

Untersuchungen zur Biosynthese von acetylierten Phenolen aus *Eutypa lata* und antifungische Naturstoffe aus wachstumshemmenden Antagonisten

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

vorgelegt von

Florian Schmidt

geboren am 19.10.1989 in Mainz

Mainz, Juni 2020

Untersuchungen zur Biosynthese von
acetylierten Phenolen aus *Eutypa lata*
und antifungische Naturstoffe aus
wachstumshemmenden Antagonisten

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2020

Abkürzungsverzeichnis

Amp	<u>A</u> mpicillin
APCI	<u>a</u> tmospheric <u>p</u> ressure <u>c</u> hemical <u>i</u> onization
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens mediated transformation</i>
BCA	<u>b</u> iological <u>c</u> ontrol <u>a</u> gents
BGC	<u>B</u> iosyntesegencluster
BioStoffV	<u>B</u> io <u>s</u> toff <u>v</u> erordnung
bp	<u>B</u> asenpaare
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
BVL	<u>B</u> undesamt für <u>V</u> erbraucherschutz und <u>L</u> ebensmittelsicherheit
Campt.	<u>C</u> amptothecin
Cefo	<u>C</u> efotaxim
CH ₃ COOH	Essigsäure
cv.	Kultivar
CV	<u>c</u> olumn <u>v</u> olume, Säulenvolumen
DIG	<u>D</u> igoxigenin
DLR	<u>D</u> ienstleistungszentrum <u>L</u> ändlicher <u>R</u> aum
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> id
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Ethylacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELSD	<i>evaporative light scattering detector</i>
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FBS	<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GO	Gene Ontology
H ₂ O _{deion}	deionisiertes Wasser
H ₂ O _{UF}	ultrafiltriertes Wasser
H ₂ O _{RF}	RNase-freies Wasser
HCl	Salzsäure
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> Hochdruckflüssigkeitschromatografie
HPLC/MS	HPLC mit angeschlossenem Massenspektrometer
Hyg	<u>H</u> ygromycin B
IC ₅₀	Konzentration, die eine 50 %ige Hemmung hervorruft
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
IPTG	<u>I</u> sopropyl- <u>β</u> - <u>D</u> - <u>t</u> hiogalactopyranosid
JGI	<u>J</u> oint <u>G</u> enome <u>I</u> nstitute

Abkürzungsverzeichnis (fortgesetzt)

Kana	<u>K</u> anamycin
Kbp	Kilobasenpaare
kDa	<u>K</u> ilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
LSU	<i>l</i> arge <i>s</i> ub <u>u</u> nit
Mbp	Megabasenpaare
MCS	<i>m</i> ultiple <i>c</i> loning <i>s</i> ite
MeOH	Methanol
MHK	<i>m</i> inimale <i>H</i> emm <u>k</u> onzentration
MW	<i>m</i> olecular <i>w</i> eight, Molekulargewicht
NaOH	Natriumhydroxid
n.t.	nicht getestet
OD ₆₀₀	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte bei 600 nm
OIV	International Organisation of Vine and Wine
ORF	<i>o</i> pen <i>r</i> eading <i>f</i> rame
<i>p.a.</i>	<i>p</i> er <i>a</i> nalysis
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenglykol
PVP	<u>P</u> oly <u>v</u> inylpyrrolidon
RIN	<i>R</i> NA <i>i</i> ntegrity <i>n</i> umber
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SDS	<i>s</i> odium <i>d</i> odecyl <i>s</i> ulfate
Strep	<u>S</u> treptomycin
TFA	Trifluoressigsäure
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Eutypa lata</i> – ein phytopathogener Ascomycet.....	1
1.1.1 Infektionszyklus von <i>Eutypa lata</i>	2
1.1.2 Eutypiose an Weinreben.....	4
1.1.3 Bekämpfungsstrategien gegen Eutypiose	5
1.2 Sekundärmetabolite aus <i>Eutypa lata</i>.....	6
1.2.1 Phytotoxizität einiger Naturstoffe	8
1.2.2 Acetylenasen.....	8
1.3 <i>Biological control agents</i> und antifungische Naturstoffe	9
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemikalien und Medienbestandteile	12
2.1.2 Säulenmaterial	16
2.1.3 Reaktionskits.....	16
2.1.4 Lösungen	17
2.1.5 Puffer.....	20
2.1.6 Kulturmedien	23
2.1.7 Plasmide	28
2.1.8 Oligonukleotide	30
2.1.9 Mikroskopie und Dokumentation	31
2.1.10 Software	31
2.2 Organismen und Zellkultur	32
2.2.1 Verwendete Organismen	32
2.2.2 Testorganismen für die biologische Charakterisierung	34
2.2.3 Aufbewahrung und Kultivierung der Organismen	34
2.2.4 Zelllinien	35
2.2.5 Pflanzen	35
2.3 Fermentation und Screening der Pilze	35
2.3.1 Fermentation in Submerskultur	35
2.3.2 Herstellung von Rohextrakten aus Kulturfiltrat und Myzel	36

2.3.3	Fermentation im 20 L-Maßstab und Gewinnung von Rohextrakt	36
2.3.4	Fermentationsanalysen.....	37
2.3.5	Untersuchungen zur Biosynthese von acetylierten Phenolen	37
2.3.6	Plattenkonfrontationsassay.....	38
2.3.7	Screening nach wachstumsinhibierenden Wirkstoffen gegen <i>Eutypa lata</i>	39
2.3.8	<i>Vitis shoot assay</i>	39
2.4	Methoden zur Aufreinigung und physikalisch-chemischen Analyse der Naturstoffe.....	40
2.4.1	HPLC- und HPLC/MS Analysen	40
2.4.2	Säulenchromatographie.....	42
2.4.3	Präparative HPLC	43
2.4.4	Strukturaufklärung der isolierten Naturstoffe	43
2.5	Biologische Charakterisierung von Naturstoffen.....	44
2.5.1	Agardiffusionstest	44
2.5.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) im Reihenverdünnungstest	44
2.5.3	Untersuchungen zur Sporenkeimungshemmung	45
2.5.4	Untersuchungen zur Keimungshemmung von Pflanzensamen.....	45
2.5.5	Blattrondelltest zur Bestimmung von phytotoxischen Eigenschaften	46
2.5.6	Kalluskulturtest.....	46
2.5.7	Untersuchung der zytotoxischen Aktivität isolierter Naturstoffe	46
2.5.8	Untersuchung zur Stabilität von aktiven Wirkstoffen	47
2.6	Molekularbiologische Methoden	47
2.6.1	Isolierung und Präparation von Nukleinsäure.....	47
2.6.2	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren.....	48
2.6.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	49
2.6.4	Agarose-Gelelektrophorese und Isolation der DNA-Fragmente.....	50
2.6.5	Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	51
2.6.6	Molekularbiologische Identifizierung von Pilzstämmen durch Sequenzierung artspezifischer DNA-Regionen.....	51
2.6.7	Restriktion von DNA.....	52
2.6.8	Ligation.....	53
2.6.9	Klonierungsmethoden zur Konstruktion von Transformationsvektoren.....	53
2.6.10	Klonierungsstrategien	53
2.6.11	Transformationsmethoden	56
2.6.12	<i>Southern Blot</i> Analyse	60
2.6.13	Vergleichende Transkriptomanalysen durch RNA-Sequenzierung	62
2.7	Bioinformatische Methoden	63
2.7.1	Verarbeitung der gDNA-Sequenzierungsdaten und Genom Assemblierung.....	63
2.7.2	Verarbeitung der RNA-Sequenzierungsdaten	63
2.7.3	<i>Gene Ontology</i> und <i>Gene Enrichment</i> Analyse.....	63
2.7.4	Identifizierung von Genclustern durch antiSMASH-Analyse	64

3	Ergebnisse	65
3.1	Untersuchungen zur Aufklärung der Biosynthese von acetylierten Phenolen	65
3.1.1	Fermentation von verschiedenen <i>Eutypa lata</i> -Stämmen.....	67
3.1.2	Biochemisches Potential verschiedener <i>Eutypa lata</i> Stämme	79
3.1.3	Biologische Charakterisierung der aus <i>Eutypa lata</i> isolierten Naturstoffe.....	80
3.1.4	Supplementation von putativen Vorstufen zur Produktionssteigerung von Eutypinol durch <i>Eutypa lata</i> IBWF E16012.....	84
3.1.5	Vergleichende Transkriptomanalysen zur Identifikation von Genen, die an der Biosynthese acetylierter Phenole beteiligt sind	85
3.2	Molekularbiologische Manipulation von <i>Eutypa lata</i>	92
3.2.1	Optimierung der Transformation von <i>Eutypa lata</i> durch Verwendung eines pilzeigenen Promotors.....	94
3.2.2	Zielgerichtete Mutagenese von <i>Eutypa lata</i>	94
3.3	Untersuchungen zu antagonistischen Pilzstämmen und deren wachstumsinhibierenden Naturstoffen	97
3.3.1	Konfrontationsassay zur Identifizierung potentieller Antagonisten	97
3.3.2	Fermentation der Antagonisten und Isolierung antifungischer Naturstoffe	98
3.3.3	Antifungische Rohextrakte, die das Wachstum von <i>Eutypa lata</i> hemmen	108
3.3.4	Biologische Charakterisierung der antifungischen Naturstoffe.....	109
3.3.5	<i>Vitis shoot assay</i> mit potentiellen Antagonisten.....	112
4	Diskussion	113
4.1	Sekundärmetabolismus von unterschiedlichen <i>Eutypa lata</i>-Isolaten	114
4.1.1	Naturstoffe aus IBWF E16012	115
4.1.2	Naturstoffe aus IBWF E16012HT	119
4.1.3	Naturstoffe aus IBWF E16121	120
4.1.4	Naturstoffe aus IBWF E16123	121
4.2	Hinweise zur Aufklärung der Biosynthese von acetylierten Phenolen in <i>Eutypa lata</i>	123
4.2.1	Potentielle Vorstufen von acetylierten Phenolen	125
4.2.2	Transkriptomanalyse enthüllt entscheidende Erkenntnisse zur Biosynthese von acetylierten Phenolen	126
4.2.3	Möglicher Biosyntheseweg von acetylierten Phenolen in <i>Eutypa lata</i>	128
4.3	Genetische Manipulation von <i>Eutypa lata</i>	129
4.3.1	Optimierung der <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelten Transformation	130
4.3.2	Zielgerichtete Mutagenese in <i>Eutypa lata</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelter Transformation	132
4.3.3	Protoplastentransformation von <i>Eutypa lata</i>	134

4.4 Antifungische Naturstoffe aus Endophyten	135
4.4.1 Naturstoffe aus IBWF E12135	135
4.4.2 Naturstoffe aus IBWF E99338	137
4.4.3 Naturstoffe aus <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> IBWF E99301	139
4.4.4 Naturstoffe aus IBWF 144-09 und IBWF 022-09	141
4.4.5 Überprüfung der antagonistisch wirkenden Endophyten als potentielle <i>biological control agents</i> gegen <i>Eutypa lata</i>	142
5 Zusammenfassung	144
6 Literaturverzeichnis	148
7 Anhang.....	162
7.1 HPLC/MS-Chromatogramme, UV/Vis- und Massenspektren der isolierten Naturstoffe	162
7.1.1 Verbindungen aus <i>Eutypa lata</i> IBWF E16012	162
7.1.2 Verbindungen aus <i>Eutypa lata</i> IBWF E16012HT	164
7.1.3 Verbindungen aus <i>Eutypa lata</i> IBWF E16121	165
7.1.4 Verbindungen aus <i>Eutypa lata</i> IBWF E16123	166
7.1.5 Verbindungen aus IBWF E12135	168
7.1.6 Verbindungen aus IBWF E99338	169
7.1.7 Verbindungen aus <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> IBWF E99301	170
7.2 Untersuchte Pilzstämmе	172
7.2.1 Alle Pilzstämmе, die im Konfrontationsassay gegen <i>E. lata</i> getestet wurden.....	172
7.2.2 Alle Rohextrakte, die gegen das Myzelwachstum von <i>Eutypa lata</i> getestet wurden	174
7.3 Zusammenfassung der verwendeten Primer	176
7.4 Plasmidkarten	178
7.5 Plattenwachstumstest zur Charakterisierung von IBWF E16012HT	180
7.6 Ergebnisse der biologischen Charakterisierung der aus <i>Eutypa lata</i> isolierten Naturstoffe.....	181
7.7 Artspezifische DNA-Sequenzen	183
7.8 HPLC-Chromatogramme der Transkriptomanalysen	186

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Der Infektionszyklus von <i>Eutypa lata</i> verändert nach Gubler und Leavitt (1992).....	2
Abb. 1.2:	Die Nebenfruchtform <i>Libertella blepharis</i> bildet Pyknidien, welche bei hoher Feuchtigkeit orangefarbene Cirrhi exsudieren (A). In den Cirrhi sind eine große Anzahl hyaliner, fadenförmiger Konidien enthalten (B). Ascosporen von <i>Eutypa lata</i> (C).....	3
Abb. 1.3:	Symptome der Eutypiose und der Erreger <i>Eutypa lata</i>	4
Abb. 1.4:	Bisher bekannte und isolierte Naturstoffe aus <i>Eutypa lata</i> , die in vier Gruppen eingeteilt werden (nach Masi <i>et al.</i> 2018).....	7
Abb. 3.1:	Strukturformeln der acetylierten Phenole Eutypin (1), Eutypinol (2), Siccayne (9) und Eulatinol (10).	65
Abb. 3.2:	Fermentation von <i>Eutypa lata</i> IBWF E16012 im 20 l-Maßstab in M2	67
Abb. 3.3:	Aufreinigungsschema von Eutypin, Siccayne, Eulatinol, FS E16012-3, Eulaglycosid und FS E16012-7 aus 37 l Kulturfiltrat von 3 x 20 l-Fermentationen von <i>Eutypa lata</i> IBWF E16012 in M2	68
Abb. 3.4:	Strukturformeln der aus <i>Eutypa lata</i> IBWF E16012 isolierten Verbindungen.	69
Abb. 3.5:	Fermentation von <i>Eutypa lata</i> IBWF E16012HT im 20 l-Maßstab in M2	71
Abb. 3.6:	Aufreinigungsschema von Eutypinol und FS E16012HT-1 aus 16 l Kulturfiltrat einer 20 l-Fermentation von IBWF E16012HT in M2	71
Abb. 3.7:	Strukturformeln von Eutypinol und FS E16012HT-1.....	72
Abb. 3.8:	Fermentation von <i>Eutypa lata</i> IBWF E16121 im 20 l-Maßstab in M2	73
Abb. 3.9:	Aufreinigungsschema von O-Methylmellein aus 12 l Kulturfiltrat einer 20 l-Fermentation von <i>Eutypa lata</i> IBWF E16121 in M2	74
Abb. 3.10:	Strukturformel von O-Methylmellein.....	74
Abb. 3.11:	Aufreinigungsschema von FS E16123-1, Eutypinol, FS E16123-3, -4, -5 und -6 aus 4,5 l Kulturfiltrat von 10 x 500 ml Fermentationen in je 1 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane von <i>Eutypa lata</i> IBWF E16123 in M2	76
Abb. 3.12:	Strukturformel von FS E16123-1.	76
Abb. 3.13:	Fermentation von <i>Eutypa lata</i> IBWF E16123 im 20 l-Maßstab in M2	77
Abb. 3.14:	Aufreinigungsschema von Tyrosol, N-Acetyltyramine, FS E16123-8, FS E16123-1 und O-Methylmellein aus 15,6 l Kulturfiltrat einer 20 l-Fermentation von <i>Eutypa lata</i> IBWF E16012 in M2	78
Abb. 3.15:	Strukturformeln von Tyrosol, N-Acetyltyramine und FS E16123-8.....	78
Abb. 3.16:	HPLC-Chromatogramme der Kulturfiltratextrakte von fünf verschiedenen <i>E. lata</i> -Stämmen nach acht Tagen Inkubation in M2 bei RT und 120 rpm.	80
Abb. 3.17:	Blattrondelltest mit Blättern von <i>Vitis vinifera</i> cv. ‚Riesling‘ zur Untersuchung von phytotoxischen Eigenschaften der aus <i>Eutypa lata</i> isolierten Naturstoffe.....	81
Abb. 3.18:	Stabilität von Eutypin nach 6 h Inkubation bei RT mit L-Cystein in äquimolarem Verhältnis.	83
Abb. 3.19:	Stabilität von Eulatinol nach 6 h Inkubation bei RT mit Cystein in äquimolarem Verhältnis.	83
Abb. 3.20:	Produktionssteigerung von Eutypinol unter Zugabe von 500 µM bzw. 2 mM putativer Vorstufen durch <i>Eutypa lata</i> IBWF E16012	85
Abb. 3.21:	Auswertung der Transkriptomanalyse der untersuchten <i>E. lata</i> -Stämme, die eine unterschiedliche Produktion von acetylierten Phenolen zeigten	88
Abb. 3.22:	Genontologie Enrichment Analyse der DE Gene von IBWF E16121 BAF, IBWF E16121 PDA und IBWF E16012 BAF	89

Abb. 3.23:	Vergleichende Analyse der stammspezifischen Transkriptomdatensätze	90
Abb. 3.24:	Genexpressionsanalyse von ausgewählten Genen in dem produzierenden Stamm IBWF E16012 im Vergleich zu dem nicht produzierenden Stamm IBWF E16121	91
Abb. 3.25:	Plattenwachstumstest mit dem <i>E. lata</i> -Wildtyp IBWF E16012 und einem Hygromycin B toleranten Stamm IBWF E16012HT auf den Medien BAF (M2) und MM+CSH (M20) mit 100 µg/ml Hygromycin B nach einer Inkubationszeit von 12 Tagen bei RT.....	96
Abb. 3.26:	Konfrontationsassay mit Pilzstämmen, die das Myzelwachstum von <i>Eutypa lata</i> inhibieren.....	98
Abb. 3.27:	Fermentation von IBWF E12135 im 2 l-Maßstab in M9 . Fermentationsdiagramm verändert nach Hitzler (2017).	99
Abb. 3.28:	Aufreinigungsschema von Cercosporamide und SH E12135-2 aus 8,3 l Kulturfiltrat von 6 x 2 l-Fermentationen in 5 l Schüttelkolben von IBWF E12135 in M9 verändert nach Hitzler (2017).....	100
Abb. 3.29:	Strukturformel von Cercosporamide.	101
Abb. 3.30:	Fermentation von IBWF E99338 im 20 l-Maßstab in M9	102
Abb. 3.31:	Aufreinigungsschema von Fusidienol A, Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate und Monodictyxanthone aus 16,5 l Kulturfiltrat einer 20 l-Fermentation von IBWF E99338 in M9	103
Abb. 3.32:	Strukturformel von Fusidienol A, Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate und Monodictyxanthone.	103
Abb. 3.33:	Fermentation von <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> IBWF E99301 im 2 l-Maßstab in M9	105
Abb. 3.34:	Aufreinigungsschema von Pannorumin A, B und C aus 5,2 l Kulturfiltrat von 3 x 2 l-Fermentationen in 5 l Erlenmeyerkolben von <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> IBWF E99301 in M9	105
Abb. 3.35:	Strukturformeln von Pannorumin A, B und C.....	106
Abb. 3.36:	Stabilität von Pannorumin A nach 6 h Inkubation mit L-Cystein in äquimolarem Verhältnis bei RT.....	107
Abb. 3.37:	Stabilität von Pannorumin B nach 6 h Inkubation mit L-Cystein in äquimolarem Verhältnis bei RT.....	107
Abb. 3.38:	Stabilität von Pannorumin C nach 6 h Inkubation mit L-Cystein in äquimolarem Verhältnis bei RT.....	108
Abb. 3.39:	Strukturformel von Asperfuran und Sporothriolide.....	109
Abb. 3.40:	<i>Vitis shoot assay</i> mit <i>Eutypa lata</i> und potentiellen Antagonisten. Verglichen wurden das Vordringen von <i>E. lata</i> in das Holzgewebe von <i>Vitis vinifera</i> cv. ‚Riesling‘ ohne die Einwirkung von Antagonisten [K-] mit der präventiven Behandlung durch die Antagonisten.	112
Abb. 4.1:	Verwandte Strukturen zur Verbindung Eulaglycosid (18).....	118
Abb. 4.2:	Vorgeschlagener Biosyntheseweg für Fomannoxin aus <i>Heterobasidion occidentale</i> TC122-12. Verändert nach Hansson <i>et al.</i> (2012).....	124
Abb. 4.3:	Vorgeschlagener Biosyntheseweg von Gaudichaudiansäure in <i>Piper gaudichaudianum</i> . Verändert nach Batista <i>et al.</i> (2018)	125
Abb. 4.4:	Das vorhergesagte Biosynthesecluster 91 aus dem <i>E. lata</i> Stamm IBWF E16121 (oben) sowie eine Tabelle mit den enthaltenen Genen und der jeweiligen putativen Funktion des Proteins (unten).....	127
Abb. 4.5:	Vorgeschlagener Biosyntheseweg für acetylierte Phenole in <i>Eutypa lata</i>	128
Abb. 4.6:	Verwandte Strukturen zu Fusidienol A (31).	138
Abb. 4.7:	Strukturen von Pannomycin, Pseudogymnosascin A und Geomycin A.	140

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Verwendete Säulen mit dem jeweiligen gepackten Material, der Größenangabe sowie die Hersteller.....	16
Tab. 2.2:	Die verwendeten Testorganismen mit der entsprechenden Stammnummer, sowie die Inkubationstemperaturen, Medien und die jeweilige Risikogruppe nach der BioStoffV (TRBA 460 und TRBA 466).....	34
Tab. 2.3:	Parameter des Standardgradienten G1 sowie der Gradient G2 zur Untersuchung der acetylierten Phenole von <i>Eutypa lata</i>	42
Tab. 2.4:	Parameter des Gradienten G3 sowie die Elutionsschritte der Niederdruck Flüssigkeitschromatographie.....	42
Tab. 2.5:	Elutionsschritte der Festphasenextraktion mit den verwendeten Eluentengemischen.....	43
Tab. 2.6:	Reaktionsansatz (links) und Reaktionsschema (rechts) einer Standard-PCR mit der DreamTaq DNA Polymerase.....	49
Tab. 2.7:	Reaktionsansatz (links) und Reaktionsschema (rechts) einer Standard-PCR mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.....	49
Tab. 2.8:	PCR-Reaktionsansatz für die Herstellung DIG-markierter DNA Sonden.....	50
Tab. 2.9:	Verschiedene Restriktionsansätze nach Verwendungszwecken differenziert.....	52
Tab. 2.10:	Reaktionsansatz einer Standard-Ligation.....	53
Tab. 3.1:	Vergleich der Genomdaten für die <i>E. lata</i> -Stämme IBWF E16012, IBWF E16121 und UCR-EL1.....	86
Tab. 3.2:	Die Anzahl der identifizierten Biosynthesecluster wurden den jeweiligen Sekundärmetabolitgruppen zugeordnet.....	86
Tab. 3.3:	Kandidatengene, die in der Genexpressionsanalyse untersucht wurden.....	91
Tab. 3.4:	Optimierung verschiedener Transformationsparameter bei der <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelten Transformation von <i>Eutypa lata</i>	93
Tab. 3.5:	Daten der Gene aus <i>E. lata</i> , die für putative Desaturasen kodieren.....	95
Tab. 3.6:	Minimale Hemmkonzentration der isolierten Naturstoffe gegen Pilz- und Bakterienstämme.....	109
Tab. 3.7:	Sporenkeimungshemmung der isolierten Naturstoffe.....	111
Tab. 3.8:	Untersuchungen zur Pflanzensamenkeimung der isolierten Naturstoffe.....	111
Tab. 3.9:	Untersuchungen zur Zytotoxizität der isolierten Naturstoffe.....	111
Tab. 4.1:	Die an der Biosynthese beteiligten Gene mit der jeweiligen Beschreibung, Protein ID und EC-Nr.....	128

1 Einleitung

1.1 *Eutypa lata* – ein phytopathogener Ascomycet

Eutypa lata (Pers.) Tul. & C. Tul. (1863) ist ein phytopathogener Ascomycet der zur Familie der Diatrypaceae gehört und ursprünglich als *E. armeniaca* beschrieben wurde (Carter, 1957; Munkvold, 2001). Das asexuelle Entwicklungsstadium (Anamorph: *Libertella blepharis* A. L. Smith.) wurde erstmals aus erkrankten Aprikosenzweigen (*Prunus armeniaca* L.) in Australien isoliert und kultiviert (Carter *et al.*, 1985; Samuel, 1933). Zuerst wurde angenommen, dass *E. lata* ein wirtsspezifisches Pathogen für Aprikosenpflanzen ist. Einige Jahre später wurde jedoch eine Pathogenität von *E. lata* auch bei der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), Vogel-Kirsche (*Prunus avium* L.), Virginische Traubenkirsche (*Prunus virginiana* L. var *demissa* [Nutt.] Torr.), Sauerkirsche (*Prunus cerasus* L.), Mandel (*Prunus dulcis* [Mill.] D. Webb), Apfel (*Malus domestica* Borkh.), Birne (*Pyrus communis* L.), Walnuss (*Juglans regia* L.) und Olive (*Olea europaea* L.) nachgewiesen (Munkvold, 2001). Darüber hinaus hat *E. lata* ein breites Wirtsspektrum und kommt bei mindestens 88 Arten verteilt auf 52 Gattungen im Holz von Dikotyledonen vor (Carter *et al.*, 1983; Carter, 1991). Der Pilz ist in vielen Regionen und Ländern verbreitet, wie zum Beispiel Australien, Europa, Nordamerika, Südafrika, Brasilien, Israel, Libyen und Neuseeland (Munkvold, 2001) und ist besonders häufig in großen Weinanbaugebieten vorzufinden. Dabei ist die Ausbreitung von *E. lata* auf Gebiete beschränkt, die einen jährlichen Niederschlag von mehr als 350 mm haben (Magarey und Carter, 1986; van Niekerk *et al.*, 2011).

