werden kann (Surico, 2009).

Es zeigte sich, dass sich die einzelnen Pilze einander sehr wohl beeinflussen. Obwohl Fm auf den HMG-Agarplatten stets das schnellste radiale Wachstum besitzt, wird er durch Pm und Pa im Wachstum gehemmt und bildet braune Pigmente im Myzel. Bei den beschriebenen Versuchen zeigten sich zusätzlich die ähnlichen Ergebnisse wie von Bruno und Sparapano publiziert (2007). Es konnte beobachtet werden, dass Pm und Pa sich gegenseitig am Wachstum hindern.

Jedoch zeigte sich im Unterschied zu der oben genannten Studie, dass sowohl Pa, als auch Pm in der Länge waren, Fm im Wachstum zu hindern, sobald sobald die Pilze aufeinander zuwuchsen. Dies

könnte damit zusammen hängen, dass andere Stämme der jeweiligen Pilze untersucht wurden oder veränderte Bedingungen verwendet wurden. Es konnte ebenfalls die durch erhöhte Enzymaktivität entstandene bräunlich verfärbte Fläche im Agar detektiert werden, die Bruno und Sparapano (2007) beschrieben haben. In den hier beschriebenen Ergebnissen konnte beobachtet werden, dass Fm deutlich empfindlicher auf höhere Temperatur reagiert als die beiden tracheomycotischen Pilze. Die Hemmung zwischen El und den beiden Pilzen Pm und Pa war nicht so eindeutig wie in den Versuchen mit Fm. El ist jedoch bei 32 °C kaum oder überhaupt nicht auf den verwendeten Agarplatten gewachsen.

Diese Sensitivität bei Temperaturen über 30 °C deckt sich mit den Beobachtungen, die Amborabé *et al.* (2005) gemacht haben. Auch in ihrem Isolationsversuch konnte eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes bei hohen Temperaturen beobachtet werden. Die Behinderung des gegenseitigen Wachstums von El und den beiden Pilzen Pa und Pm könnte indes ein Grund dafür sein, dass die drei Pilze bei der Isolation aus dem Weinstock nicht im selben Gewebe gefunden werden können. Bei den Versuchen durch Serra *et al.* (2000) wurde Pm nämlich vor allem im schwarz verfärbten Innenmark des Stammes isoliert während El im oberen Teil des befallenen Stumpfes vorzufinden war.

Es ist also festzuhalten, dass die Pilze sehr unterschiedlich aufeinander reagieren und bei einigen Kombinationen der Esca-assoziierten Pilze eine Hemmung des jeweils anderen *in vitro* auf Festmedien zu beobachten ist. Die hier dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass sich die Zusammensetzung des pathogenen Endophytenpektrums durch veränderte klimatische Bedingungen ändert und dass nicht alle Esca-assoziierten Pilze gleich mit veränderten Umweltbedingungen umgehen können. Dieser Aspekt ist von großer Bedeutung wenn man verstehen will, welche genetischen und physiologischen Ereignisse und Grundlagen zum Ausbruch der Esca Krankheit und den beobachteten Krankheitssymptomen führen. In wie weit ähnliche Effekte auch in der Pflanze, bei der Verteilung der Pilze in den unterschiedlichen Geweben von Bedeutung sind, lässt sich nur anhand von *in vivo* Studien mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Mutanten bestimmen. Es konnte die von Bruno und Sparapano (2007) beobachtete Anregung der Enzymaktivität bei Cokultivierung der drei erstgenannten Pilze bestätigt werden. Erste Schritte, um die Pilze und ihr Wachstum auch in der Pflanze beobachten zu können sind im folgenden Kapitel (4.4) vorgenommen worden. Nachdem in die Genome der drei Esca-assoziierten Pilze Pm, Pa und El bereits mit Hilfe verschiedener Transformationsmethoden rekombinante DNA, die für Fluoreszenzproteine kodiert eingebracht werden konnten (Fischer, 2010a), sollte noch der letzte, während dieser Arbeit verwendete Pilz *Fm. mediterranea* genetisch manipuliert und somit GFP-markiert werden.

#### 4.4 Fluoreszenzmarkierte *Esca*-assoziierte Pilze und in vivo-Versuche

Wie bereits beschrieben wurden Versuche unternommen alle vier hier untersuchten *Esca*-assoziierten Pilze durch rekombinante DNA zu markieren. Die beiden Pilze Pm und Pa konnten mit Hilfe der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation mit den Sequenzen für DsRed und CFP (Cyan Fluoreszenz Protein) bereits im Vorfeld dieser Arbeit genetisch verändert werden.

Die Transformationen erfolgten, mit leichten Abwandlungen nach den Protokollen, die für *Magnaporthe oryzae* etabliert sind (Rho *et al.*, 2001). In das Genom von *Eutypa lata* konnte mit Hilfe der Protoplastentransformation genetisch manipuliert werden (Fischer, 2010a).

Als letztes wurde versucht in das Genom des Weißfäuleerregers *Fm. mediterranea* die Gensequenz, welche für ein Fluoreszenzprotein codiert, einzubauen.

##### 4.4.1 Einbringung eines Fluoreszenzprotein-codierenden Gens in das Genom von *Fomitiporia mediterranea*

Im Jahr 2012 wurde die Genomsequenz des Pilzes Fm publiziert (<http://genome.jgi.doe.gov/Fomme1/Fomme1.home.html>). Da es bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht gelungen war die Gensequenz eines Fluoreszenzproteins in das Genom einzubringen und im Myzel des Basidiomyceten ein solches Protein heterolog zu exprimieren, wurde mit Hilfe der nun verfügbaren Genomsequenz ein neuer Expressionsvektor mit Fm spezifischen Promotoren generiert. Bisher ist es jedoch trotz der erfolgreichen Erstellung dieses Vektors auf Basis des binären pCamb0380-Vektors nicht gelungen den Pilz genetisch zu manipulieren. Zusätzlich wurde noch kein Protokoll zur Transformation dieses Pilzes publiziert. Es wurden anhand des Genoms bisher lediglich Sequenzvergleiche mit anderen *Agaricomycetes* durch Morgenstern *et al.* (2008 und 2010) durchgeführt, bei denen Sequenzen für pilzliche Peroxidasen (Klasse II) auffindig gemacht werden konnten.

##### 4.4.2 Charakterisierung der Fluoreszenzmutanten von *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* und *Eutypa lata* mittels Weinpflanzenwachstumsversuchen und Fluoreszenzmikroskopie

Im Jahr 2012 wurde eine Kolonisationsstudie von GFP-markierten Pm Stämmen veröffentlicht (Landi *et al.*, 2012). Die verwendeten Pm Mutanten wurden durch eine Protoplastentransformationsmethode unter Verwendung von Polyethylenglycol generiert. Der verwendete Vektor enthielt ebenso wie die

Vektoren, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, eine Hygromycin-Resistenzkassette und die Sequenz des GF Proteins, die jedoch unter der Regulation des *ToxA* Gen Promotors aus *Pyrenophora tritici-repentis* stand.

Es konnte im Rahmen der hier durchgeführten Vorversuche gezeigt werden, dass es die Transformation der beiden Pilze Pm und Pa auch mit Hilfe der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation ermöglicht, rekombinante DNA in das pilzliche Genom zu intrigieren. Zudem ist die Transformationseffizienz durch *Agrobacterium tumefaciens* um bis zu 50 mal höher, als bei der Protoplastentransformation (Cardoza *et al.*, 2006).

In ihrer Studie infizierten Landi (*et al.*, 2012) Stecklinge unter anderem vom *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet Sauvignon' und von *V. rupestris*. Diese wurden durch das Eintauchen in eine Konidiensuspension des ausgewählten Pilzes Pch-sGFP71 beimpft und bei ca. 4 °C und ca. 25 °C inkubiert. Nach sechs Monaten Inkubation der Weinpflanzen wurden diese in 5 cm lange Segmente unterteilt und die Präparate mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nach sechs Monaten bei 4 °C kein Pilzwachstum zu beobachten war. Bei 25 °C war Pm in der Lage das Holz des Kultivars zu kolonisieren.

Die Expression des GF Proteins konnte in der genannten Studie, ebenso, wie im hier diskutierten Versuch im Xylem-Bereich, in erster Linie um die Gefäße lokalisiert werden. Im hier gezeigten Experiment wurden die beiden Pilze Pm und Pa nach dreimonatiger Inkubation 7 bzw. 10 cm unterhalb der Infektionsstelle detektiert. Die Ergebnisse laut Literatur lagen bei bis zu 30 cm. Allerdings wurden die Pflanzenstücke sechs Monate inkubiert, bei einer um 3 °C höheren Temperatur. Landi *et al.* (2012) konnten zeigen, dass die Eindringtiefe der Pilze vom beimpften Weinpflanzenkultivar abhängt. Im Fall von *V. vinifera* cv. 'Cabernet Sauvignon' konnte die Fluoreszenz der Pm Mutante lediglich in einer Tiefe von 10-15 cm nachgewiesen werden, während der Pilz beim Kultivar 'Montepulciano' 30 cm unterhalb der der Inokulationsstelle beobachtet werden konnte.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis aus diesem Versuch ist der Nachweis, dass die genetisch veränderten Organismen die gleiche Infektionsrate wie die verwendeten Wildtyp Stämme aufweisen. Alle Fluoreszenzmutanten von Pm und Pa konnten aus den vorher infizierten *V. vinifera* Pflanzen nach drei Monaten reisoliert werden. Dies ließ sich durch die hier dargestellte Studie nicht für El bestätigen. El konnte lediglich in zwei der drei Testpflanzen nachgewiesen werden.

McLean *et al.* (2009) konnte zeigen, dass die Integration des rekombinanten Fluoreszenzgens keinen Einfluss auf die Infektionsrate im Vergleich zum Wildtypstamm von Pm hat. Diese Aussagen müssen für die beiden Pilze Pa und El erst noch bestätigt werden.

Im hier durchgeführten Versuch konnte jedoch gerade bei Pa gezeigt werden, dass die Infektion der Schnittstellen durch die Fluoreszenzmutante in allen Fällen gelang. Das Wachstum wurde zusätzlich anhand der Fluoreszenz im Kernholz des Stammes detektiert. El wurde vermehrt direkt unterhalb der Rinde der Pflanze beobachtet. Ein gezieltes Wachstum entlang der Leitungsbahnen der Pflanze wurde für diesen Pilz nicht beobachtet. Studien zeigten aber, dass El besonders direkt unter der Infektionsstelle im Stamm der Pflanze gefunden wird und dort die größten Veränderungen des Pflanzengewebes hervorruft. Allerdings wurde El Myzel auch immer wieder in der Nähe des Xylems und Phloems gefunden (Moller und Kasimatis, 1978; Chapuis *et al.*, 1998; Rudelle *et al.*, 2005, Bertsch *et al.*, 2013).

Es lässt sich nicht ausschließen, dass die für diese Arbeit verwendeten Pflanzen zu jung waren, oder die Infektion nicht weit genug fortgeschritten war, um eine fundiertere Aussage zu treffen. Die Wachstumsversuche mit den verwendeten Fluoreszenzmutanten müssten für weitere Untersuchungen in älteren Pflanzen mit einem ausgeprägten Stamm wiederholt werden um das Myzel gezielt im Xylem, dem Kambium, dem Mark oder der Rinde zu lokalisieren.

#### **4.5 Screening zur Identifikation von antagonistischen Organismen für den biologischen Weinbau**

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse des Antagonisten-Screenings diskutiert. Es konnten während dieser Arbeit mehrere potentielle Pilz- und Bakterien-Stämme isoliert und charakterisiert werden, die als potentielle Antagonisten für den biologischen Weinbau getestet werden können. Es wurde vor allem nach Stämmen der Gattung *Trichoderma* und nach endophytischen Pilzen gesucht, die besonders für den Pflanzenschutz geeignet sind. Es wurde zusätzlich eine genauere Analyse der antagonistischen Wirkmechanismen bei zwei Endophyten vorgenommen.

##### **4.5.1 *Trichoderma* Stämme für den biologischen Pflanzenschutz im Weinbau**

Pilze der Gattung *Trichoderma* können aus Bodenproben, Totholz und vielen anderen Formen von pflanzlichem Material isoliert werden. Die große Mehrheit der Arten wurde bis zum heutigen Tag den imperfekten Pilzen zugerechnet, da in fast allen Fällen keine sexuellen Formen bekannt sind. Die Gattung der Trichodermen zeichnet sich durch ein schnelles Wachstum auf den meisten Kulturmedien und durch die Produktion einer großen Anzahl von Sporen (Konidien) in kurzer Zeit aus. Die Kolonien haben dann meist eine grünliche Färbung auf der Oberseite, die auf der Pigmentierung der Konidien basiert (Weindling, 1932). Die Unterseite der Agarplatten färbt sich in der Folge des Wachstums medienabhängig weißlich, über gelb bis hin zu orange (Gams und Bissett, 1998). Die meisten Arten

produzieren zusätzlich große Mengen an dickwandigen Sporen, sogenannte Chlamydosporen durch die Umwandlung von Hyphenzellen (Bissett, 1991). Bereits seit den frühen 1930er Jahren werden *Trichoderma*-Stämme als biologische Pflanzenschutzmittel erforscht. In dieser Zeit wurden erste Sammlungen über Pilzkrankungen im Land- und Forstbau erstellt, die mit Hilfe von *Trichoderma*-Spezies bekämpft werden können (Falck, 1931). Die weitere Erforschung der Gattung führte so schon früh zur Entwicklung von kommerziellen *Trichoderma*-Produkten, die besonders in Sonderkulturen bis zum heutigen Tag weltweit eingesetzt werden (Thom, 1941; Schuster und Schmoll, 2010; Mukherjee *et al.*, 2013). Die Untersuchungen, die bisher mit Pilzen der Gattung in vielen Anwendungsgebieten gemacht wurden, zeigen, dass die Schutzmechanismen sehr vielfältig sind. Um Pflanzenschutzmittel effektiv einsetzen zu können, ist es wichtig, dass die Grundlagen der biologischen Aktivität verstanden werden (Sharon *et al.*, 2011). Die *Trichoderma* Spezies bieten aber aufgrund ihres breiten Wirkspektrums und der möglicherweise sehr spezifischen und diversen Wirkmechanismen eine gute Alternative für den biologischen Pflanzenschutz. Eine der wichtigsten Eigenschaften von Mitgliedern der Gattung ist ihre Fähigkeit andere Pilze zu parasitieren (Druzhinina *et al.*, 2011). Diese Eigenschaft wurde ebenfalls Anfang des vergangenen Jahrhunderts bei der Erforschung von Zitruskeimlingen, die mit *Rhizoctonia solani* infiziert waren und mit Hilfe von mycoparasitierenden *Trichoderma* sp. behandelt werden konnten, beobachtet (Weindling, 1932). Es zeigte sich, dass die Hyphen des Antagonisten die Zellen des Pathogens penetrieren und anschließend das Zytoplasma auflösen. Dieses Phänomen wurde unabhängig von der Zufuhr von Nährstoffen durch die Wirtspflanze beobachtet.

Diese Mykoparasitismus ließ sich auch während dieser Studie, besonders im Einsatz gegen Fm beobachten. Da sowohl *Trichoderma* Stämme als auch Fm rasch wachsen, lies sich die Lyse des Fm Myzels gut verfolgen. Pertot *et al.* (2009) konnten protektive Eigenschaften von *Trichoderma atroviride* SC1 gegen weinpathogene Pilze im Einsatz bei Weinpflanzen nachweisen.

Einen weiteren Wirkmechanismus gegen pathogene Pilze zeigen einige *Trichoderma* Arten, die Gliotoxin sekretieren (Brian, 1944). Ob dieses Toxin, alleine dafür verantwortlich gemacht werden kann, dass diese Arten die Rhizosphäre dominieren können und wie weit das Toxin ein aktives Prinzip dieser biologischen Pflanzenschutzmittel ist, bleibt noch umstritten (Reino *et al.*, 2008). Es konnte nachgewiesen werden das Gliotoxin antifungisch gegen die Esca-assoziierten Pilze wirkt (Degenkolb *et al.*, 2006 und 2008). Während der hier diskutierten Versuche mit den IBWF eigenen Stämmen wurde aber nur in drei Fällen, und dabei auch nur zweimal bei Pa und einmal in Verbindung mit El eine Hemmhofentwicklung gegenüber den getesteten *Trichoderma* Stämmen beobachtet. Das eine Wirkung von Gliotoxin im 96-Loch-Plattentest, der als Kontrolle der Ergebnisse durchgeführt wurde, gerade bei Pm zu beobachten war, könnte damit erklärt werden, dass die untersuchten *Trichoderma* Stämme im

durchgeführten Test zu wenig oder kein Gliotoxin produzierten, was sie wiederum interessant macht. Denn Stämme die antifungisch gegen Pm wirken, aber kein Toxin produzieren sind im Feldversuch deutlich ungefährlicher für Menschen.

Neuere Untersuchungen zur Entschlüsselung der möglichen Mechanismen der biologischen Kontrolle lassen weitere biologische Aktivitäten vermuten. Unter Anderem ist die Produktion von Chitinasen und Glucanasen für eine Reduktion potentieller Pflanzenpathogene von Bedeutung. Diese Enzyme bauen die Polysaccharide, das Chitin und die Glukane der pilzlichen Zellwand ab, wodurch die Zellwandintegrität gestört wird (Gajera und Vakharia, 2010). In wie weit die Produktion von Glucanasen durch *Trichoderma* spp. zu einer Reduktion der Esca Symptome führen könnte stellt eine weitere interessante Frage dar, die im Zusammenhang mit der Koinkubation der Pilze untersucht werden könnte.