Obwohl *E. lata* hauptsächlich der Krankheitserreger der Eutypiose an Weinreben ist, wird der Organismus zusätzlich mit der Esca-Krankheit assoziiert. Da der Pilz häufig aus dem Holz angrenzender Nekrosen isoliert werden konnte, wird vermutet, dass er für andere phytopathogene Pilze wegbereitend bei der Holzbesiedlung ist (Fischer und Kassemeyer, 2003; Larignon und Dubos, 1997; Mugnai *et al.*, 1999).

Um die Hintergründe der Pathogenität von *E. lata* auf molekulargenetischer Ebene zu untersuchen, wurde im Jahr 2013 das Genom des Stamms UCR-EL1 sequenziert. Nach der Annotation von proteinkodierenden Genen konnten potentielle Virulenzfaktoren identifiziert werden. Das Genom hat eine Gesamtlänge von 54 Megabasen, einen GC-Gehalt von 46,6 % und es wurden insgesamt 11685 Proteine annotiert (Blanco-Ulate *et al.*, 2013). Mit der Veröffentlichung der Genomsequenz wurde eine molekularbiologische Bearbeitung des Organismus vereinfacht, wodurch weitere Erkenntnisse zum Krankheitsverlauf erwartet werden. In diesem Zusammenhang können besonders Transkriptom- und Proteomanalysen zur Aufklärung von pathogenitätsrelevanten Faktoren dienen.

1.1.1 Infektionszyklus von *Eutypa lata*

Der Infektionszyklus von *E. lata* ist in Abb. 1.1 am Beispiel einer Infektion an Weinreben dargestellt. Auf infiziertem und abgestorbenem Holz werden bei feuchten Wetterbedingungen Perithezien gebildet, die einen Durchmesser von 0,5 mm besitzen und in schwarzen subcortikalen Stromata eingebettet sind. Diese Perithezien enthalten eine Vielzahl von spindelförmigen Asci mit jeweils einer Größe von 30-60 x 5-7,5 μm , die wiederum acht längliche Ascosporen tragen (Abb. 1.2 C; jeweils 7-11 x 2 μm). Bei Regen werden die Ascosporen aus den Asci freigesetzt und durch Anemochorie verbreitet (Carter und Moller, 1977). Dabei können die Ascosporen Distanzen von bis zu 60 km überwinden (Ramos *et al.*, 1975).

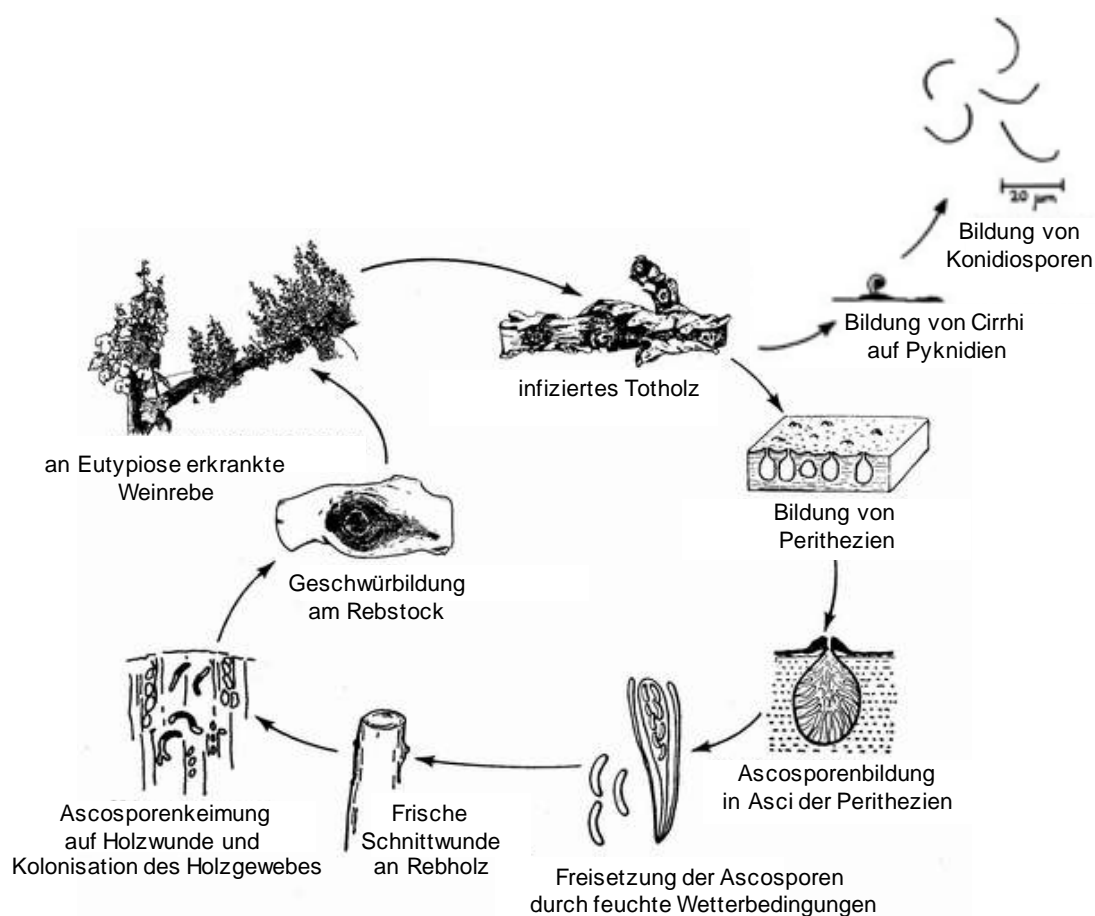


Abb. 1.1: Der Infektionszyklus von *Eutypa lata* verändert nach Gubler und Leavitt (1992).

Die optimale Keimungstemperatur der Ascosporen beträgt 22-25 °C. Bei Temperaturen von 35 °C oder höher konnte dagegen keine Auskeimung beobachtet werden (Carter, 1957). Die Verteilung der Ascosporen erfolgt während des gesamten Jahres. Die Freisetzung beginnt 2-3 h nach dem ersten Niederschlag und endet 24 h nachdem Regenfall (Pearson, 1980). Die Ascosporen dienen als primäres Inokulationsmaterial und sind maßgeblich an der Verbreitung des Pilzes beteiligt. Sie keimen auf offenen Wunden aus, die im Frühjahr durch den

Rückschnitt der Triebe oder durch mechanische Schäden entstehen und kolonisieren so die Wirtspflanze (Carter, 1957; Moller und Carter, 1965; Carter und Moller, 1977; Sosnowski *et al.*, 2008). Vor allem älteres Holz scheint weniger resistent gegen Infektionen durch Ascosporen zu sein als einjährige Pflanzen (Moller und Kasimatis, 1980). Ein Grund könnten größere Wunden bei mehrjährigen Pflanzen sein (Carter, 1991; Sosnowski *et al.*, 2008). Primär werden die Xylemgefäße infiltrierte, die sich bei fortschreitender Infektion dunkelbraun verfärben, absterben und dadurch ihre Funktionalität verlieren. Erst sekundär wird das Phloem und das kortikale Gewebe infiziert, wo die Bildung von Geschwüren stattfindet (Carter und Moller, 1977). Das Geschwür am Rebstock lässt sich häufig erst nach mehreren Jahren beobachten und geht von der ursprünglichen Infektionsstelle aus. Nach einigen Jahren sterben die betroffenen Triebe ab (Kasimatis und Moller, 1978).

Neben den Perithezien werden auch schwarze Pyknidien des Anamorph *Libertella blepharis* auf infiziertem Wirtsgewebe produziert, die bei hoher Feuchtigkeit creme- bis orangefarbene Tröpfchen exsudieren. Diese werden als Cirrhi (Abb. 1.2 A) bezeichnet und enthalten eine große Anzahl hyaliner, fadenförmiger Konidien (Abb. 1.2 B), die eine Größe von 20-45 x 0,8-1,5 µm haben (Glawe und Rogers, 1982; Munkvold, 2001). Die asexuellen Konidien scheinen nicht infektiös zu sein und sind nicht am Infektionszyklus beteiligt (Carter, 1957). Des Weiteren wurde die Keimung von Konidien selten beobachtet (Carter und Moller, 1977; Belarbi und Mur, 1983; Ju *et al.*, 1991; Živković *et al.*, 2012).

Da das Teleomorph *E. lata* unter Laborbedingungen in Reinkultur nicht ausgebildet wird (Munkvold, 2001) und die Konidien von *L. blepharis* nicht gut auskeimen (Živković *et al.*, 2012), steht als Inokulationsmaterial lediglich das Myzel des Anamorphs zur Verfügung (Abb. 1.3 C).

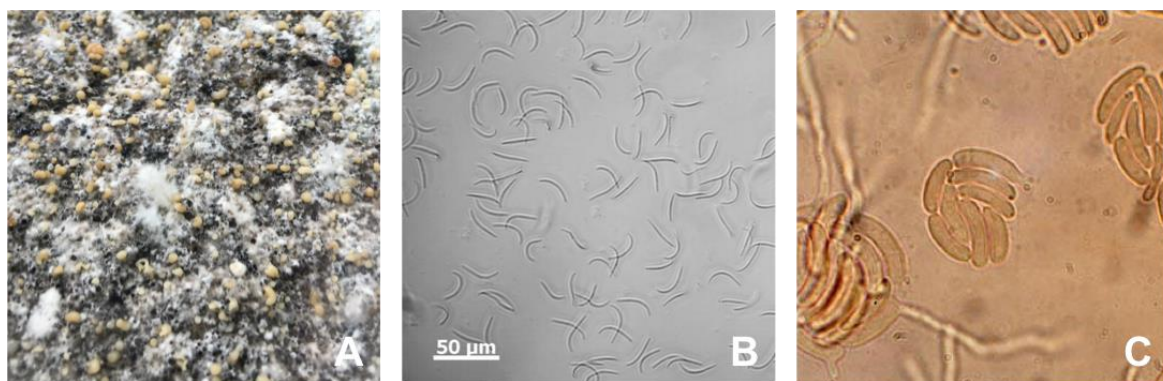


Abb. 1.2: Die Nebenfruchtform *Libertella blepharis* bildet Pyknidien, welche bei hoher Feuchtigkeit orangefarbene Cirrhi exsudieren (A). In den Cirrhi sind eine große Anzahl hyaliner, fadenförmiger Konidien enthalten (B). Ascosporen von *Eutypa lata* (C, Munkvold, 2001).

1.1.2 Eutypiose an Weinreben

Eutypa lata ist der Erreger der Eutypiose an Weinreben (*Vitis vinifera*), die in der Literatur auch als *Eutypa dieback* bezeichnet wird (Bertsch *et al.*, 2013; Carter, 1988). Diese mehrjährige, letale Pflanzenkrebserkrankung reduziert die Lebensdauer der Weinpflanze und beeinträchtigt das Wachstum sowie den Ertrag (Munkvold *et al.*, 1994). Siebert (2001) hat den wirtschaftlichen Verlust in Kalifornien, der jährlich durch die Eutypiose-Erkrankung entsteht, auf mindestens 260 Mio. US\$ geschätzt. In Australien wurden Ertragsverluste von mindestens 860 kg/ha für das Kultivar Shiraz und 740 kg/ha für Cabernet Sauvignon ermittelt (Wicks und Davies, 1999). Auch Fontaine *et al.* (2016) berichtet von enormen Schäden (8,3 Mrd. AU\$), die für die australische Weinindustrie durch Eutypiose entstehen. Dabei zeigen die Rebsorten signifikante Unterschiede in Bezug auf die Infektionsanfälligkeit. Besonders empfindlich scheint die Rebsorte Cabernet Sauvignon zu sein (Mahoney *et al.*, 2003; Munkvold und Marois, 1995).



Abb. 1.3: Symptome der Eutypiose und der Erreger *Eutypa lata*. **A:** Verkümmerte Triebe und kleine chlorotische Blätter einer Weinrebe. **B:** Braune, keilförmige Nekrose im Stamm einer infizierten Weinrebe. **C:** Myzelwachstum von *Libertella blepharis* auf BAF-Medium (**M2**), der aus einer infizierten Weinpflanze isoliert wurde.

Da die ersten äußeren Symptome erst ein bis acht Jahre nach der Infektion sichtbar werden, ist die Diagnose und Erkennung einer Erkrankung verzögert, wodurch auch die Behandlung der Pflanze und eine Erforschung der Krankheit erschwert wird (Carter, 1978; Moller und Kasimatis, 1978; Sosnowski *et al.*, 2007). Die Symptome äußern sich in verkümmerten Trieben mit verkürzten Internodien und kleinen, chlorotischen, zerfetzten Blättern mit nekrotischen Rändern (Abb. 1.3 A). Darüber hinaus vertrocknen die meisten Blütenstände bevor sie sich öffnen und infizierte Weintrauben erscheinen in der Regel sehr klein. Besonders im Frühling können die Blattsymptome detektiert werden. Bei fortgeschrittener Krankheit wird bei einem Querschnitt durch den Stamm zusätzlich eine braune, keilförmige Nekrose sichtbar (Abb. 1.3 B; Moller *et al.*, 1974; Bertsch *et al.*, 2013). Als eine Ursache dieser Symptome werden phytotoxische Sekundärmetabolite angenommen, die von dem im Stamm lebenden Pathogen produziert, sekretiert und über den Pflanzensaft zu den krautigen Teilen der Pflanze

transportiert werden (Amborabé *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003). Zusätzlich werden Zellwand abbauende Enzyme sekretiert, die zum Zerfall des Pflanzengewebes und einer weichen Fäulnis beitragen (Blanco-Ulate *et al.*, 2013; Rolshausen *et al.*, 2008). Drei bis vier Jahre nach Erscheinen der ersten Symptome sterben die an Eutypiose erkrankten Rebstöcke schließlich ab (Munkvold *et al.*, 1994; Octave *et al.*, 2005).

1.1.3 Bekämpfungsstrategien gegen Eutypiose

Bei bereits infizierten Weinreben gibt es bisher keine Methoden im industriellen Maßstab, die eine kurative Behandlung der Pflanze ermöglichen. Lediglich das als *remedial surgery* bezeichnete Heilverfahren ist ein wirksames Mittel zur Bekämpfung der Eutypiose. Diese Methode gehört zur Weinberghygiene und dem Krankheitsmanagement. Darunter versteht man die komplette Entfernung aller infizierten Holzteile und den Wiederaufbau der verbleibenden gesunden Rebstöcke. Dadurch wird die Häufigkeit einer Neuinfektion im Weinberg reduziert und somit auch die Weiterverbreitung der Krankheit (Sosnowski *et al.*, 2011). Nach der Behandlung werden die abgestorbenen und infizierten Weinreben verbrannt. Weitere Maßnahmen um die Eutypiose zu beschränken sind lediglich präventiv. Da eine Infektion der Weinrebe durch offene Wunden stattfindet, konzentrieren sich diese Behandlungen auf den Wundschutz und gute Kulturpflege. Es wurde eine Eindämmung der Krankheit beobachtet, nachdem das Zurückschneiden der Triebe bei trockener Witterung und im späten Winter oder frühem Frühling durchgeführt wurde und auf Hygienemethoden, wie z. B. die Desinfektion von Vermehrungsmaterial und die Anwendung einer Heißwasserbehandlung, geachtet wurde (Munkvold und Marois 1995; Bertsch *et al.*, 2013). Jedoch bieten diese Maßnahmen keinen vollständigen Schutz und verringern nur die Wahrscheinlichkeit einer Infektion. Zudem ist der verspätete Rückschnitt durch die Erweiterung der Rebflächen in vielen Regionen nicht praktikabel (Sosnowski *et al.*, 2013). Eine weitere Methode ist der doppelte Rückschnitt, der die Infektionsrate ebenfalls reduziert. Diese beinhaltet ein mechanisches Stutzen im Winter und ein Rückschnitt per Hand im Frühling (Weber *et al.*, 2007).

Um offene Wunden zusätzlich zu schützen, werden sie mit Fungiziden oder *biological control agents* (BCAs) behandelt. Allerdings wurden in der Vergangenheit einige gut wirkende Breitbandfungizide, wie die Benzimidazole Carbendazim und Benomyl, sowie Natriumarsenit und Flusilazol aufgrund von Gesundheits- und Sicherheitsbedenken in den meisten Ländern, darunter auch Deutschland, vom Markt genommen (Halleen *et al.*, 2010; Lecomte *et al.*, 2003; Mondello *et al.*, 2018; Sosnowski *et al.*, 2008). Aktuell ist in Deutschland kein chemisches Fungizid zur Bekämpfung der Eutypiose zugelassen. Lediglich das biologische Produkt Vintec® darf seit September 2018 zur Wundbehandlung gegen Esca-Infektionen bei der

Pflanzguterzeugung verwendet werden. Vintec® enthält den Organismus *Trichoderma atroviride* SC1 der mit den Sporen pathogener Pilze konkurriert und diese verdrängt. Da das Anwendungsgebiet von Vintec® auf die Esca-Erreger *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum* beschränkt ist, kann es nicht zur Bekämpfung der Eutypiose verwendet werden (BVL, 2018; DLR Rheinpfalz, 2019). Eine antifungische Wirkung gegen *E. lata* ist nicht bekannt.

Die Entwicklung von neuen unbedenklichen Wirkstoffen ist daher besonders im Hinblick auf die zukünftige Erhaltung der Weinreben extrem wichtig. Sosnowski und Mundy (2019) berichten von fünf Fungiziden, die 70-90 % der Neuinfektion von *E. lata* verhindern. Abgesehen von den als gesundheitsschädlich eingestuften Wirkstoffen Carbendazim und Flusilazol, die als Positivkontrolle dienten, wurden Tebuconazol, Mancozeb und Fluazinam getestet. Ausgehend von dieser Studie wurde in Neuseeland das erste Fungizid Fluazinam (GEM®) zur gleichzeitigen Behandlung von *Eutypa dieback* und *Botryosphaeria dieback* zugelassen. Obwohl Fluazinam (Shirlan) auch in Deutschland ein zulässiger Wirkstoff ist, wird lediglich der Gebrauch gegen *Phytophthora infestans*, den Erreger der Kraut- und Knollenfäule, genehmigt (BVL, 2011).

1.2 Sekundärmetabolite aus *Eutypa lata*

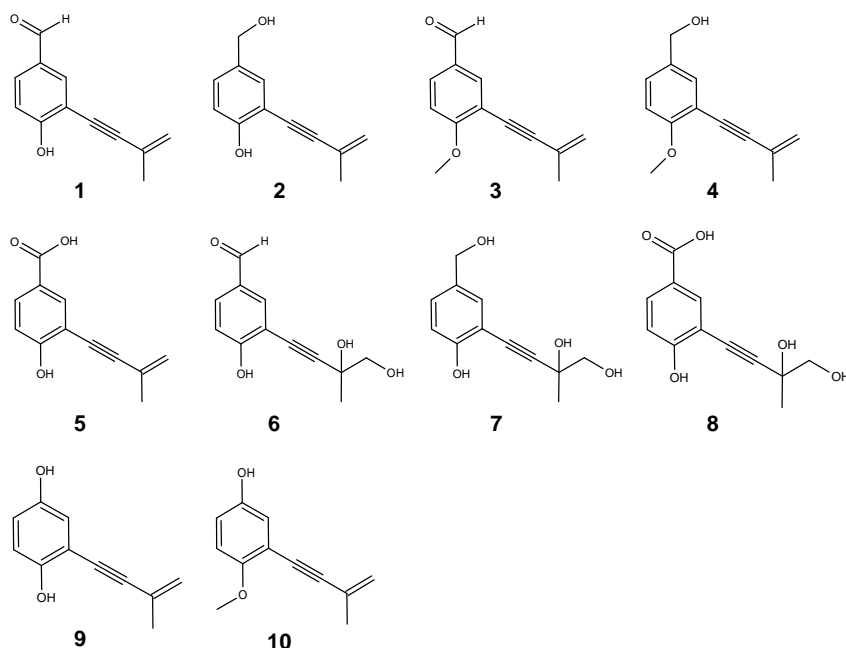
Eutypa lata ist bekannt dafür viele sekundäre Naturstoffe zu produzieren. So wurden in den letzten 30 Jahren 16 verschiedene Sekundärmetabolite aus axenischen Kulturen von *E. lata* isoliert (Andolfi *et al.*, 2011; Masi *et al.*, 2018). Da einige Naturstoffe, wie z. B. Eutypin (1), phytotoxische Eigenschaften besitzen und in Blütenständen sowie im Pflanzensaft erkrankter Weinreben nachgewiesen wurden, werden sie mit der Entstehung der Krankheitssymptome in Verbindung gebracht (Rolshausen *et al.*, 2008, Tey-Rulh *et al.*, 2003). Aufgrund ihrer chemischen Struktur lassen sich die bisher isolierten Sekundärmetabolite in vier verschiedene Gruppen unterteilen (siehe Abb. 1.4): Acetylierte Phenole (1-10), Chromene (11-13), Cyclohexen-Epoxide (14-15) und ein Benzofuran-Derivat (16). In der Arbeit von Masi *et al.* (2018) wurde ein Überblick der bekannten Naturstoffe gegeben.

Die acetylierten Phenole sind strukturell eng miteinander verwandt und unterscheiden sich lediglich in ihrer Substitution. Das charakteristische Grundgerüst besteht aus einem Phenol, welches mit einer Pentenyne Seitenkette in *ortho*-Stellung zur Hydroxygruppe verbunden ist (Mahoney *et al.*, 2003). Zu dieser Gruppe gehören die Verbindungen Eutypin (1), Eutypinol (2), O-Methyleutypin (3), O-Methyleutypinol (4), ein Carbonsäureanalog von Eutypin (5), 3-(3,4-Dihydroxy-3-methyl-1-butynyl)-4-hydroxy-benzaldehyd (6), 2-(3,4-Dihydroxy-3-methyl-1-

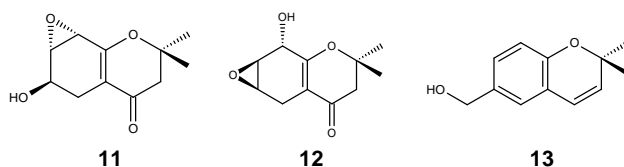
butynyl)-4-hydroxymethylphenol (**7**), 3-(3,4-Dihydroxy-3-methyl-1-butynyl)-4-hydroxybenzoesäure (**8**), Siccayne (**9**) und Eulatinol (**10**).

Die beiden Isomere 6-Hydroxy-2,2-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydro-7,8-epoxychroman-4-on (**11**) und 8-Hydroxy-2,2-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydro-6,7-epoxychroman-4-on (**12**) sowie Eulatachromen (**13**) sind der Gruppe der Chromene zugeordnet. Weitere Sekundärmetabolite sind die Verbindungen Eutypoxid B (**14**), allenisches Epoxycyclohexen (**15**) und das Benzofuran Derivat 2-Iso-propenyl-5-formylbenzofuran (**16**).

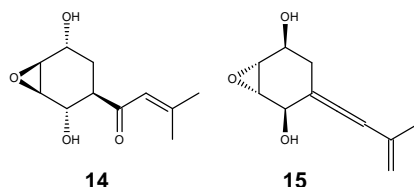
1) Acetylierte Phenole



2) Chromene



3) Cyclohexen-Epoxide



4) Benzofuran-Derivat

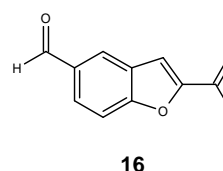


Abb. 1.4: Bisher bekannte und isolierte Naturstoffe aus *Eutypa lata*, die in vier Gruppen eingeteilt werden (nach Masi *et al.*, 2018).

1.2.1 Phytotoxizität einiger Naturstoffe

Obwohl der Ascomycet *E. lata* in der Lage ist eine Reihe von bioaktiven Naturstoffen zu produzieren, wurde häufiger davon berichtet, dass sich die Zusammensetzung und Ausbeute der produzierten Sekundärmetabolite bei den untersuchten *E. lata*-Stämmen signifikant unterscheiden kann (Mahoney *et al.*, 2003; Molyneux *et al.*, 2002). Lange Zeit galt Eutypin (**1**) als das einzige beschriebene Phytotoxin, dass für die Entwicklung der Blattsymptome verantwortlich gemacht wurde. Durch intensive Untersuchungen an Blättern und Protoplasten wurde die phytotoxische Wirkung bestätigt (Deswarte *et al.*, 1994; Jiménez-Teja *et al.*, 2006; Renaud *et al.*, 1989). Es konnte zudem gezeigt werden, dass **1** durch einen passiven Diffusionsmechanismus in die Pflanzenzellen eindringt und aufgrund des Ionisationszustandes des Moleküls im Cytoplasma akkumuliert (Deswarte *et al.*, 1996a). Des Weiteren wurde für **1** eine protonophore Aktivität beschrieben, wodurch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien der Weinpflanzenzellen entkoppelt wird und der Elektronentransport gehemmt wird (Deswarte *et al.*, 1996b). Bei hohen Konzentrationen und unter leicht sauren Bedingungen reagiert **1** zu dem zyklischen Produkt **16**, welches ebenfalls Nekrosen in Weinblättern verursacht (Mahoney *et al.*, 2003; Renaud *et al.*, 1989).

In Kalifornien, Australien und Neuseeland wurden jedoch auch *E. lata*-Stämme aus Eutypiose erkrankten Weinreben isoliert, die kein Eutypin produzieren, obwohl die Stämme pathogen waren. Diese Beobachtungen und die weitere Bearbeitung dieser Stämme führten zur Isolation von Eulatinol (**10**) und Eulatachromene (**13**) (Molyneux *et al.*, 2002). In einem Bioassay mit Weinblattscheiben zeigten die Verbindungen **10**, **13** und **16** sogar eine stärkere phytotoxische Wirkung als **1**. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass **1** nicht alleine für die Phytotoxizität an Weinreben verantwortlich ist, was die Komplexität der Erkrankung unterstreicht. Da die acetylierten Phenole **2** und **9** jedoch keine nekrotischen Stellen auf den Blättern verursachten, ist die Dreifachbindung nicht essentiell für die Bioaktivität (Mahoney *et al.*, 2003; Molyneux *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003). Dennoch ist die Acetylen-Einheit charakteristisch für diese Naturstoffe und erfordert bei der Biosynthese spezifische Acetylasen, die im Zusammenhang mit dem biosynthetischen Ursprung von besonderem Interesse sind (Fischer und Thines, 2017).

1.2.2 Acetylasen

Acetylierte Sekundärmetabolite werden besonders zahlreich von Pflanzen- und Pilzarten produziert und verfügen über antitumorale, antibakterielle, antimikrobielle, antifungische, phytotoxische und weitere medizinisch relevante Eigenschaften (Kuklev *et al.*, 2013). Dementsprechend sind sie interessant für die pharmazeutische Industrie, den Pflanzenschutz und die chemische Biologie in der Grundlagenforschung. Die Funktionalität der Acetylen-

Einheit ist dabei besonders wichtig und findet auch in der Materialwissenschaft ihre Anwendung (Zhu und Zhang, 2018). Allerdings ist über die biologische Herkunft der Acetylene bisher nur sehr wenig bekannt. Acetylenasen sind Enzyme, die für die Biosynthese dieser Verbindungen verantwortlich sind. Sie gehören zu einer Familie von membrangebundenen Desaturasen, die die Abstraktion von Wasserstoffen katalysieren. Diese Membranständigkeit ist eine große Herausforderung und behindert die Entdeckung sowie das mechanistische Verständnis dieser Enzymfamilie (Zhu *et al.*, 2015a). Obwohl in letzter Zeit einige Acetylenasen identifiziert werden konnten, beschränken sich diese Berichte überwiegend auf bioinformatische oder *in vivo* Studien (Zhu *et al.*, 2015b). Die erste Acetylenase, die bei einem Pilz nachgewiesen wurde, stammt aus dem Basidiomyceten *Cantharellus formosus*. Sie ist an der Fettsäurebiosynthese beteiligt. Sie wurde heterolog in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und wird auch als Δ^{12} -Acetylenase bezeichnet, da sie eine Dreifachbindung an Position 12 der Linolsäure katalysiert, wodurch Crepeninsäure entsteht (Blacklock *et al.*, 2010). Mit Hilfe der Gensequenz dieser Acetylenase lassen sich möglicherweise auch bei anderen Pilzen homologe Acetylenasen finden, die an der Biosynthese von acetylierten Sekundärmetaboliten beteiligt sind.

1.3 **Biological control agents und antifungische Naturstoffe**

Aufgrund von immer häufiger auftretenden Resistenzbildungen gegen Pestizide und dem steigenden Bewusstsein für Umweltschutz, gewinnt beim Rebschutz die biologische Bekämpfung zunehmend an Bedeutung (Hajek und Eilenberg, 2018). Dabei ist der größte Vorteil, dass antagonistische Pilz- oder Bakterienstämmen die Schnittwunden der Pflanze kolonisieren und so einen längeren Schutz bieten. Chemische Fungizide sind dagegen eher für einen kurzfristigen Schutz geeignet. Aus diesem Grund wäre eine Kombination aus beiden Ansätzen eine optimale Lösung. Die Entwicklung solcher Methoden wurde bereits von Mutawila *et al.* (2015) adressiert.

In Bezug auf die Bekämpfung von Eutypiose beschäftigten sich mehrere Arbeiten mit der Identifizierung von wachstumshemmenden BCAs und deren Anwendung im Pflanzenschutz. Ferreira *et al.* (1991) berichteten von einem *Bacillus subtilis*-Stamm, der bei *in vitro*-Studien das Myzelwachstum von *E. lata* um 91,4 % hemmte, während die Keimung der Ascosporen zu 100 % gehemmt wurde. Außerdem wurde von einer signifikanten Reduktion der Infektionsrate mit *E. lata* berichtet, die durch die Ausbringung einer Zellsuspension von *B. subtilis* auf die Schnittwunden der Weinrebe erzielt wurde. Für diese Wirkung wurden mindestens zwei antibiotische Verbindungen verantwortlich gemacht, die allerdings nicht näher beschrieben wurden. Vielversprechende Ergebnisse wurden ebenfalls durch die Organismen *Fusarium lateritium* und *Cladosporium herbarum* erzielt, die im Vergleich zu

Benomyl ähnlich effektiv eine Infektion bei Weinpflanzen durch *E. lata* verhindern (Halleen *et al.*, 2010; Munkvold und Marois, 1993). John *et al.* (2005) bestätigten die protektive Wirkung von *F. lateritium* und zeigten, dass *Trichoderma harzianum* sowie *Trichoderma*-enthaltende Produkte, wie z. B. Vinevax™, erheblich die Infektionsrate von *E. lata* reduzierten. In einer weiteren *in vitro*-Studie wurde bei 121 von 188 antifungischen Bakterienstämmen eine antagonistische Aktivität gegen *E. lata* nachgewiesen. Insbesondere einige Stämme von *Bacillus subtilis* und *Erwinia herbicola* hemmten zudem das Myzelwachstum von *E. lata* mehr als 50 % auf autoklaviertem Rebholz, wobei diese Hemmung durch die Hydrolaseaktivität von Chitinasen, Proteasen und Cellulasen hervorgerufen wurde (Schmidt *et al.*, 2001). Anhand von diesen Beispielen wird ersichtlich, welches Potential in oberflächenbesiedelnden Mikroorganismen steckt, die unschädlich für die Wirtspflanze sind und gleichzeitig vor einer Infektion mit einem Pathogen schützen. Abgesehen von *cell wall degrading enzymes*, die von Antagonisten sekretiert werden, sind häufig auch antifungische Naturstoffe für die Wachstumshemmung des Pathogens verantwortlich. Vor allem endophytische Mikroorganismen bieten eine Quelle für bisher unentdeckte biologisch aktive Sekundärmetabolite (Schulz *et al.*, 2002). Durch die Entwicklung von neuen Screeningmethoden wurde der Zugang zu diesen Naturstoffen ermöglicht, wodurch sich das Interesse an Endophyten, vor allem aus unerforschten Habitaten, in den letzten Jahrzehnten deutlich erhöht hat (Aly *et al.*, 2010; Aly *et al.*, 2011). Dieser Trend wird sich in der nächsten Zeit fortsetzen, da Naturstoffe für die pharmazeutische und Agrarindustrie vielversprechender sind als die kombinatorische Chemie. Denn Naturstoffe können mit ihrer biologischen Aktivität direkt als Wirkstoff eingesetzt werden, als Leitstrukturen für synthetische Modifikationen dienen oder zur Entdeckung neuer *mode of action* beitragen (Bano *et al.*, 2016; Schulz *et al.*, 2002; Selim *et al.*, 2012).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Aus den in Kapitel 1.1-1.3 beschriebenen Hintergründen ergaben und ergeben sich wissenschaftliche Fragestellungen, die in dieser Dissertation adressiert werden sollten. Daraus resultierten zwei Themengebiete. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten Experimente und Untersuchungen in Bezug auf die Biosynthese von acetylierten Phenolen durch *E. lata* angestellt werden. Der zweite Teil sollte sich anschließend auf die Bekämpfung der Eutypiose beziehen, indem antagonistische Pilze und antifungische Naturstoffe identifiziert bzw. isoliert werden.

Untersuchungen zur Aufklärung der Biosynthese von acetylierten Phenolen

In diesem Teil der Arbeit sollte die Biosynthese von acetylierten Phenolen durch *Eutypa lata* aufgeklärt werden. Dazu sollte eine Transformationsmethode für diesen Organismus etabliert werden, um gezielt Gene inaktivieren zu können um an der Biosynthese beteiligte Enzyme zu identifizieren. Da die Produktion und Zusammensetzung von Sekundärmetaboliten bei *E. lata*-Stämmen variieren kann, sollte zunächst das biochemische Potential von mehreren isolierten *E. lata*-Stämmen untersucht werden. Dazu sollten sie submers fermentiert und die produzierten Sekundärmetabolite zur Identifikation isoliert werden. Außerdem sollten die Naturstoffe bezüglich ihrer biologischen Aktivität charakterisiert werden. Um weitere Informationen zu potentiellen Vor- bzw. Zwischenstufen der acetylierten Phenole zu erhalten, sollten Supplementationversuche mit Aminosäuren und weiteren in Betracht kommenden Vorstufen durchgeführt werden. Da auf molekularbiologischer Ebene bisher wenige Daten zur Verfügung stehen, sollten zusätzlich die Genome ausgewählter *E. lata*-Stämme sequenziert werden. Mit Hilfe von diesen Daten sollten dann Gencluster vorhergesagt bzw. identifiziert werden, die an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sind. Durch vergleichende Transkriptomanalysen bei unterschiedlicher Produktion von acetylierten Phenolen sollten zudem weitere beteiligte Gene identifiziert werden. Zusätzlich sollte mit Hilfe von qRT-PCR eine Validierung der Transkriptomdaten vorgenommen werden.

Suche nach antagonistischen Pilzstämmen und Isolation von antifungischen Naturstoffen

Die Suche nach Pilzstämmen, die eine antagonistische bzw. wachstumshemmende Wirkung auf *E. lata* haben, sowie die Isolierung von antifungischen Naturstoffen sollte im Vordergrund des zweiten Teils dieser Arbeit stehen. Dazu sollten Pilzstämmen aus der Stammsammlung des IBWF in einem Konfrontationsassay gegen *E. lata* eingesetzt werden. Bei einer Hemmung des vegetativen Wachstums von *E. lata* sollten die Antagonisten auf antifungische Sekundärmetabolite hin untersucht werden. Im nächsten Schritt sollten diese Stämme submers fermentiert und die biologisch aktiven Naturstoffe isoliert werden. Anschließend sollte von diesen Verbindungen die minimale Hemmkonzentration gegen *E. lata* bestimmt und weitere Bioaktivitäten in verschiedenen Testsystemen charakterisiert werden. Um zu überprüfen, ob diese Pilzstämmen auch das Potential haben als *biological control agent* eingesetzt zu werden, sollten sie zusätzlich in der Lage sein, Weinreben zu kolonisieren. Dazu sollte mit den Antagonisten und dem Pathogen *E. lata* ein *Vitis shoot assay* durchgeführt werden, bei dem sie die Weinpflanze vor einer Besiedlung durch *E. lata* schützen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Medienbestandteile

Antibiotika

Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Camptothecin	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Cefotaxim-Natrium	Dr. Friedrich Eberth Arzneimittel GmbH, Ursensollen
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ciclopirox olamine	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
G418 (Geneticin)	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Glufosinat-Ammonium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glufosinat-Ammonium (BASTA®)	Bayer CropScience Deutschland GmbH, Langenfeld
Hygromycin B (HygroGold™)	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin G-Kaliumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pyraclostrobin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rifampicin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tebuconazole	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tetracyclinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Antikörper und Enzyme

Anti-11-Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
FastAP	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Lallzyme MMX™	ZEFÜG GmbH & Co. KG, Bingen
Lysing Enzymes (<i>Trichoderma harzianum</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
RNase A	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Lösungsmittel p.a./HPLC grade

Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt
Acetonitril (HPLC/MS grade)	Scharlau Chemie A. S., Barcelona, Spanien

Acetonitril (HPLC grade)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Cyclohexan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
DMSO	VWR International GmbH, Darmstadt
Diethylether	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Ethylacetat	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Methanol	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Toluol	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Säuren und Laugen

CH ₃ COOH <i>p.a.</i> (100%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HCOOH <i>p.a.</i> (98-100%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HCl <i>p.a.</i> (32%)	Merck KGaA, Darmstadt
KOH	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Maleinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
TFA <i>p.a.</i> (100%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Medienbestandteile für Fest- und Flüssigmedien

2-Naphtalenessigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acetosyringon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bacto™ Casamino Acids	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Nutrient Broth	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Difco™ Agar, granulated	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Difco™ Potato Dextrose Broth	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
D-Sorbit	Merck KGaA, Darmstadt
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gamborg B5 Medium	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V, Haarlem, NL
Glukose	SHS, Gesellschaft für Klinische Ernährung GmbH, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hefeextrakt	Leiber GmbH, Bramsche
Kartoffelpüree (Gut & Günstig)	EDEKA Zentrale AG & Co. KG, Hamburg
KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
K ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt

KH ₂ PO ₄	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Kinetin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Maltose Monohydrat	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Malzextrakt	Lindenmeyer GmbH & Co. KG, Weinsberg
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaCl	VWR International GmbH, Darmstadt
NaNO ₃	VWR International GmbH, Darmstadt
N-Z-Amine® A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
IPTG	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Sabouraud-2% Glucose-Bouillon	Merck KGaA, Darmstadt
Saccharose (Haushaltszucker)	EDEKA Zentrale AG & Co. KG, Hamburg
Spanagar	H. Carroux, Hamburg
Thiamindichlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
X-Gal	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Medienbestandteile für die Zellkultur

Gibco™ DMEM-Medium	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Gibco™ DPBS (1x)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Gibco™ FBS	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Gibco™ Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Trypsin/EDTA solution (10x)(0,5 %/0,2 %)	Merck KGaA, Darmstadt

Weitere Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwert
Antibiotika-Testplättchen (6 mm, 10 mm)	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Casein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CDP-Star, ready to use	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cellulose Nitrat Membranfilter (0,45 µm)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Chromabond® Säule, C ₁₈ ec, 2000 mg	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Digoxigenin-11-dUTP, alkali-lable	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA Molecular Weight Marker III und VII, DIG-labeled	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
EDTA – Dinatriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Elektroporationsküvette, 1 mm	Peqlab, Erlangen
Faltenfilter, MN615 ¼ - ø150 mm	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Ficoll® 400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Zellkulturflaschen, Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glukoseteststreifen, Diabur-Test 5000	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HPLC-Gläschen (Vials N11, 1,5 ml)	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Ladepuffer (6x Orange Loading Dye)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Tyrosin	Merck KGaA, Darmstadt
Magermilchpulver	Sucofin TSI GmbH & Co. KG, Zeven
Microplates, 6, 24, 96 well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Miracloth	Merck KGaA, Darmstadt
Na ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Papierrundfilter, MN 615 – ø90 mm	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Parafilm®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Petrischalen	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Polyethylenglykol 4000 und 6000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Probegläschen (4 ml) mit Deckel	Supelco®, Bellefonte, USA
PVP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Roti®-Nylon Plus, Transfermembran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, PP-Tubes (14 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht
SILICON-Antischaum US	C. Schliessmann Kellerei-Chemie GmbH & Co. KG, Schwäbisch Hall
SDS, ultra pure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Spritze, 30 ml, Terumo® Syringe	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Sterilfilter, Whatman™ FP 30/0.2 CA-S	GE Healthcare Life Sciences, Dassel
Tiefenfilter	Pall Filtersystems GmbH, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Wasser

Es wurde Wasser in drei unterschiedlichen Qualitäten verwendet. Medien, Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser H₂O_{deion} (Seradest SD 2000, SERAL-Reinstwasser-Systeme GmbH, Ransbach-Baumbach) angesetzt. Bei molekularbiologischen und flüssigkeitschromatografischen Arbeiten wurde ausschließlich ultrafiltriertes Wasser H₂O_{UF} (Milli-Q®Synthesis, Quantum® EX, Q-Gard® 2, Millipore GmbH, Schwalbach) verwendet. Um empfindliche RNA vor Degradierung zu schützen, wurde bei RNA-Isolation und RT-qPCR Analysen nukleasefreies Wasser H₂O_{RF} (Ultra Pure™ DNase/RNase-freies destilliertes Wasser, Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet.

2.1.2 Säulenmaterial

In Tab. 2.1 sind die verwendeten Säulen dargestellt, welche bei HPLC-Analysen zur Auftrennung der zu untersuchenden Naturstoffe dienten. Analytische Säulen wurden zur Identifikation von extrahierten Naturstoffen und zur Optimierung von Methoden verwendet. Präparative Säulen fanden bei der Isolation von Naturstoffen ihre Anwendung.

Tab. 2.1: Verwendete Säulen mit dem jeweiligen gepackten Material, der Größenangabe sowie die Hersteller.

#	Säulenbezeichnung	Partikelgröße [µm]	Länge x Durchmesser [mm]	Hersteller
Analytische Säulen				
S1	LiChrospher® 100 RP-18	5	125 x 4,0	Merck KGaA, Darmstadt
S2	SunFire™ C18	5	250 x 4,6	Waters GmbH, Eschborn
S3	Superspher® 100 RP-18	4	125 x 2,0	Merck KGaA, Darmstadt
S4	ZORBAX Eclipse XDB-C8	5	150 x 4,6	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn
S5	ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl	3,5	150 x 3,0	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn
S6	ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl	5	150 x 4,6	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn
Präparative Säulen				
S7	SunFire™ C18	5	250 x 19,0	Waters GmbH, Eschborn
S8	ZORBAX Eclipse XDB-C8	5	150 x 21,2	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn
S9	ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl	5	150 x 21,2	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn

2.1.3 Reaktionskits

Die nachfolgend aufgelisteten Reaktionskits wurden für molekularbiologische Arbeiten verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurde nach den entsprechenden Anleitungen der Hersteller gearbeitet.

Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Gibson Assembly® HiFi DNA Cloning Kit	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
iTaq™ Univ. SYBR® Green One-Step Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
pGEM®-T Easy Vector System	Promega GmbH, Mannheim
RNase-free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

2.1.4 Lösungen

Der pH-Wert der Lösungen wurde, falls nicht anders angegeben, mit 1 M HCl-Lösung oder 1 M NaOH-Lösung eingestellt.

L1	<u>Acetosyringon-Lösung (200 mM)</u>	
	Acetosyringon	392 mg
	DMSO	ad 10 ml
L2	<u>Alkalische Lyse-Lösung (SOL I)</u>	
	1 M Glukose-Lösung	2 ml
	1 M Tris-HCl-Lösung (pH 8)	1 ml
	0,5 M Na ₂ EDTA-Lösung (pH 8)	0,8 ml
	H ₂ O _{deion}	ad 40 ml
L3	<u>Alkalische Lyse-Lösung (SOL II)</u>	
	10 M NaOH-Lösung	0,8 ml
	10 % SDS	4 ml
	H ₂ O _{deion}	ad 40 ml
L4	<u>Alkalische Lyse-Lösung (SOL III)</u>	
	5 M Kaliumacetat-Lösung	30 ml
	10 % SDS	5,75 ml
	H ₂ O _{deion}	ad 50 ml
L5	<u>Antikörper-Lösung (Anti-Digoxigenin-AP)</u>	
	Anti-Digoxigenin-AP	1,5 µl
	<i>Southern Blot</i> Blockingpuffer (P5)	20 ml
L6	<u>Denhardt's-Lösung (100x)</u>	
	Ficoll® 400	1 g
	PVP	1 g
	BSA, Fraktion V	1 g
	H ₂ O _{deion}	ad 50 ml
L7	<u>IPTG Stammlösung (100 mM)</u>	
	IPTG	238 mg
	H ₂ O _{deion}	ad 10 ml

L8 Nitratsalzlösung (20x)

KCl	10,4 g
KH ₂ PO ₄	30,4 g
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	10,4 g
NaNO ₃	120 g
H ₂ O _{deion}	ad 1 L

L9 PEG-Lösung (Fischer, 2014)

PEG 4000	10 g
KCl	7,6 ml
Tris-HCl (pH 8,0)	0,6 g
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	5,5 g
H ₂ O _{deion}	ad 100 ml

L10 PEG-Lösung (Bradshaw *et al.*, 2005)

PEG 6000	20 g
STC-Puffer (P16)	50 ml

L11 Protoplastierungslösung (Fischer, 2014)

NaCl	5,9 g
β-Mercaptoethanol	100 µl
H ₂ O _{deion}	ad 100 ml

Zu 20 ml Protoplastierungslösung wurden 400 mg *Lysing Enzymes (Trichoderma harzianum)* oder Lallzyme MMX™ gegeben. Anschließend wurde die Protoplastierungslösung zentrifugiert und steril filtriert.

L12 Saline

NaCl	9 g
H ₂ O _{deion}	ad 1 L

L13 Spurenelementlösung I (1000x)

CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0,17 g
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	0,16 g
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	0,5 g
H ₃ BO ₃	1,1 g
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	0,5 g
Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	5 g
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	0,15 g
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	2,2 g
H ₂ O _{deion}	ad 100 ml

Alle Komponenten wurden eingewogen, zur verbesserten Löslichkeit auf 60 °C erhitzt und wieder abgekühlt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M KOH auf 6,8 eingestellt.

L14 Spurenelementlösung II (1000x)

CuSO ₄ • 5 H ₂ O	100 mg
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	100 mg
H ₃ BO ₃	100 mg
MnSO ₄ • H ₂ O	100 mg
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	100 mg
H ₂ O _{deion}	ad 1 L

L15 X-Gal Stammlösung

X-Gal	500 mg
DMSO	ad 10 ml

Antibiotikallösungen

Antibiotikallösungen wurden mit H₂O_{deion}, angesetzt, sterilfiltriert (Filtertyp FP 30/0.2 CA-S) und in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Anschließend wurden die Lösungen bei -20 °C gelagert. Rifampicin wurde dagegen in MeOH und Tetracyclinhydrochlorid in EtOH gelöst.

L16 Ampicillin-Lösung (100 mg/ml, Amp)

Ampicillin Natriumsalz	1 g
H ₂ O _{deion}	ad 10 ml

L17 Cefotaxim-Lösung (100 mg/ml, Cefo)

Cefotaxim	1 g
H ₂ O _{deion}	ad 10 ml

L18 Kanamycin-Lösung (100 mg/ml, Kana)

Kanamycinsulfat	1 g
H ₂ O _{deion}	ad 10 ml

L19 Penicillin-Lösung (100 mg/ml, Pen)

Penicillin G-Kaliumsalz	1 g
H ₂ O _{deion}	ad 10 ml

L20 Rifampicin-Lösung (10 mg/ml, Rif)

Rifampicin	100 mg
MeOH	ad 10 ml

L21 Streptomycin-Lösung (100 mg/ml, Strep)

Streptomycinsulfat	1 g
H ₂ O _{deion}	ad 10 ml

L22 Tetracyclinhydrochlorid-Lösung (5 mg/ml, Tet)

Tetracyclinhydrochlorid	50 mg
EtOH	ad 10 ml

2.1.5 Puffer

Der pH-Wert der Puffer wurde, falls nicht anders angegeben, mit 1 M HCl-Lösung oder 1 M NaOH-Lösung eingestellt.

P1 K-Puffer

K ₂ HPO ₄	200 g
KH ₂ PO ₄	145 g
H ₂ O _{deion}	ad 1 L

P2 Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	11,6 g
NaCl	8,8 g
H ₂ O _{deion}	ad 1 L
pH	7,5

P3 MN-Puffer

MgSO ₄ • 7 H ₂ O	30 g
NaCl	15 g
H ₂ O _{deion}	ad 1 L

P4 OM-Puffer (Bradshaw *et al.*, 2005)

MgSO ₄ • 7 H ₂ O	16,8 g
Na ₂ HPO ₄	0,14 g
H ₂ O _{deion}	ad 100 ml
pH	5,8

Zu 20 ml OM-Puffer wurden 500 mg Lysing Enzymes von *T. harzianum* oder Lallzyme MMX™ gegeben und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Puffer abzentrifugiert und sterilfiltriert.