Abgesehen von der antimykotischen Wirkung von *Trichoderma* spp. gegen eine Vielzahl pathogener Pilze scheint die Stärkung der pflanzeigenen Abwehr ein weiterer Effekt zu sein. Es wurden inzwischen erste Ergebnisse veröffentlicht, die unter anderem auf eine Aktivierung der Pflanzenabwehr durch die Sekretion von kurzen Peptiden durch *Trichoderma* spp. hinweisen (Viterbo *et al.*, 2007). So könnten Elicitoren, die von antagonistischen Stämmen abgegeben werden die Regulation von abwehrinduzierenden Genen beeinflussen (Hanson und Howell, 2004). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Hyphen in die obere Epidermisschicht von Gurken eindringen, was zu einer Erhöhung der Peroxidase-Aktivität, einer Produktion von fungitoxischen Verbindungen, einer Erhöhung der Chitinase-Aktivität und der Abscheidung von Callose auf der inneren Oberfläche der Zellwände führt. Eine erhöhte Enzymaktivitäten zusätzlich wurde in den Wurzeln und den Blättern beobachtet (Yedidia *et al.*, 1999; Howell, 2003).

Die Effekte durch die Erhöhung der Pflanzenabwehr können in den hier verwendeten Systemen nicht untersucht werden, und das in Kapitel 4.5.3 beschriebene *Vitis-shoot-Assay* kann durch das Fehlen des intakten pflanzlichen Organismus dazu keinerlei Aufschluss geben. Die verwendeten Pflanzenstücke sind zu klein und die Zellmasse ohne Wurzeln und Blätter kann keine ausreichende Abwehrantwort auf die Infektion geben, dazu ist die Dauer des Experiments mit nur sieben Tagen zusätzlich zu kurz.

In den vergangenen Jahren wurden sehr vielversprechende Ergebnisse zum Schutz von Weinpflanzen gegen eine Infektion von Esca-assoziierten Pilzen veröffentlicht. Diese Ergebnisse zielten bisher aber nur auf den Schutz von Schnittwunden als präventive Maßnahme ab. Die Erforschung und Entwicklung von *Trichoderma* Stämmen als kurative und systemische biologische Kontrollorganismen erscheint aber durch diese ersten Erfolge sinnvoll und könnte besonders im ökologischen Weinbau zu einer

Reduktion insbesondere der Neuinfektionen führen (di Marco *et al.*, 2002, Lecomte, 2009).

#### 4.5.2 Endophytische Pilze für den biologischen Pflanzenschutz im Weinbau

Endophytische Pilze führen oft zu einer Steigerung der Wachstumsleistung der Wirtspflanze, sie induzieren eine Veränderung des Stoffwechsels in der Pflanze, ermöglichen eine erhöhte Stresstoleranz und eine erhöhte Resistenz gegenüber Insekten und Nematoden. Ein besonders komplexes und interessantes Forschungsfeld ist die Interaktion von mehreren Endophyten in einer Pflanze, denn statistisch werden mehr als fünf mutualistisch wachsende Pilze aus einer Pflanze isoliert. Dabei gilt es zu beachten, dass nicht alle Endophyten aus einer Pflanze isoliert werden können, denn einige Organismen können nicht auf artifiziellen Medien kultiviert werden, da sie obligat auf ihren Wirt angewiesen sind (Clay, 1991; Schulz *et al.*, 2002).

##### 4.5.2.1 Fermentation und Wirkstoffisolation aus dem Endophyten IBWF E11228

Der Endophyt IBWF E11228 konnte anhand einer ITS Sequenzierung als Spezies der Gattung *Xylaria* identifiziert werden. Mit Hilfe eines Agardiffusionstests wurde beobachtet, dass der Pilz Pa, Fm und El im Wachstum hemmt. Aufgrund dessen wurde eine Fermentation durchgeführt um etwaige sekundäre Metabolite, die für die antimykotische Wirkung verantwortlich sind, zu isolieren.

Die Gattung *Xylaria* wird bereits seit vielen Jahren erforscht und so konnte ein Vergleich der isolierten Substanzen mit den bereits in der Literatur veröffentlichten Wirkstoffen vorgenommen werden (Pettigrew und Wilson, 2006). Endophytische *Xylariaceae* wurden bereits aus Nadelbäume, Monokotyledonen, Dikotyledonen und Farnen isoliert und sind somit für alle großen Gruppen der Landpflanzen dokumentiert (Brunner und Petrini, 1992). Auf HMG Festmedium (**M10**) wachsen die meisten Arten der *Xylariaceae* mit einem weißen, flachen und leicht glänzenden Myzel und bilden dabei ausgeprägte Hyphenstränge. Ältere Kulturen sind meist schwarz oder braun und bilden dunkle, gestielte Stromata aus (Peršoh *et al.*, 2009). Nur eine geringe Anzahl von Arten erzeugt arteigene morphologische Merkmale, wodurch die Mehrzahl der Anamorphe nicht zu unterscheiden sind. *Xylariaceae* bilden eine ganze Reihe verschiedener Sekundärmetabolite. Zu den wichtigsten Substanzen zählen Butyrolacton, Isocumarin, Bernsteinsäure-Derivate sowie Xylaron (Amaral und Rodrigues-Filho, 2010; Schüffler *et al.*, 2007). Es konnte bisher auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Phytopathogenität einiger Isolate im Zusammenhang mit der Produktion von Sekundärmetaboliten, z.B. Cytochalasin steht (Brunner und Petrini, 1992; Oliveira *et al.*, 2011). Neben den genannten Substanzen produzieren einige Arten auch Sordaricin, welches als fungizid beschrieben



wurde (Schneider *et al.*, 2005; Pongcharoen *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass *Xylaria poitei* Pfeffersamen und junge Pflanzen vor dem Oomyceten *Phytophthora capsici* schützen kann. So steigt die Überlebensrate der Jungpflanzen um bis zu 58,3%, während eine alleinige Infektion des Oomyceten zu einer 100 %igen Mortalität führt (Ramos-Sandoval *et al.*, 2010). In einer weiteren Studie wurde 7-amino-4-Methylcoumarin isoliert, für das eine deutliche Wirkung sowohl gegen Bakterien als auch gegen Pilze gezeigt wurde. Es wurden unter anderem *Penicillium*, *Aspergillus* und *Candida* Stämme im Wachstum gehemmt (Liu *et al.*, 2007).

Der Stamm IBWF E11228 zeigte eine deutliche Hemmung des vegetativen Wachstums im Agardiffusionstest gegen Pa, Fm und El und es wurde nach der Fermentation in HMG Medium (**M10**) eine Bioaktivitäts-gestützte Isolation von Sekundärmetaboliten durchgeführt. Dabei wurden drei Substanzen isoliert, wobei nur zwei gegen Fm und El einen deutlichen Hemmhof bewirkten. Eine der Substanzen die aus dem Kulturfiltrat des Pilzes isoliert werden konnte ist Xylarenon A. Diese Annahme stützt sich auf die Ergebnisse der HPLC-MS Analytik. Die Struktur wurde durch Hu *et al.* (2008) erstmals aufgeklärt. In dieser Arbeitsgruppe wurden auch erste biologische Tests durchgeführt, allerdings nur gegen Tumorzellen und gegen Bakterien. Die Untersuchungen ergaben moderate biologische Aktivitäten; gegen Hefen wurde z.B. keine Wirkung bis zu einer Konzentration von 50 µg/mL beobachtet. Bei der dritten Substanz, die keine Aktivität nach der Isolation gegen Fm bzw. El aufwies handelt es sich möglicherweise um eine Vorstufe von Xylarenon A. Substanzen, die aus einem *Xylaria* Stamm isoliert worden sind und gegen die Esca-assoziierten Pilze Fm und El eingesetzt werden können, wurde in dieser Arbeit jedoch zum ersten Mal beschrieben.

#### 4.5.2.2 Fermentation und Wirkstoffisolation aus dem Endophyten IBWF E99121

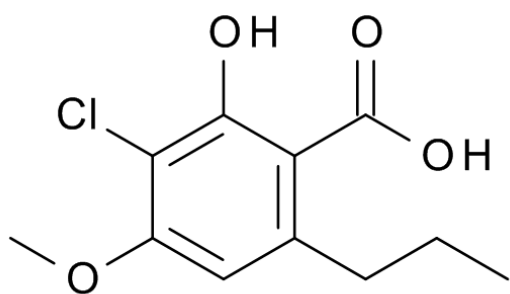
Nach den ersten Antagonistentests wurde der Stamm IBWF E99121 aufgrund seiner antagonistischen Wirkung gegenüber Pa für weitere Untersuchungen ausgewählt. Im Folgenden wurde eine Fermentation des Pilzes im 10 L-Maßstab durchgeführt um die fungiziden Substanzen zu isolieren und zu charakterisieren. Die ITS Sequenzierung zeigt, dass es sich um *Chaetomium globosum* handelt.

*Chaetomium* ist eine Gattung der Schlauchpilze (Ascomycota, Sordariomycetes), die in der Regel ein sehr dichtes Myzelgeflecht, ein Apothecium, welches mit Hyphen bedeckt ist, keulenförmige Asci und pigmentierte, einzellige Ascosporen besitzt (Crous *et al.*, 2009). Viele *Chaetomium* Arten zersetzen Pflanzen und sonstige zellulosereichen Materialien und können leicht aus Kompost, Pflanzenresten und aus Bodenproben isoliert werden. Die Gattung umfasst zusätzlich eine Anzahl von Spezies, die bei höheren Temperaturen bis 37 °C wachsen können, weshalb diese auch teilweise mit Infektionen bei

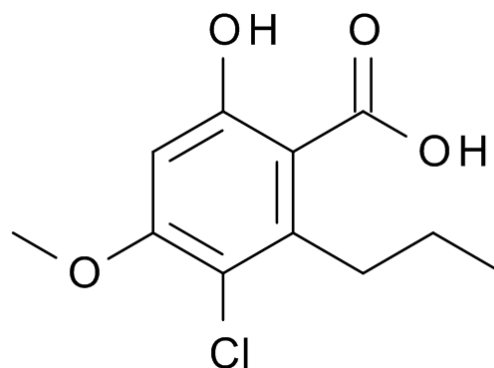
Wirbeltieren assoziiert werden (Hattori *et al.*, 2000, Barron *et al.*, 2003). *Chaetomium globosum*, welcher der Typus der Gattung ist, kann leicht von zerfallenden Pflanzenmaterial, Saatgut und andere Cellulosesubstraten isoliert werden. Es ist die am häufigsten isolierte der mehr als 150 Arten von *Chaetomium* spp., die bisher beschrieben wurden (Domsch *et al.*, 2007).

Die Strukturaufklärung ergab, dass es sich bei der Substanz JF-E99121-1 um 3-Chloro-2-Hydroxy-4-Methoxy-6-Propyl-Benzoesäure handelt. Diese wurde bereits beschrieben und aus Flechten isoliert. Allerdings wurde keine weitere biologische Charakterisierung vorgenommen (Elix *et al.*, 1985).

Die Substanz JF-E-99121-2 konnte als 5-Chlordivaricatsinsäure aufgeklärt werden. Erstmals wurde die Struktur der Substanz von Huneck *et al.* (1980) publiziert, nachdem Tibell (1976) sie aus dem Ascomyceten *Thelomma californicum* isoliert hatte. Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde beobachtet, dass es sich um eine chlorierte Verbindung handelt. Bei dem Depsid aus *T. californicum* handelt es sich allerdings um 3-Chlordivaricatsäure. Weitere Publikationen sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht veröffentlicht worden.



**Abb.19:** Struktur der Reinsubstanz JF-E-99121-1 (3-Chloro-2-Hydroxy-4-Methoxy-6-Propyl-Benzoesäure)



**Abb.20:** Struktur der Reinsubstanz JF-E-99121-2 (5-Chlordivaricatsinsäure)

5-Chlordivaricatsinsäure (JF-E-99121-2) hemmt das Wachstum des Esca-assoziierten Pilz *Phaeoacremonium aleophilum*. In wie weit eine ausreichende Aktivität *in planta* jedoch erreicht werden kann, müsste weiter untersucht werden, denn nur bei einer ausreichenden Konzentration des Fungizids in der Pflanze kann es das Wachstum des Pilzes hemmen.

Für die dritte Substanz JF-E-99121-3 konnte mit Hilfe einer HPLC-MS Messung gezeigt werden, dass es sich um Aureonitol handelt. Diese Substanz zeigte keine fungizide Aktivität im Test mit den Esca-assoziierten Pilzen. Die Totalsynthese dieser Substanz wurde 2008 von Jervis und Cox publiziert. Die erste Isolation der Substanz wurde bereits im Jahr 1979 durch Bohlmann und Ziesche aus *Helichrysum*

*aureonitens* durchgeführt. Die Pflanze gehört zur Familie der *Asteraceae* und wächst in der Kwazulu-Natal Provinz in Südafrika. Es ist allerdings umstritten ob es sich um einen pflanzeigenen Wirkstoff handelt, oder ob die Substanz von endophytischen Pilzen produziert wird. Die Wirksamkeit von *Chaetomium globosum* als biologisches Bekämpfungsmittel gegen den Kraut- und Knollenfäule Erreger *Phytophthora infestans* in Kartoffelpflanzen wurde durch Shanthiyaa *et al.* (2013) auf Aureonitol zurückgeführt. Der Organismus wurde in dieser Publikation in einer Flüssigapplikation auf die Knollen, Blätter und den umgebenden Boden aufgebraucht. Dadurch ergab sich ein höherer Knollenertrag durch die Verringerung der Krautfäuleinfektionen. Eine Aktivität von Aureonitol gegen die Esca-assoziierten Erreger wurde bisher allerdings nicht publiziert. Die Substanz zeigte in den hier durchgeführten Versuchen auch keine fungizide Aktivität im 96-Lochplatten-Test.

Neben diesen Substanzen die in dieser Arbeit als bioaktiv gegen des Esca-assoziierten Pilz Pa charakterisiert werden konnten produziert *C. globosum* eine Reihe von weiteren Verbindungen. Zu diesen gehören Chaetoglobosin G (Qin *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2004), Cytoglobosin A-G (Cui *et al.*, 2010), Azaphilon, Chaetoviridin A und C (McMullin *et al.*, 2013), Orsellinsäure, Globosumon A, B und C (Bharat *et al.*, 2005) und verschiedene Steroide (Qin *et al.*, 2009).

Es wurden auch Studien zur Aktivität der sekundären Metaboliten von *C. globosum* gegen pflanzenpathogene Pilze durchgeführt (Li *et al.*, 2011). Eine Studie zeigte, dass das Kulturfiltrat von *C. globosum* über 80 Prozent der Sporen von *Setosphaeria turcica*, dem Erreger der Blattfleckenkrankheit bei Mais, auf der Blattoberfläche an der Keimung hindern kann. Es zeigte sich weiter, dass es sich bei den beiden fungiziden Substanzen um Chaetoglobosin A und C handelt. Die Aktivität von Chaetoglobosin A war jedoch sowohl *in vitro* als auch *in planta* deutlich stärker, als jene von Chaetoglobosin C (Zhang *et al.*, 2013). Es wurden auch Studien zur biologischen Kontrolle des weinpathogenen Pilzes *Colletotrichum gloeosporioides* durch *C. globosum* durchgeführt. Extrakte des Kulturfiltrates, die mit Hilfe von Ethylacetat hergestellt worden waren, zeigten eine Reduktion der Sporenkeimung des Pathogens um bis zu 65 Prozent. Auch in diesem Versuch wurde Chaetoglobosin C als aktive Komponente getestet und bestätigt (Soytong *et al.*, 2005). In Bezug auf die Esca Erkrankung bei Weinpflanzen, wurde *C. globosum* inzwischen mehrfach auch aus gesunden und befallenen Pflanzen isoliert (Casieri *et al.*, 2009; González und Tello, 2011). Eine Aktivität des Pilzes und den biologisch aktiven Substanzen die bereits beschrieben wurden, gegen die Esca-assoziierten Pilze ist bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht publiziert worden. Die Isolation des Pilzes *C. globosum* aus Esca-infizierten Pflanzen (Król, 2006; Hofstetter *et al.*, 2012) lässt einen Einsatz als Organismus zur Biokontrolle von Pa allerdings fraglich erscheinen.

#### 4.5.3 *Vitis-shoot-Assay* zur erweiterten Analyse Esca-antagonistischer Organismen

Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.5.3 zeigen, war es mit Hilfe des *Vitis-shoot-Assays* möglich, Ergebnisse, die anhand verschiedener Testsysteme zur Isolation von antagonistischen Mikroorganismen durchgeführt wurden, zu bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle Pilze, für die in den vorangegangenen Auswahlverfahren eine Aktivität gegen die Esca-assoziierten Pilze beobachtet wurde, auch auf den Weinpflanzenstücken in der Lage waren die Kolonisierung der Wirtspflanze zu verhindern. Besonders die Ergebnisse bei Pm zeigten, dass die Wirkung im Agardiffusionstest meist deutlicher zu Gunsten des antagonistischen Pilzes ausgefallen waren, als dies im *Vitis-shoot-Assay* der Fall war. Eine erste Erkenntnis dieses Versuchsteils ist, dass die Wirksamkeit der isolierten, potentiell protektiven Pilze erst *in vivo* bestätigt werden muss. Der Einfluss der Pflanze sowie zusätzlicher biotischer und abiotischer Faktoren auf die Wirksamkeit der Effektivität der Antagonisten kann so untersucht werden. Besonders die Wirkung einer lebenden Pflanze mit ihren vitalen Abwehrmechanismen kann so abgeschätzt werden.

Erste Studien zeigen, dass zum Beispiel trans-Resveratrol und Viniferin einen negativen Einfluss auf das Wachstum von Pm und Pa haben und die Resistenz der Pflanze fördern (Santos *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2009). Zusätzlich produzieren *Vitis* spp. und auch andere Pflanzen eine Reihe von Stilbenen, zu denen auch Phytoalexine gehören (Großkinsky *et al.*, 2012). Diese niedermolekularen Substanzen sind in den letzten Jahren wieder in den Fokus der Forschung gerückt und könnten der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse im Antagonistentest und im *Vitis-shoot-Assay* sein (Escoriza *et al.*, 2013).