P5	<u>Southern Blot Blockingpuffer</u>	
	Magermilchpulver	1,5 g
	Maleinsäurepuffer (P2)	ad 100 ml
P6	<u>Southern Blot Denaturierungspuffer</u>	
	NaCl	187 g
	NaOH	64 g
	H ₂ O _{deion}	ad 4 L
P7	<u>Southern Blot Depurinierungspuffer</u>	
	HCl (37 %)	24,6 ml
	H ₂ O _{deion}	ad 1 L
P8	<u>Southern Blot Detektionspuffer</u>	
	NaCl	5,8 ml
	Tris	12,1 g
	H ₂ O _{deion}	ad 1 L
P9	<u>Southern Blot Hybridisierungspuffer</u>	
	Denhardt's Lösung (L6)	50 ml
	10 % SDS-Lösung	50 ml
	20x SSPE-Puffer (P12)	300 ml
	H ₂ O _{deion}	ad 1 L
P10	<u>Southern Blot Neutralisationspuffer</u>	
	NaCl	350,6 g
	Tris	242,3 g
	H ₂ O _{deion}	ad 4 L
	pH	7,4
	Der pH-Wert wurde mit 37 % HCl <i>p.a.</i> eingestellt.	
P11	<u>Southern Blot Waschpuffer</u>	
	Maleinsäurepuffer (P2)	100 ml
	Tween® 20	0,5 ml
P12	<u>20x SSPE-Puffer</u>	
	NaCl	841,5 g
	Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	29,8 g
	NaH ₂ PO ₄ • 2 H ₂ O	110,4 g
	H ₂ O _{deion}	ad 4 L
	pH	7,4
	Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH eingestellt.	

P13	<u>2x SSPE-Puffer + 0,1 % SDS</u>	
	10 % SDS-Lösung	10 ml
	20x SSPE-Puffer (P12)	100 ml
	H ₂ O _{deion}	ad 1 L
P14	<u>0,2x SSPE-Puffer + 0,1 % SDS</u>	
	10 % SDS-Lösung	10 ml
	20x SSPE-Puffer (P12)	10 ml
	H ₂ O _{deion}	ad 1 L
P15	<u>ST-Puffer (Bradshaw <i>et al.</i>, 2005)</u>	
	Sorbitol	18,2 g
	Tris	1,2 g
	H ₂ O _{deion}	ad 100 ml
P16	<u>STC-Puffer (Bradshaw <i>et al.</i>, 2005)</u>	
	Sorbitol	21,8 g
	Tris	0,6 g
	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,73 g
	H ₂ O _{deion}	ad 100 ml
P17	<u>STC-Puffer (Fischer, 2014)</u>	
	Sorbitol	18,2 g
	Tris-HCl (pH 8,0)	0,6 g
	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	5,5 g
	H ₂ O _{deion}	ad 100 ml
P18	<u>Stripping-Puffer</u>	
	10 % SDS-Lösung	200 µl
	10 M NaOH	4 ml
	H ₂ O _{deion}	ad 200 ml
P19	<u>TAE-Puffer (50x)</u>	
	EDTA	64,3 g
	Tris	484,4 g
	H ₂ O _{deion}	ad 2 L
	pH	8,0

Der pH-Wert wurde mit 100 % CH₃COOH *p.a.* eingestellt.

2.1.6 Kulturmedien

Alle angegebenen Medienbestandteile wurden eingewogen, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gelöst und für eine Dauer von 45 min bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 2,1 bar autoklaviert. Alle Angaben beziehen sich auf 1 L Medium. Zur Herstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2 % granulierter Difco™ Agar zugesetzt. Die pH-Werte der Medien wurden, falls nicht anders angegeben, mit 1 M HCl-Lösung oder 1 M NaOH-Lösung eingestellt. Zu allen Medien, die Antibiotika enthalten, wurden diese nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen des Mediums auf ca. 55 °C hinzugegeben.

M1 AI-Medium (*Agrobacterium tumefaciens* Induktionsmedium)

1 % CaCl_2 -Lösung	1 ml
0,01 % Fe_2SO_4 -Lösung	10 ml
20 % Glukose-Lösung	5 ml
50 % Glyzerin-Lösung	5 ml
K-Puffer (P1)	0,8 ml
1 M MES-Lösung	40 ml
MN-Puffer (P3)	20 ml
20 % NH_4NO_3 -Lösung	2,5 ml
Spurenelementlösung II (L14)	5 ml

Zuerst wurden 900 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ mit 2 % granuliertem Difco™ Agar autoklaviert. Anschließend wurden alle angegebenen Medienbestandteile zusammengeführt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ auf 100 ml aufgefüllt und sterilfiltriert. Nach dem Abkühlen des Festmediums auf eine Temperatur von ca. 50 °C wurden die angesetzten Medienbestandteile in das Festmedium überführt und 1 ml einer 200 mM Acetosyringon-Lösung (**L1**) zugegeben.

M2 BAF-Medium

Maltose Monohydrat	20 g
Glukose	10 g
Bacto™ Pepton	2 g
Bacto™ Yeast Extract	1 g
KH_2PO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	73,5 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,78 mg
pH	5,5

M3 CM-Medium

Bacto™ Casamino Acids	1 g
Bacto™ Pepton	2 g
Bacto™ Yeast Extract	1 g
Glukose	10 g
Nitratsalzlösung (L8)	50 ml
Spurenelementlösung I (L13)	1 ml
pH	6,5

M4 Czapek-Dox-Medium

Saccharose	30 g
NaNO ₃	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	73,5 mg
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	10 mg
pH	6,3

M5 DMEM-Medium

Das fertige DMEM-Medium wurde vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt. Das fötale Kälberserum (FBS) wurde 30 min bei 55°C hitzeinaktiviert.

Gibco™ DMEM-Medium	89 ml
Gibco™ FBS	10 ml
Gibco™ Penicillin-Streptomycin	1 ml

M6 Doppelmalz-Medium

Malzextrakt	40 g
pH	5,5

M7 Erbsenmedium

Das Erbsenmedium wurde zur Kultivierung von *Phytophthora infestans* von der BASF SE (Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt.

M8 G5VIT-Medium

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

M9 HMG-Medium

Glukose	10 g
Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
pH	5,5

M10 HA-Medium

Glukose	4 g
Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
pH	5,5

M11 LB-Medium

Bacto™ Trypton	10 g
Bacto™ Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
pH	7,4

M12 LB-AXI-Medium

LB-Medium (M11)	1 L
Ampicillin-Lösung (L16)	1 ml
IPTG-Stammlösung (L7)	4 ml
X-Gal Stammlösung (L15)	4 ml

M13 LB-Amp-Medium

LB-Medium (M11)	1 L
Ampicillin-Lösung (L16)	1 ml

M14 LB-Kana-Medium

LB-Medium (M11)	1 L
Kanamycin-Lösung (L18)	600 µl

M15 LB-Rif-Medium

LB-Medium (M11)	1 L
Rifampicin-Lösung (L20)	6 ml

M16 LB-Rif+Kana-Medium

LB-Medium (M11)	1 L
Rifampicin-Lösung (L20)	6 ml
Kanamycin-Lösung (L18)	600 µl

M17 LB-Tet-Medium

LB-Medium (M11)	1 L
Tetracyclinhydrochlorid-Lösung (L22)	10 ml

M18 Malz-Medium

Malzextrakt	20 g
pH	5,5

M19 Minimalmedium (MM)

Glukose	10 g
Nitratsalzlösung (20x) (L8)	50 ml
0,01 % Biotinlösung	250 µl
Spurenelementlösung I (L13)	1 ml
1 % Thiamindichlorid-Lösung	1 ml
pH	6,5

M20 Minimalmedium+Cefo+Strep+Hyg (MM+CSH)

Minimalmedium (M19)	1 L
Cefotaxim-Lösung (L17)	2 ml
Streptomycin-Lösung (L21)	3 ml
Hygromycin B (HygroGold™)	1 ml

M21 NB-Medium

Bacto™ Nutrient Broth	8 g
NaCl	1 g
pH	6,5

M22 PDA-Medium

Difco™ Potato Dextrose Broth	24 g
pH	5,5

M23	<u>PDA-Medium+Cefo+Strep+Hyg (PDA+CSH)</u>	
	PDA-Medium (M22)	1 L
	Cefotaxim-Lösung (L17)	2 ml
	Streptomycin-Lösung (L21)	3 ml
	Hygromycin B (HygroGold™)	1 ml
M24	<u>PDA-Medium+Pen+Strep (PDA+PS)</u>	
	PDA-Medium (M22)	1 L
	Penicillin-Lösung (L19)	2 ml
	Streptomycin-Lösung (L21)	3 ml
M25	<u>SABOURAUD-Medium</u>	
	SABOURAUD-2 % Dextrose Broth	30 g
	pH	5,6
M26	<u>SOB-Medium</u>	
	Bacto™ Trypton	20 g
	Bacto™ Yeast Extract	5 g
	NaCl	0,5 g
M27	<u>SOC-Medium</u>	
	SOB-Medium (M26)	100 ml
	1 M Glukoselösung, sterilfiltriert	2 ml
M28	<u>Regenerationsmedium (Fischer, 2014)</u>	
	Saccharose	342,3 g
	Hefeextrakt	1 g
	Casein	1 g
	H ₂ O _{deion}	ad 1 L
M29	<u>Regenerationsmedium 1 (Bradshaw <i>et al.</i>, 2005)</u>	
	Difco™ Potato Dextrose Broth	24 g
	Saccharose	8 g
	Difco™ Agar, granulated	18 g
	H ₂ O _{deion}	ad 1 L
M30	<u>Regenerationsmedium 2 (Bradshaw <i>et al.</i>, 2005)</u>	
	Difco™ Potato Dextrose Broth	2,4 g
	Difco™ Agar, granulated	1,8 g
	H ₂ O _{deion}	ad 100 ml

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C wurde zum Regenerationsmedium 2 (Bradshaw) eine Hygromycin B-Lösung gegeben (Endkonzentration: 100 µg/ml bzw. 500 µg/ml). Anschließend wurden 5 ml der Überschicht auf das Regenerationsmedium 1 gegossen.

M31 Wasser-Kinetin Agar

Difco™ Agar, granulated 20 g

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C wurden 200 µl von einer Kinetin-Stammlösung (1 mg/ml) zum Wasseragar gegeben.

M32 Weinblattextraktmedium (WEM)

Es wurden 15 g Weinblätter in lauwarmem Wasser gewaschen, zusammen mit 100 ml H₂O_{deion} in einen Mixer (Laboratory Blender 7011S, Warning® Laboratory Science, Torrington, USA) gegeben und auf der höchsten Stufe für 30 s zerkleinert. Zur Entfernung größerer Blattstücke wurde das Extrakt über einen Tiefenfilter (Filtersystems GmbH, Karlsruhe) filtriert. Im Anschluss wurden Medienbestandteile für 1 L Minimalmedium (**M19**) eingewogen und mit 900 ml H₂O_{deion} gelöst. Vor dem Autoklavieren wurden 100 ml des zubereiteten Weinblattextraktes zum Minimalmedium hinzugefügt.

Es wurden Weinblätter der Sorten *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet-Sauvignon' (CS) und 'Weißburgunder' (WB) verwendet.

2.1.7 Plasmide

pAJF-EFA1-GFP (Länge 5113 bp | verleiht Ampicillinresistenz)

Dieser Vektor basiert auf dem Plasmid pBluescript® II KS (-) (Stratagene, La Jolla, USA), in welchen zusätzlich das *eGFP* Gen integriert wurde (Shimomura *et al.*, 1962). Dabei wird das GFP Gen durch den konstitutiven Promotor des Elongationfaktors 1α (EFA1) aus *Pyricularia oryzae* (MGG_03641.8) reguliert. Das Plasmid wurde freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

pCAMB0380 (Länge: 6812 bp | verleiht Kanamycinresistenz)

Dieser Vektor gehört zu einer Reihe von pCAMBIA-Plasmiden (CAMBIA, Canberra, Australien), welche insbesondere für die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation verwendet werden. Als binäres Plasmid eignet sich dieser Vektor zur Replikation sowohl in *E. coli* als auch in *A. tumefaciens*. Dabei zeichnet er sich durch eine hohe Kopienzahl in *E. coli* und eine stabile Replikation in *A. tumefaciens* aus. Aufgrund der

kleinen Größe und einer *multiple cloning site* (MCS) ist dieses Plasmid gut geeignet um eigene Vektoren zu konstruieren. Der DNA-Abschnitt, der sich zwischen den beiden Grenzsequenzen (*left border*, *right border*) befindet, wird als Transfer-DNA (t-DNA) bezeichnet und wird während der Transformation von den *A. tumefaciens*-Zellen in das Genom des Zielorganismus integriert (Chilton *et al.*, 1980). Ausgehend von diesem Plasmid wurden weitere Vektoren zur genetischen Manipulation von filamentösen Pilzen generiert.

pCAMB-HPT(*Hind*III) (Länge: 8316 bp | verleiht Hygromycin- und Kanamycinresistenz)

Dieser Vektor basiert auf dem Plasmid pCAMB0380. Es wurde das Hygromycin B Phosphotransferase Gen *hpt* (Gritz und Davies, 1983), welches mit Hilfe des konstitutiven Promotors *trpC* von *Aspergillus nidulans* reguliert wird (Cullen *et al.*, 1987), an der Restriktionsschnittstelle *Hind*III in das Plasmid integriert. Die Kinase und der Promotor bilden gemeinsam die *HPT*-Kassette, welche als Selektionsmarker fungiert und eine Hygromycinresistenz vermittelt. Das Plasmid wurde freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

pCAMB-HPT-EFA-GFP (Länge: 10447 bp | verleiht Hygromycin- und Kanamycinresistenz)

Dieser Vektor basiert ebenfalls auf dem Plasmid pCAMB0380. Hier wurden zusätzlich die *HPT*-Kassette und das *eGFP* Gen integriert wurden. Das Plasmid wurde freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

pCB1636 (Länge: 4417 bp | verleiht Hygromycin- und Ampicillinresistenz)

Dieser Vektor basiert auf dem Plasmid pBluescript® II KS (-) (Stratagene, La Jolla, USA), welches zusätzlich eine *HPT*-Kassette trägt. Es ist ein *high copy*-Plasmid zur Klonierung und Amplifikation in *E. coli*. Durch die Anwesenheit einer Ampicillinresistenz und des *lacZ* Gens eignet sich dieser Vektor für die Blau-Weiß-Selektion und kann zur Identifikation von rekombinanten Bakterienkolonien verwendet werden (Sweigard *et al.*, 1997).

pGEM®-T Easy (Länge: 3017 bp | verleiht Ampicillinresistenz)

Der pGEM®-T Easy Vektor (Promega GmbH, Mannheim) wurde für das Klonieren und Integrieren von PCR-Produkten verwendet.

pJet1.2/blunt (Länge: 2974 bp | verleiht Ampicillinresistenz)

Dieser Vektor wurde dem CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) entnommen.

pSJ-basic (Länge: 5923 bp | verleiht Hygromycin- und Kanamycinresistenz)

Der pSJ-basic Vektor ist von pCAMB0380 abgeleitet und wurde als Grundgerüst (*backbone*) für die einfache Verwendung beim Klonieren mittels *Gibson Assembly* konstruiert. Zwischen der *BglII*-Restriktionsschnittstelle und der *PstI*-Restriktionsschnittstelle, welche sich beide direkt neben den Grenzsequenzen (*left border*, *right border*) befinden, liegt die HPT-Kassette. Die Besonderheit dieses Plasmids ist die im Vergleich zum Ausgangsvektor kleinere Größe, da nicht kodierende DNA-Sequenzen herausgeschnitten wurden, wodurch größere DNA-Fragmente in das Plasmid integriert werden können. Das Plasmid wurde freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

pC-G418-YR (Länge: 10770 bp | verleiht Neomycin-, Geneticin- und Kanamycinresistenz)

Dieser Vektor basiert auf dem pCAMBIA0380 Vektor. Er enthält das Neomycin-Phosphotransferase Gen *nptII* (de Vries und Wackernagel, 1998), das unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors *trpC* von *Aspergillus nidulans* (Cullen *et al.*, 1987) steht. Dadurch wird eine Resistenz gegen Aminoglykosid-Antibiotika, wie Neomycin oder Geneticin verliehen. Das Plasmid pC-G418-YR wurde freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt (Sidhu *et al.*, 2015).

2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Anhang unter Kapitel 7.3 aufgelistet und wurden von Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) synthetisiert. Die Primer, die im Zusammenhang mit der Gibson Assembly Methode benötigt wurden, sind mit dem NEBuilder® Assembly Tool (NEB, New England Biolabs Inc.) erstellt worden. Alle weiteren Primer wurden mit dem webbasierten Programm Primer3 (version 4.1.0; Untergasser *et al.*, 2012) entworfen. Die Bestimmung der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer wurde mit dem T_m Calculator von Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte) durchgeführt. Im Folgenden sind die Richtlinien angegeben, nach denen effiziente Primer für unterschiedliche Anwendungen entworfen wurden:

- Bei Geninaktivierungsexperimenten wurde darauf geachtet, dass die Primerpaare so ausgewählt wurden, dass das zu manipulierende Gen von zwei flankierenden DNA-Sequenzen umgeben ist, welche nach der Amplifikation eine Größe von ca. 500 bp haben. Dies sollte die Effizienz der homologen Rekombination bei der Transformation von *E. lata* erhöhen.

- Zur Vorbereitung der DIG-markierten DNA-Sonden für *Southern Blot* Analysen wurden die Primerpaare so entworfen, dass die amplifizierte DNA-Sonde eine Größe von ca. 300 bp hat und in der Lage ist mit einem Teil der flankierenden Regionen zu hybridisieren.
- Für Genexpressionsanalysen, die mittels quantitativer „real-time“ PCR (qRT-PCR, siehe Kapitel 2.6.3.3) durchgeführt wurde, sind Primerpaare entworfen worden, die eine erwartete Amplikongröße von 70-150 bp und eine Schmelztemperatur von 60 °C besitzen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Primer auf dem codierenden Bereich des Gens (Exons) befinden. Da nicht alle zu untersuchenden Gene Introns enthalten, konnten keine Intron-umspannenden Primer verwendet werden.

2.1.9 Mikroskopie und Dokumentation

Stereomikroskopische Untersuchungen wurden mit dem Stereomikroskop Stemi DV4 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) durchgeführt. Lichtmikroskopische Analysen erfolgten mit dem Mikroskop Primo Star (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen), das zur Dokumentation mit der Kamera ZEISS AxioCam ERc 5c ausgestattet war. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Forschungsmikroskop ZEISS Axio Imager 2 mit gekoppelter AxioCam MRm (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) durchgeführt.

Die Dokumentation und Auswertung von Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems QUANTUM Modell 1100 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

Um Signale bei *Southern Blot* Analysen zu detektieren und zu dokumentieren wurde das ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet.

Alle makroskopischen Dokumentationen wurden mit der integrierten Digitalkamera (12 Megapixel) eines iPhone 6s (Apple Inc., Cupertino, USA) angefertigt.

2.1.10 Software

Für die Darstellung und Bearbeitung von DNA-Sequenzen, die Auswahl von geeigneten Restriktionsendonukleasen sowie für die Konstruktion von Klonierungsstrategien wurden die Programme pDRAW32 (K. Olesen, AcaClone Software), SnapGene Viewer (GSL Biotech LLC, Chicago, USA) und ApE – A plasmid Editor (M. Wayne Davis) verwendet.

Die Software UGENE (M. Fursov, Unipro) fand ihre Anwendung um multiple Sequenzalignments anzufertigen, zu visualisieren und größere Genombereiche zu bearbeiten.

Die Programme für das Primerdesign und die Schmelztemperaturbestimmung sind bereits in Kapitel 2.1.8 beschrieben.

Mit der Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurden die Dokumentationen der *Southern Blot* Analysen ausgewertet.

QUANTUM ST4 (Vilber Lourmat, Eberhardzell) ist das Programm, mit dem die dokumentierten Agarosegele ausgewertet wurden.

Mit dem Programm CFX Manager™ 2.1 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurden die Rohdaten aus den qRT-PCR Experimenten aufbereitet.

2.2 Organismen und Zellkultur

2.2.1 Verwendete Organismen

Agrobacterium tumefaciens

Stamm: *A. tumefaciens* AGL1, (BAA-101) (ATCC, Manassas, USA)

Genotyp: AGL0 recA::bla pTIBo542deltaT Mop+ CbR (Lazo *et al.*, 1991)

Dieser Stamm ist gegen Rifampicin und Carbenicillin resistent und die Zellen sind chemokompetent.

Escherichia coli

Stamm: *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, USA)

Genotyp: endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 lac glnV44 F' [::TN10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK⁻ mK⁺) (Bullock *et al.*, 1987)

Dieser Stamm ist gegen Tetracyclin resistent und die Zellen sind elektrokompent.

Stamm: *E. coli* NEB-5 alpha ScEf sowie HiFi (New England Biolabs Inc., Ipswich,USA)

Genotyp: fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

Dieser Stamm ist gegen Streptomycin resistent und die Zellen sind chemokompetent.

Stamm: *E. coli* NEB 10-beta ScEf sowie HiFi (New England Biolabs Inc., Ipswich,USA)

Genotyp: Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80 Δ(lacZ)M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ(mrr- hsdRMS-mcrBC)

Dieser Stamm ist gegen Streptomycin resistent und die Zellen sind elektrokompent.

Eutypa lata (anamorph: *Libertella blepharis*)

Es wurde mit verschiedenen *Eutypa lata* Stämmen gearbeitet. Der Stamm IBWF E16012 wurde im August 2015 von [REDACTED] aus dem Rebholzmaterial einer *Vitis vinifera* cv. 'Spätburgunder'-Pflanze isoliert, welche typische Symptome einer Eutypiose zeigte. Dabei wurde Pflanzenmaterial aus der Rebanlage Winkeler Dachsberg im Rheingau (Hessen) entnommen (Muskat, 2016). Die weiteren Stämme IBWF E16121, IBWF E16122 und IBWF E16123 wurden ebenfalls aus infiziertem Rebholzmaterial isoliert und wurden freundlicherweise von [REDACTED] aus Freiburg zur Verfügung gestellt. Alle Stämme wurden auf BAF-Medium (**M2**) oder PDA-Medium (**M22**) als Standard kultiviert und dienten als Ausgangsstämme für Transformationsversuche.

Weitere verwendete Pilzstämme

Folgende Pilzstämme wurden der Stammsammlung des IBWF entnommen und zur Bearbeitung auf HMG-Medium (**M9**) kultiviert. Alle weiteren untersuchten Pilzstämme befinden sich im Anhang unter Kapitel 7.2.

IBWF E12135, IBWF E99338, IBWF E99301, IBWF 144-09, IBWF 022-09

2.2.2 Testorganismen für die biologische Charakterisierung

Alle Testorganismen wurden auf den in Tab. 2.2 angegebenen Medien bei entsprechender Temperatur kultiviert.

Tab. 2.2: Die verwendeten Testorganismen mit der entsprechenden Stammnummer, sowie die Inkubationstemperaturen, Medien und die jeweilige Risikogruppe nach der BioStoffV (TRBA 460 und TRBA 466).

Organismus	Stammnummer	Temperatur [°C]	Medium	Risikogruppe
Filamentöse Pilze				
<i>Botrytis cinerea</i> [#]		RT	M18	1
<i>Eutypa lata</i>	IBWF E16012	RT	M2	1
<i>Rhizomucor miehei</i>	Tü 284	37	M10	1
<i>Penicillium chrysogenum</i> [*]		27	M10	1
<i>Paecilomyces variotii</i>	ETH 114646	37	M10	2
<i>Phytophthora infestans</i> [#]		18	M7	1
<i>Pyricularia oryzae</i>	70-15	27	M3	1
Hefen				
<i>Candida albicans</i>	ATCC [®] 90028 [™]	37	M25	2
<i>Eremothecium coryli</i>	ATCC [®] 10647 [™]	27	M10	1
grampositive Bakterien				
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	ATCC [®] 9999 [™]	37	M21	1
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC [®] 381 [™]	37	M21	1
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC [®] 11632 [™]	37	M21	2
gramnegative Bakterien				
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	LMG 2683	27	M21	1
<i>Escherichia coli</i>	DSM 613	37	M21	1

Mit * markierte Stämme wurden der IBWF Stammsammlung entnommen.

mit # markierte Stämme wurden von der BASF SE (Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Aufbewahrung und Kultivierung der Organismen

Die langfristige Aufbewahrung der Pilzstämmen erfolgte bei 4 °C auf Schrägröhrchen unter Paraffinöl. Zur Bearbeitung dieser Kulturen wurden sie auf dem Festmedium **M9** bei RT inkubiert. Bakterienstämmen wurden dagegen in Glycerinstocks bei -80 C gelagert. Dafür wurden die Bakterien in einer 5 ml Flüssigkultur (**M11**) über Nacht bei 27 C bzw. 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 500 µl der Bakteriensuspension und 500 µl einer Glycerinlösung (50 %) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gemischt. Um mit diesen Stämmen zu arbeiten, wurde die jeweilige Bakteriensuspension aufgetaut, auf LB-Festmedium (**M11**) ausgestrichen und über Nacht bei 27 °C bzw. 37 °C inkubiert.

2.2.4 Zelllinien

Um die Zytotoxizität der isolierten Naturstoffe zu bestimmen, wurde die Zelllinie HeLa-S3 (DSMZ ACC 161, epitheliales Cervixkarzinom, human) verwendet und in DMEM Medium (**M5**) kultiviert.

Die Kalluskultur von *Vitis vinifera* L. wurde mit der Zelllinie PC-1137 (DSMZ, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) erstellt. Dazu wurden die Zellen in Flüssigmedium **M8** bei RT auf einem Taumelschüttler (Duomax 1030, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach) oder auf Festmedium **M8** kultiviert.