Versuche zum Schutz der Schnittwunden werden schon seit einiger Zeit unternommen. Die Arbeitsgruppe um Sosnowski *et al.* (2008) versuchte die Eintrittsstellen gegen die Infektion von El zu schützen. Sie verwendeten jedoch keine Organismen, sondern setzten verschiedenen Substanzen, z.B. Carbendazim und Pyrimethanil ein. Der Einsatz der Fungizide erbrachte keine einheitlichen Ergebnisse im Labor und später im Feld. Diese Arbeiten zeigen aber, dass es im Allgemeinen möglich ist die Infektionsrate von El durch den Einsatz von den beschriebenen Substanzen stark zu reduzieren. Um die Interaktion von Pilzen, die zum Schutz auf Schnittwunden aufgebracht wurden und den pathogenen Pilzen zu untersuchen, generierten Mutawila *et al.* (2011) fluoreszierende *Trichoderma* Stämme und ebenfalls Fluoreszenzfarbstoffe-exprimierende Stämme von Pm und El. Es zeigte sich, dass das Wachstum des protektiven Pilzes besonders in Anwesenheit der beiden Esca Pilze angeregt wurde und dass El nach 90 Tagen nicht in der infizierten Pflanze detektiert werden konnte. Das Wachstum von Pm konnte aber nicht gänzlich unterdrückt werden, was sich anhand der roten

Fluoreszenz in den Xylemgefäßen nachweisen ließ. Weiter beobachteten Mutawila *et al.* (2011), dass das Wachstum von Pm eine Hemmung erfuhr, jedoch erst in einer Tiefe von mehr als 3 cm unterhalb der Inokulationsstelle. Diese Beobachtung kann im im Kapitel 3.5.3 beschriebenen Ansatz jedoch nicht überprüft werden, da die eingesetzten *Vitis* Stücke lediglich 5-8 mm lang waren.

Einige Firmen setzen verschiedener *Trichoderma* spp. als Basis biologischer Schutzmittel für Reben ein (vinevax™, Agrimm Technologies Ltd., Christchurch, Neuseeland). Der Vorteil solcher Mittel, die lebende Organismen enthalten, ist die sehr lange Wirkdauer von bis zu fünf Jahren, die zusätzliche positive Wirkung der antagonistischen Pilze auf die Pflanze und die hohe Spezifität (Kexiang *et al.*, 2002, Kotze, 2008). Zusätzlich können für jeden Standort eigene einheimische antagonistische Organismen isoliert und zur Produktreife gebracht werden. Dieser Punkt fördert Forschung auf regionaler Ebene und verhindert die Verbreitung nur eines Pilzes über ganz Anbauggebiete. Es ist somit zusätzlich eine sich schnell verbreitende Resistenz, auch auf Grund der sehr viel komplexeren Interaktion zwischen den Pilzen, als zwischen einem Schädling und dem eingesetzten Fungizid, wenig wahrscheinlich. Da die Ergebnisse in einigen Studien noch nicht zufriedenstellend sind, könnten im Pflanzenschutz Mischpräparate mit mehreren Organismen eingesetzt werden (Fourie *et al.*, 2006). Zusätzlich können aus den untersuchten Endophyten Substanzen isoliert werden, deren Leitstrukturen in der chemische Industrie für neuer Fungizide verwendet werden können (Dayan *et al.*, 2009).

Neben Pilzen wurden in diesem Versuchsteil auch Bakterien auf die Schnittflächen aufgebracht. Da es ebenfalls Studien zur Wirksamkeit von Prokaryonten beim Wundschutz gibt, sollte dieser Aspekt auch beachtet werden (Compant *et al.*, 2012). Der Einsatz von nützlichen Bakterien, die aus der Rhizo- und Endosphäre der Pflanze isoliert worden waren, wurde untersucht. Außerdem wurde kontrolliert, wie die Zellen und ihre Sekundärmetabolite die Erreger von Weinkrankheiten direkt oder indirekt bekämpfen können. Zwei fungizide Substanzen die sich bereits im Einsatz befinden und industriell hergestellt werden sind Mildiomycin aus dem Actinomyceten *Streptoverticillium rimofaciens* (Sumitomo Chemical Taketa) und Polyoxin B aus *Streptomyces cacaoi* (Kaken Pharmaceutical Company Ltd.). Sie werden beide gegen *Botrytis cinerea* eingesetzt (Copping und Duke, 2007). Viele Studien zum Gebrauch von *Bacillus subtilis* Stämmen gegen *Botrytis* sp. haben auch hier gezeigt, dass eine Reduktion des Pilzbefalls mit Hilfe von Bakterien möglich ist (Elmer und Reglinski, 2006). Die Produkte sind Bio-Save 1000 (Industrial Ventilation, Inc.), Serenade (Bayer Crop Science AG) und Rhapsody (Bayer AG), die ebenfalls gegen *Botrytis* sp. und den Echten Mehltau eingesetzt werden. Bei der biologischen Kontrolle durch Bakterien gegen die Esca-assoziierten Pilzen wurde bisher vor allem der Schutz vor *Eutypa lata* untersucht. Schmidt *et al.* (2001) testeten verschiedene bakterielle Antagonisten in unterschiedlichen Testsystemen und konnten zwei *Bacillus subtilis* Stämme, vier

*Erwinia herbicola*, zwei *Serratia plymuthica* und 16 *Actinomyceten* Stämme isolieren, die das Wachstum von El ausreichend vielversprechend hemmten, um weitere Untersuchungen zu erlauben.

In den hier dargestellten Experimenten konnten ebenfalls aktive bakterielle Antagonisten isoliert werden, die das Durchwachsen der *Vitis* Stücke durch die Pilze Pa, Fm und El verhindern konnten. Die Wirkung des Gesamtorganismus war dabei immer stärker im Vergleich dazu, wenn isolierte Extrakte eingesetzt wurden. Die zellfreien Überstände zeigten keine oder nur stark reduzierte Wirkung. Fraglich bleibt, ob bei diesem Ansatz lediglich eine zu geringe Wirkstoffmenge eingesetzt wurde; da lediglich Extrakte, die 1:100 konzentriert worden waren, eingesetzt wurden. Auch Schmidt *et al.* (2001) nutzen die lebenden *Bacillus* sp. und *Erwinia* sp. Zellen, da durch Isolationsversuche keine fungiziden Substanzen, welche eine Wirkung gegen *E. lata* hatten, isoliert werden konnten.

Es ließ sich mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuch bestätigen, dass sowohl Bakterien, als auch endophytische Pilze und ihre Extrakte zum Schutz der Schnittwunden *in vitro* gegen Esca-assoziierte Pilze eingesetzt werden können. Im nächsten Schritt müssen die Ergebnisse mittels Gewächshaus- und Freilandversuchen validiert werden und die Isolierung fungizider Reinsubstanzen aus den ausgewählten Organismen vorangetrieben werden.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis für die molekularen und biochemischen Grundlagen der Esca-Krankheit an Reben zu erarbeiten. Hierzu wurden sechs Teilprojekte durchgeführt. Die beiden Pilze *Pm. chlamydospora* und *Pa. aleophilum* wurden submers kultiviert um die gewonnenen Extrakte auf phytotoxische Substanzen zu untersuchen. Dabei wurden Metabolite isoliert, die zum ersten mal mit der Esca-Krankheit assoziiert werden konnten, wie Siderophoren und Kaempferol-3-O-Glukosid. Diese können das Verständnis der Pilz-Pflanze-Interaktion um neue Aspekte ergänzen. Die Glykosylierung von Kaempferol durch Pm wurde erstmals nachgewiesen und die hier dargelegten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Pilz in der Lage ist, die von der Pflanze als Abwehrantwort produzierte Substanz, seinerseits zu nutzen. Dies bedeutet, dass Pm einen pflanzlichen Abwehrstoff durch Glykosylierung umwandelt und für die Wirtspflanze toxisiert. Die durchgeführten Injektionstests *in vivo* in Weinpflanzen zeigten zudem, dass Esca-ähnliche Symptome durch K3G hervorgerufen werden können. Abseits dieser neuen Erkenntnisse konnten auch literaturbekannte Phytotoxine in den Extrakten identifiziert werden.

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurden Polyketidsynthase-Gene der beiden Pilze Pm und Pa inaktiviert. Zusätzlich wurde der veränderte Sekundärstoffwechsel bzw. die Reaktion der Insertionsmutanten auf abiotischen Stress und Infektionsfähigkeit von *Vitis*-Pflanzen untersucht. Damit ist es in dieser Arbeit erstmals gelungen selektiv Gene der Esca-assoziierten Pathogene zu inaktivieren. Es zeigte sich, dass die Mutanten sensibler als die Wildtyp-Stämme bezüglich Salz-, Trocken- und oxidativen Stress reagieren. Die Infektionsfähigkeit bleibt jedoch unverändert.

Die Analyse der Infektionsmechanismen sollte auch bei der Transformation der Pilze mit Fluoreszenzgenen im Fokus stehen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es GFP-Mutanten der Pilze Pm, Pa und El zu generieren um das Wachstum nach Infektion von Weinpflanzen zu erfassen. Mit Hilfe der Fluoreszenzmutanten war es möglich ein neues Verfahren zur Suche nach potentiellen Antagonisten zu erstellen. Mit dem *Vitis Shoot Assay* konnten die Esca-assoziierten Pilze und Fungizide, endophytische Pilze, *Trichoderma* spp. und Bakterien-Stämme in einem Testverfahren auf Schnittwunden untersucht werden. Dabei konnten erste biologische Wundschutzmittel auf Basis ganzer Organismen identifiziert werden. Es zeigte sich, dass der durchgeführte Antagonistentest und das hier beschriebene innovative *Vitis Shoot Assay* nicht immer äquivalente Ergebnisse generierten und dass sich die beiden Verfahren ergänzen.

Des Weiteren wurde eine Interaktionsstudie der vier Esca-assoziierten Pilze unter Stressbedingungen und verschiedenen Temperaturen durchgeführt um den Einfluss äußere biotischer und abiotischer Faktoren auf das Zusammenwirken dieser Erreger zu untersuchen. Die Pilze reagieren sehr unterschiedlich in den durchgeführten Stresstests und die Dominanz einzelner Erreger hängt stark von der Temperatur und den osmotischen Verhältnissen ab. Es konnte gezeigt werden, dass veränderte klimatische Bedingungen zur veränderten Zusammensetzung des Erregerspektrums führen kann.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse geben neue Einblicke in die Esca Erkrankung von Weinreben und ermöglichen die weitere Forschung einiger weiterer Aspekte.

## 6 Ausblick

Die neuen Erkenntnisse aus der hier vorgelegten Arbeit zu den Themen Esca Krankheit bei Weinpflanzen und molekularen Grundlagen der Pilz-Pflanze-Interaktion bringen für die wissenschaftliche Gemeinschaft einen wichtigen Fortschritt für die Erforschung des Krankheitskomplexes. Aus allen Themengebieten ergeben sich aus dieser Arbeit neue Fragestellungen, die zukünftig adressiert werden sollten; nicht nur um die Krankheit besser verstehen, sondern auch bekämpfen zu können.

Die Isolierung der Substanz Kaempferol-3-O-Glukosid und die Analyse ihrer Wirkung auf Weinpflanzen zeigen, dass die bisherige einhellige Meinung zu den molekularen Grundlagen der Pilz-Pflanze-Interaktion um weitere Aspekte ergänzt werden muss. Die bisher publizierten Ergebnisse ließen vermuten, dass alleine die Synthese und Sekretion der Substanzen Scytalon und Isoscleron zur Entstehung der Esca Symptome notwendig sind. Weshalb die Injektion dieser Sekundärmetabolite in Weinpflanzen aber nicht zu den beschriebenen Esca Symptomen führen und aus welchem Grund das Esca-Krankheitsbild transient in Erscheinung tritt, konnte nicht beantwortet werden. Durch die in dieser Arbeit gefundenen Metabolite erscheint es notwendig, die Esca-Krankheit als multifaktorielles Problem wahrzunehmen, dass auch weiterhin durch neue Forschungsansätze untersucht werden muss. Zusätzlich sollte die Flavonol-Glykosyltransferase isoliert werden, um einen Beleg für die hier aufgestellten These zu erhalten.

Erste Ergebnisse zur Fragestellung der alleinigen Wirkung von Scytalon und Isoscleron wurden durch die hier beschriebenen Insertionsversuche in Polyketidsynthasegene bei Pm und Pa generiert. Allerdings sind weitere Versuche mit Insertionsmutanten, die keine Intermediate der 1,8-Dihydroxynaphthalen-Melanin-Biosynthese mehr produzieren, durchzuführen.

Nach der erfolgreichen Transformation von Pm, Pa und El bleibt die Transformation des Basidiomyceten Fm noch zu adressieren. Weitere Versuche mit optimierten Transformationsvektoren und pilzspezifischen Promotoren sind nötig. Hierfür könnte die inzwischen veröffentlichte Genomsequenz des Pilzes die mögliche genetische Manipulation erheblich vereinfachen.

In einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit wurde nach antagonistischen Pilzen und Bakterien als mögliche *Biocontrol Agents* gesucht. Die identifizierten Organismen und ihre produzierten Sekundärmetabolite könnten nicht nur im Weinbau zum Schutz der Reben eingesetzt werden. Weitere Gewächshaus- und Feldversuchen stehen dazu noch aus.

Im letzten Projekt der hier vorgelegten Dissertation wurde ein neues Verfahren beschrieben, um



potentielle Schutzorganismen, die anhand des Antagonisten-Screenings detektiert werden konnten, in einem komplexen System zu untersuchen. In wie weit das hier beschriebene *Vitis-shoot-Assay* kostengünstig und zeitsparend die Selektion der zuvor beobachteten antagonistischen Organismen ermöglicht und als Zwischenschritt vor die Analyse der Interaktion zwischen Wirtspflanze, Pathogen und biologischem Schutzorganismus geschaltet werden kann, muss in weiteren Tests untersucht werden.

Es ist zwingend erforderlich, die Ausbreitung des Esca Krankheit sowohl in Europa als auch in Kalifornien und Südafrika einzudämmen. Um eine effiziente Bekämpfung der beteiligten Pilze zu ermöglichen, müssen die molekularen Grundlagen der Krankheit und die Pilz-Pflanze-Interaktion erforscht werden. Solange die wichtigsten Fragen in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt sind, wird es schwer möglich sein, die dringend benötigten Schutzmaßnahmen zu etablieren um eine weitere Ausbreitung der Krankheit zu verhindern. Hierfür ist eine größere Anstrengung seitens der Forschung nötig, auch interdisziplinär die Problematik der Krankheit ausgehend von der Pflanze und den beteiligten Mikroorganismen zu beleuchten und aufzuklären. Erst im Anschluss daran wird es möglich sein, nicht nur präventiv sondern auch kurativ die gefährdeten Reben zu behandeln.

## 7 Referenzen

- Abbassy M. R., Hendy H. H., Mowafi, M. H. und Nawar, M. A. (2012): Biology of *Euseius scutalis* (Acari: Phytoseiidae) on *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae) at different temperatures; Acarines, Band 6, Seiten 15-19
- Abawi G. S. und Widmer T. L. (2000): Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops; Applied Soil Ecology, Band 15 (1), Seiten 37-47
- Abou-Mansour A., Couché E. und Tabacchi R. (2004): Do fungal naphthalenones have a role in the development of Esca symptoms?; Phytopathologia Mediterranea, Band 43 (1), Seiten 75-82
- Abou-Mansour E., Polier J., Pezet R. und Tabacchi R. (2010): Purification and partial characterisation of a 60 KDa laccase from *Fomitiporia mediterranea*; Phytopathologia Mediterranea, Band 48 (3), Seiten 447-453
- Adams M. (2014): *Phaeoacreomium aleophilum*-Polyketidsynthase-Deletionsmutanten-Sekundärstoffwechsel-Analyse und Isolation von biologischen Fungiziden aus Bakterien und endophytischen Pilzen; Bachelorarbeit, Hochschule Trier, Umwelt-Campus Birkenfeld
- Aggarwal R., Tewari A. K., Srivastava K. D. und Singh D. V. (2004): Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*; Mycopathologia, Band 157 (4), Seiten 369-377
- Ahmed A. A. und Fath-Allah M. M. (2012): Double Infecions with Cucumber mosaic virus and plum pox virus (Sharka) in Apricot Trees; International Journal of Virology, Band 8 (1), Seiten 50-60
- Ahmed A. A., Sherin A., Mahfouze S. A. und Sabry G. H. (2012): Peroxidase isozyme polymorphism in Grape Cultivars infected by Grapevine fan leaf virus (GFLV) and Tomato ring spot virus (ToRSV); Journal of American Science, Band 8 (3), Seiten 674-687
- Al Rwahnih M., Rowhani A., Smith R.J., Uyemoto J.K. und Sudarshana M.R. (2012): Grapevine Necrotic Union, a newly recognized disease of unknown etiology in grapevines grafted on 110 Richter rootstock in California; Journal of Plant Pathology, Band 94 (1), Seiten 145-156
- Alan L. Olmstead und Paul W. Rhode (2009): Quantitative indices on the early growth of the California wine industry; RMI-CWE Working Paper number 0901; <http://vinecon.ucdavis.edu/publications/cwe0901.pdf>
- Allègre M., Daire X., Héloir M.-C., Trouvelot S., Mercier L., Adrian M. und Pugin A. (2007): Stomatal deregulation in *Plasmopora viticola*-infected grapevine leaves; New Phytologist, Band 173, Seiten 832-840
- Almeida Rodrigo P. P., Daane K. M., Bell V. A., Blaisdell G. K., Cooper M. L., Herrbach E. und Pietersen G. (2013): Ecology and management of grapevine leafroll disease; Frontiers in Microbiology, Band 4, Seiten 1-13
- Altmayer B., Fader B., Harms M., Ipach R., Ipach U., Lipps H.-P., Schirra K.-J. und Ziegler B. (2010): Sachkunde im Pflanzenschutz (Weinbau), 6. überarbeitete Auflage; Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Abteilung Phytomedizin
- Aly A. H., Debbab A. und Proksch P. (2011): Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises; Applied microbiology and biotechnology, Band 90 (6), Seiten 1829-1845
- Aly A. H., Debbab A., Kjer J. und Proksch P. (2010): Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products; Fungal diversity, Band 41 (1), Seiten 1-16

- Amalfitano C., Agrelli D., Arrigo A., Mugnai L., Surico G. und Evidente A. (2011): Stilbene polyphenols in the brown red wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by "Esca proper"; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 50, Seiten 224-235
- Amborabé B. E., Fleurat-Lessard P., Bonmort J., Roustan J. P. und Roblin G. (2001): Effects of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, on plant cell plasma membrane: Possible subsequent implication in disease development; *Plant Physiology and Biochemistry*, Band 39 (1), Seiten 51-58
- Amborabé B. E., Octave S. und Roblin G. (2005): Influence of temperature and nutritional requirements for mycelial growth of *Eutypa lata*, a vineyard pathogenic fungus; *Comptes Rendus Biologies*, Band 328 (3), Seiten 263-270
- Amselem J., Cuomo C. A., van Kan J. A. L., Viaud M., Benito E. P., Couloux A., Coutinho P. M., de Vries R. P., Dyer P. S., Caroline Levis C., Mauceli E., Neuvéglise C., Oeser B., Pearson M., Poulain J., Poussereau N., Quesneville H., Rasclé C., Schumacher J., Ségurens B., Sexton A., Silva E., Sirven C., Soanes D. M., Talbot N. J., Templeton M., Yandava C., Yarden O., Zeng Q., Rollins J. A., Lebrun M.-H. und Dickman M. (2011): Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*; *PLoS Genetics*, Band 7 (8), Seiten 1-27
- Andolfi A., Cimmino A., Evidente A., Iannaccone M., Capparelli R., Mugnai L. und Surico G. (2009): A new flow cytometry technique to identify *Phaeoconiella chlamydospora* exopolysaccharides and study mechanisms of Esca grapevine foliar symptoms; *Plant Disease*, Band 93 (7), Seiten 680-684
- Andolfi A., Evidente A., Bruno G. und Sparapano L. (2006): Two Naphthalenone Pentakides from Liquid Cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a Fungus Associated with Esca of Grapevine; *Phytopathologia mediterranea*, Band 39 (1), Seiten 162-168
- Andolfi A., Mugnai L., Luque J., Surico G., Cimmino A. und Evidente A. (2011): Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases; *Toxins*, Band 3 (12), Seiten 1569-1605
- Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C. und Fuchs M. (2004): Grapevine fanleaf virus: still major threat to the grapevine industry; *Journal of Plant Pathology* (2004), Band 86 (3), Seiten 183-195
- Ansari M. A. und Butt T. M. (2011): Effect of potting media on the efficacy and dispersal of entomopathogenic nematodes for the control of black vine weevil, *Otiorrhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae); *Biological Control*, Band 58 (3), Seiten 310-318
- Anwar S. A., McKenry M. A. und Ramming R. (2002): A Search for More Durable Grape Rootstock Resistance to Root-knot Nematode; *American Journal of Enology and Viticulture*, 2002, Band 53 (1), Seiten 19-23
- Aroca A., Gramaje D., Armengol J., García-Jiménez J. und Raposo R. (2010): Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain; *European Journal of Plant Pathology*, Band 126 (2), Seiten 165-174
- Atallah S. S., Gómez M. I., Fuchs M. F. und Martinson T. E. (2012): Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York; *American Journal of Enology and Viticulture*, Band 63 (1), Seiten 73-79
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. und Struhl K. (2000): Short Protocols in Molecular Biology, 5th Edition, 2 Band Set; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN: 978-0-471-25092-0
- Backhaus G. F. (1991): Biological of *Otiorrhynchus sulcatus* by insect parasitizing nematodes; *Pflanzenschutzamt Oldenburg, Pests of plants*, Band 91(2), Seiten 80-85
- Bacon C. W. und White Jr. J. F. (2000): *Microbial Endophytes*; Marcel Dekker, Inc. New York

- Bais H. P., Walker T. S., Kennan A. J., Stermitz F. R. und Vivanco J. M. (2003): Structure-dependent phytotoxicity of catechins and other flavonoids: flavonoid conversions by cell-free protein extracts of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed) roots; *Journal of agricultural and food chemistry*, Band 51 (4), Seiten 897-901
- Baker L. G., Specht C. A., Donlin M. J. und Lodge J. K. (2007): Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in; *Eukaryotic cell*, Band 6 (5), Seiten 855-867
- Barron M. A., Sutton D. A., Veve R., Guarro J., Rinaldi M., Thompson E. und Madinger N. E. (2003): Invasive mycotic infections caused by *Chaetomium perlucidum*, a new agent of cerebral phaeohyphomycosis; *Journal of clinical microbiology*, Band 41 (11), Seiten 5302-5307
- Bautista-Baños S., Garcia-Dominguez E., Barrera-Necha L. L., Reyes-Chilpa R. und Wilson C. L. (2003): Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytris cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit; *Postharvest biology and technology*, Band 29 (1), Seiten 81-92
- Bedding R. A. (1984): Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp.; *Annals of Applied Biology*, Band 104 (1), Seiten 117-120
- Bell A. A., Stipanovic R. D. Puhalla J. E. (1976): Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*: Identification of (+)-Scytalone as a natural precursor to melanin; *Tetrahedron*, Band 32 (12), Seiten 1353-1356
- Bell C. R., Dickie G. A., Harvey W. L. G., Chan J. W. Y. F. (1995): Endophytic bacteria in grapevine; *Canadian Journal of Microbiology*, Band 41, Seiten 46-53
- Bernard M. B., Cole P., Kobelt A., Horne P. A., Altmann J. A, Wratten S. D. und Yen A. L. (2010): Reducing the Impact of Pesticides on Biological Control in Australian Vineyards: Pesticide Mortality and Fecundity Effects on an Indicator Species, the Predatory Mite *Euseius victoriensis* (Acari: Phytoseiidae); *Journal of Economic Entomology*, Band 103(6), Seiten 2061-2071
- Bertolini E., García J., Yuste A. und Olmos A. (2010): High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR; *European Journal of Plant Pathology*, November 2010, Band 128 (3), Seiten 283-287
- Bertsch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E. und Fontaine, F. (2012): Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood; *Plant Pathology*, Band 62, Seiten 243-265
- Bester W., Crous P. W., Fourie P. H. (2007): Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species; *Australian Journal of Plant Pathology*, Band 36, Seiten 73-77
- Bharat P., Bashyal B. P., Wijeratne E. K., Faeth S. H. und Gunatilaka A. L. (2005): Globosumones A-C, Cytotoxic Orsellinic Acid Esters from the Sonoran Desert Endophytic Fungus *Chaetomium globosum* 1; *Journal of natural products*, Band 68 (5), Seiten 724-728
- Bingle L. E., Simpson T. J. und Lazarus C. M. (1999): Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes; *Fungal Genetics and Biology*, Band 26 (3), Seiten 209-223
- Bissett J. (1991): A revision of the genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification; *Canadian Journal of Botany*, Band 69 (11), Seiten 2357-2372
- Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Dumas V., Mestre P. und Merdinoglu D. (2012): A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of Ren5, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew; *Theoretical and Applied Genetics*; December 2012, Band 125 (8), Seiten 1663-1675
- Blanco-Ulate B., Rolshausen P. E. und Cantu, D. (2013b): Draft genome sequence of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* UCR-EL1; *Genome announcements*, Band 1 (3), doi: 10.1128/genomeA.00228-13
- Blanco-Ulate B., Rolshausen P., Cantu D. (2013a): Draft Genome Sequence of the Ascomycete *Phaeoacremonium*

- aleophilum* Strain UCR-PA7, a Causal Agent of the Esca Disease Complex in Grapevines; Genome Announcement, Band 1 (3). pii: e00390-13. doi: 10.1128/genomeA.00390-13
- Bohlmann F. und Ziesche J. (1979): Ein Ungewöhnliches Tetrahydrofuran-Derivat aus *Helichrysum aureonitens*; Phytochemistry, Band 18 (4), Seiten 664-665
- Böhnert H. U., Fudal I., Dioh W., Tharreau D., Notteghem J. L. und Lebrun M. H. (2004): A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice; The Plant Cell Online, Band 16 (9), Seiten 2499-2513
- Böll S. und Herrmann J. V. (2004): A long-term study on the population dynamics of the grape leafhopper (*Empoasca vitis*) and antagonistic mymarid species; Journal of Pest Science, Band 77 (1), Seiten 33-42
- Bonafos R., Serranob E., Auger P. und Kreiter S. (2007): Resistance to deltamethrin, lambda-cyhalothrin and chlorpyrifos-ethyl in some populations of *Typhlodromus pyri* (Scheuten) and *Amblyseius andersoni* (Chant) (*Acari: Phytoseiidae*) from vineyards in the south-west of France; Crop Protection, Band 26 (2), Seiten 169-172
- Borie B., Jacquiot L., Jamaux-Despréaux I., Larignon P. und Péros J. P. (2002): Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France; Plant Pathology, Band 51 (1), Seiten 85-96
- Borroto-Fernandez E. G., Sommerbauer T., Popowich E., Schartl A. und Laimer M. (2008): Somatic embryogenesis from anthers of the autochthonous *Vitis vinifera* cv. Domina leads to Arabis mosaic virus-free plants; European Journal of Plant Pathology, May 2009, Band 124 (1), Seiten 171-174
- Bradshaw R., Duan G. und Long P. G. (2005): Transformation of fungal grapevine trunk disease pathogens with the green fluorescent protein gene; Phytopathologia Mediterranea, Band 44 (2), Seiten 162-168
- Brakhage A. A. (2005): Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants; Current drug targets, Band 6 (8), Seiten 875-886
- Brian P. W. (1944): Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*; Nature, Band 154, Seiten 667-668
- Brown D. J. F. (1986): The transmission of two strains of arabic mosaic virus from England by populations of *Xiphinema diversicaudatum* (*Nematoda: Dorylaimoidea*) from ten countries; Revue Nématologie-IRD, Band 9 (1), Seiten 83-87
- Brown R. G., und Lindberg B. (1967): Polysaccharides from Cell Walls of *Aureobasidium*; Acta Chemica Scandinavica, Band 21(9), Seiten 2379-2382
- Bruno G. und Sparapano L. (2002): Abstract: Antagonistic behaviour of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. vs. *Fomitiporia mediterranea*: isolation, purification, chemical and biological characterisation of active compounds; Phytopathologia Mediterranea, Band 44 (1), Seiten 101-102
- Bruno G. und Sparapano L. (2006a): Effects of three Esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli; Physiological and Molecular Plant Pathology, Band 69 (4), Seiten 209-223
- Bruno G. und Sparapano L. (2006b): Effects of three Esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines: Physiological and Molecular Plant Pathology, Band 69 (4), Seiten 195-208
- Bruno G. und Sparapano L. (2006c): Effects of three Esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions; Physiological and Molecular Plant Pathology, Band 69 (4), Seiten 182-194
- Bulgari D., Casati P., Crepaldi P., Daffonchio D., Quaglino F., Brusetti L., Bianco P. A. (2001): Restructuring of

- endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. Plants; Applied Environmental Microbiology, Band 77, Seiten 5018–5022
- Bundock P., den Dulk-Ras A., Beijersbergen A. und Hooykaas P. J. (1995): Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*; The EMBO Journal, Band 14 (13), Seiten 3206-3214
- Bürckert J.-P. (2012): Untersuchung interaktiver Virulenzdeterminanten in Esca-assoziierten Pilzen; Diplomarbeit IBWF, TU Kaiserslautern
- Caffi T., Rossi V., Legler S. E. und Bugiani R. (2011): A mechanistic model simulating ascospore infections by *Erysiphe necator*, the powdery mildew fungus of grapevine; Plant Pathology, Band 60 (3), Seiten 522–531
- Calderon-Montano M. J., Burgos-Morón E., Pérez-Guerrero C. und López-Lázaro M. (2011): A review on the dietary flavonoid kaempferol; Mini reviews in medicinal chemistry, Band 11 (4), Seiten 298-344
- Calzarano F. und Di Marco S. (2007): Wood discoloration and decay in grapevines with Esca proper and their relationship with foliar symptoms; Phytopathologia Mediterranea, Band 46 (1), Seiten 96-101
- Camps C., Kappel C., Lecomte, P., Léon C., Gomès E., Coutos-Thévenot P. und Delrot S. (2010): A transcriptomic study of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon) interaction with the vascular ascomycete fungus *Eutypa lata*; Journal of experimental botany, Band 61 (6), Seiten 1719-1737
- Cardoza R. E., Vizcaino J. A., Hermosa M. R., Monte E. und Gutierrez S. (2006): A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation; The Journal of Microbiology, Band 44 (4), p.383-395
- Casieri L., Hofstetter V., Viret O. und Gindro K. (2009): Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants; Phytopathologia Mediterranea, Band 48 (1), Seiten 78-83
- Castillo-Muñoz N., Fernández-González M., Gómez-Alonso S., García-Romero E. und Hermosín-Gutiérrez I. (2009): Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines; Journal of agricultural and food chemistry, Band 57 (17), Seiten 7883-7891
- Castillo-Muñoz N., Gómez-Alonso S., García-Romero E., Gómez M. V., Velders A. H. und Hermosín-Gutiérrez I. (2008): Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes; Journal of agricultural and food chemistry, Band 57 (1), Seiten 209-219
- Castillo-Munoz N., Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E. und Hermosin-Gutierrez I. (2007): Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines; Journal of Agricultural and Food Chemistry, Band 55 (3), Seiten 992-1002
- Castillo-Muñoz N., Gómez-Alonso S., García-Romero E., Gómez M. V., Velders A. H. und Hermosín-Gutiérrez I. (2008): Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes; Journal of agricultural and food chemistry, Band 57 (1), Seiten 209-219
- Cathala G., Savouret J.-F., Mendez B., West B. L., Karin M., Martial J. A. und Baxter J. D. (1983): A Methode for Isolation of intact, translationally active ribonucleic acid DNA; Laboratory Methods, Band 2 (4), Seiten 329-335
- Celebi-Toprak F., Thompson J. R. und Perry K. L. (2013): Arabis mosaic virus in Grapevines in New York State; Plant Disease, Band 97 (6), Seite 849
- Chang R., Yeager A. R. und Finney N. S. (2003): Probing the mechanism of a fungal glycosyltransferase essential for cell wall biosynthesis. UDP-Chitobiose is not a substrate for chitin synthase; Organic & biomolecular chemistry, Band 1 (1), Seiten 39-41
- Chapuis L., Richard L. und Dubos B. (1998): Variation in susceptibility of grapevine pruning wound to infection by *Eutypa lata* in south-western France; Plant Pathology, Band 47 (4), Seiten 463-472.

- Charles J. G., Cohen D., Walker J.T. S., Forgie S. A., Bell V. A., Breen K. C. (2006): A review of the ecology of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3); *Viticulture; New Zealand Plant Protection*; Band 59, Seiten 330-337
- Chilton M. D., Saiki R. K., Yadav N., Gordon M. P. und Quetier F. (1980): T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Band 77 (7), Seiten 4060-4064
- Chumley F. G. und Valent B. (1990): Genetic analysis of melanin-deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*; *Molecular Plant Microbe Interactions*, Band 3, Seiten 135-143
- Cichelli A., Calzarano F. und Odoardi M. (2001): Preliminary evaluation of variations in composition induced by esca on cv. Trebbiano d'Abruzzo grapes and wines; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 40 (3), Seiten 443-448
- Clay K. (1991): Endophytes as Antagonists of Plant Pests; *Microbial Ecology of Leaves*, Seiten 331-357
- Collemare J., Billard, A., Böhnert, H. U. und Lebrun M. H. (2008): Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity; *Mycological research*, Band 112 (2), Seiten 207-215
- Comalada M., Ballester I., Bailón E., Sierra S., Xaus J., Gálvez J. und Zarzuelo A. (2006): Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship; *Biochemical pharmacology*, Band 72 (8), Seiten 1010-1021
- Compant S., Brader G., Muzammil S., Sessitsch A., Lebrühi A. Und Mathieu F. (2012): Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases; *Biocontrol*, doi: 10.1007/s10526-012-9479-6
- Copping L. G. und Duke S. O. (2007): Natural products that have been used commercially as crop protection agents; *Pest management science*, Band 63 (6), Seiten 524-554
- Cortesi P., Fischer M. und Milgroom M. G. (2000): Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of Esca; *Phytopathology*, Band 90 (9), Seiten 967-972
- Cretazzo E., Tomás M., Padilla C., Roselló J., Medrano H., Padilla V. und Cifre J.(2010): Incidence of virus infection in old vineyards of local grapevine varieties from Majorca: implications for clonal selection strategies; *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Spanish Journal of Agricultural Research*, Band 8 (2), Seiten 409-418
- Cristina Sgherri, Annamaria Ranieri, Mike F. Quartacci (2013): Antioxidative responses in *Vitis vinifera* infected by grapevine fanleaf virus; *Journal of Plant Physiology*, Band 170 (2), Seiten 121-128
- Crous P. W. und Gams W. (2006): *Phaeomonniella chlamydospora*, a Causal Organism of Petri Grapevine Decline and Esca; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 39 (1), Seiten 112-118
- Crous W. P., Verkley G. J. M., Groenewald J. Z. und Samson R. A. (2009): *Fungal Biodiversity*; CBS Laboratory Manual Series, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, The Netherlands
- Cseh E., Takács A., Kocsis L. und Gáborjányi R. (2012): General properties of grapevine viruses occurring in Hungary; *Journal of Central European Agriculture*, 2012, Band 13 (1), Seiten 44-57
- Cui C. M., Li X. M., Li C. S., Proksch P. und Wang B. G. (2010): Cytochalasins A- G, Cytochalasans from a Marine-Derived Endophytic Fungus, *Chaetomium globosum* QEN-14; *Journal of natural products*, Band 73 (4), Seiten 729-733
- Cullen D., Leong S. A., Wilson L. J. und Henner, D. J. (1987): Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene hpt Gene; Band 57 (1), Seiten 21-26