2.2.5 Pflanzen

Die isolierten Naturstoffe wurden auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der Pflanzensamenkeimung sowie auf phytotoxischen Eigenschaften untersucht. Dazu wurden folgende Pflanzenarten verwendet:

<i>Agrostis capillaris</i> (Poaceae)	Rotes Straußgras	Bayerische Futtersaatbau GmbH, Ismaning
<i>Lepidium sativum</i> L. (Brassicaceae)	Kresse	Dreschflegel GbR, Witzenhausen
<i>Setaria italica</i> L. (Poaceae)	Kolbenborstenhirse	Dreschflegel GbR, Witzenhausen
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Riesling' (Vitaceae)	Weinrebe	DLR Rheinpfalz, Neustadt a.d.W.

2.3 Fermentation und Screening der Pilze

2.3.1 Fermentation in Submerskultur

Die Pilzstämmen wurden in 1 L Erlenmeyerkolben mit 500 ml Flüssigmedium bei RT auf einer Rundschüttelmaschine (Infors AG, Bottmingen) bei 120 rpm fermentiert. *Eutypa lata* wurde dabei überwiegend in **M2** und alle anderen Pilze in **M9** kultiviert. Um zu untersuchen, ob die Pilzstämmen in unterschiedlichen Medien verschiedene Sekundärmetabolite produzieren, wurden Medientests mit **M2**, **M4**, **M6**, **M9**, **M10**, **M19**, **M22** und **M32** durchgeführt. Während der Kultivierung wurde der Fermentationsverlauf alle zwei bis drei Tage kontrolliert. Dazu wurde an der Sicherheitswerkbank Heraeus® HS 18 (Heraeus Holding GmbH, Hanau) steril eine Probe entnommen, von welcher der Glukosegehalt (siehe 2.3.4.2) und der pH-Wert (siehe 2.3.4.1) bestimmt wurde. Die Fermentation wurde beendet, wenn die frei verfügbare Glukose auf ein Gehalt von 0 % abgesunken war und der pH-Wert wieder anstieg.

2.3.2 Herstellung von Rohextrakten aus Kulturfiltrat und Myzel

Nach Beendigung der Fermentation oder um die Wirkstoffproduktion währenddessen zu überprüfen, wurde das Myzel von der Kulturbrühe mittels eines Büchnertrichters, einem Papierrundfilter (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren), optionalem Tiefenfilter (Pall Filtersystems GmbH, Karlsruhe) und einer Vakuumflasche separiert. Das erhaltene Kulturfiltrat wurde in einem 1:1 Verhältnis mit EE oder Et₂O in einen Scheidetrichter gegeben und extrahiert. Die untere wässrige Phase wurde verworfen und die obere organische Phase wurde über NaSO₄ getrocknet und anschließend mit einem Rotationsverdampfer (LABOROTA 4002, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach) unter Vakuum bei 45 °C bis zur Trockene eingengt. Das filtrierte Myzel wurde vor einer weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert und gefriergetrocknet (Christ Gamma 1-20, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz). Im Anschluss wurde das lyophilisierte Myzel für mindestens eine Stunde bei 120 rpm in einem Erlenmeyerkolben mit MeOH extrahiert. Danach wurde das Extrakt vom Myzel durch Filtration getrennt und ebenfalls am Rotationsverdampfer eingengt. Die Rohextrakte wurden in MeOH aufgenommen, in gewogene Probegläschen (Supelco®, Bellefonte, USA) überführt und in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg) eingengt. Schließlich wurde das Extraktgewicht ermittelt.

Für die HPLC-Analyse wurde das Rohextrakt in MeOH gelöst und auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Zur Vermeidung von Schwebstoffen wurde das gelöste Rohextrakt für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde es in ein HPLC-Gläschen (Vials N11, 1,5 ml, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) überführt.

2.3.3 Fermentation im 20 L-Maßstab und Gewinnung von Rohextrakt

Um die zu untersuchenden Naturstoffe in einer größeren Menge zu erhalten, wurden die Pilzstämme in einem Bioreaktor (Batch-Fermentation, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mit einem Fassungsvermögen von 20 L submers fermentiert. Die Fermentation wurde bei 22 °C unter Rühren (120 rpm) bei einer Luftzufuhr von ca. 3 L/min durchgeführt. Zur Überprüfung des Fermentationsverlaufs sowie der Wirkstoffkonzentration wurde täglich eine Probe von 100 ml entnommen. Von dieser Probe wurde, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, der Glukosegehalt, der pH-Wert sowie das Myzeltrockengewicht ermittelt. Anschließend wurde das Kulturfiltrat aufgearbeitet und das Rohextrakt gewonnen (siehe 2.3.2), welches zur Aufbewahrung in ein Probegläschen überführt und bei -20 °C gelagert wurde.

Nach dem Ende der Fermentation wurde das Myzel von der Kulturbrühe separiert und das resultierende Kulturfiltrat wurde dreimal im Verhältnis 3:1 EE (oder Et₂O) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde mit dem Rotationsverdampfer LABOROTA 20 (Heidolph Instruments

GmbH & Co. KG, Schwabach) evaporiert. Das Rohextrakt wurde in MeOH aufgenommen, in einen gewogenen 250 ml Rundkolben überführt, erneut bis zur Trockene eingengt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

2.3.4 Fermentationsanalysen

2.3.4.1 pH-Wert

Der pH-Wert der Kulturbrühe wurde mit dem Orion™ 2-Star Benchtop pH-Meter (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) bestimmt.

2.3.4.2 Glukose

Um den Gehalt der frei verfügbaren Glukose zu ermitteln, wurden die Glukose-Teststreifen DUS G Health Mate (DFI Co., Ltd. ,388-25 Gimhae-si, Gyeongsangnam-do, Korea) verwendet.

2.3.4.3 Myzeltrockengewicht

Um das Myzeltrockengewicht einer laufenden Fermentation zu bestimmen, wurde ein definiertes Volumen Kulturbrühe mit Hilfe eines Büchnertrichters über einen gewogenen Papierrundfilter filtriert (siehe 2.3.2). Der Filter mit dem darauf liegenden Myzel wurde über Nacht im Trockenschrank bei 65 °C getrocknet. Am nächsten Tag wurde das Myzeltrockengewicht durch Rückwiegen des Filters bestimmt.

2.3.4.4 Quantitative Wirkstoffbestimmung im Kulturfiltrat

Zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration im Kulturfiltrat wurden Rohextrakte eines definierten Volumens angefertigt (siehe 2.3.2), welche mittels HPLC-Analysen (siehe 2.4.1) gemessen wurden. Dabei wurden die enthaltenen Wirkstoffe über ihre UV-Absorption bei definierter Wellenlänge quantifiziert. Als Referenz dienten Kalibrationsgeraden, die mit Hilfe von Standards oder isolierten Naturstoffen erstellt wurden.

2.3.5 Untersuchungen zur Biosynthese von acetylierten Phenolen

Die Aufklärung der Biosynthese von acetylierten Phenolen erforderte weitere Informationen zu chemischen Vor- bzw. Zwischenstufen. Aus diesem Grund wurden Supplementationsexperimente mit dem *Eutypa lata*-Stamm IBWF E16012 durchgeführt. Die supplementierten Chemikalien waren entweder am Primärmetabolismus beteiligt oder hatten eine ähnliche Strukturformel wie die produzierten Sekundärmetaboliten. Der Stamm IBWF E16012 wurde mehrere Tage in einem 1 L Erlenmeyerkolben mit einer Schikane mit 500 ml **M2** bis zur

Produktion der zu untersuchenden Naturstoffe vorkultiviert. Danach wurde das Myzel von der Kulturbrühe steril in 50 ml Zentrifugenröhrchen durch Zentrifugation separiert, einmal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gewaschen und in gleichem Volumen mit frischem **M2** oder **M19** aufgenommen. Das Kulturfiltrat wurde verworfen. So wurde gewährleistet, dass einerseits die Kultur in der Lage ist, die acetylierten Phenole zu produzieren und andererseits ein Nachweis des Produktionsunterschieds zwischen Beginn der Fermentation und dem weiteren Fermentationsverlauf möglich war. Anschließend wurden je 50 ml der erhaltenen „frischen“ Kulturbrühe in autoklavierte 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane überführt. Es folgte die Supplementation der Chemikalien, die in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst waren, sodass eine Endkonzentration von 500 μM oder 2 mM erreicht wurde. Als Kontrolle diente eine Kultur ohne Zusatz. Direkt nach der Zugabe und anschließend alle 24 h wurde steril eine Probe entnommen, die auf ihre Wirkstoffkonzentration bestimmt wurde (siehe 2.3.4.4). Aufgrund des kleinen Volumens wurden 2 ml Kulturbrühe in ein 2 ml Reaktionsgefäß gefüllt und für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg). Vom Überstand wurden 1 ml in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml EE überschichtet. Im Anschluss wurde die Lösung für 2 min gevortext und erneut für 1 min abzentrifugiert. Mit einer Pipette wurde die obere organische Phase abgenommen (1 ml) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg) wurde das Lösungsmittel evaporiert, das verbleibende Rohextrakt mit 100 μl MeOH aufgenommen und in ein HPLC-Gläschen (Vials N11, 1,5 ml, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) gefüllt.

2.3.6 Plattenkonfrontationsassay

Die Identifikation von potentiellen *Eutypa lata*-Antagonisten wurde in einem ersten Schritt durch ein Plattenkonfrontationsassay erzielt, welches in Petrischalen auf Festmedium **M2** durchgeführt wurde. Es wurde jeweils der Stamm *Eutypa lata* IBWF E16012 gegen einen Pilzstamm aus der Stammsammlung des IBWF getestet. Von den zu untersuchenden Pilzen wurden aus einer gut angewachsenen Kultur Myzelstücke mit einem Korkbohrer (0,5 cm Durchmesser) entnommen und auf einer Agarplatte platziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die beiden Myzelstücke ca. 7 cm getrennt voneinander liegen. Da einige Stämme ein langsames Wachstum aufwiesen, wurde das Weinrebenpathogen erst zwei Tage später hinzugefügt. Die Inkubation des Plattenassays erfolgte anschließend für 10 Tage bei RT. Dann konnten mögliche Wachstumshemmhöfe beobachtet und ausgewertet werden. Pilzstämme, die gegenüber *E. lata* eine antifungische Aktivität aufwiesen, wurden in weiteren Experimenten untersucht. Im Anhang unter Kapitel 7.2.1 sind die untersuchten Stämme in Tabellen aufgelistet.

2.3.7 Screening nach wachstumsinhibierenden Wirkstoffen gegen *Eutypa lata*

Nachdem im Plattenkonfrontationsassay (siehe 2.3.6) Pilzstämme mit antifungischen Eigenschaften gegen *Eutypa lata* identifiziert werden konnten, wurden sie submers fermentiert und das Rohextrakt von Myzel und Kulturfiltrat gewonnen (siehe 2.3.1 und 2.3.2). Um zu überprüfen, ob die Rohextrakte Naturstoffe enthalten, die das Myzelwachstum von *E. lata* inhibieren, wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt (siehe 2.5.2). Bei einer effektiven Wachstumsinhibition durch das getestete Rohextrakt wurde es im nächsten Schritt mit Hilfe der HPLC in eine 96-Lochplatte fraktioniert (Säule **S1** und Gradient **G1**; siehe 2.4.1). Um die antifungischen Wirkstoffe zu identifizieren, erfolgte erneut eine Inkubation mit einer Myzelsuspension von *E. lata* (siehe 2.5.2). Von dieser Fraktionierung wurde ein Duplikat erstellt, um die aktiven Naturstoffe in einer HPLC/MS Analyse nachträglich zu identifizieren. Wenn die Informationen zu Retentionszeit, UV-Spektrum und Massenspektrum des Naturstoffs ausreichend bekannt waren, konnten sie mit den Daten der Reinsubstanzdatenbank des IBWF verglichen werden. Dadurch konnten bekannte Naturstoffe aussortiert werden. Für die Isolation unbekannter Naturstoffe wurde eine Fermentation im 20 L-Maßstab mit den Produzenten durchgeführt (siehe 2.3.3).

Des Weiteren wurden Rohextrakte aus der Rohextraktsammlung des IBWF gegen das Myzelwachstum von *E. lata* getestet. Diese Rohextrakte waren in DMSO gelöst und auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Es wurden jeweils 2 µl der Rohextrakte in die Vertiefungen der 96-Lochplatte pipettiert, sodass die Wirkung einer Konzentration von 100 µg/ml untersucht werden konnte. Die Durchführung des Assays erfolgte wie unter Kapitel 2.5.2 beschrieben. Alle getesteten Rohextrakte sind im Anhang unter Kapitel 7.2.2 aufgelistet.

2.3.8 *Vitis shoot assay*

Das *Vitis shoot assay* wurde in Anlehnung an die Arbeit von Landi *et al.*, (2012) durchgeführt. Dabei wurde die Holzbesiedlung und die Interaktion mit *Vitis* spp. durch *Phaemoniella chlamydospora* untersucht. Für das *Vitis shoot assay* mit *E. lata* wurden in dieser Arbeit Edelreiser (*Vitis vinifera* cv. 'Riesling') vom DLR Rheinpfalz (Neustadt an der Weinstraße) zur Verfügung gestellt, die mit BELTANOL oberflächendesinfiziert wurden. Zu Beginn wurden die Edelreiser für ein paar Minuten in H₂O_{deion} gewaschen und anschließend mit einer sterilen Astschere unter einem Auge in 6 cm lange Stück geschnitten. Diese Aststücke wurden vertikal in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gestellt, das zuvor mit 10 ml 55 °C heißen Festmediums **M31** gefüllt wurde. Danach wurde der Agar auf RT gekühlt, sodass das Rebstück stabilisiert wurde (Abb. 2.1 A). Als Inokulationsmaterial dienten 25 µg bzw. 50 µg Myzelnassgewicht des Testorganismus einer gut angewachsenen Flüssigvorkultur, welches oben auf die frisch geschnittene Wunde des Rebstücks platziert wurde. Bei Ko-Inkubationsexperimenten wurde

der Antagonist zwei Tage vor *E. lata* inokuliert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Tagen wurden die Rebstöcke ausgehend von der Inokulationsstelle mit einer sterilen Astschere in 5 mm dicke Astquerschnitte zerlegt (Abb. 2.1 B). Im Anschluss wurden die Astscheiben auf **M24** Festmedium inkubiert und über einen Zeitraum von neun Tage beobachtet. Wenn Pilzmyzel aus dem Holzmaterial in die Agarplatte gewachsen war, wurde ein Eindringen des Pilzes bis zu dieser Position angenommen (Abb. 2.1 C). Ob es sich um den Pilz handelt, der als potentieller Antagonist dienen sollte oder um *E. lata* wurde makroskopisch oder gegebenenfalls mikroskopisch anhand von morphologischen Merkmalen festgestellt.

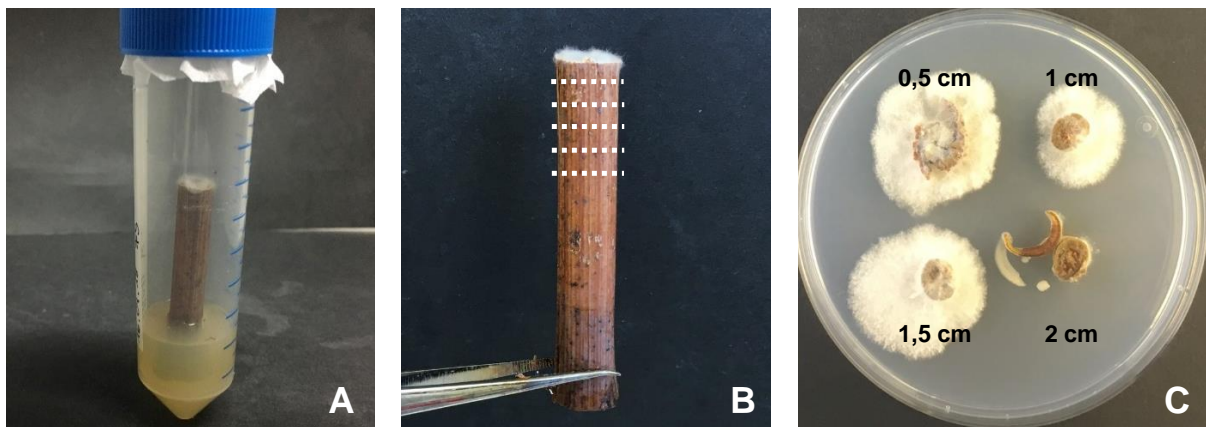


Abb. 2.1: Durchführung des *Vitis shoot assay*. **A:** Rebstücker (6 cm lang) wurden vertikal in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gestellt und mit Agar stabilisiert. **B:** Nach der Inkubation wurden die infizierten Rebstücker in 5 mm dicke Astquerschnitte zerlegt. **C:** Inkubation der Astquerschnitte auf **M24** Festmedium.

2.4 Methoden zur Aufreinigung und physikalisch-chemischen Analyse der Naturstoffe

2.4.1 HPLC- und HPLC/MS Analysen

Die Analyse von Rohextrakten wurde mit einer HPLC-Anlage (Agilent 1100 Series HPLC System, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) mit angeschlossenem DAD durchgeführt. Vor der Applikation der Proben wurden diese in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und anschließend in die dafür vorgesehenen HPLC-Gläschen (Vials N11, 1,5 ml, MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) überführt. Das Injektionsvolumen konnte zwischen 0,5 µl und 25 µl gewählt werden. Zur Auftrennung der Analyten wurden die in Tab. 2.1 aufgeführten analytischen Säulen, sowie die Gradienten in Tab. 2.3 verwendet. Um eine Vergleichbarkeit von unterschiedlichen Proben zu gewährleisten, wurden standardisierte Bedingungen gewählt, die mit Standardläufen (Säule **S1** und Gradient **G1**) durchgeführt wurden. Der Säulenofen wurde dazu auf 40 °C temperiert. Die Standardläufe dienen zur Untersuchung von Extrakten, der Bestimmung von Retentionszeiten und UV-Spektren, sowie für die quantitative Wirkstoffbestimmung. Im Anschluss wurden die erhaltenen Daten mit der Reinsubstanzdatenbank des IBWF verglichen, um bereits bekannte Naturstoffe

zu identifizieren. Für die Optimierung von schwer trennbaren Naturstoffgemischen wurden die weiteren analytischen Säulen sowie individuell angepasste Gradienten verwendet. Als Elutionsmittel dienten $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ oder mit 0,1 % TFA angesäuertes $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ (Eluent A) und MeCN oder MeOH (Eluent B).

Da einige Sekundärmetabolite, die aus *Eutypa lata* extrahiert wurden, keine größeren Unterschiede in strukturellen und physikochemischen Eigenschaften aufwiesen, wurde für die Identifikation dieser Naturstoffe der optimierte Gradient **G2** in Kombination mit der Säule **S4** verwendet.

Um biologisch aktive Substanzen innerhalb eines Naturstoffgemisches zu identifizieren, wurden die Rohextrakte mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Analyt-FC, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) in eine 96-Lochplatte abgelegt. Dazu wurden 400 μg Rohextrakt injiziert, das mit der Säule **S1** und Gradient **G1** aufgetrennt wurde und in jeweils 250 μl Fraktionen (0,25 min/Fraktion) abgelegt wurde. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel evaporiert, die Platte mit EtOH überschichtet und erneut unter sterilen Bedingungen getrocknet. Schließlich erfolgte die Inkubation mit einer Sporen- oder Zellsuspension, um die biologische Aktivität zu überprüfen.

Die Bestimmung der Molekülmasse (bzw. des m/z-Verhältnisses) von Analyten erfolgte mit einer HPLC/MS Anlage (Agilent 1260 Infinity HPLC-System, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn), die mit einem DAD und einem Massenspektrometer (6130 Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) ausgestattet war. Als Trennmaterial wurde die Säule **S4** verwendet, die auf 40 °C temperiert wurde. Der Standardgradient **G1** wurde mit einer verringerten Flussrate von 0,45 ml/min angewendet und als Eluent A diente entweder $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ oder mit 0,1 % HCOOH versetztes $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$. Die Massenspektren wurden mit APCI, also chemischer Ionisierung bei Atmosphärendruck aufgenommen. Dazu wurde bei positiven Ionen eine Kapillarspannung von 3.500 V und einem Coronastrom von 4 μA sowie bei negativen Ionen eine Kapillarspannung von 2.200 V und einem Coronastrom von 12 μA angewandt. Die Verdampfungstemperatur betrug dabei 400 °C und die Fragmentorspannung 140 V.

Tab. 2.3: Parameter des Standardgradienten **G1** sowie der Gradient **G2** zur Untersuchung der acetylierten Phenole von *Eutypa lata*.

Gradient	Flussrate [ml/min]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
G1	1 (bei HPLC-Läufen) 0,45 (bei HPLC/MS-Läufen)	0	99	1
		20	0	100
		24	0	100
		25	99	1
G2	0,45	0	99	1
		6	70	30
		22	60	40
		24	0	100
		26	0	100
		28	99	1

2.4.2 Säulenchromatographie

2.4.2.1 Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie (Flash-Chromatographie)

Für die Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie stand ein PURIFLASH® 4250-250 System (Interchim Deutschland GmbH, Mannheim) mit integriertem Fraktionssammler und Lichtstreuendetektor (ELSD) zur Verfügung. Sie wurde als Vorreinigung der Extrakte durchgeführt, insbesondere wenn es sich um größere Extraktmengen (> 2 g) handelte. Zur Vorbereitung wurde das Rohextrakt an Kieselgel (40-63 µm, Geduran® Si 60, Merck KGaA, Darmstadt) gebunden, dass in eine 50 g Leerkartusche gefüllt und als Kieselgelsäule gepackt wurde. Danach erfolgte die Elution mit Cyclohexan, Ethylacetat und MeOH mit dem in Tab. 2.4 dargestellten Gradienten **G3**. Die Fraktionen wurden in 25 ml Reagenzgläsern gesammelt und im Anschluss in Abhängigkeit der Absorption der Naturstoffe zu größeren Fraktionen vereinigt.

Tab. 2.4: Parameter des Gradienten **G3** sowie die Elutionsschritte der Niederdruck Flüssigkeitschromatographie.

#	Säulenvolumen	Cyclohexan [%]	Ethylacetat [%]	Methanol [%]
1	0	100	0	0
2	3	100	0	0
3	23	0	100	0
4	28	0	100	0
5	33	0	50	50
6	35	0	0	100
7	40	0	0	100

2.4.2.2 Festphasenextraktion an Chromabond®-Kartuschen

Bei kleineren Ausgangsmengen (< 2 g) wurde das Rohextrakt zur Vorreinigung und Fraktionierung über C₁₈ ec Chromabond®-Kartuschen (2000 mg, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) fraktioniert. In einem ersten Schritt wurde dazu das Säulenmaterial mit drei Säulenvolumen (CV) MeCN und anschließend mit drei CV H₂O_{UF} (bzw. bei Bedarf 0,1 % TFA in H₂O_{UF}) konditioniert. Dann wurde das Rohextrakt auf die Säule appliziert und mit ebenfalls drei CV der angesetzten Eluentengemische eluiert. Die Elutionsschritte erfolgten mit einem Stufengradient und sind in Tab. 2.5 dargestellt.

Tab. 2.5: Elutionsschritte der Festphasenextraktion mit den verwendeten Eluentengemischen.

Fraktion	Eluent A H ₂ O _{UF} [%]	Eluent B MeCN [%]
1	100	0
2	80	20
3	70	30
4	60	40
5	40	60
6	20	80
7	0	100

2.4.3 Präparative HPLC

Die Naturstoffisolation von größeren Mengen wurde mit einem präparativen HPLC-System (JASCO PU-2087 Plus, JASCO Labor- und Datentechnik, Gross-Umstadt) durchgeführt. Bevor die Aufreinigung der Naturstoffe erfolgte, wurden die Methoden an der analytischen HPLC optimiert, sodass diese nur auf das größere Säulenvolumen mit daraus resultierendem erhöhtem Fluss angepasst werden mussten. Die verwendeten präparativen Säulen sind in Tab. 2.1 und die Elutionsmittel sind in Kapitel 2.4.1 aufgeführt. Da die Säule nicht temperiert wurde, fand die Chromatografie bei Raumtemperatur statt.

2.4.4 Strukturaufklärung der isolierten Naturstoffe

Die Strukturaufklärung bzw. -bestätigung der isolierten Naturstoffe wurde von [REDACTED] und [REDACTED] durchgeführt.

2.5 Biologische Charakterisierung von Naturstoffen

2.5.1 Agardiffusionstest

Zu einer ersten Prüfung auf bioaktive Sekundärmetabolite wurde mit den Rohextrakten ein Agardiffusionstest in Anlehnung an Zähler (1965) durchgeführt. Dazu wurden 50 µg und 100 µg des jeweiligen Extrakts auf ein Antibiotika-Testplättchen (6 mm, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) appliziert, nach dem Abdampfen des Lösungsmittels auf eine Testplatte gelegt und für 24 h bei der für die getesteten Organismen optimalen Temperatur inkubiert. Die Organismen und ihre bevorzugten Kultivierungsbedingungen sind in Tab. 2.2 dargestellt, wobei für diesen Test lediglich *Rhizomucor miehei*, *Penicillium chrysogenum*, *Paecilomyces variotii*, *Eremothecium coryli*, *Aneurinibacillus migulanus*, *Micrococcus luteus* und *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* verwendet wurden. Die Auswertung des Agardiffusionstests erfolgte durch Ausmessen des Hemmhofdurchmessers.