- Daudi A., Cheng Z., O'Brien J. A., Mammarella N., Khan S., Ausubel F. M. und Bolwell G. P. (2012): The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity; *The Plant Cell Online*, Band 24 (1), Seiten 275-287
- Dayan F. E., Cantrell C. L. und Duke S. O. (2009): Natural products in crop protection; *Bioorganic und medicinal chemistry*, Band 17 (12), Seiten 4022-4034
- De Bary A. (1879): *Die Erscheinung der Symbiose*; Verlag K.J. Trübner, Strassburg, Deutschland
- de Groot M. J., Bundock P., Hooykaas P. J. und Beijersbergen A. G. (1998): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi; *Nature biotechnology*, Band 16, Seiten 839-842
- Dean R. A., Talbot N. J., Ebbole D. J., Farman M. L., Mitchell T. K., Orbach M. J., Thon M., Kulkarni R., Xu J.-R., Pan H., Read N. D., Lee Y.-H., Carbone I., Brown D., Oh Y. Y., Donofrio N., Jeong J. S., Soanes D. M., Djonovic S., Kolomiets E., Rehmeier C., Li W., Harding M., Kim S., Lebrun M., Bohnert H., Coughlan S., Butler J., Calvo S., Ma L., Nicol R., Purcell S., Nusbaum C., Galagan J. E. und Birren B. W. (2005): The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*; *Nature*, Band 434 (7036), Seiten 980-986
- Dean R., Van Kan J. A., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu P. D. und Foster, G. D. (2012): The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology; *Molecular plant pathology*, Band 13 (4), Seiten 414-430
- Decante D. und van Helden M. (2001): Répartition intraparcellaire des cicadelles ravageurs du vignoble bordelais; *Integrated Control in Viticulture*, IOBC, Band 24 (7), Seiten 203– 210
- Degenkolb T., Gräfenhan T., Berg A., Nirenberg H. I., Gams W. und Brückner H. (2006): Peptaibiotics: Screening for Polypeptide Antibiotics (Peptaibiotics) from Plant-Protective *Trichoderma* Species; *Chemistry & biodiversity*, Band 3 (6), Seiten 593-610
- Degenkolb T., Von Doehren H., Fog Nielsen K., Samuels G. J. und Brückner H. (2008): Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*; *Chemistry & Biodiversity*, Band 5 (5), Seiten 671-680
- Delplancke M., Alvarez N., Benoit L., Espíndola A., Joly H., Neuenschwander S., Arrigo N. (2013): Evolutionary history of almond tree domestication in the Mediterranean basin; *Molecular Ecology*, Band 22 (4), Seiten 1092–1104
- De Miccolis Angelini R. M., Rotolo C., Masiello M., Gerin D., Pollastro S. und Faretra F. (2014): Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy; *Pest management science*, DOI: 10.1002/ps.3711
- Di Marco S., Mazzullo A., Cesari A. und Osti F. (2001): How iron could be involved in esca fungi development; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 40 (3), Seiten 449-452
- Di Marco S., Osti F., Roberti R., Calzarano F., Cesari A., Brunelli A. und Canova A. (2002): Activity of *Trichoderma* species towards *Phaeoconiella chlamydospora*, a pathogen associated with Esca on grapevine; *Atti Giornate fitopatologiche*, Band 2, Seiten 419-424
- Di Marco S. und Osti F. (2007): Application of *Trichoderma* to Prevent *Phaeoconiella chlamydospora* Infections in Organic Nurseries; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 46 (1), Seiten 73-83
- Díaz G. A. und Latorre B. A. (2013): Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile; *Crop Protection*, Band 46, Seiten 106–112
- Díaz-Sánchez V., Avalos J. und Limón M. C. (2012): Identification and regulation of fusA, the polyketide synthase gene responsible for fusarin production in *Fusarium fujikuroi*; *Applied and environmental microbiology*, Band 78 (20), Seiten 7258-7266



- Dickinson J. M., Hanson J. R. und Truneh A. (1995): Metabolites of some biological control agents; Pesticide science, Band 44 (4), Seiten 389-393
- Domsch K. H., Gams W. und Anderson T.-H. (2007): Compendium of Soil Fungi; Ausgabe 2, Verlag IHW-Verlag
- Downey M. O., Harvey J. S. und Robinson S. P. (2003): Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.); Australian Journal of Grape and Wine Research, Band 9 (2), Seiten 110-121
- Druzhinina I. S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B. A., Kenerley C. M., Monte E., Mukherjee P. K., Zeilinger S., Grigoriev I. V. und Kubicek C. P. (2011): *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success; Nature Reviews Microbiology, Band 9 (10), Seiten 749-759
- Dry I. B., Feechan A., Anderson C., Jermakow A. M., Bouquet A., Adam-Blondon A.-F. und Thomas M. R. (2010): Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew; Australian Journal of Grape and Wine Research, Band 16, Seiten 94–105
- Duso C., Castagnoli M., Simoni S. und Angeli G. (2010): The impact of eriophyoids on crops: recent issues on *Aculus schlechtendali*, *Calepitrimerus vitis* and *Aculops lycopersici*; Experimental and Applied Acarology, Band 51 (1-3), Seiten 151-168
- Elix J. A., Evans J. E. und Nash T. H. (1988): New depsides from *Dimelaena* lichens; Australian Journal of Chemistry, Band 41 (11), Seiten 1789-1796
- Elliott C. E., Callahan D. L., Schwenk D., Nett M., Hoffmeister D. und Howlett B. J. (2013): A gene cluster responsible for biosynthesis of phomonoic acid in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*; Fungal Genetics and Biology, Band 53, Seiten 50–58
- English-Loeb G., Villani M., Martinson T., Forsline A. und Consolie N. (1999). Use of entomopathogenic nematodes for control of grape *phylloxera* (*Homoptera: Phylloxeridae*): a laboratory evaluation; Environmental entomology, Band 28 (5), Seiten 890-894
- Ermini M. J., Laise P. B. und Essler C. G. (2010): Quantitative effect of leaf damage caused by downy mildew (*Plasmopara viticola*) on growth and yield quality of grapevine 'Merlot' (*Vitis vinifera*); Vitis, Band 49 (2), Seiten 77–85
- Escoriza G., Sansberro P., Garcia-Lampasona S., Gatica M., Bottini R. und Piccoli P. (2013): In vitro cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay synthesize the phytoalexin nerolidol upon infection by *Phaeoacremonium parasiticum*; Phytopathologia Mediterranea, Band 52 (2), Seiten 289-297
- Eskalen A., Feliciano A. J. und Gubler W. D. (2007): Susceptibility of Grapevine Pruning Wounds and Symptom Development in Response to Infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora*; Plant Disease, Band 91 (9), Seiten 1100-1104
- Esmenjaud D., Bouquet A., Demangeat G., Van Helden M. und Ollat N. (2011): Nematode-Resistant Rootstocks as a major component of the management alternative for grapevine fanleaf virus control in grapes; Acta Horticulturae (ISHS), Band 904, Seiten 111-115
- Espósito A., Fiorentino A., D'Abrosca B., Izzo A., Cefarelli G., Golino A. und Monaco P. (2008): Potential allelopathic interference of *Melilotus neapolitana* metabolites on three coexisting species of *Mediterranean herbaceous* plant community; Journal of Plant Interactions, Band 3 (3), Seiten 199-210
- Estreicher S. K. (2013): A Brief History of Wine in Spain; European Review, Band 21, Seiten 209-239
- Evidente A., Sparapano L., Andolfi A. und Bruno G. (2000): Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with Esca of grapevine; Phytopathologia Mediterranea, Band 39 (1), Seiten 162-168

- Evidente A., Superchi S., Cimmino A., Mazzeo G., Mugnai L., Rubiales D. und Villegas-Fernández A. M. (2011): Regiolone and isosclerone, two enantiomeric phytotoxic naphthalenone pentaketides: computational assignment of absolute configuration and its relationship with phytotoxic activity; *European Journal of Organic Chemistry*, Band 28, Seiten 5564-5570
- Ezra D., Hess W. M. und Strobel G. A. (2004): New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus; *Microbiology*, Band 150 (12), Seiten 4023-4031
- Faeth S. H. (2002): Are endophytic fungi defensive plant mutualists?; *Oikos*, Band 98 (1), Seiten 25-36
- Falck R. (1931): On the influence of floating on the resistance of structural timber to dry rot and on the protection of wood by fungous infection and diffusion saturation; *Mitteldeutsche Forstwirtschaft und Forstwissenschaft*, Seiten 480-485
- Ferris H., Zheng L. und Walker M. A. (2012): Resistance of Grape Rootstocks to Plant-parasitic Nematodes; *Journal Nematologie*, Band 44 (4), Seiten 377-386
- Figueiredo A., Fortes A. M., Ferreira S., Sebastiana M., Hae Choi Y., Sousa L., Acioli-Santos B., Pessoa F., Verpoorte R., und Maria Salome Pais (2008): Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi; *Journal of Experimental Botany*, Band 59 (12), Seiten 3371-3381
- Figueiredo J. G., Goulin E. H., Tanaka F., Stringari D., Kava-Cordeiro V., Galli-Terasawa L. V. und Glienke C. (2010): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*; *Journal of microbiological methods*, Band 80 (2), Seiten 143-147
- Fischer J. (2010a): Etablierung effizienter Transformationsmethoden Esca-assoziierter Ascomyceten; Diplomarbeit, IBWF, TU Kaiserslautern
- Fischer M. (2002): A new wood-decaying basidiomycete species associated with Esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (*Hymenochaetales*); *Mycological Progress*, Band 1 (3), Seiten 315-324
- Fischer M. (2010b): *Fomitiporia mediterranea* (*Basidiomycetes*) as a white rot pathogen of Esca-diseased vines: sporulation and host colonization in the field; 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, Berlin, Germany, 6-9 September, (428), Seiten 335-336
- Fischer M. und Kassemeyer H. H. (2003): Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany; *Vitis-Geilweilerhof*, Band 42 (3), Seiten 109-116
- Fisher P. J., Petrini O. S. B. C. und Sutton B. C. (1993): A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England; *Sydowia*, Band 45 (2), Seiten 338-345
- Fleurat-Lessard P., Luini E., Berjeaud J.-M. und Roblin G. (2010): Diagnosis of grapevine Esca disease by immunological detection of *Phaeoconiella chlamydospora*, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Band 16 (3), Seiten 455-463
- Food and Agriculture Organisation of the United Nations (2009); [http://www.responsibleagroinvestment.org/sites/responsibleagroinvestment.org/files/FAO\\_Agbiz%20handbook\\_grapes\\_0.pdf](http://www.responsibleagroinvestment.org/sites/responsibleagroinvestment.org/files/FAO_Agbiz%20handbook_grapes_0.pdf)
- Fourie P. H. und Halleen F. (2006): Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens; *European Journal of Plant Pathology*, Band 116 (4), Seiten 255-265
- Fujii I., Mori Y., Watanabe A., Kubo Y., Tsuji G. und Ebizuka Y. (2000): Enzymatic synthesis of 1, 3, 6, 8-tetrahydroxynaphthalene solely from malonyl coenzyme A by a fungal iterative type I polyketide synthase PKS1;

Biochemistry, Band 39 (30), Seiten 8853-8858

Furuya S., Mochizuki M., Aokia Y., Kobayashia H., Takayanagi T., Shimizu M. und Suzuki S. (2010): Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases; *Biocontrol Science and Technology*, Band 21 (6), Seiten 705-720

Fuska J., Kuhr I., Nemeč P. und Fusková A. (1970): The effect of palitantin, a metabolite of *Penicillium frequentans* on *Leishmania brasiliensis*; *Folia Microbiologica*, Band 15 (2), Seiten 111-116

Gadoury D. M., Cadle-Davidson L., Wilcox W. F., Dry I. B., Seem R. C. und Milgroom M. G. (2012): Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph; *Molecular Plant Pathology*, Band 13 (1), Seiten 1-16

Gaffoor I., Brown D. W., Plattner, R., Proctor R. H., Qi W. und Trail F. (2005): Functional analysis of the polyketide synthase genes in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*); *Eukaryotic Cell*, Band 4 (11), Seiten 1926-1933

Gajera H. P. und Vakharia D. N. (2010): Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem; *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Band 74 (3), Seiten 274-282

Gams W. und Bissett J. (1998): Morphology and identification of *Trichoderma*; *Trichoderma* and *Gliocladium*, Basic biology, taxonomy and genetics, Band 1, Seiten 3-34

Gan P. H. P., Dodds P. N. und Hardham H. R. (2012): Plant Infection by Biotrophic Fungal and Oomycete Pathogens; Signaling and Communication in Plant Symbiosis; *Signaling and Communication in Plants*, Band 10, 2012, Seiten 183-212

García-Garrido M., Lenzemo V., Castellanos-Morales V., Steinkellner S. und Vierheilig H. (2009): Strigolactones, signals for parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi; *Mycorrhiza*, Band 19 (7), Seiten 449-459

Gokce E., Franck W. L., Oh Y., Dean R. A. und Muddiman D. C. (2012): In-depth analysis of the *Magnaporthe oryzae* conidial proteome; *Journal of proteome research*, Band 11 (12), Seiten 5827-5835

González V. und Tello M. L. (2011): The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain; *Fungal Diversity*, Band 47 (1), Seiten 29-42

Goodwin S. B., M'Barek S. B., Dhillon B., Wittenberg A. H., Crane C. F., Hane J. K. und de Vries R. P. (2011): Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis; *PLoS genetics*, Band 7 (6), Seiten 1-17

Götz B. (1944): Freiland- und Laboratoriumsuntersuchungen über das Puppenstadium des einbindigen Traubenwicklers *Clysia ambiguella*; *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, Band 30 (4), Seiten 526-550

Gramaje D., Aguilar M. I. und Armengol J. (2011): First Report of *Phaeoacremonium krajdienii* Causing Petri Disease of Grapevine in Spain; *Plant Disease*, Band 95 (5), Seite 615

Gramaje D., Armengol J. (2011): Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification and management strategies; *Plant Diseases*, Band 95, Seiten 1040-1055

Gramaje D., Ayres M. R., Trouillas F. P. und Sosnowski M. R. (2012): Efficacy of fungicides on mycelial growth of diatrypaceous fungi associated with grapevine trunk disease; *Australasian Plant Pathology*, Band 41 (3), Seiten 295-300

Graniti A., Sparapano L. und Bruno G. (2001): Some advancements of the studies on pathogenesis of Esca and brown wood-streaking of grapevines [*Vitis vinifera* L.]; *Informatore Fitopatologico*, Band 51 (5), Seiten 13-21

- Gritz L. und Davies J. (1983): Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*; *Gene*, Band 25 (2), Seiten 179-188
- Großkinsky D. K., van der Graaff E. und Roitsch T. (2012): Phytoalexin transgenics in crop protection-Fairy tale with a happy end?; *Plant Science*, Band 195 (10), Seiten 54-70
- Gründlinger M., Yasmin S., Lechner B. E., Geley S., Schrettl M., Hynes M. und Haas H. (2013): Fungal siderophore biosynthesis is partially localized in peroxisomes; *Molecular microbiology*, Band 88 (5), Seiten 862-875
- Grundmann E. (2012): Fermentation von möglichen Esca-assoziierten Pilzen und Charakterisierung potentieller pathogenitätsrelevanter Gene, Masterarbeit IBWF, TU Kaiserslautern
- Gubler W. D., Rolshausen P. E., Trouillas F. P., Urbez J. R., Voegel T., Leavitt G. M. und Weber E. A. (2009): Research update – grapevine trunk diseases in California; *Practical Winery & Vineyard Magazine*, Band 2, Seiten 1-9
- Guerin-Dubrana L., Labenne A., Labrousse J. C., Bastien S., Rey P. und Gegout-Petit A. (2013): Statistical analysis of grapevine mortality associated with Esca or *Eutypa* dieback foliar expression; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 52 (2), Seiten 276-288
- Gunde-Cimerman N., Ramos J. und Plemenitaš A. (2009): Halotolerant and halophilic fungi; *Mycological research*, Band 113 (11), Seiten 1231-1241
- Gutiérrez-Gutiérrez C., Palomares-Rius J. E., Jiménez-Díaz R. M. und Castillo P. (2011): Host suitability of *Vitis* rootstocks to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the dagger nematode *Xiphinema index*, and plant damage caused by infections; *Plant Pathology*, Band 60 (3), Seiten 575-585
- Haas H., Eisendle M. und Turgeon B. G. (2008): Siderophores in fungal physiology and virulence; *Annual Review Phytopathology*, Band 46, Seiten 149-187
- Halleen F., Fourie P. H. und Lombard P. J. (2010): Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods; *South African Journal for Enology & Viticulture*, Band 31 (2), Seiten 125-132
- Hamer J. E. und Timberlake W. E. (1987): Functional organization of the *Aspergillus nidulans* trpC promoter; *Molecular and cellular biology*, Band 7 (7), Seiten 2352-2359
- Hanson L. E. und Howell C. R. (2004): Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma viren*; *Phytopathology*, Band 94 (2), Seiten 171-176
- Hao Z., Fayolle L., van Tuinen D., Chatagnier O., Li X., Gianinazzi S. und Gianinazzi-Pearson V. (2012): Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* involves priming of defence gene responses in grapevine; *Journal of Experimental Botany*, (2012) Band 63 (10), Seiten 3657-3672
- Harm A., Kassemeyer H. H., Seibicke T. und Regner F. (2011): Evaluation of chemical and natural resistance inducers against downy mildew (*Plasmopara viticola*) in grapevine; *American Journal of Enology and Viticulture*, Band 62 (2), Seiten 184-192
- Harman E., Howell R., Viterbo A., Chet I. und Lorito M. (2004): *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts; *Nature Reviews Microbiology*, Band 2 (1), Seiten 43-56
- Harrison B. D. und Winslow R. D. (1961): Laboratory and field studies on the relation of arabis mosaic virus to its nematode vector *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky); *Annals of Applied Biology*, Band 49 (4), Seiten 621-633
- Hattori N., Adachi M., Kaneko T., Shimosuma M., Ichinohe M. und Iozumi K. (2000): Case Report. Onychomycosis due to *Chaetomium globosum* successfully treated with itraconazole; *MYCOSES-Berlin*, Band 43 (1-2), Seiten 89-

- Henriquez J. L., Schroeder B. K., Riquelme D., und Alarcon P. A. (2011): Inhibitory effects of *Bacillus amyloliquefasciens* and *Paenibacillus polymyxa* on *Botrytis cinerea* causing gray rot of grapes; *Phytopathology*, Band 101 (6), Seiten 71-71
- Hermosa R., Viterbo A., Chet I. und Monte E. (2012): Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes; *Microbiology*, Band 158 (1), Seiten 17-25
- Hider R. C. und Kong X. (2010): Chemistry and biology of siderophores; *Natural product reports*, Band 27 (5), Seiten 637-657
- Hof C., Eisfeld K., Welzel K., Antelo L., Foster A. J. und Anke H. (2007): Ferricrocin synthesis in *Magnaporthe grisea* and its role in pathogenicity in rice; *Molecular plant pathology*, Band 8 (2), Seiten 163-172
- Hofstetter V., Buyck B., Croll D., Viret O., Couloux A., & Gindro K. (2012): What if Esca disease of grapevine were not a fungal disease?; *Fungal Diversity*, Band 54 (1), Seiten 51-67
- Höfte M. (1993): Classes of microbial siderophores; Iron chelation in plants and soil microorganisms, Academic Press Inc., San Diego, California, Seiten 3-26
- Hoppe, T. und Kutschera U. (2010): In the shadow of Darwin: Anton de Bary's origin of myxomycetology and a molecular phylogeny of the plasmodial slime molds; *Theory in Biosciences*, Band 129 (1), Seiten 15-23
- Howell C. R. (2003): Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts; *Plant disease*, Band 87 (1), Seiten 4-10
- Hrazdina G., Marx G. A. und Hoch H. C. (1982): Distribution of Secondary Plant Metabolites and Their Biosynthetic Enzymes in Pea (*Pisum sativum* L.) Leaves Anthocyanins and Flavonol Glycosides; *Plant Physiology*, Band 70 (3), Seiten 745-748
- Huneck S., Sundholm G. und Follmann, G. (1980): 3-Chlordivaricatsäure, ein neues depsid aus *Thelomma*-Arten; *Phytochemistry*, Band 19 (4), Seiten 645-649
- Hübschen J., Kling L., Ipach U., Zinkernagel V., Brown D. und Neilson R. (2004): Development and validation of species-specific primers that provide a molecular diagnostic for virus-vector longidorid nematodes and related species in German viticulture; *European Journal of Plant Pathology*, Band 110 (9), Seiten 883-891
- Hyde K. D. und Soyong, K. (2008): The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, Band 33, Seiten 163-173
- HYPPZ, INRA, The french national Institute for agricultural research, Encyclopédie des ravageurs européens, <http://www7.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/6eupamb.htm>
- Ibrahim G. A., Metwally A. M., El-Halawany A. S. H., El-Sayed K. M. (2010): Evaluating the efficiency of different levels of *Neoseiulus californicus*, MC gregor released for controlling the spider mite *Tetranychus urticae* (Koch) and european red mite *Panonychus ulmi* (Koch), on young apple trees; *Egyptian Journal of Agricultural Research*, Band 88 (2), Seiten 451-463
- Idnurm A. und Howlett B. J. (2001): Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi; *Molecular Plant Pathology*, Band 2 (4), Seiten 241-255
- Jahn B., Koch A., Schmidt A., Wanner G., Gehringer H., Bhakdi S. und Brakhage, A. A. (1997): Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence; *Infection and immunity*, Band 65 (12), Seiten 5110-5117
- Jelkmann W., Mikona C., Turturo C., Navarro B, Rott M. E., Menzel W., Saldarelli P, Minafra A. und Martelli G. P. (2012): Molecular characterization and taxonomy of grapevine leafroll-associated virus 7; *Archives of Virology*,

Band 157 (2), Seiten 359-362

Jervis P. J. und Liam R. C. (2008): Total Synthesis and Proof of Relative Stereochemistry of (-)-Aureonitol; Journal of Organic Chemistry, Band 73, Seiten 7616-7624

Jiao W., Feng Y., Blunt J. W., Cole A. L. und Munro M. H. (2004): Chaetoglobosins Q, R, and T, Three Further New Metabolites from *Chaetomium g lobosum*; Journal of natural products, Band 67 (10), Seiten 1722-1725

Kagan J., Sharon, I., Beja O. und Kuhn J. C. (2008): The tryptophan pathway genes of the Sargasso Sea metagenome: new operon structures and the prevalence of non-operon organization; Genome Biology, Band 9 (1), Seiten 1-17

Kast W. K. (2013): *Botrytis* Bekämpfung: kulturtechnisch –chemisch-ökologisch; Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau Weinsberg, <http://www.lvwo-bw.de/pb/Lde/669334>

Kathiresan K. und Manivannan S. (2006): alpha-Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil; African journal of Biotechnology, Band 5 (10), Seiten 829-832

Keller N. P., Turner G. und Bennett J. W. (2005): Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics; Nature Reviews Microbiology, Band 3 (12), Seiten 937-947

Kexiang G., Xiaoguang L., Yonghong L., Tianbo Z. und Shuliang W. (2002): Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. piricola, the cause of apple ring rot; Journal of Phytopathology, Band 150 (4-5), Seiten 271-276

Khaldi N., Collemare J., Lebrun M. H. und Wolfe K. H. (2008): Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi; Genome Biology, Band 9 (1), Seiten 1-10

Kilani-Feki O. und Jaoua S. (2011): Biological control of *Botrytis cinerea* using the antagonistic and endophytic *Burkholderia cepacia* Cs5 for vine plantlet protection; Canadian Journal of Microbiology, Band 57, Seiten 896-901

Kline J. R., Martin J. R., Jordan C. F. und Koranda J. J. (1970): Measurement of transpiration in tropical trees with tritiated water; Ecology, Band 51 (6), Seiten 1068-1073

Kolb C. A., Kopecký J., Riederer M. und Pfündel E. E. (2003): UV screening by phenolics in berries of grapevine (*Vitis vinifera*); Functional plant biology, Band 30 (12), Seiten 1177-1186

Kotze C. (2008): Biological control of the grapevine trunk disease pathogens: pruning wound protection; Dissertation, Stellenbosch: University of Stellenbosch

Kramer T. und Nauen R. (2011): Monitoring of spirodiclofen susceptibility in field populations of European red mites, *Panonychus ulmi* (Koch) (*Acari: Tetranychidae*), and the cross-resistance pattern of a laboratory-selected strain; Pest Management Science, Band 67 (10), Seiten 1285–1293

Krings M., Taylor T. und Dotzler N. (2012): Fungal endophytes as a driving force in land plant evolution: evidence from the fossil record; Biocomplexity of Plant–Fungal Interactions, First Edition. Edited by Darlene Southworth, Published 2012 by John Wiley & Sons, Inc.

Król E. (2006): Fungi inhabiting decaying grapevine (*Vitis* spp.) cuttings; Journal of Plant Protection Research, Band 46 (4), Seiten 353-357

Kuntzmann P., Villaume S., Larignon P. und Bertsch C. (2010): Esca, BDA and Eutypiosis: foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace; Vitis, Band 49 (2), Seiten 71-76

Laimer M., Lemaire O., Herrbach E., Goldschmidt V., Minafra A., Bianco P. und Wetzler T. (2012): Resistance to viruses, Phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: A review; Journal of Plant Pathology, Band 91 (1), Seiten 7-23

- Lambert C., Papastamoulis Y., Waffo-Tégou P., Mérillon J. und Cluzet S. (2012): Effects of phenolic compounds towards grapevine wood decay fungi; Oeno2011 - Actes de colloques du 9e symposium international d'oenologie de Bordeaux, Seite 90-94
- Lamprecht R. L., Spaltman M., Stephan D., Wetzels T. und Burger J. T. (2013): Complete Nucleotide Sequence of a South African Isolate of Grapevine Fanleaf Virus and Its Associated Satellite RNA; Viruses, Band 5, Seiten 1815-1823
- Landi L., Murolo S. und Romanazzi G. (2012): Colonization of *Vitis* spp. Wood by sGFP-Transformed *Phaeoconiella chlamydospora*, a Tracheomycotic Fungus Involved in Esca Disease; Phytopathology, Band 102 (3), Seiten 290-297
- Landrault N., Larronde F., Delaunay J.-G., Castagnino C., Vercauteren J., Merillon J.-M., Gasc F., Cros G. und Teissedre P.-L. (2002): Levels of Stilbene Oligomers and Astilbin in French Varietal Wines and in Grapes during Noble Rot Development; Journal of Agricultural and Food Chemistry, Band 50 (7), Seiten 2046-2052
- Langcake P., Cornford C. A. und Pryce R. J. (1979): Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves; Phytochemistry, Band 18 (6), Seiten 1025-1027
- Larignon P. und Dubos B. (1997): Fungi associated with Esca disease in grapevine; European Journal of Plant Pathology, Band 103 (2), Seiten 147-157
- Larignon P. und Dubos B. (2000): Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*: In First international workshop on grapevine trunk diseases-Esca and grapevine declines, Siena, Italy, 1-3 October 1999, Band 39 (1), Seiten 184-189
- Latouche G., Bellow S., Poutaraud A., Meyer S. und Cerovic Z. G. (2013): Influence of constitutive phenolic compounds on the response of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves to infection by *Plasmopara viticola*; Planta, Band 237 (1), Seiten 351-361
- Lecomte P. (2009): Control of grapevine trunk diseases (Esca): present status and perspectives of solutions; Progrès Agricole et Viticole, Band 126 (18), Seiten 401-408
- Lecomte P., Darrieutort G., Pieri P., Rey P. und Fermaud M. (2012): Esca in France: increase, possible causes and symptoms; 10e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes 2012, Seiten 391-402
- Lee B. N., Kroken S., Chou D. Y., Robbertse B., Yoder O. C. und Turgeon B. G. (2005): Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress; Eukaryotic Cell, Band 4 (3), Seiten 545-555
- Letousey P., Baillieul F., Perrot G., Rabenoelina F., Boulay M., Vaillant-Gaveau N., Clément C. und Fontaine F. (2010): Early events prior to visual symptoms in the apoplectic form of grapevine Esca disease; Phytopathology, Band 100 (5), Seiten 424-431
- Lewis D. H. (1973): Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy; Biological Reviews, Band 48 (2), Seiten 261-277
- Li H. Q., Li X. J., Wang Y. L., Zhang Q., Zhang A. L., Gao J. M. und Zhang X. C. (2011): Antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*; Biochemical Systematics and Ecology, Band 39 (4), Seiten 876-879
- Licht L. (2012): Genetik-gestützte Methoden zur Fungizid-Targetsuche und fed-batch geführte Metabolitenuntersuchung Esca-assoziiierter Pilze, Bachelorarbeit IBWF, Fachhochschule Trier (Umweltcampus Birkenfeld)
- Lima M. R., Felgueiras M. L., Graça G., Rodrigues J. E., Barros A., Gil A. M. und Dias A. C. (2010): NMR metabolomics

of Esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves; Journal of experimental botany, Band 61 (14), Seiten 4033-4042

Liu G., Greenshields D. L., Sammynaiken R., Hirji R. N., Selvaraj G. und Wei Y. (2007): Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses; Journal of cell science, Band 120 (4), Seiten 596-605

Lorrain B., Ky I., Pasquier G., Jourdes M., Guerin Dubrana L., Gény L., Rey P., Donèche B. und Teissedre P.-L. (2012): Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines; Australian Journal of Grape and Wine Research, Band 18 (1), Seiten 64-72

Lozzia G. C. und Rigamonti I. E. (2001): Environmental reevaluation and strategies of Integrated Pest Management (IPM); Integrated Control in Viticulture, Band 24 (7), Seiten 165 - 171

Luque J., Martos S., Aroca A., Raposo R. und Garcia-Figueres F. (2009): Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain; Journal of Plant Pathology, Band 91 (2), Seiten 381-390

Magnin-Robert M., Letousey P., Spagnolo A., Rabenoelina F., Jacquens L., Mercier L., Christophe C. und Fontaine F. (2011): Leaf stripe form of Esca induces alteration of photosynthesis and defence reactions in presymptomatic leave; Functional Plant Biology, Band 38 (11), Seiten 856-866

Maier F. J., Malz S., Lösch A. P., Lacour T. und Schäfer W. (2005): Development of a highly efficient gene targeting system for *Fusarium graminearum* using the disruption of a polyketide synthase gene as a visible marker; FEMS yeast research, Band 5 (6-7), Seiten 653-662

Marco di S., Osti F und Mugnai L. (2010): First studies on the potential of copper formulation for the control of leaf stripe disease within Esca complex in grapevine; Phytopatology Mediterranea, Band 2011 (50), Seiten 300-309

Martín L. und Martín M. T. (2013): Multi-gene sequence analysis and phenotypic diversity of *Phaeoacremonium* species isolated from grapevines in Spain; European Journal of Plant Pathology, Band 137 (2), Seiten 343-361

Martin N., Vesentini D., Rego C., Monteiro S., Oliveira H. und Ferreira R. B. (2009): *Phaeomoniella chlamydospora* infection induces changes in phenolic compounds content in *Vitis vinifera*; Phytopathologia Mediterranea, Band 48 (1), Seiten 101-116

Martinson T. (1995): Management of Insect Pests in Organic Vineyards; Organic Grape and Wine Production Symposium, ed. R. Pool, Seiten 102-106

Masuoka N., Matsuda M. und Kubo I. (2012): Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids; Food Chemistry, Band 131 (2), Seiten 541-545

McGlacken G. P. und Fairlamb I. J. (2005): 2-Pyrone natural products and mimetics: isolation, characterisation and biological activity; Natural product reports, Band 22 (3), Seiten 369-385

McGovern P. E., Luley B. P., Rovira N., Mirzoian A., Callahan M. P., Smith K. E., Hall G. E., Davidson T. und Henkin J. M. (2013): Beginning of viticulture in France; PNAS, Band 110 (25) Seiten 10147-10152

McIntyre J. A. (2009): A 'civilized' drink and a 'civilizing' industry: wine growing and cultural imagining in colonial New South Wales, Dissertation, The University of Sydney, <http://hdl.handle.net/2123/5763>

McLean T., Fourie P. H. und McLeod A. (2009): Reporter gene transformation of the trunk disease pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* and biological control agent *Trichoderma harzianum*; Australasian Plant Pathology, Band 38 (2), Seiten 153-167

McMullin D. R., Sumarah M. W., Blackwell B. A. und Miller J. D. (2013): New azaphilones from *Chaetomium globosum* isolated from the built environment; Tetrahedron Letters, Band 54 (6), Seiten 568-572



- Mendgen K. und Hahn M. (2002): Plant infection and the establishment of fungal biotrophy; Trends in plant science, Band 7 (8), Seiten 352-356
- Michielse C. B., Hooykaas P. J., van den Hondel C. A. und Ram A. F. (2005): *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi; Current genetics, Band 48 (1), Seiten 1-17
- Michielse C. B., Hooykaas P. J., van den Hondel C. A. und Ram A. F. (2008): *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*; Nature protocols, Band 3 (10), Seiten 1671-1678
- Miclot A.-S., Wiedemann-Merdinoglu S., Duchêne E., Merdinoglu D. und Mestre P. (2012): A standardised method for the quantitative analysis of resistance to grapevine powdery mildew; European Journal of Plant Pathology, Band 133 (2), Seiten 483-495
- Miean K. H. und Mohamed S. (2001): Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants; Journal of agricultural and food chemistry, Band 49 (6), Seiten 3106-3112
- Miller T. C. und Gubler W. D. (2004): Sensitivity of California Isolates of *Uncinula necator* to Trifloxystrobin and Spiroxamine, and Update on Triadimefon Sensitivity; Plant Disease, Band 88 (11), Seiten 1205-1212
- Molitor D., Liermann J. C., Berkelmann-Löhnertz B., Buckel I., Opatz T. und Thines E. (2012): Phenguignardic Acid and Guignardic Acid, Phytotoxic Secondary Metabolites from *Guignardia bidwellii*; Journal of Natural Products, Band 75 (7), Seiten 1265-1269
- Moller W. S. und Kasimatis A. N. (1978): Dieback of grapevines caused by *Eutypa armeniacae*; Plant Disease Reporter, Band 62, Seiten 254-258
- Morgenstern I., Klopman S. und Hibbett D. S. (2008): Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the *Agaricomycetes*; Journal of molecular evolution, Band 66 (3), Seiten 243-257
- Morgenstern I., Robertson D. L. und Hibbett D. S. (2010): Characterization of three mnp genes of *Fomitiporia mediterranea* and report of additional class II peroxidases in the order *Hymenochaetales*; Applied and environmental microbiology, Band 76 (19), Seiten 6431-6440
- Moriwaki A., Kihara J., Kobayashi T., Tokunaga T., Arase S. und Honda Y. (2004): Insertional mutagenesis and characterization of a polyketide synthase gene (PKS1) required for melanin biosynthesis in *Bipolaris oryzae*; FEMS microbiology letters, Band 238 (1), Seiten 1-8
- Mostert L., Crous P. W., Groenewald J. E., Gams W. und Summerbell R. C. (2003): *Togninia (Calosphaeriales)* is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny; Mycologia, Band 95 (4), Seiten 646-659
- Moutinho-Pereira J., Correia C., Gonçalves B., Bacelar E., Coutinho J., Ferreira H., Lousada J. und Cortez M. (2012): Impacts of Leafroll-Associated Viruses (GLRaV-1 and-3) on the Physiology of the Portuguese Grapevine Cultivar 'Touriga Nacional' Growing under Field Conditions; Annuals of Applied Biology, Band 160 (3), Seiten 237-49
- Mugnai L., Graniti A. und Surico, G. (1999): Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines; Plant disease, Band 83 (5), Seiten 404-418
- Mukherjee M., Mukherjee K., Horwitz A., Zachow C., Berg, G. und Zeilinger S. (2012): *Trichoderma*-Plant-Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control; Indian Journal of Microbiology, Band 52 (4), Seiten 522-529
- Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Singh U. S., Mukherjee M. und Schmoll, M. (2013): *Trichoderma* in agriculture, industry and medicine: an overview; Trichoderma: biology and applications, doi: [10.1079/9781780642475.0001](https://doi.org/10.1079/9781780642475.0001), Seiten 1-9
- Mulero J., Pardo F. und Zafrilla P. (2010): Antioxidant activity and phenolic composition of organic and