Die Testplatten wurden in zwei unterschiedlichen Arten vorbereitet. Für Pilztestplatten wurden Sporensuspensionen bzw. bei *Eremothecium coryli* eine Zellsuspension von 10^6 Sporen bzw. Zellen/ml mit dem jeweiligen Medium hergestellt und 20 ml einschichtig in eine Petrischale gegossen. Bei Bakterientestplatten wurde dagegen eine erste Unterschicht (10 ml) des Mediums ohne Zellen in die Petrischale gefüllt. Auf die abgekühlte Unterschicht wurde danach eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in entsprechendem Nährmedium gegeben. Die Testplatten wurden bei 4 °C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) im Reihenverdünnungstest

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurden die Organismen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der zu testenden Reinsubstanzen oder Rohextrakte inkubiert. Die MHK ist dabei definiert als die geringste Konzentration von einer Testsubstanz, bei der eine Wachstumsinhibition des zu untersuchenden Organismus nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden die Organismen in 50 ml Kulturen für 16-24 h vorkultiviert und anschließend auf eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Es wurde ein Reihenverdünnungstest in einer 96-Lochplatte (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) durchgeführt. Die Testsubstanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in die Vertiefungen der Platte vorgelegt und nachdem das Lösungsmittel verdampft war, wurden 200 µl der Zell- oder Myzelsuspension zugegeben. Nach 24 h Inkubation bei der in Tab. 2.2 angegebenen Bedingungen erfolgte die Auswertung. Dazu wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Spektralphotometer für Mikroplatten (Benchmark Plus™, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gemessen und mit

der Positiv- und Negativkontrolle verglichen. Für die Bakterienstämme wurden 50 µg/ml Tetracyclin und für die Pilzstämme wurde 50 µg/ml Ciclopirox als Positivkontrolle verwendet. Die Negativkontrolle blieb ohne Zusatz. Als MHK wurde die geringste Konzentration angegeben, bei der die Absorption, der der Positivkontrolle entsprach.

Im Falle von *Eutypa lata* wurde die Myzelsuspension aus einer gut angewachsenen *E. lata* Flüssigkultur in **M2** angesetzt. Die Konzentration wurde mit frischem **M2** auf 1 mg/ml Myzelnassgewicht eingestellt. Der Reihenverdünnungstest mit *E. lata* wurde bei RT und 120 rpm für drei Tage inkubiert und anschließend wie oben angegeben ausgewertet. Als Positivkontrolle dienten 50 µg/ml Ciclopirox oder Hygromycin B.

2.5.3 Untersuchungen zur Sporenkeimungshemmung

Die Fähigkeit zur Hemmung der Sporenkeimung wurde für die isolierten Reinsubstanzen mit Sporen von *Pyricularia oryzae* (in H₂O und **M3**), *Botrytis cinerea* und *Phytophthora infestans* untersucht. Die optimalen Kultivierungsbedingungen der Organismen sind in Tab. 2.2 aufgeführt. Für den Test wurden 10-11 Tage alte gut angewachsene *Pyricularia oryzae* Platten, ca. 3-4 Wochen alte *Botrytis cinerea*, bzw. ca. 21 Tage alte *Phytophthora infestans* Platten benötigt. Die Sporen wurden mit dem entsprechenden Medium abgeschwemmt, über Miracloth filtriert, abzentrifugiert und auf eine Sporensuspension mit $2-4 \cdot 10^4$ Sporen/ml eingestellt. Die Sporensuspensionen wurden im Anschluss in eine 96-Lochplatte vorgelegt und die Reinsubstanzen wurden in geringem Volumen Lösungsmittel (< 1 % des Gesamtvolumens) und in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 24 h bzw. 48 h und der Test wurde anschließend zur Auswertung mikroskopisch untersucht.

2.5.4 Untersuchungen zur Keimungshemmung von Pflanzensamen

Um die Reinsubstanzen auf ihr Potential einer Keimungshemmung von Pflanzensamen zu untersuchen, wurden sie mit Samen von *Agrostis capillaris*, *Lepidium sativum* und *Setaria italica* inkubiert. Im Fall von *L. sativum* und *S. italica* wurden kleine Rundfilter in die Vertiefungen einer 48-Lochplatte gelegt, auf die die Reinsubstanzen in verschiedenen Mengen pipettiert wurden. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurden jeweils 12 Samen auf die Filter gelegt, die mit 150 µl Leitungswasser benetzt wurden. Beim *Agrostis capillaris*-Test konnten die Reinsubstanzen dagegen direkt in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte platziert werden, die nach dem Abdampfen des Lösungsmittels mit 200 µl Leitungswasser gefüllt wurden. Danach wurden die Samen mit Hilfe einer Sähvorrichtung auf die Wasseroberfläche gebracht. Als Positivkontrolle diente 5 % Phosphorsäure, die eine Auskeimung der Samen

vollständig verhinderte. Die Platten aller Ansätze wurden für 5-7 Tage in einer geschlossenen, lichtdurchlässigen und befeuchteten Kammer bei 28 °C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 h inkubiert. Die Tests wurden nach der Inkubationszeit in Bezug auf die Menge der ausgekeimten Samen und auf Unterschiede in der Sproßlänge optisch ausgewertet.

2.5.5 Blattrondelltest zur Bestimmung von phytotoxischen Eigenschaften

Der Blattrondelltest wurde mit Weinblättern (*Vitis vinifera* cv. 'Riesling') und den zu untersuchenden Rohextrakten bzw. Reinsubstanzen in Anlehnung an Harm *et al.*, (2011) durchgeführt. Dazu wurden Weinblattrondelle (ø 1 cm) mit einem Korkbohrer ausgestanzt und auf Wasser-Kinetin-Agarplatten (**M31**) gelegt. Zur Fixierung der Testlösung wurden 5 µl einer 2 % Gelatinlösung in die Mitte des Rondells pipettiert. In diesen Fixierungstropfen wurden schließlich maximal 5 µl der gelösten Testsubstanz gegeben, sodass eine totale Menge von 50-200 µg getestet werden konnte. Die Agarplatten mit den darauf liegenden Blattrondellen wurden für zwei Tage bei RT und ohne Licht inkubiert. Danach wurden die Blattrondelle auf Nekrosenbildung untersucht und dokumentiert.

2.5.6 Kalluskulturtest

Die Kultivierung der Kalluskultur von *Vitis vinifera* L. wurde bereits in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Es wurden Reinsubstanzen in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte vorgelegt und nach Abdampfen des Lösungsmittels wurden 200 µl einer Zellsuspension hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei RT und 6 rpm auf einem Taumelschüttler. Im Anschluss wurden die Zellen nach dem Färbeverfahren von Widholm (1972) behandelt und in Bezug auf ihre Vitalität mikroskopisch analysiert.

2.5.7 Untersuchung der zytotoxischen Aktivität isolierter Naturstoffe

Um das cytotoxische Potential von isolierten Reinsubstanzen zu bestimmen, wurde ein Cytotoxizitätstest mit der Zelllinie HeLa-S3 (siehe 2.2.4) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde die Zelllinie mehrere Tage vor der Anwendung in Zellkulturflaschen (Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) in **M5** bei feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ und 37 °C in einem CO₂-Inkubator (Galaxy® 170 S, Eppendorf AG, Hamburg) kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage entnommen und die Zellen mit steriler Gibco™ DPBS-Lösung gewaschen. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen wurden 2 ml einer einfachen Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben. Durch Zugabe von frischem **M5** wurde die Trypsinaktivität gestoppt und die Zellsuspension konnte nach der Einstellung auf $1-2 \cdot 10^4$ Zellen/ml für den Test

eingesetzt werden. 200 µl Zellsuspension wurden in eine 96-Lochplatte ausgesät und für 24 h anwachsen gelassen. Danach wurde das Medium entnommen und mit neuem Medium mit darin enthaltenen Testsubstanzen ersetzt. Nach 48 bis 72 h wurden die Zellen mikroskopisch analysiert und auf das Absterben der Zellen überprüft.

2.5.8 Untersuchung zur Stabilität von aktiven Wirkstoffen

Zur Überprüfung der Stabilität von bioaktiven Naturstoffen wurden diese mit L-Cystein in H₂O_{UF} in äquimolarem Verhältnis in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 6 h bei RT inkubiert. Als Kontrollen wurden die Substanzen auch ohne L-Cystein angesetzt. Danach wurden alle Ansätze an der HPLC gemessen (siehe 2.4.1) und mit den Kontrollen verglichen. Dabei wurde untersucht, ob der Naturstoff mit L-Cystein reagierte.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolierung und Präparation von Nukleinsäure

2.6.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* wurden die zu untersuchenden Bakterienkulturen in 5 ml Flüssigmedium **M11** für 16 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Für die Selektion der Zellen enthielt das Medium zusätzlich ein entsprechendes Antibiotikum, das vom Resistenzgen des transformierten Plasmids abhängig war (siehe 2.1.7). Anschließend wurde die Plasmid-DNA für analytische Zwecke mit Hilfe der alkalischen Lyse (L1-L3) nach Green und Sambrook (2012) isoliert. Für präparative Zwecke wurde die Isolation der Plasmid-DNA mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Eluiert wurde die Plasmid-DNA jeweils mit 30 µl H₂O_{UF}. Im Anschluss wurde die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA photometrisch durch UV/Vis Spektroskopie bestimmt (siehe 2.6.2). Bis zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

2.6.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus filamentösen Pilzen

Um genomische DNA (gDNA) von filamentösen Pilzen zu erhalten, wurden diese in 500 ml Flüssigmedium **M9** (bei *E. lata* in **M2**) in 1 L Erlenmeyerkolben mit einer Schikane bei RT und 220 rpm submers fermentiert (siehe 2.3.1). Die Dauer der Inkubation war dabei von der Wachstumsgeschwindigkeit des jeweiligen Pilzstamms abhängig. Die Fermentation wurde beendet bevor der Glukosegehalt auf 0 % gesunken war und eine ausreichende Menge an

Biomasse produziert wurde. Darauf folgte die Trennung von Kulturfiltrat und Myzel. Für die weiteren Schritte wurde das Myzel mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Das lyophilisierte Myzel wurde entweder unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert oder mit Hilfe eines Tissue Lyser II (QIAGEN GmbH, Hilden) für 2 min bei einer Frequenz von 30/s in 2 ml Reaktionsgefäßen (Safe-Lock, Eppendorf AG, Hamburg) durch zwei enthaltene Metallkugeln (5 mm) pulverisiert. Dieses puderförmige Myzel wurde als Ausgangsmaterial für die Isolierung der gDNA verwendet, welche mit dem GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Danach wurde die Konzentration der isolierten gDNA bestimmt (siehe 2.6.2). Die langfristige Aufbewahrung der gDNA erfolgte bei 4 °C.

2.6.1.3 Isolierung von RNA aus *Eutypa lata*

Um vergleichende Transkriptomanalysen und Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR durchführen zu können, wurde RNA aus *Eutypa lata* benötigt. Dazu wurden die Stämme kultiviert, wie in Kapitel 2.6.1.2 und 2.3.5 beschrieben. Das Myzel wurde nach der Fermentation vom Kulturfiltrat separiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, lyophilisiert und mit einem Mörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Danach wurde dieses Ausgangsmaterial verwendet, um die Isolation der RNA mit dem RNeasy® Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) laut den Herstellerangaben durchzuführen. Um verbleibende und bei späteren Anwendungen störende gDNA zu entfernen, wurden die Proben zusätzlich mit dem RNase-free DNase Set (QIAGEN GmbH, Hilden) behandelt. Die RNA wurde im Anschluss in 100 µl H₂O_{RF} aufgenommen und auf ihre Qualität und Quantität analysiert (siehe 2.6.2). Zum Schutz vor einer Degradierung wurde die isolierte RNA bei -80 °C gelagert.

2.6.2 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung bzw. die Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde mittels UV/VIS Spektroskopie unter Verwendung eines NanoDrop ND-1000 Systems (NanoDrop Technologies, Rocky River, USA) durchgeführt. Die Qualität konnte dabei über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Ein Quotient von ca. 1,8 wurde bei gDNA als sauber gewertet, während bei isolierter RNA ein optimaler Wert von ca. 2,0 angenommen wurde.

Um die Integrität der isolierten Gesamt-RNA zu untersuchen, wurde die Qualität mit Hilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) bestimmt. Die Messung wurde unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Pico Kits (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als

Qualitätsmerkmal wurde für die isolierte RNA ein RIN-Wert berechnet, der für weitere Anwendungen mindestens einen Wert von 5,0 voraussetzte.

2.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.6.3.1 Amplifikation von genomischer DNA und Plasmid-DNA

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine zentrale Methode der Molekulargenetik, die von Kary B. Mullis 1983 entdeckt und etabliert wurde (Mullis *et al.*, 1986). Die PCR wurde für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus gDNA bzw. Plasmid-DNA verwendet. Dazu wurde je nach Ansatz mit zwei unterschiedlichen DNA-Polymerasen gearbeitet. Um das Amplikon im Anschluss in den Vektor pGEM[®]-T Easy zu ligieren oder die ITS eines Pilzstamms zu sequenzieren (siehe 2.6.6), wurde die DreamTaq DNA Polymerase verwendet. Der Reaktionsansatz und das Reaktionsschema einer Standard-PCR mit der DreamTaq DNA Polymerase ist in Tab. 2.6 dargestellt. Bei einer Assemblierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Gibson Assembly wurden die DNA-Fragmente mit der Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert (Tab. 2.7). Als Thermocycler stand für alle Reaktionen ein GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt) zur Verfügung.

Tab. 2.6: Reaktionsansatz (links) und Reaktionsschema (rechts) einer Standard-PCR mit der DreamTaq DNA Polymerase.

Komponenten	Volumen	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
DreamTaq Puffer (10x)	5 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
dNTP's (10 mM)	1 µl	Denaturierung	95 °C	30 s	
Primer forward (5 µM)	4 µl	Annealing	T _m -5 °C	30 s	35
Primer reverse (5 µM)	4 µl	Elongation	72 °C	1 min/kb	
DreamTaq DNA Polymerase	0,5 µl	Finale Elongation	72 °C	5 min	1
Template DNA (ca. 100 ng)	x µl	Lagerung	4 °C	∞	1
H ₂ O _{UF}	ad 50 µl				

Tab. 2.7: Reaktionsansatz (links) und Reaktionsschema (rechts) einer Standard-PCR mit der Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase.

Komponenten	Volumen	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Phusion [®] HF Puffer (5x)	10 µl	Initiale Denaturierung	98 °C	2 min	1
dNTP's (10 mM)	1 µl	Denaturierung	98 °C	10 s	
Primer forward (5 µM)	4 µl	Annealing	T _m -3 °C	10 s	35
Primer reverse (5 µM)	4 µl	Elongation	72 °C	15 s/kb	
Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl	Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Template DNA (ca. 100 ng)	x µl	Lagerung	4 °C	∞	1
H ₂ O _{UF}	ad 50 µl				

2.6.3.2 Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden

Um eine DNA-Sonde mit Digoxigenin (DIG) zu markieren, wurde eine PCR mit der DreamTaq DNA Polymerase und DIG-markierten dUTP's durchgeführt. Dabei dienten die konstruierten Vektoren als Template-DNA. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 2.8 dargestellt und das Reaktionsschema entspricht der Tab. 2.6. Die DIG-markierte DNA-Sonde wurde für die Hybridisierung mit DNA einer genomischen Region und zur Detektion in einer *Southern Blot* Analyse benötigt (siehe 2.6.12).

Tab. 2.8: PCR-Reaktionsansatz für die Herstellung DIG-markierter DNA Sonden.

Komponenten	Volumen
DreamTaq Puffer (10x)	5 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
DIG-11-dUTP's	1,5 µl
Primer forward (5 µM)	2 µl
Primer reverse (5 µM)	2 µl
DreamTaq DNA Polymerase	0,5 µl
Template DNA (ca. 100 ng)	x µl
H ₂ O _{UF}	ad 50 µl

2.6.3.3 Quantitative „real-time“ Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Um die Daten aus der RNA-Sequenzierung zu validieren und die Genexpression ausgewählter Gene zu untersuchen, wurde eine qRT-PCR mit dem iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template wurde isolierte RNA verwendet, die wie in Kapitel 2.6.1.3 beschrieben, extrahiert wurde. Für die Amplifikation und Detektion wurde der C1000™ Thermal Cycler (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte nach der Livak Methode, die in Anlehnung an die Pfaffl Methode etabliert wurde (Livak und Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Zur Normalisierung der Daten und für die relative Quantifizierung des Zielgens wurde das konstitutiv exprimierte Actin (Protein ID: 6894) von *E. lata* als Referenzgen (*house-keeping gene*) genutzt. Die für die qRT-PCR verwendeten Primer sind im Anhang in Tab. 7.6 aufgelistet.

2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese und Isolation der DNA-Fragmente

Für die Auftrennung, Identifizierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren diente die Agarose-Gelelektrophorese. Diese Methode wurden nach den allgemeinen Vorschriften nach Green und Sambrook (2012) durchgeführt. Zunächst wurden die nukleinsäurehaltigen Proben mit dem Gelladepuffer Orange Loading Dye (6x) versetzt und in die Taschen eines 1 %

Agarosegels pipettiert. Die Agarosegele wurden im Vorfeld mit 1x TAE-Puffer (**P19**) angesetzt, der auch als Laufpuffer diente. Als Referenz und zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden 10 µl des Molekulargewichtsmarkers GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder mit auf das Gel aufgetragen. Die Durchführung der Gelelektrophorese fand in einem horizontalen Elektrophoresesystem (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei einer konstanten Spannung von 90-100 V statt. Im Anschluss wurde das Gel für wenige Sekunden in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) inkubiert und für 20 min in einem Wasserbad entfärbt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des QUANTUM Modell 1100 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei einer UV-Strahlung von 365 nm.

Nach der Gelelektrophorese wurden die benötigten DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die darauffolgende Aufreinigung der DNA wurde mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 30 µl H₂O_{UF}.

2.6.5 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung von PCR-Amplikons und von DNA-Fragmenten in konstruierten Vektoren wurde von der GATC-Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Für die Genomsequenzierung wurden 2 µg gDNA von jedem Stamm in einem 150 bp *paired-end* Lauf mittels Illumina HiSeq vom BGI Beijing Genome Institute (Hongkong) sequenziert. Die Transkriptomsequenzierungen wurden mit 2 µg RNA entweder in einem 100 bp *paired-end* Lauf durch BGI Beijing Genome Institute (Hongkong) oder in einem 2 x 150 bp *paired-end* Lauf durch die GATC-Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Es wurde auch hier die Illumina HiSeq Methode angewendet, nachdem die Proben für die Sequenzierung mit Adaptoren ligiert und durch die Firmen vorbereitet wurden.

2.6.6 Molekularbiologische Identifizierung von Pilzstämmen durch Sequenzierung artspezifischer DNA-Regionen

Zur Identifizierung von Pilzstämmen wurden artspezifische DNA-Regionen amplifiziert und sequenziert. Dazu wurde die genomische DNA der zu untersuchenden Pilzstämmen isoliert (siehe 2.6.1.2). Danach wurden die artspezifischen DNA-Regionen mit der isolierten gDNA als Template und den Primern in Tab. 7.7 amplifiziert (siehe 2.6.3.1). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden im Anschluss sequenziert (siehe 2.6.5) und mit Sequenzen der NCBI Datenbank verglichen. Dabei wurde zuerst die ITS-Region (White *et al.*, 1990) sequenziert. Wenn diese Region nicht eindeutig zuzuordnen war oder keine vergleichbaren DNA-Sequenzen vorhanden waren, wurden zusätzlich die LSU 28s (Vilgalys und Hester, 1990), ein

Teil des Actin-Gens und ein Teil des Elongationsfaktors 1 α (Carbone und Kohn, 1999) analysiert.

2.6.7 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen von Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte) und New England Biolabs Inc. (Ipswich, USA) mit ihren jeweiligen kompatiblen Puffern nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Dabei wurde unter verschiedenen Verwendungszwecken differenziert. Sie unterschieden sich in der eingesetzten DNA-Menge, in der Dauer der Inkubationszeit sowie in der Größe des Volumens. In der nachfolgenden Tab. 2.9 sind die Restriktionsansätze zu Analysezielen, Klonierungszwecken und zur Vorbereitung auf *Southern Blot* Analysen zusammengefasst. In Bezug auf analytische Fragestellungen wurde bei Verwendung von FastDigest™-Restriktionsenzymen die Inkubationsdauer auf 15 min verkürzt.

Um unerwünschte Religationen nach einer Restriktion zu Klonierungszwecken zu verhindern, wurden im Anschluss 3 μ l Fast AP zu dem restringierten Vektor gegeben und für weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. In diesem Schritt dephosphoryliert die thermosensitive alkalische Phosphatase das DNA-Molekül und wurde danach für 15 min bei 65 °C denaturiert und inaktiviert.

Tab. 2.9: Verschiedene Restriktionsansätze nach Verwendungszwecken differenziert.

Restriktionsansatz zu Analysezielen	
DNA (250-500 ng)	x μ l
Enzympuffer (10x)	2 μ l
Restriktionsenzym	1 μ l
H ₂ O _{UF}	ad 20 μ l
Die Inkubationsdauer betrug 1,5 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur	
Restriktionsansatz zu Klonierungszwecken	
DNA (1,0-1,5 μ g)	x μ l
Enzympuffer (10x)	10 μ l
Restriktionsenzym	3 μ l
H ₂ O _{UF}	ad 100 μ l
Die Inkubationsdauer betrug 1,5 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur	
Restriktionsansatz zur Vorbereitung auf <i>Southern Blot</i> Analysen	
DNA (5-10 μ g)	x μ l
Enzympuffer (10x)	20 μ l
Restriktionsenzym	5 μ l
H ₂ O _{UF}	ad 200 μ l
Die Inkubation erfolgte über Nacht bei der für das Enzym optimalen Temperatur	

2.6.8 Ligation

Um PCR-Produkte oder restringierte DNA-Fragmente in ein Plasmid zu ligieren, wurde das Enzym T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) mit einem kompatiblen Puffer verwendet. Bei Ligationen mit den Vektoren pJet1.2/blunt oder pGEM[®]-T Easy wurden nach den Angaben der Hersteller gearbeitet. Bei anderen Anwendungen wurde ein Standard-Ligationsansatz angesetzt (Tab. 2.10), für 60 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Dabei wurde ein molares Verhältnis von 3:1 für das DNA-Insert und den Vektor gewählt. Berechnet wurde die eingesetzte Menge mit folgender Formel (Mülhardt, 2007):

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektormenge [ng]} \times \text{Insertlänge [bp]}}{\text{Vektorlänge [bp]}} \times \text{molares Verhältnis Insert : Vektor}$$

Tab. 2.10: Reaktionsansatz einer Standard-Ligation.

Komponenten	Volumen
Vektor-DNA (50 ng)	x µl
Insert-DNA	y µl
Ligasepuffer (10x)	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
H ₂ O _{UF}	ad 20 µl

2.6.9 Klonierungsmethoden zur Konstruktion von Transformationsvektoren

Für die Konstruktion von Transformationsvektoren dienten zwei unterschiedliche Klonierungsmethoden. Neben der klassischen Klonierung, die eine Reihe von Restriktions- und Ligationsschritten beinhalten konnte, wurde auch die Methode des Gibson Assembly[®] (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) durchgeführt. Diese Technik ermöglicht die Assemblierung von mehreren DNA-Fragmenten innerhalb einer Reaktion, was direkt zum gewünschten Konstrukt führt. Dabei wurde in Anlehnung an Gibson *et al.*, (2009) nach den Angaben der Hersteller gearbeitet.

2.6.10 Klonierungsstrategien

Das Ziel der Klonierungsarbeiten war die Generierung von Geninaktivierungsvektoren bzw. von Konstrukten, die eine erfolgreiche Transformation von *Eutypa lata* ermöglichen. Dazu wurde die Hygromycinresistenz verleihende *HPT*-Kassette zwischen die flankierenden Sequenzen eines Zielgens (5' *upstream* bzw. 3' *downstream*) in einen pCAMBIA0380 Vektor ligiert. Die Klonierungsschritte dieser Konstrukte sind in 2.6.10.1-3 beschrieben. Die dazugehörigen Vektorkarten befinden sich im Anhang unter Kapitel 7.4.

Da das Hygromycin B Phosphotransferase Gen *hpt* in der *HPT-Kassette* unter der Kontrolle des starken konstitutiven Promotor *trpC* von *Aspergillus nidulans* steht und bei *E. lata* nicht bekannt war, ob dieser Promotor eine erfolgreiche Expression von *hpt* in *E. lata* garantiert, wurden Konstrukte mit organismusspezifischen Promotoren generiert. Es wurde eine Sequenz (ca. 1500 bp) von einer vermuteten Promotorregion der zwei konstitutiv exprimierten Gene Elongationsfaktor 1 α (Protein ID: 6820) und GAPDH (Protein ID: 1330) aus *E. lata* zusammen mit dem *hpt*-Gen und dem Vektor pCAMB0380 assembliert. Für beide Promotoren wurde je ein Vektor generiert, die in Kapitel 2.6.10.4 und 2.6.10.5 beschrieben sind. Die Vektorkarten befinden sich im Anhang unter Kapitel 7.4.