- conventional grapes and wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, Band 23 (6), Seiten 569-574
- Mullins E. D. und Kang S. (2001): Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants; *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, Band 58 (14), Seiten 2043-2052
- Mundy D. C. und Manning M. A. (2010): Ecology and management of grapevine trunk diseases in New Zealand: a review; *New Zealand Plant Protection*, Band 63, Seiten 160-166
- Muruamendiaraz A., Lecomte P. und Legorburu F. J. (2009): Occurrence of the *Eutypa lata* sexual stage on grapevine in Rioja; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 48 (1), Seiten 140-144
- Mutawila C., Fourie P. H., Halleen F. und Mostert L. (2011): Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeoconiella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 50 (4), Seiten 46-60
- Nicholson T. P., Rudd B. A., Dawson M., Lazarus C. M., Simpson T. J. und Cox R. J. (2001): Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases; *Chemistry & biology*, Band (2), Seiten 157-178
- Nicol J. M., Stirling G. R., Rose B. J., May P. und van Heeswijck R. (2008): Impact of nematodes on grapevine growth and productivity: current knowledge and future directions, with special reference to Australian viticulture; *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Band 5 (3), Seiten 109-127
- Nielsen M. L., Nielsen J. B., Rank C., Klejnstrup M. L., Holm D. K., Brogaard K. H. und Mortensen U. H. (2011): A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*; *FEMS microbiology letters*, Band 321 (2), Seiten 157-166
- Núñez-Trujillo G., Cabrera R., Burgos-Reyes R. L., Silva E. da, Giménez C., Cosoveanu A. und Brito, N. (2012): Endophytic fungi from *Vitis vinifera* L. isolated in Canary Islands and Azores as potential biocontrol agents of *Botrytis cinerea*; *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, Band 16 (1), Seiten 1-6
- Odenbach D., Breth B., Thines E., Weber R. W., Anke H. und Foster A. J. (2007): The transcription factor Con7p is a central regulator of infection-related morphogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*; *Molecular microbiology*, Band 64 (2), Seiten 293-307
- Oide S., Moeder W., Haas H., Krasnoff S., Gibson D. D., Haas H., Yoshioka K. und Turgeon B. G. (2006): NPS6, encoding a non-ribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes; *Plant Cell*, Band 18, Seiten 283-53
- Oliver R. P. und Ipcho S. V. (2004): Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens; *Molecular Plant Pathology*, Band 5 (4), Seiten 347-352
- Osti F. und Di Marco S. (2010): Iron-dependent, non-enzymatic processes promoted by *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*, agents of Esca in grapevine; *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Band 74 (5), Seiten 309-316
- Özben S., Değirmenci K., Demirci F. und Uzunok S. (2012): First Report of *Phaeoacremonium scolyti* associated with Esca and Petri Diseases of Grapevine in Turkey; *Plant Disease*, Band 96 (5), Seite 766
- Padmavati M., Sakthivel N., Thara K. V. und Reddy A. R. (1997): Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids; *Phytochemistry*, Band 46 (3), Seite 499-502
- Palomares-Rius J. E., Gutiérrez-Gutiérrez C., Cantalapiedra-Navarrete C., Castillo P. (2012): Prevalence and diversity of Grapevine fanleaf virus in southern Spain; *Plant Pathology*; Band 61 (6), Seiten 1032-1042
- Pellegrini A., Leoni V. und Pertot I. (2012): Survival of *Trichoderma atroviride* SC1 on grapevine pruning wounds and efficacy against Esca disease agents; *IOBC/WPRS bulletin*, Band 78, Seiten 315-318

- Pereira-Crespo S., Segura A., García-Berrios J. und Cabaleiro C. (2012): Partial defoliation improves must quality of cv. Albariño infected by Grapevine leafroll associated virus 3; *Phytopathologia Mediterranea* and 51 (2), Seiten 383–389
- Pertot I., Savazzini F., Michelson L., Prodorutti D., Pellegrini C., Ferrari A. und Longa C. (2009): *Trichoderma atroviride* SC1 for biocontrol of fungal diseases in plants; Safe Crop Centre FEM Italy, IOBC/WPRS bulletin, [http://www.organic-world.net/fileadmin/documents-abim/presentations2008/session4/4\\_Pertot\\_ABIM-2008.pdf](http://www.organic-world.net/fileadmin/documents-abim/presentations2008/session4/4_Pertot_ABIM-2008.pdf)
- Philpott C. C. (2006): Iron uptake in fungi: a system for every source; *Biochimica et Biophysica Acta*, Band 1763 (7), Seiten 636-645
- Picotti P. und Pavan F. (2009): Influence of grapevine cultivars on the leafhopper *Empoasca vitis* and its egg parasitoids; *BioControl*, Band 54 (1), Seiten 55-63
- Pietersen G., Spreeth N., Oosthuizen T., van Rensburg A., van Rensburg M., Lottering D., Rossouw N. und Tooth D. (2013): Control of Grapevine Leafroll Disease Spread at a Commercial Wine Estate in South Africa: A Case Study; *American Journal of Enology and Viticulture*, Band 64 (2), Seiten 296-305
- Pihet M., Vandeputte P., Tronchin G., Renier G., Saulnier P., Georgeault, S., Mallet R., Chabasse D., Symoens F. und Bouchara J. P. (2009): Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia; *BMC microbiology*, Band 9 (177), Seiten 1-11
- Pinto K. M., Cordeiro do Nascimento L., Cintra de Souza Gomes E., Florêncio da Silva H. und Dos Reis M. J. (2012): Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epiderminological, biochemical and economic aspects; *European Journal of Plant Pathology*; Band 134: Seiten 745-754
- Platzer V. und Schweigkofler W. (2009): In vitro-Wirkung von Fungiziden auf *Fomitiporia mediterranea* und *Phaeoconiella chlamydospora*, die Erreger der Esca-Krankheit der Rebe; *Mitteilungen Klosterneuburg*, Band 59, Seiten 74-83
- Pozo M., Jung S., López-Ráez, J. und Azcón-Aguilar C. (2010): Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defence mechanisms; *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, doi 10.1007/978-90-481-9489-6\_9, Seiten 193-207
- Prodorutti D., Pellegrini A., Colombini A., Charlot B. und Pertot I. (2012): *Trichoderma atroviride* SC1 is a good wound colonizer and can protect grapevine from infections of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* in nurseries and vineyards; 8th International workshop on grapevine trunk diseases, Valencia, Spain, 18-21 June 2012
- Qin J. C., Gao J. M., Zhang Y. M., Yang S. X., Bai M. S., Ma Y. T. und Laatsch H. (2009a): Polyhydroxylated steroids from an endophytic fungus, *Chaetomium globosum* ZY-22 isolated from *Ginkgo biloba*; *Steroids*, Band 74 (9), Seiten 786-790
- Qin J. C., Zhang Y. M., Gao J. M., Bai M. S., Yang S. X., Laatsch H. und Zhang A. L. (2009b): Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*; *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, Band 19 (6), Seiten 1572-1574
- Quader M., Riley I. T., Ophel-Keller K., Walker G. E. (2002): Root-knot nematode quantification for management options in grapevines; *Australian Grapegrower and Winemaker*, Band 458, Seiten 13-16
- Rakimov A., Ben-Dov Y., White V. und Hoffmann A. A. (2013); Soft scale insects (*Hemiptera: Coccoidea: Coccidae*) on grapevines in Australia; *Australian Journal of Entomology*, Band 52 (4), Seiten 371-378
- Ramos D. E., Moller W. J. und English H. (1975): Production and dispersal of ascospores of *Eutypa armeniacae* in

California; Phytopathology, Band 65 (12), Seiten 1364-1371

Raski D. J., Goheen A. C., Lider L. A. und Meredith C. P. (1983): Strategies against Grapevine fanleaf virus and its nematode vector; Plant Disease, Band 67 (3), Seiten 335-339

Rattighieri E., Rinaldi R., Bowes K. und Mercuri A. M. (2013): Land use from seasonal archaeological sites: the archaeological evidence of small roman farmhouses in Cinigiano, south-eastern Tuscany – Central Italy; Annuario del Reale istituto botanico di (Roma), Band 3, Seiten 207–215

Reátegui R. F., Wicklow D. T. und Gloer J. B. (2006): Phaeofurans and sorbicillin analogues from a fungicolous *Phaeoacremonium* species (NRRL 32148); Journal of natural products, Band 69 (1), Seiten 113-117

Regner F. (2012): Biologische Erfassung und Bekämpfung von Esca; Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung. Wissensbericht 2011, Seiten 42-49

Reino J. L., Guerrero R. F., Hernández-Galán R. und Collado I. G. (2008): Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*; Phytochemistry Reviews, Band 7 (1), Seiten 89-123

Renshaw J. C., Robson G. D., Trinci A. P., Wiebe M. G., Livens F. R., Collison D. und Taylor R. J. (2002): Fungal siderophores: structures, functions and applications; Mycological Research, Band 106 (10), Seiten 1123-1142

Rho H. S., Kang S. und Lee Y. H. (2001): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*; Molecules and cells, Band 12 (3), Seiten 407-411

Riaz S., Hu R. und Walker M. A. (2012): A framework genetic map of *Muscadinia rotundifolia*; Theoretical and Applied Genetics, Band 125 (6), Seiten 1195-1210

Riaz S., Tenschler A. C., Ramming D. W. und Walker M. A. Walker (2010): Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding; Theoretical Applied Genetics, Band 122 (6), Seiten 1059-1073

Robbins S. H. (1981): Pressure trunk injections of potassium as a possible short term corrective measure for potassium deficiency in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and prune (*Prunus domestica* L.); <http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/23565/ROBBINSSCOTTH1982.pdf?sequence=1>

Rodriguez J., White Jr. F., Arnold A. und Redman. S. (2009): Fungal endophytes: diversity and functional roles; New Phytologist, Band 182 (2), Seiten 314-330

Rodriguez R. und Redman R. (2008): More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis; Journal of Experimental Botany, Band 59 (5), Seiten 1109-1114

Rodriguez R., Redman S. und Henson J. (2004). The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments; Mitigation Adaption Strategies Global, Change, Band 9, Seiten 261-272

Rolshausen P. E., Úrbez-Torres J. R., Rooney-Latham S., Eskalen A., Smith, R. J. und Gubler W. D. (2010): Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases; American Journal of Enology and Viticulture, 61 (1), Seiten 113-119

Rolshausen P. E., Baumgartner K., Travadon R., Fujiyoshi P., Mahoney N., Molyneux R. und Wilcox W. (2011): Species identification of the causal agent of *Eutypa* dieback of grapevine in northeastern US and southeastern Canadian vineyards; Phytopathology, Band 101 (6), Seiten 156-156

Rudelle J., Octave S., Kaid-Harche M., Roblin G. und Fleurat-Lessard P. (2005): Structural modifications induced by *Eutypa lata* in the xylem of trunk and canes of *Vitis vinifera*; Functional plant biology, Band 32 (6), Seiten 537-547

- Ryan K. G., Markham K. R., Bloor S. J., Bradley J. M., Mitchell K. A. und Jordan B. R. (1998): UVB Radiation Induced Increase in Quercetin: Kaempferol Ratio in Wild-Type and Transgenic Lines of *Petunia*; *Photochemistry and Photobiology*, Band 68 (3), Seiten 323-330
- Rymelska N., Borodynko N., Pospieszny H. und Hasiów-Jaroszewska B. (2013): Analysis of the biological and molecular variability of the polish isolates of Tomato black ring virus (TBRV); *Virus Genes*, Springer Science, doi: 10.1007/s11262-013-0941-z
- Marvelli S., De' Siena S., Rizzoli E. und Marchesini M. (2013): The origin of grapevine cultivation in Italy: The Archeobotanical Evidence; *Annali di Botanica (Roma)*, Band 3, Seiten 155-163
- Saidi A. und Safaeizadeh M. (2011): First Report of Cucumber mosaic virus infecting *Geraniums (Pelargonium spp.)* in Iran; *Asian Journal of Plant Pathology*, Band 5 (4), Seiten 163-165
- Sanchez J. F., Chiang Y. M., Szewczyk E., Davidson A. D., Ahuja M., Oakley C. E. und Wang C. C. (2010): Molecular genetic analysis of the orsellinic acid/F9775 gene cluster of *Aspergillus nidulans*; *Molecular BioSystems*, Band 6 (3), Seiten 587-593
- Sánchez-Rabanela F., Jáuregui O., Casals I., Andrés-Lacueva C., Izquierdo-Pulido M. und Lamuela-Raventós R. M. (2003): Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*); *Journal of Mass Spectrometry*, Band 38 (1), Seiten 35-42
- Sandanayaka W. R. M., Blouin A. G., Prado E. und Cohen D. (2013): Stylet penetration behaviour of *Pseudococcus longispinus* in relation to acquisition of grapevine leafroll virus 3; *Arthropod-Plant Interactions*, Band 7 (2), Seiten 137-146
- Santos C., Fragoeiro S., Oliveira H. und Phillips A. (2006a): Response of *Vitis vinifera* L. plants inoculated with *Phaeoacremonium angustius* and *Phaeomoniella chlamydospora* to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite; *Scientia horticultrae*, Band 107 (2), Seiten 131-136
- Santos C., Fragoeiro S., Valentim H. und Phillips A. (2006b): Phenotypic characterisation of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* strains isolated from grapevines: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses; *Scientia Horticulturæ*, Band 107 (2), Seiten 123-130
- Schellenberger P., Sauter C., Lorber B., Bron P., Trapani S., Bergdoll M., Marmonier A., Schmitt-Keichinger C., Lemaire O., Demangeat G. und Ritzenthaler C. (2011): Structural Insights into Viral Determinants of Nematode Mediated Grapevine fanleaf virus Transmission; *PLoS Pathogens*, Band 7 (5), Seiten 1-14
- Schmidt C. S., Lorenz D. und Wolf G. A. (2001): Biological control of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* I: screening of bacterial antagonists; *Journal of Phytopathology*, Band 149 (7-8), Seiten 427-435
- Schmidt-Büsser D., von Arx M. und Guerin P. M. (2009): Host plant volatiles serve to increase the response of male European grape berry moths, *Eupoecilia ambiguella*, to their sex pheromone; *Journal of Comparative Physiology A*, Band 195 (9), Seiten 853-864
- Schmitt I., Kautz S. und Lumbsch H. T. (2008): 6-MSAS-like polyketide synthase genes occur in lichenized ascomycetes; *Mycological research*, Band 112 (2), Seiten 289-296
- Scholefield P. und Morison J. (2010): Assessment of Economic Cost of Endemic Pests and Diseases on the Australian Grape and Wine Industry; Scholefield Robinson Horticultural Services Pty Ltd ., <http://www.gwrdc.com.au/wp-content/uploads/2012/09/GWR-08-04.pdf>, Seiten 1-145
- Schöffler A., Sterner O. und Anke H. (2007): Cytotoxic alpha-pyrones from *Xylaria hypoxylon*; *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Biosciences*, Band 62, Seiten 169-172
- Schulz B., Wanke U., Draeger S. und Aust H. J. (1993): Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods; *Mycological Research*, Band 97 (12), Seiten 1447-1450

- Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A. K. und Krohn K. (2002): Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites; *Mycological Research*, Band 106 (9), Seiten 996-1004
- Schumann J. und Hertweck C. (2006): Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes; *Journal of biotechnology*, Band 124 (4), Seiten 690-703
- Schuster A. und Schmoll M. (2010): Biology and biotechnology of *Trichoderma*; *Applied microbiology and biotechnology*, Band 87 (3), Seiten 787-799
- Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E. und Töpfer R. (2012): Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine; *Theoretical and Applied Genetics*, Band 124 (1), Seiten 163-176
- Schwarz M., Köpcke B., Weber R. W., Sterner O. und Anke H. (2004): 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi; *Phytochemistry*, Band 65 (15), Seiten 2239-2245
- Schwarz S. (2011): Fermentative Untersuchung stress-induzierter Metabolite Esca-assoziiierter Pilze und Isolierung putativ pathogenitätsrelevanter Gene in *Phaeoconiella chlamydospora*, Diplomarbeit IBWF, TU Kaiserslautern
- Seigler D. und Price P. W. (1976): Secondary compounds in plants: primary functions; *American naturalist*, Band 110 (971), Seiten 101-105
- Serra S., Borgo M. und Zanzotto A. (2000): Investigation into the presence of fungi associated with Esca of young vines; First international workshop on grapevine trunk diseases-Esca and grapevine declines, Band 39 (1), Seiten 21-25
- Sevik M. (2012): Natural occurrence of Cucumber mosaic virus infecting water mint (*Mentha aquatica*) in Antalya and Konya, Turkey; *Acta Botanica Croatica*, Band 71 (1), Seiten 187-193
- Shady S. Atallah, Miguel I. Gómez, Marc F. Fuchs, and Timothy E. Martinson (2012): Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes Vineyards of New York; *American Journal of Enology and Viticulture*, Band 63 (1), Seiten 73-80
- Shanthiyaa V., Saravanakumar D., Rajendran L., Karthikeyan G., Prabakar K. und Raguchander T. (2013): Use of *Chaetomium globosum* for biocontrol of potato late blight disease; *Crop Protection*, Band 52, Seiten 33-38
- Shao-Hua L. (2001): Grape Production in China; FAO 2011
- Sharon E., Chet I. und Spiegel Y. (2011): Trichoderma as a biological control agent; *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes*, *Progress in Biological Control*, Band 11, Seiten 183-201
- Shoresh M., Harman G. E. und Mastouri F. (2010): Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents; *Annual review of phytopathology*, Band 48, Seiten 21-43
- Siebert J. B. (2001): *Eutypa*: The economic toll on vineyards, *Wines and Vines*, Band 4, Seiten 50-56
- Siegfried W. und Bolay, A. (1993): *Eutypa* in vineyards; *Landwirtschaft Schweiz*, Band 6 (5), Seiten 285-286
- Sikora R., Pocasangre L., Felde A., Niere B., Vu T. und Dababat A. (2008): Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes; *Biological Control*, Band 46 (1), Seiten 15-23
- Slana M., Žigon, D., Makovec T. und Lenasi H. (2011): The response of filamentous fungus *Rhizopus nigricans* to flavonoids; *Journal of basic microbiology*, Band 51 (4), Seiten 433-441
- Smith L. R., Mahoney N. und Molyneux R. J. (2003): Synthesis and Structure-Phytotoxicity Relationships of Acetylenic Phenols and Chromene Metabolites, and their Analogues, from the Grapevine Pathogen *Eutypa lata*;

- Journal of natural products, Band 66 (2), Seiten 169-176
- Sofia J., Gonçalves M. und Oliveira H. (2005): Spatial distribution of Esca symptomatic plants in Dão vineyards (Centre Portugal) and isolation of associated fungi; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 45, Seiten 87-92
- Soleas G. J., Diamandis E. P. und Goldberg D. M. (1997): Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention; *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, Band 11, Seiten 287-313
- Soledade M., Pedras C., Morales V. M. und Taylor J. L. (1994): Phomapyrones: three metabolites from the blackleg fungus; *Phytochemistry*, Band 36 (5), Seiten 1315-1318
- Sosnowski M. R., Creaser M. L., Wicks T. J., Lardner R. und Scott E. S. (2008): Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*; *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Band 14 (2), Seiten 134-142
- Sosnowski M. und Wicks T. (2007): A global perspective on grapevine disease; *Australian Viticulture*, [http://www.sardi.sa.gov.au/data/assets/pdf\\_file/0008/93869/Sosnowski\\_Wicks\\_AV\\_11\\_1.pdf](http://www.sardi.sa.gov.au/data/assets/pdf_file/0008/93869/Sosnowski_Wicks_AV_11_1.pdf)
- Soytong K., Srinon W., Rattanacherdchai K., Kanokmedhakul S. und Kanokmedhakul K. (2005): Application of antagonistic fungi to control anthracnose disease of grape; *Journal of Agricultural Biotechnology*, Band 1, Seiten 33-41
- Spengler R. N., Chang C. und Tourtellotte P. A. (2013): Agricultural production in the Central Asian mountains: Tuzusai, Kazakhstan (410-150 b.c.); *Journal of Field Archaeology*, Band 38 (1), Seiten 68-85
- Spielmann A., Krastanova S., Douet-Orhant V. und Gugerli P. (2000): Analysis of transgenic grapevine (*Vitis rupestris*) and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an Arabis mosaic virus coat protein gene; *Plant Science*, Band 156 (2), Seiten 235-244
- Staben C., Jensen B., Singer M., Pollock J., Schechtman M., Kinsey J. und Selker E. (1989): Use of a bacterial Hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation; *Fungal Genetics Newsletter*, Band 36, Seiten 79-81
- Stierle A., Strobel G. und Stierle D. (1993): Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew; *Science*, Band 260 (5105), Seiten 214-216
- Stone J. K., Polishook J. D. und White J. F. (2004): Endophytic fungi. *Biodiversity of Fungi*; Elsevier Academic Press, Burlington, Seiten 241-270
- Surico G. (2009): Towards a redefinition of the diseases within the Esca complex of grapevine; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 48 (1), Seiten 5-10
- Surico G., Mugnai L. und Marchi G. (2006): Older and more recent observations on Esca: a critical overview; *Phytopathologia Mediterranea*, Band 45 (4), Seiten 68-86
- Surico G., Mugnai L. und Marchi G. (2008): The Esca disease complex; Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria, Band 3, Seiten 119-136
- Szandala E. S. und Backhouse D. (2001): Suppression of sporulation of *Botrytis cinerea* by antagonists applied after infection; *Australasian Plant Pathology*, Band 30 (2), Seiten 165-170
- Takano Y., Kubo Y., Shimizu K., Mise K., Okuno T. und Furusawa I. (1995): Structural analysis of PKS1, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*; *Molecular and General Genetics*, Band 249 (2), Seiten 162-167
- Tanguay P., Loppnau P., Morin C., Bernier L. und Breuil C. (2006): A spontaneous albino mutant of *Ceratocystis resinifera* results from a point mutation in the polyketide synthase gene, PKS1; *Canadian journal of microbiology*,

Band 52 (6), Seiten 501-507

Tejesvi M. V., Nalini M. S., Mahesh B., Prakash, H. S. Kini, K. R. Shetty, H. S. und Subbiah V. (2007): New hopes from endophytic fungal secondary metabolites; *Boletín de la Sociedad Química de México*, Band 1 (1), Seiten 19-26

Tello M. L., Gramaje D., Gómez A., Abad-Campos P. und Armengol J. (2012): Analysis of phenotypic and molecular diversity of *Phaeoconiella chlamydospora* isolates in Spain; *Journal of Plant Pathology*, Band 92 (1), Seiten 195-203

Thines E., Anke H. und Weber R. W. S. (2004): Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi; *Mycological Research*, Band 108 (1), Seiten 14-25

Thom C. (1941): Out of the Furrow; *Journal of Bacteriology*, Band 41 (1), Seiten 1-15

Tibell L. (1976): The genus *Thelomma*; *Botanic Notiser*, Band 129, Seiten 221-249

Travadon R., Rolshausen P. E., Gubler W. D., Cadle-Davidson L. und Baumgartner, K. (2013): Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* to wood infection by fungal trunk pathogens; *Plant Disease*, doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0525-RE>

Tripathi P. und Dubey N. K. (2004): Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables; *Postharvest biology and technology*, Band 32 (3), Seiten 235-245

Tripathi P., Dubey N. K. und Pandey V. B. (2002): Kaempferol: the antifungal principle of *Acacia nilotica* L. Del.; *Journal of the Indian Botanical Society*, Band 81, Seiten 51-54

Turgeon B. G. und Baker S. E. (2007): Genetic and Genomic Dissection of the *Cochliobolus heterostrophus* Tox1 Locus Controlling Biosynthesis of the Polyketide Virulence Factor T-toxin; *Advances in Genetics*, Band 57, Seiten 219-261

UIPP (2002): view on the Commission Communication: Towards a Thematic Strategy on the Sustainable Use of Pesticides (COM 2002/347 final); Union de l'Industrie de la Protection des Plantes France; <http://www.uipp.org/>

Uyemoto, J. K. (1975): A severe outbreak of virus-induced grapevine decline in Cascade grapevines in New York; *Plant Disease Reporter*, Band 59 (2) Seiten 98-10

Valtaud C., Larignon P., Roblin G. und Fleurat-Lessard P. (2009): Developmental and ultrastructural features of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in relation to xylem degradation in Esca disease of the grapevine; *Journal of Plant Pathology*, Band 91 (1), Seiten 37-51

Van den Ent F. und Löwe J. (2006): RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids; *Journal of biochemical and biophysical methods*, Band 67 (1), Seiten 67-74

Van Leeuwen T., Witters J., Nauen R., Duso C. und Tirry L. (2010): The control of eriophyoid mites: state of the art and future challenges, *Eriophyoid Mites: Progress and Prognoses*; *Experimental and Applied Acarology*, Band 51 (1-3), Seiten 205-224

Van Tol R. W. H. M., van Dijk N., und Sabelis M. W. (2004): Host plant preference and performance of the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus*; *Agricultural and Forest Entomology*, Band 6 (4), Seiten 267-278

Verma M., Brar S., Tyagi R., Surampalli R. und Valéro R. (2007): Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control; *Biochemical Engineering Journal*, Band 37 (1), Seiten 1-20

Villate L., Fievet V., Hanse B., Delemarre F., Plantard O., Esmenjaud D. und van Helden M. (2008): Spatial



- Distribution of the Dagger Nematode *Xiphinema index* and Its Associated Grapevine fanleaf virus in French Vineyard; *Phytopathology*, Band 98 (8), Seiten 942-948
- Vincenot L., Perazzolli M. und Pertot I. (2011): Functional and molecular analysis of grapevine induced resistance against *Plasmopara viticola* in relation to the physiology of the microbial inducer. PR-Proteins and induced resistance against pathogens and insects; Neuchâtel, Switzerland 4-8 September 2011, Seite 108
- Vinexpo (2013): <http://www.vinexpo.com/de/>
- Viterbo A. D. A., Wiest A., Brotman Y., Chet I. und Kenerley C. (2007): The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses; *Molecular Plant Pathology*, Band 8 (6), Seiten 737-746
- Vogt H., Schropp A., Neumann U. und Eichhorn K. W. (1993): Befallsregulierung des Einbindigen Traubenwicklers *Eupoecilia ambiguella* Hbn. durch Paarungsstörung mit synthetischem Pheromon; *Journal of Applied Entomology*, Band 115 (1-5), Seiten 217-232
- Walker, A. C. (2012): A history of the Tasmanian wine industry. Research Master thesis, University of Tasmania, <http://eprints.utas.edu.au/14809/2/whole-walker-thesis-2012.pdf>
- Wang Y., DiGuistini S., Wang T. C. T., Bohlmann J. und Breuil C. (2010): *Agrobacterium*-mediated gene disruption using split-marker in *Grossmannia clavigera*, a mountain pine beetle associated pathogen; *Current genetics*, Band 56 (3), Seiten 297-307
- Weindling R. (1932): *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi; *Phytopathology*, Band 22, Seiten 837-845
- White J. und Torres M. (2010): Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?; *Physiologia Plantarum*, Band 138 (4), Seiten 440-446
- Whiting E. C., Khan A. und Gubler W. D. (2001): Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeoemoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp.; *Plant Disease*, Band 85 (2), Seiten 195-201
- Widholm J. M. (1972): The Use of Fluorescein Diacetate and Phenosafranine for Determining Viability of Cultured Plant Cells; *Biotechnic & Histochemistry*, Band 47 (4), Seiten 189-194
- Winkler J. B., Chalal M., Ghirardo A., Daire X., Adrien, M. und Schnitzler J. P. (2013): Emission of volatile organic compounds (VOC) by grapevine leaves in response to elicitor treatment and *Plasmopara viticola* inoculation; Conference Series, [http://www.uibk.ac.at/iup/infolder/ptrms\\_2013.pdf#page=239](http://www.uibk.ac.at/iup/infolder/ptrms_2013.pdf#page=239), Seite 238
- Witzgall P., Kirsch P. und Cork A. (2010): Sex Pheromones and Their Impact on Pest Management; *Journal of Chemical Ecology*, Band 36 (1), Seiten 80-100
- Xiao J. H., Chen D. X., Wan W. H., Hu X. J., Qi Y. und Liang Z. Q. (2006): Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions; *Process biochemistry*, Band 41 (8), Seiten 1887-1893
- Xu Y., Xu T. F., Zhao X. C., Zou Y., Li Z. Q., Xiang J., Li F. J., Wang Y. J. (2012): Co-expression of VpROMT gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* with VpSTS in tobacco plants and its effects on the accumulation of pterostilbene; *Protoplasma*, Band 249 (3), Seiten 819-833
- Yang G. E., Rose M. S., Turgeon B. G. und Yoder O. C. (1996): A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin; *The Plant Cell*, Band 8 (11), Seiten 2139-2150
- Yedidia I., Benhamou N. und Chet I. (1999): Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*; *Applied and Environmental Microbiology*, Band 65 (3), Seiten

1061-1070

Yeh H. H., Chang S. L., Chiang Y. M., Bruno K. S., Oakley B. R., Wu T. K. und Wang C. C. (2013): Engineering Fungal Nonreducing Polyketide Synthase by Heterologous Expression and Domain Swapping; *Organic letters*, Band 15 (4), Seiten 756-75

Yelton M. M., Hamer J. E. und Timberlake W. E. (1984): Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Band 81 (5), Seiten 1470-1474

Yoder O. C. und Turgeon B. G. (2001): Fungal genomics and pathogenicity; *Current opinion in plant biology*, Band 4 (4), Seiten 315-321

Yu J. H. und Keller N. (2005): Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi; *Annual Review of Phytopathology*, Band 43, Seiten 437-458

Yurlova N. A., de Hoog G. S. und Fedorova L. G. (2008): The influence of ortho-and para-diphenoloxidase substrates on pigment formation in black yeast-like fungi; *Studies in mycology*, Band 61 (1), Seiten 39-49

Zanolli P. und Pavan F. (2011): Autumnal emergence of *Anagrus* wasps, egg parasitoids of *Empoasca vitis*, from grapevine leaves and their migration towards brambles; *Agricultural and Forest Entomology*, Band 13 (4), Seiten 423-433

Zanolli P. und Pavan F. (2013): Occurrence of different development time patterns induced by photoperiod in *Anagrus atomus* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of *Empoasca vitis* (Homoptera: Cicadellidae); *Physiological Entomology*, Band 38 (4), Seiten 269-278

Zhang A., Lu P., Dahl-Roshak A. M., Pares P. S., Kennedy S., Tkacz J. S. und An Z. (2003): Efficient disruption of a polyketide synthase gene (pks1) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*; *Molecular Genetics and Genomics*, Band 268 (5), Seiten 645-655

Zhang G., Wang F., Qin J., Wang D., Zhang J., Zhang Y. und Pan H. (2013): Efficacy assessment of antifungal metabolites from *Chaetomium globosum* No. 05, a new biocontrol agent, against *Setosphaeria turcica*; *Biological Control*, Band 64 (1), Seiten 90-98

Zhang Z. und Gurr S. J. (2000): Walking into the unknown: a 'step down' PCR-based technique leading to the direct sequence analysis of flanking genomic DNA; *Gene*, Band 253 (2), Seiten 145-150

Zhao P. J., Wang H. X., Li G. H., Li H. D., Liu J. und Shen Y. M. (2007): Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces* sp. Lz531; *Chemistry & biodiversity*, Band 4 (5), Seiten 899-904

Zhong S. und Steffenson B. J. (2001): Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*; *Phytopathology*, Band 91 (5), Seiten 469-476

## 8 Anhang

ITS Sequenzen der charakterisierten endophytischen Pilze:

### E11228

*Xylaria grammica* Gensequenzen der ITS1, 5.8S rRNA und ITS2, 28S rRNA, Stamm: BCC 18746

BIOTEC Culture Collection (BCC)

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

113 Thailand Science Park, Phaholyothin Road,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120 THAILAND

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/371918823?  
report=genbank&log\\$=nuclalign&blast\\_rank=50&RID=1D16H1EJ01N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/371918823?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=50&RID=1D16H1EJ01N)

Sequenz:

```
GGCATAAGTCTCGTTGGTGACCAGCGGAGGGATCATTATAGAGTCTAAAAAACTCCCAAACCCATGTGGACATAC  
CTCAAGTTGCCTCGGCAGGTGCGCCTACCCGTAAGTCTTACCCTGTAAGATCTACCCTGTAAGCGGGGTAA  
GCCTGCCAGTGGACCAACAAACTCTGTTATTTTTGAATTCTGAATCTATAACTAAATAAGTTAAAACCTTCAA  
CAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA  
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGCATTCTAGTGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTTC  
AACCTTAAGCCCTGTTGCTTAGCGTTGGGAGCCTACAGTACTGTAGCTCCCCAAAGTTAGTGGCGGAGTCGGTT  
TCACACTCTAGACGTAGTAAATTTTTCTCGTCTGTAGTTGAGCCGGTCCCCTGCCGTAAAACACCCAATTTATCA  
AGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
```

### E99121

*Chaetomium globosum* Gensequenzen der ITS1, 5.8S rRNA und ITS2, 28S rRNA, Stamm: H35

Engineering and Research Center for Southwest Bio-Pharmaceutical

Resources of National Education Ministry of China, Guizhou University,

Xiahui Road, No14,

Huaxi District, Guiyang, Guizhou 550025, China

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/536708338?  
report=genbank&log\\$=nuclalign&blast\\_rank=8&RID=1DEKMZ9E014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/536708338?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=8&RID=1DEKMZ9E014)

Sequenz:

```
GGCGCCCCTGGGCCCCACCGCGGGCGCCCGGAGGTCACCAAACCTCTTGATAATTTATGGCCTCTCTGAGTCT  
TCTGTACTGAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG  
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTG  
GCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGCAG  
GCCCTGAAAAGCAGTGGCGGGCTCGCTGTACACCGAGCGTAGTAGCATATATCTCGCTCTGGGCGTGCTGCGGG  
TTCCGGCCGTTAAACCACCTTTTAACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGACCCGCTGAACTTAAGCATA  
TCAATAAACGGAACCT
```