2.6.10.1 pCAMB-HPT-5610-KO

Zur Konstruktion des Geninaktivierungsvektors pCAMB-HPT-5610-KO wurden mittels PCR die flankierenden Regionen (5': 506 bp und 3': 501 bp) neben dem Gen mit der Protein ID 5610 amplifiziert und jeweils in den pJet1.2/blunt ligiert. Dazu wurde die aus *E. lata* extrahierte gDNA als Template-DNA sowie die Primer **P1** und **P2** für die 5'-*upstream* Region und die Primer **P3** und **P4** für die 3'-*downstream* Region verwendet (siehe Tab. 7.4). Anschließend wurde die Sequenz 5610_5' unter Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* und T4-DNA-Ligase in den pCAMB-HPT(*HindIII*) Vektor kloniert, was in dem Vektor pCAMB-HPT-5610_5' resultierte. Danach wurde die Sequenz 5610_3' mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *PmlI* aus dem pJet1.2-5610_3' Vektor herausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor pCAMB-HPT-5610 5' ligiert. Dieser Endvektor wurde als pCAMB-HPT-5610-KO bezeichnet.

2.6.10.2 pCAMB-HPT-10483-KO

Zur Konstruktion des Geninaktivierungsvektors pCAMB-HPT-10483-KO wurden mittels PCR die flankierenden Regionen (5': 500 bp und 3': 500 bp) des Gens mit der Protein ID 10483 amplifiziert und jeweils in den pJet1.2/blunt ligiert. Dazu wurde die aus *E. lata* extrahierte gDNA als Template-DNA sowie die Primer **P5** und **P6** für die 5'-*upstream* Region und die Primer **P7** und **P8** für die 3'-*downstream* Region verwendet (siehe Tab. 7.4). Anschließend wurde die Sequenz 10483_5' unter Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* und T4-DNA-Ligase in den pCAMB-HPT(*HindIII*) Vektor kloniert, was in dem Vektor pCAMB-HPT-10483_5' resultierte. Danach wurde die Sequenz 10483_3' mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *PmlI* aus dem pJet1.2-10483_3' Vektor herausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor pCAMB-HPT-10483_5' ligiert. Dieser Endvektor wurde als pCAMB-HPT-10483-KO bezeichnet.

2.6.10.3 pCAMB-HPT-10881-KO

Zur Konstruktion des Geninaktivierungsvektors pCAMB-HPT-10881-KO wurden mittels PCR die flankierenden Regionen (5': 500 bp und 3': 524 bp) des Gens mit der Protein ID 10881 amplifiziert und jeweils in den pJet1.2/blunt ligiert. Dazu wurde die aus *E. lata* extrahierte gDNA als Template-DNA sowie die Primer **P9** und **P10** für die 5'-*upstream* Region und die Primer **P11** und **P12** für die 3'-*downstream* Region verwendet (siehe Tab. 7.4). Anschließend wurde die Sequenz 10881_5' unter Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* und T4-DNA-Ligase in den pCAMB-HPT(*HindIII*) Vektor kloniert, was in dem Vektor pCAMB-HPT-10881_5' resultierte. Danach wurde die Sequenz 10881_3' mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *PmlI* aus dem pJet1.2-10881_3' Vektor herausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor pCAMB-HPT-10881_5' ligiert. Dieser Endvektor wurde als pCAMB-HPT-10881-KO bezeichnet.

2.6.10.4 pFS-EI_EF1a-HPT

Die Konstruktion des Transformationsvektors pFS-EI_EF1a-HPT wurde mit Hilfe des Gibson Assembly® generiert. Als EI_EF1a wurde dabei die Promotorregion des Elongationsfaktors 1 α (Protein ID: 6820) aus *E. lata* bezeichnet. Zu Beginn wurden mittels PCR die DNA-Fragmente EI_EF1a (1482 bp, mit **P17** und **P18**) und HPT (1026 bp, mit **P19** und **P20**) amplifiziert (siehe Tab. 7.4). Als Template diente dabei gDNA aus *E. lata* bzw. der Vektor pCB1636. Der Vektor pSJ-basic wurde als Grundgerüst verwendet, der mit *BglII* und *PstI* restringiert wurde. Anschließend wurden die drei DNA-Fragmente mit der Gibson Assembly® Methode zu dem Vektor pFS-EI_EF1a -HPT assembliert.

2.6.10.5 pFS-EI_GAPDH-HPT

Die Konstruktion des Transformationsvektors pFS-EI_GAPDH-HPT wurde mit Hilfe des Gibson Assembly® generiert. Als EI_GAPDH wurde dabei die Promotorregion der Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase (Protein ID: 1330) aus *E. lata* bezeichnet. Zu Beginn wurden mittels PCR die DNA-Fragmente EI_GAPDH (1477 bp, mit **P21** und **P22**) und HPT (1026 bp, mit **P23** und **P24**) amplifiziert (siehe Tab. 7.4). Als Template diente dabei gDNA aus *E. lata* bzw. der Vektor pCB1636. Der Vektor pSJ-basic wurde als Grundgerüst verwendet, der mit *BglII* und *PstI* restringiert wurde. Anschließend wurden die drei DNA-Fragmente mit der Gibson Assembly® Methode zu dem Vektor pFS-EI_GAPDH-HPT assembliert.

2.6.11 Transformationsmethoden

2.6.11.1 Elektroporation von *Escherichia coli*-Zellen

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Um elektrokompetente *E. coli*-Zellen herzustellen, wurde der Stamm XL1-Blue aus einem Glyzerinstock entnommen, auf dem Selektionsmedium **M17** ausgestrichen und für 16 h bei 37 °C kultiviert. Danach wurden einzelne Kolonien in 14 ml Röhrchen (Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg) mit 5 ml Flüssigmedium **M17** überführt und für 16 h bei 37 °C und 220 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 4 ml dieser Vorkulturen verwendet, um einen 1 L Erlenmeyerkolben (vier Schikanen) mit 400 ml LB-Medium (**M11**) und zusätzlichen 20 mM Glukose zu inokulieren. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 37 °C auf einem Schüttler bei 220 rpm, bis eine OD₆₀₀ der Kultur von 0,6-0,8 gemessen wurde. Im Anschluss wurde die Kultur für 10 min auf Eis abgekühlt und für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Jouan GR 422, Jouan SA). Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen wurden zweimal mit 150 ml H₂O_{UF} durch Resuspension und Zentrifugation gewaschen. Danach wurde das Zellpellet mit 50 ml eiskalter Glycerinlösung (10 %) gewaschen und mit 2 ml der Glycerinlösung (10 %) resuspendiert. Schließlich wurden jeweils 80 µl der Zellsuspension in sterile, eisgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der elektrokompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte bei -80 °C. Während dem gesamten Prozess wurden die Zellen zwischen den einzelnen Waschschritten auf Eis gelagert.

Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden nach der Elektroporationsmethode von Fiedler und Wirth (1988) transformiert. Zuerst wurden die aliquotierten *E. coli*-Zellen (80 µl) schonend auf Eis aufgetaut. Dann wurden 2 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben und der gesamte Transformationsansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm, Peqlab, Erlangen) überführt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei einer Kapazität von 25 µF, 1,3 kV und 200 Ω elektroporiert. Nach dem elektrischen Impuls wurden die Zellen zur Regeneration in 300 µl vorgewärmten SOC-Medium (**M27**) aufgenommen, in ein 14 ml Röhrchen (Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg) überführt und für eine Stunde bei 37 °C und 220 rpm auf dem Rundschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Kultur auf einem geeigneten Selektionsmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen.

Identifizierung von Transformanten

Die resultierenden Einzelkolonien wurden in 5 ml LB-Medium (**M11**) mit entsprechendem Antibiotikum in einem 14 ml Röhrchen (Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg) über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Von diesen Transformanten wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.6.1.1) und mit Hilfe von Restriktionsanalysen überprüft (siehe 2.6.7).

2.6.11.2 Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Vektoren, die mit Hilfe der Gibson Assembly[®] Methode konstruiert wurden, wurden in chemisch-kompetente *E. coli* NEB 5 alpha Zellen transformiert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Die Identifizierung der Transformanten wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.6.11.1 beschrieben.

2.6.11.3 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Eutypa lata*

Die Transformation von *Eutypa lata* wurde mit Hilfe der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation in Anlehnung an de Groot *et al.*, (1998) und Figueiredo *et al.*, (2010) durchgeführt.

Herstellung chemisch-kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Für die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation wurde der Stamm *A. tumefaciens* AGL1 verwendet. Die Zellen wurden für die Herstellung von einer Glyzerinkultur entnommen, auf dem Festmedium **M15** ausgestrichen und für 3 Tage bei 28 °C in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden mehrere Kolonien in ein 14 ml Röhrchen (Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg) mit 5 ml flüssigem **M15** überführt und über Nacht bei 28 °C und 220 rpm kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 400 ml LB-Medium (**M11**) in einem 1 L Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen inokuliert und bei 28 °C und 220 rpm auf einem Rundschtüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,8 erreicht wurde. Nach dem die Kultur danach für 10 min auf Eis abkühlte, wurde sie für 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Jouan GR 422, Jouan SA). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 100 ml 20 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die *A. tumefaciens*-Zellen in 4 ml eisgekühlter 20 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Anschließend wurden je 100 µl der Zellsuspension in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation chemisch-kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen durch Hitzeschock

Die *A. tumefaciens* AGL1-Zellen wurden schonend auf Eis aufgetaut und mit 6 µl des zu transformierenden pCAMBIA-Vektors versetzt. Es folgte ein Hitzeschock für 5 min in einem Wasserbad bei 37 °C. Zur Regeneration wurden die Zellen mit 300 µl LB-Medium (**M11**) aufgenommen und für 4 h bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. Danach wurden 150 µl des Transformationsansatzes zur Selektion auf eine vorgewärmte LB-Rif+Kana-Platte (**M16**) ausplattiert und für 3 Tage bei 28 °C in Dunkelheit kultiviert.

Transformation von *E. lata* mit Hilfe von *A. tumefaciens*

Von den transformierten *A. tumefaciens*-Zellen wurden mehrere Kolonien als Inokulum für 5 ml Flüssigmedium (**M16**) verwendet. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 28 °C und 220 rpm in Dunkelheit. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml dieser Kultur für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg) und der Überstand wurde verworfen. Die pelletierten Zellen wurden mit 750 µl AIM-Medium (**M1**) resuspendiert und zu weiteren 4 ml **M1** in ein 14 ml Röhrchen (Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg) gegeben. Dieser Ansatz wurde für 6 h bei 28 °C und 220 rpm inkubiert.

Da *E. lata* auf artifiziellem Medium unter Laborbedingungen keine Ascosporen produziert und die Konidiosporen schlecht auskeimen (Živković *et al.*, 2012), wurde Myzel einer jungen Kultur für die Transformation verwendet. Dazu wurden die *E. lata*-Stämme für 5 Tage auf einem Rundschtütler bei RT und 120 rpm in 50 ml **M2** in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane inkubiert. Für den Transformationsansatz wurde die Myzelsuspension von *E. lata* im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension der transformierten *A. tumefaciens* AGL1-Zellen vermischt. Danach wurden 400 µl des Transformationsansatzes auf den Rand eines Nitrocellulosefilters (0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) pipettiert, der mittig auf einer AIM-Agarplatte (**M1**) platziert wurde. Nach dem Trocknen der Lösung wurden die AIM-Platten für 48 h bei 28 °C in Dunkelheit kultiviert. Zur Selektion der Transformanten wurde der Nitrocellulosefilter auf Selektionsplatten transferiert. In diesem Fall handelte es sich dabei entweder um **M20**- oder **M23**-Platten. Anschließend wurden die Selektionsplatten für 2-3 Wochen bei RT inkubiert. Nachdem die ersten Kolonien von dem Nitrocellulosefilter in das Medium gewachsen waren, wurden sie erneut auf Selektionsmedium vereinzelt.

Um die Transformanten zu analysieren und um eine ausreichende Myzelmenge für eine DNA-Präparation zu erhalten, wurden die Kolonien für 8 Tage in 50 ml **M2** bei RT und 120 rpm in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane kultiviert. Zur Reinkultur und Vorbeugung vor Kontaminationen mit anderen Mikroorganismen wurden für die Transformanten Schrägröhrchen angefertigt (siehe 2.2.3).

2.6.11.4 Protoplastentransformation von *Eutypa lata* nach Fischer (2014)

Für die Protoplastentransformation von *E. lata* wurden zwei verschiedene Methoden durchgeführt. Die erste Methode ist an die Dissertation von Herr Dr. Fischer (2014) angelehnt.

Gewinnung von Protoplasten

Die Transformationen wurden mit Myzel und Sporen von *E. lata* angesetzt. Dabei wurden unterschiedliche Ausgangskulturen verwendet. Zum einen wurde das Pilzmaterial von drei Wochen alten BAF-Platten (**M2**) mit sterilem H₂O_{deion} abgeschwemmt und in 50 ml **M2** über Nacht bei RT und 120 rpm auf einem Rundschüttler kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur für 10 min bei RT und 4000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Jouan GR 422, Jouan SA) und das pelletierte Myzel stand für die Protoplastierung bereit. In einem anderen Ansatz wurden 50 ml **M2** in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane mit fünf ausgeschnittenen Myzelstücken inokuliert und für 5 Tage bei RT und 120 rpm auf einem Rundschüttler inkubiert. Diese Kultur wurde ebenfalls für 10 min bei RT und 4000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Jouan GR 422, Jouan SA). Nach dem Verwerfen des Überstands konnte das sedimentierte Myzel protoplastiert werden. Diese beiden Ansätze unterschieden sich vor allem in der Zellzahl und Dichte des Myzels.

Das Myzelpellet wurde anschließend in einer Protoplastierungslösung (**L11**) resuspendiert und in eine Petrischale überführt. Es folgte eine Inkubation für 3-5 h auf dem Wippschüttler (ST5, CAT Scientific Inc., CA, USA) bei RT oder 37 °C. Der Grad der Protoplastierung wurde nach jeder Stunde mikroskopisch überprüft. Nach der Protoplastierung des Myzels wurden die Protoplasten für 10 min bei 4 °C und 2000 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge Jouan GR 422, Jouan SA) und anschließend als weiß erscheinende Schicht entnommen. Zu den Protoplasten wurden 20 ml STC-Puffer (**P17**) gegeben, womit sie gewaschen wurden und nach erneuter Zentrifugation mit 1 ml **P17** aufgenommen wurden.

Transformation der Protoplasten

Es wurden jeweils 100 µl der Protoplastenlösung in 15 ml Falconröhrchen überführt und mit je 1,5 µg linearisierter Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde 1 ml PEG-Lösung (**L9**) zu den Protoplasten gegeben. Dieser Ansatz wurde dann für 20 min bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Zu jeder Suspension wurden 5 ml flüssiges, 55 °C warmes Regenerationsmedium (**M28**) gegeben. Danach wurden Selektionsplatten (**M20**) mit dem Regenerationsmedium überschichtet und bei RT inkubiert.

2.6.11.5 Protoplastentransformation von *Eutypa lata* nach Bradshaw *et al.* (2005)

Die zweite Methode für die Protoplastentransformation von *Eutypa lata* wurde in Anlehnung an Bradshaw *et al.* (2005) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden Myzel und Sporen von *E. lata* verwendet, wie in Kapitel 2.6.11.4 beschrieben.

Gewinnung von Protoplasten

Das sedimentierte Myzelpellet wurde in 20 ml OM-Puffer (**P4**) resuspendiert, in eine Petrischale überführt und für 3-5 h bei RT oder 37 °C und 80 rpm auf einem Rundschüttler inkubiert. Der Protoplastierungsgrad der Zellen wurde jede Stunde mikroskopisch kontrolliert, bis eine hohe Anzahl an Protoplasten sichtbar wurde. Danach wurde die Protoplastensuspension über Miracloth filtriert. Anschließend wurden 5 ml davon in jeweils ein 14 ml Röhrchen (Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg) überführt und mit 2 ml ST-Puffer (**P15**) überschichtet. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm (Zentrifuge Jouan GR 422, Jouan SA). Die Protoplasten wurden aus einer weiß-milchigen Interphase entnommen und zweimal mit 5 ml STC-Puffer (**P16**) gewaschen. Danach wurden die Protoplasten in 1 ml **P16** aufgenommen und auf eine Zellsuspension mit $1,2\text{-}3\cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

Transformation der Protoplasten

Zu je 150 µl der Protoplastensuspension wurden 5 µg linearisierte Vektor-DNA gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde sukzessive PEG-Lösung (**L10**) in den Schritten 250 µl, 250 µl und 850 µl hinzugeführt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Ansätze invertiert und gut gemischt. Es erfolgte erneut eine Inkubation für 20 min bei RT, bevor 5 ml **P16** zu den Protoplasten überführt wurden. Die Protoplastensuspensionen wurden für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Jouan GR 422, Jouan SA) und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Protoplasten in 500 µl **P16** aufgenommen. Schließlich wurden jeweils 100 µl der Protoplastensuspension auf Regenerationsmedium 1 (**M29**) ausplattiert und getrocknet. Nach einer Inkubation von 24 h bei RT wurden die Platten mit 5 ml Regenerationsmedium 2 (**M30**) überschichtet. Darauf folgte eine Inkubation der Platten bei RT, bis fungizid-resistente Kolonien gewachsen waren.

2.6.12 Southern Blot Analyse

Die *Southern Blot* Analyse wurde in Anlehnung an die allgemeinen Vorschriften nach Green und Sambrook (2012) durchgeführt. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transformation von *Eutypa lata* wurde die gDNA der Transformanten isoliert (siehe 2.6.1.2) und für die DNA-Hybridisierung mit einer DIG-markierten DNA-Sonde verwendet.

DNA-Restriktion, Präzipitation und gelelektrophoretische Auftrennung

In einem ersten Schritt wurde die gDNA der Transformanten über Nacht restringiert, wie in Kapitel 2.6.7 beschrieben. Am nächsten Tag wurde die restringierte DNA präzipitiert, indem die Ansätze mit 150 µl Isopropanol versetzt, invertiert und für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurden (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde entnommen und das gefällte DNA-Pellet wurde im Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg) getrocknet. Aufgenommen wurde die DNA in einem Mix aus 5 µl Orange Loading Dye (6x) und 20 µl H₂O_{UF}. Anschließend wurden die Ansätze zum Lösen der DNA für 20 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 V über einen Zeitraum von 4 h (siehe 2.6.4). Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden 10 µl der DIG-markierten DNA Molecular Weight Marker III und VII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit auf das Gel aufgetragen.

Transfer der DNA auf eine Trägermembran

Um den DNA-Transfer auf eine Trägermembran vorzubereiten, wurde das Agarosegel zur Depurinierung der DNA für 15 min in **P7** auf einem Wipptisch inkubiert. Zur Denaturierung und Trennung der DNA-Doppelstränge wurde das Gel anschließend zweimal für 15 min in **P6** geschwenkt und mit der zweimaligen Inkubation von 15 min in **P10** neutralisiert. Zwischen jedem Pufferwechsel wurde das Agarosegel kurz mit H₂O_{UF} gewaschen.

Im Anschluss wurde die einzelsträngige DNA mit Hilfe eines Kapillarblots auf eine Nylonmembran (Roti[®]-Nylon Plus, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) übertragen. Dabei wurde nach der Vorschrift von Darling und Brickell (1994) vorgegangen. Zur Fixierung der DNA auf der Nylonmembran wurde der Blot mit Hilfe eines UV-Crosslinker (FLX-20M, Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich) für 40 s mit UV-Licht bei einem kontinuierlichen Energiedichtegradienten von 0,120 J/cm² gegen 0 J/cm² bestrahlt.

Hybridisierung mit der DNA-Sonde

Nach Transfer und Fixierung der DNA wurde die Nylonmembran in 20 ml Hybridisierungspuffer (**P9**) mit 40 µl enthaltener denaturierter Lachssperma-DNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für 90 min bei 65 °C unter Rotation in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Mit diesem Schritt wurden freie Bindungsstellen auf der Membran abgedeckt, um unspezifische Bindungen der DNA-Sonde zu reduzieren. Dazu wurde die Lachssperma-DNA direkt vor der Zugabe für 5 min bei 95 °C erhitzt und danach wieder für 5 min auf Eis gekühlt. Danach erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C in 20 ml Hybridisierungspuffer (**P9**) mit 20-30 ng/ml DIG-markierter DNA-Sonde. Mit Hilfe der PCR wurde die DNA-Sonde hergestellt (siehe 2.6.3.2), die vor der Zugabe ebenfalls denaturiert wurde. Am nächsten Tag wurde der

Hybridisierungspuffer mit der DNA-Sonde abgeschüttet und zur Entfernung von ungebundenen DNA-Molekülen wurde die Nylonmembran bei 65 °C jeweils zweimal mit 25 ml **P13** und anschließend zweimal mit 25 ml **P14** gewaschen.

Detektion der DNA-Sonde

Um die hybridisierte und DIG-markierte DNA-Sonde zu detektieren, wurden polyklonale Antikörper (Anti-11-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Dazu folgten weitere Wasch- und Detektionsschritte, die alle bei RT durchgeführt wurden. Zu Beginn wurde die Nylonmembran mit 50 ml Waschpuffer (**P11**) gewaschen. Um freie unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, die an den Antikörper binden könnten, wurde die Nylonmembran für 30 min in 100 ml Blockingpuffer (**P5**) inkubiert. Danach wurde der Blockingpuffer mit 20 ml Antikörperlösung (**L5**) ausgetauscht und ebenfalls für 30 min in der Hybridisierungsröhre inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte in 50 ml Waschpuffer (**P11**) für jeweils 15 min und eine Inkubation der Nylonmembran für 3 min in 20 ml Detektionspuffer (**P8**). Anschließend wurde die Nylonmembran mit 1,5 ml CDP-Star (*ready-to-use*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) vollständig bedeckt, eingeschweißt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit des Substrats (CDP-Star) wurde anschließend entnommen und die Folie wurde erneut verschlossen. Nach dem die Nylonmembran auf einer Glasplatte fixiert wurde, erfolgte schließlich die Detektion der DNA-Sonde durch die Lichtemission eines Chemilumineszenz-Signals, die mit Hilfe des ChemiDoc™ XRS+ Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) dokumentiert wurde.

2.6.13 Vergleichende Transkriptomanalysen durch RNA-Sequenzierung

Um Gene zu identifizieren, die an der Biosynthese von acetylierten Phenolen beteiligt sind, wurden Transkriptomanalysen mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurden dazu die beiden *E. lata*-Stämme IBWF E16012 und IBWF E16121 miteinander verglichen. In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von 500 µM Zimtaldehyd auf die Produktion der Naturstoffe von IBWF E16012 im Vergleich zur Negativkontrolle untersucht. Nach der Fermentation wurde die RNA von *E. lata* aus dem Myzel isoliert, wie in Kapitel 2.6.1.3 beschrieben. Anschließend wurde die Qualität und Integrität der RNA mit Hilfe eines Bioanalyzers (Agilent 2100, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) bestimmt (siehe 2.6.2). Die Sequenzierung der RNA-Proben wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.6.5 beschrieben.

2.7 Bioinformatische Methoden

Die Verarbeitung der sequenzierten gDNA- und RNA-Proben sowie die bioinformatische Auswertung der Daten wurden freundlicherweise von [REDACTED] und [REDACTED] durchgeführt.

2.7.1 Verarbeitung der gDNA-Sequenzierungsdaten und Genomassemblierung

Nach der Sequenzierung der gDNA (siehe 2.6.5) erfolgte mit Hilfe der Software SPAdes (version 3.9.1) eine *de novo* Genomassemblierung. Anschließend wurde mit der Software AUGUSTUS (version 3.2.3) eine Genvorhersage (*ORF calling*) durchgeführt.

2.7.2 Verarbeitung der RNA-Sequenzierungsdaten

Für die Auswertung der Transkriptomuntersuchungen und die Analyse von differentiell exprimierten Genen wurden die RNA-Sequenzierungsdaten verarbeitet. Dazu wurde eine Pipeline mit dem Programm R verwendet. Zu Beginn wurde die Qualität der rohen *paired-end* RNA-Seq *reads* mit dem Programm FastQC überprüft. Danach wurden die *reads* mit dem Alignmentprogramm HISAT (version 2.0.5) auf das assemblierte *E. lata* Genom vom Stamm IBWF E16121 referenziert. Mit SAMtools (version 1.3.1) wurden anschließend die *Alignments* umformatiert und mit Cufflinks (version 2.2.1) wurde das Expressionslevel der Transkripte quantifiziert. Schließlich wurde das differentielle Expressionsmuster mit CummeRBund (version 2.14.0) visualisiert.

2.7.3 Gene Ontology und Gene Enrichment Analyse

Die *Gene Ontology* (GO) und *Gene Enrichment* Analyse von differentiell exprimierten (DE) Genen wurde nach der gleichen Vorgehensweise durchgeführt, wie in der Dissertation von Yemelin (2017) beschrieben. Die Beurteilung der Genexpression basierte auf der Quantifizierung der „gemappten reads“ mittels des CuffDiff Programms. Dabei wurden jedem Gen ein FPKM-Wert (Fragmente pro Kilobase Transkript pro Million abgebildeter Fragmente) zugewiesen. Nur diejenigen Gene, die im betrachteten Vergleich einen FC-Wert von mindestens fünf, unter allen untersuchten Bedingungen einen FPKM-Wert von mindestens zehn hatten und durch einen p-Wert von 0,05 gekennzeichnet sind, wurden als signifikant differentiell exprimiert betrachtet und für die weitere Analyse herangezogen. Eine BLASTp-Suche wurde gegen die nicht redundante Datenbank des NCBI durchgeführt, um funktionelle

Orthologe in anderen Pilzorganismen unter Verwendung des Taxonomiefilters Pilze (Taxa 4751, Fungi) und einer E-Wert-Schwelle von $1,0E-3$ zu identifizieren.

Zusätzlich wurde eine Genontologie und funktionelle Annotation der abgeleiteten Proteinsequenzen unter Verwendung von Blast2GO 4.0.2 über die Suche nach den besten Treffern mit den folgenden Grenzwerten angewendet: E-Wert $1,0E-6$ und interner Annotationsgrenzwert von 55, um Gene (bzw. kodierte Proteine) hinsichtlich molekularen Funktionen, biologischen Prozessen und zellulären Komponenten als GO-Terme zu klassifizieren. Die Ergebnisse der BLASTp-Analyse, Funktionsdomänenanalyse mittels InterProScan (beschränkt auf BlastProDom, HMMPfam und TMHMM), sowie die Vorhersage von Signalpeptiden mittels SignalP 4.1-Software; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) wurden verwendet, um endgültige Zuweisungen zu GO-Funktionskategorien für jedes Gen vorzunehmen, die in der abschließenden Tabelle als "benutzerdefinierte Kategorie" angegeben sind. Schließlich wurde die GO-Anreicherung (unter ausschließlicher Berücksichtigung des biologischen Prozesses) von DE-Genen mithilfe des in Bioconductor 3.3 implementierten TopGO-Programms (Release-Version 2.26.0) berechnet, wobei der exakte Fisher-Test für die statistische Signifikanz verwendet wurde. Die angereicherten DE Gene mit einem p-value-cutoff von ≤ 0.05 wurden beibehalten und anschließend wurde eine GO-Reduktion mittels REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) durch Entfernen redundanter GO-Terme durchgeführt. TreeMaps wurden erstellt, um angereicherte und nicht redundante GO-Kategorien zu visualisieren.

Dazu wurden die Softwareprogramme Blast2GO Pro, TopGO und REVIGO verwendet (Conesa und Götz 2008; Alexa und Rahnenfuehrer 2016; Supek *et al.*, 2011). Mit dem Blast2GO Pro Analysetool wurde eine funktionale Annotation durchgeführt, indem die Beschreibungen der Genfunktionen abgerufen und zugeordnet wurden. Danach wurden die Ergebnisse mit der GO Annotation vom JGI verglichen und angepasst. Die resultierenden GO Bezeichnungen wurden in einer TopGO Analyse mit dem Fisher-Yates-Test weiter prozessiert, um eine Liste mit signifikant angereicherten GO Clustern zu erhalten. Dazu wurde ein korrigierter P-Wert von 0,05 angenommen. In der nachfolgenden REVIGO Onlineanalyse wurden überrepräsentierte GO Kategorien der differentiell exprimierten Gene ($p < 0,05$) ermittelt und eine globale Beschreibung von biologischen Prozessen generiert.

2.7.4 Identifizierung von Gencluster durch antiSMASH-Analyse

Um Gencluster zu identifizieren, die für die Biosynthese von acetylierten Phenolen verantwortlich sind bzw. daran beteiligt sind, wurde mit den assemblierten *E. lata* Genomen eine antiSMASH-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die fungiSMASH version 4.0.0rc1 verwendet (Blin *et al.*, 2019).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Aufklärung der Biosynthese von acetylierten Phenolen

Um den Stoffwechsel und damit auch die Produktion von Sekundärmetaboliten in *Eutypa lata* zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Diese werden nachfolgend zuerst kurz erläutert, bevor sie in den Unterkapiteln genauer beschrieben werden.

Naturstoffanalysen von verschiedenen *Eutypa lata*-Stämmen

Eutypa lata ist ein Produzent von vielen Naturstoffen, die zu verschiedenen Klassen zusammengefasst werden können (siehe Kapitel 1.2). In Bezug auf die Ausprägung der Krankheitssymptome von *Eutypa dieback* scheinen besonders die acetylierten Phenole eine hohe Relevanz für den Pilz zu haben. Die wichtigsten Vertreter, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden, sind die Sekundärmetabolite Eutypin (**1**), Eutypinol (**2**), Siccayne (**9**) und Eulatinol (**10**) (siehe Abb. 3.1).

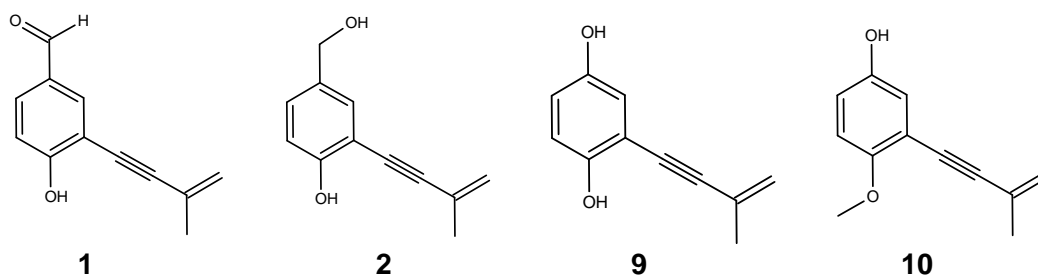


Abb. 3.1: Strukturformeln der acetylierten Phenole Eutypin (**1**), Eutypinol (**2**), Siccayne (**9**) und Eulatinol (**10**).

Um die Biosynthese dieser acetylierten Phenole aufzuklären, wurden zu Beginn dieser Arbeit Naturstoffanalysen mit unterschiedlichen *E. lata*-Stämmen durchgeführt. Dazu wurden in einem ersten Schritt die verschiedenen *E. lata*-Stämme IBWF E16012, IBWF E16012HT, IBWF E16121, IBWF E16122 und IBWF E16123 in axenischen Kulturen submers fermentiert. Nach Beendigung der jeweiligen Fermentation erfolgte eine Extraktion von Kulturfiltrat und Myzel. Im Anschluss wurden die produzierten Naturstoffe mittels HPLC/MS analysiert. Die einzelnen Fermentationen der *E. lata*-Stämme sowie die Isolation der produzierten Sekundärmetabolite werden im Kapitel 3.1.1 beschrieben.

Da *E. lata* in der Lage ist eine Reihe von unterschiedlichen Naturstoffe zu produzieren, wurden die einzelnen Stämme zusätzlich auf Unterschiede in ihrem biochemischen Potential untersucht (siehe 3.1.2). Dabei wurde einerseits die Qualität der Naturstoffe überprüft und andererseits auch die Quantität der Produktion untersucht. Denn aus mehreren Publikationen

ist bereits bekannt, dass die Zusammensetzung von produzierten Naturstoffen stark variieren kann und abhängig vom jeweiligen *E. lata*-Stamm ist (Mahoney *et al.*, 2003; Molyneux *et al.*, 2002).

Um die Phytotoxizität und weitere bioaktive Eigenschaften der isolierten Verbindungen zu überprüfen, wurde im Anschluss eine biologische Charakterisierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.3 zusammengefasst.

Supplementationsversuche

Die Untersuchung eines Biosynthesewegs kann auf verschiedene Arten erfolgen. Bei der Analyse ist deshalb besonders entscheidend, welche Zwischenschritte bzw. Zwischenprodukte gebildet und verwertet werden. Aus diesem Grund wurden Supplementationsversuche mit putativen chemischen Vorstufen durchgeführt, um die Verwertung der potentiellen Edukte und deren Einfluss auf die Biosynthese von acetylierten Phenole zu untersuchen. Des Weiteren wurde analysiert, ob eine Produktionssteigerung dieser Naturstoffe durch die hinzugefügten Chemikalien induziert wurde. Dadurch konnten weitere Hinweise zum Biosyntheseweg und beteiligten Zwischenprodukten gewonnen werden. Die Ergebnisse zu diesen Versuchen sind unter Kapitel 3.1.4 zusammengefasst.

Genom- und Transkriptomanalyse von verschiedenen *E. lata*-Stämmen

Nachdem Unterschiede im biochemischen Potential von zwei *E. lata*-Stämmen sowie bei den Supplementationsversuchen nachgewiesen wurden, waren die Voraussetzungen für vergleichende Genom- und Transkriptomanalysen erfüllt. Als nächsten Schritt wurden die Genome der *E. lata*-Stämme IBWF E16012 und IBWF E16121 sequenziert und assembliert. Danach wurden die Genome mittels antiSMASH-Analyse auf Biosynthesecluster für Sekundärmetabolite untersucht. Um die an der Biosynthese beteiligten Gene zu identifizieren, wurden anschließend vergleichende Transkriptomanalysen durchgeführt. Dabei wurde die Genregulation von einer produzierenden und einer nicht produzierenden Bedingung analysiert, wodurch potentielle Kandidatengene identifiziert wurden. Die ausgewählten Kandidatengene wurden schließlich in einer Genexpressionsanalyse untersucht. Die Vorgehensweise, Auswertung und die Verifizierung der Daten sind in Kapitel 3.1.5 dargestellt.

3.1.1 Fermentation von verschiedenen *Eutypa lata*-Stämmen

3.1.1.1 Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16012

Eutypa lata IBWF E16012 wurde in **M2** bei 22 °C im 20 l-Maßstab fermentiert. Um die Ausbeute von Rohextrakt und den darin enthaltenen Naturstoffen zu erhöhen wurde dieser Ansatz dreimal durchgeführt. Die Abb. 3.2 zeigt einen typischen Fermentationsverlauf. Das Wachstum des Pilzes stagnierte nach etwa 9-10 Tagen und das Myzelrockengewicht erreichte bis zum Ende der Fermentation einen Wert von 6,5 g/l. Zu Beginn wurde ein pH-Wert von etwa fünf gemessen, welcher im Verlauf der Fermentation zwischen Tag sieben und Tag 14 auf einen Wert von vier sank. Die ersten acetylierten Phenole waren schon nach drei bis vier Tagen erstmals nachweisbar. Die höchsten Naturstoffkonzentrationen konnten jedoch erst nach dem vollständigen Verbrauch der freien Glukose im Kulturfiltrat detektiert werden. Die Konzentrationen von Eutypinol (**2**) und Siccayne (**9**) stiegen bis zum Ende der Fermentation auf etwa 7 mg/l, der Gehalt an Eutypin (**1**) erreichte an Tag 13 ein Maximum mit ca. 3,5 mg/l und fiel dann am nächsten Tag auf etwa 2,4 mg/l ab. Die Konzentration von Eulatinol (**10**) erreichte bis zum Ende der Fermentation einen Wert von 3,5 mg/l.

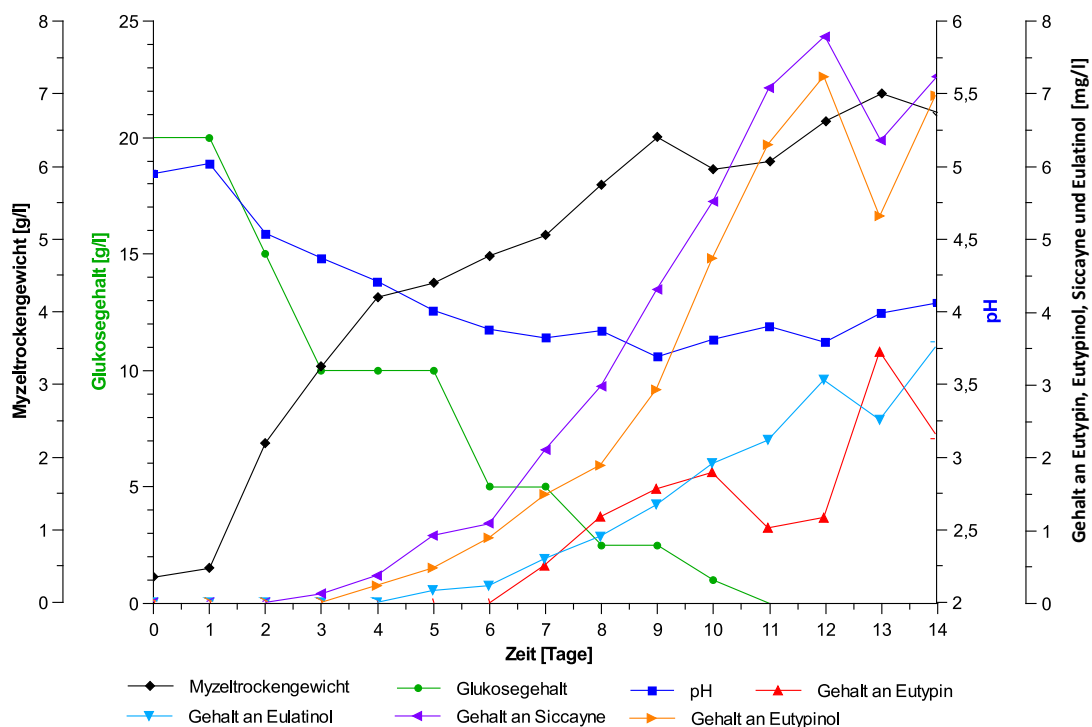


Abb. 3.2: Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16012 im 20 l-Maßstab in **M2**.

3.1.1.1.1 Isolierung von Eutypin, Siccayne, Eulatinol, FS E16012-3, Eulaglycosid und FS E16012-7

Die Fermentation wurde nach 14 Tage beendet und das Kulturfiltrat wurde vom Myzel getrennt. Anschließend wurde das Kulturfiltrat mit Et₂O extrahiert. Die Kulturfiltratextrakte von allen drei Fermentationen wurden vereinigt.

Aufgrund der täglichen Probenahme über den gesamten Fermentationsverlauf wurden nach der Fermentation lediglich 37 l von 60 l Ausgangsvolumen gewonnen. Aus den 37 l Kulturfiltrat wurden die acetylierten Phenole Eutypin (**1**, 45,2 mg), Siccayne (**9**, 75,7 mg), Eulatinol (**10**, 45,6 mg), FS E16012-3 (**17**, 2,2 mg), Eulaglycosid (**18**, 2,0 mg) und FS E16012-7 (**19**, 2,3 mg) isoliert. Obwohl Eutypinol (**2**) im Kulturfiltrat nachgewiesen wurde, konnte die Verbindung nicht aus dem Rohextrakt präpariert werden. Das Aufreinigungsschema des Kulturfiltratextrakts ist in Abb. 3.3 dargestellt. Dabei wurde das Rohextrakt mit dem Gradienten **G3** über eine Chromatographie an Kieselgel aufgereinigt (siehe Tab. 2.4).

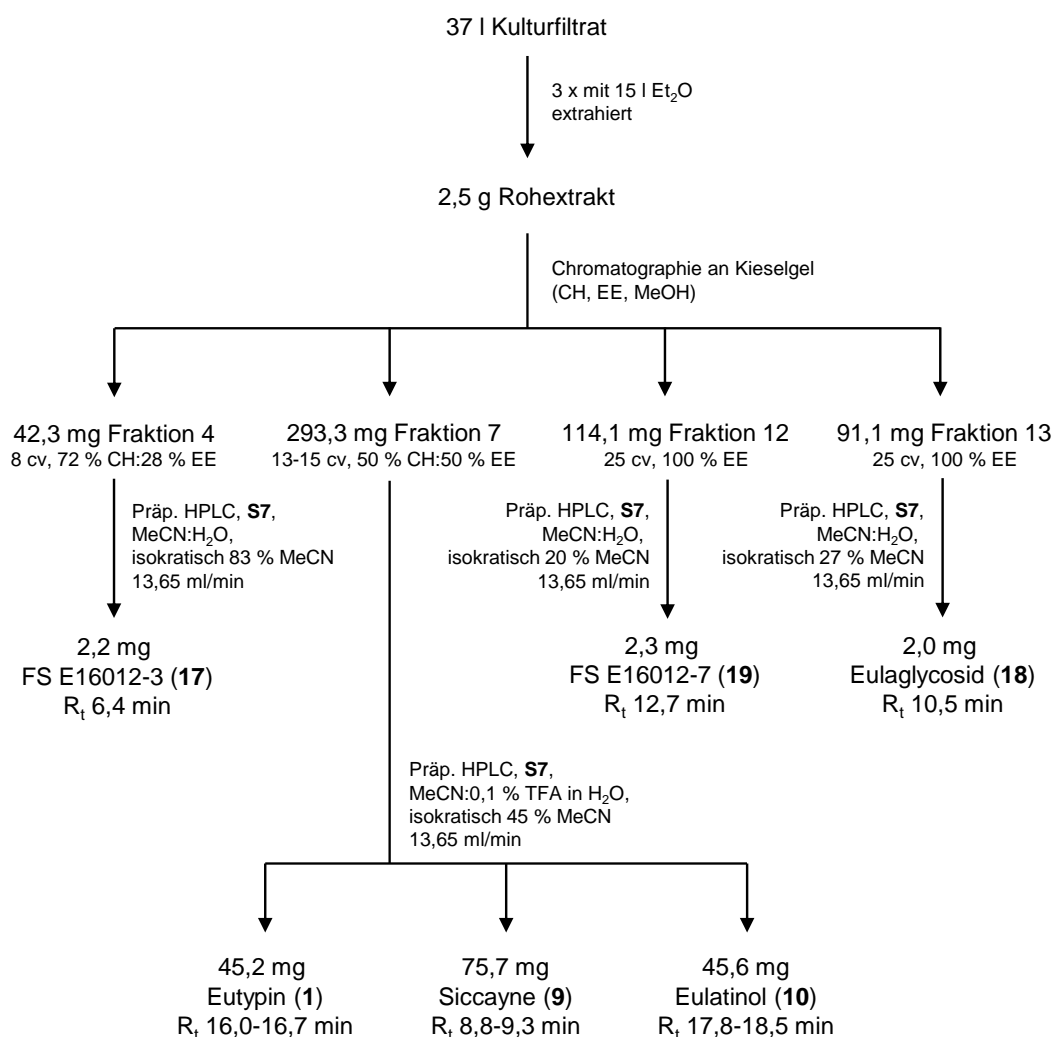


Abb. 3.3: Aufreinigungsschema von Eutypin, Siccayne, Eulatinol, FS E16012-3, Eulaglycosid und FS E16012-7 aus 37 l Kulturfiltrat von 3 x 20 l-Fermentationen von *Eutypa lata* IBWF E16012 in **M2**.

3.1.1.1.2 Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Sekundärmetabolite

Eutypin (**1**), Siccayne (**9**), Eulatinol (**10**), FS E16012-3 (**17**) und die bisher nicht beschriebenen Verbindungen Eulaglycosid (**18**) und FS E16012-7 (**19**) sind acetylierte Phenole. Diese bestehen aus einem Phenol, das in *ortho*-Stellung zur Hydroxygruppe eine Pentenyne Seitenkette trägt. Die Unterschiede dieser sehr ähnlichen Strukturen sind Substitutionen am Phenolring (siehe Abb. 3.4). Die Strukturaufklärung wurde durch die Arbeitsgruppe von [REDACTED] durchgeführt. Die HPLC/MS Chromatogramme der Naturstoffe sowie die UV- und Massenspektren sind im Anhang unter Kapitel 7.1.1 zusammengefasst.

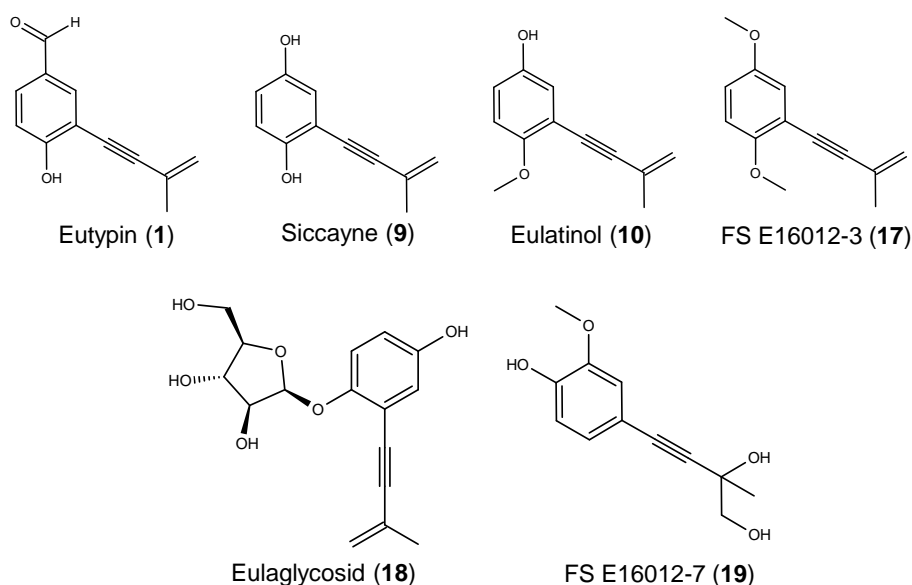


Abb. 3.4: Strukturformeln der aus *Eutypa lata* IBWF E16012 isolierten Verbindungen.

Eutypin (**1**, C₁₂H₁₀O₂, MW 186) wurde erstmals von Renaud *et al.* (1989) aus *Eutypa lata* isoliert und ist eine gelbliche amorphe Substanz, die sich gut in MeCN löst. Mit Hilfe eines Standards, der freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt wurde, konnten vergleichende HPLC/MS-Messungen durchgeführt werden, die bestätigten, dass es sich bei der isolierten Reinsubstanz um Eutypin (**1**) handelte. Die Struktur von **1** enthält eine Aldehydgruppe in *para*-Stellung zur Hydroxygruppe. Demnach handelt es sich um ein 4-Hydroxybenzaldehyde, das eine Pentenyne-Seitenkette trägt.

Siccayne (**9**) wurde erstmals aus dem Ascomyceten *Helminthosporium siccans* isoliert (Ishibashi *et al.*, 1968), welcher zu *Pyrenophora lolii* umbenannt wurde (Dovaston, 1948). **9** ist gut in MeCN löslich. Die Summenformel dieser rötlichen amorphen Verbindung lautet C₁₁H₁₀O₂ und das Molekulargewicht beträgt 174 g/mol. Die Struktur konnte durch die in der Datenbank

des IBWF hinterlegten Daten zur Retentionszeit, UV-Spektrum und Massenspektrum bestätigt werden. Sie zeichnet sich durch zwei Hydroxygruppen am Benzolring aus.

Eulatinol (**10**, C₁₂H₁₂O₂, MW 188) hat die gleiche Grundstruktur wie **9**, ist allerdings an einer Hydroxygruppe methyliert und wurde zum ersten Mal aus *E. lata* isoliert (Molyneux *et al.*, 2002). **10** ist eine dunkelbraune amorphe Substanz, die gut in MeCN löslich ist. Die Produktion von **10** durch *E. lata* wurde zusätzlich bestätigt, indem Kulturfiltrat direkt und ohne Extraktion sowie ohne Kontakt mit MeOH mit der HPLC/MS gemessen wurden.

FS E16012-3 (**17**, C₁₃H₁₄O₂, MW 186, 1,4-Dimethoxy-2-(3-methyl-3-buten-1-yn-1-yl)benzene) ist ein gelber amorpher Feststoff, der in Chloroform löslich ist. Im Vergleich zu **9** sind bei **17** die beiden Hydroxygruppen methyliert. Bisher wurde diese Verbindung lediglich ausgehend von Siccayne durch Synthese hergestellt (Guerrero-Vásquez *et al.*, 2014; Ishibashi *et al.*, 1968). Da die Kulturfiltratextrakte mit MeOH aufgenommen wurden, kann auch hier eine Methylierung von Vorstufen nicht ausgeschlossen werden. Es konnte kein Nachweis in den Tagesproben von *E. lata* erbracht werden.

Eulaglycosid (**18**) ist ein brauner amorpher Feststoff mit einem Molekulargewicht von 306 g/mol und einer chemischen Zusammensetzung von C₁₆H₁₈O₆. Diese neue Verbindung hat ebenfalls die Grundstruktur von **9**, die an einer Hydroxygruppe mit einer β-D-Ribofuranose glykosyliert ist, wodurch das Molekül sehr polar ist. Aus diesem Grund ist es auch gut in polaren Lösungsmitteln wie MeCN löslich.

Die bisher nicht publizierte Verbindung FS E16012-7 (**19**) hat ein Molekulargewicht von 222 g/mol und die Summenformel lautet C₁₆H₁₈O₆. **19** ist eine braune amorphe Substanz, die sich gut in polaren Lösungsmitteln wie MeCN löst. Obwohl **19** ebenfalls ein acetyliertes Phenol ist, gibt es größere Strukturunterschiede zu den anderen Verbindungen. Die Hydroxygruppe am Benzolring ist in *para*-Stellung zur Seitenkette und das Ende der Seitenkette besitzt zwei Hydroxygruppen statt einer Ketogruppe.

3.1.1.2 Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16012HT

In Abb. 3.5 ist der Fermentationsverlauf einer 20-l Fermentation in **M2** mit dem *E. lata*-Stamm IBWF E16012HT dargestellt. Das Myzeltrockengewicht erreichte bis zum Ende der Fermentation an Tag zehn einen Wert von ca. 3,8 g/l und die frei verfügbare Glukose war komplett aufgebraucht. Während der Fermentation sank der pH-Wert von einem Anfangswert bei 5,8 auf 4,3 und stabilisierte sich. Schon am dritten Tag konnten Eutypinol (**2**) und FS E16012HT-1 (**20**) im Kulturfiltrat nachgewiesen werden. Dabei blieb die Naturstoffkonzentration von **20** relativ konstant bei ca. 1 mg/l. Die Konzentration von **2** hingegen stieg stetig auf bis zu 1,9 mg/l.

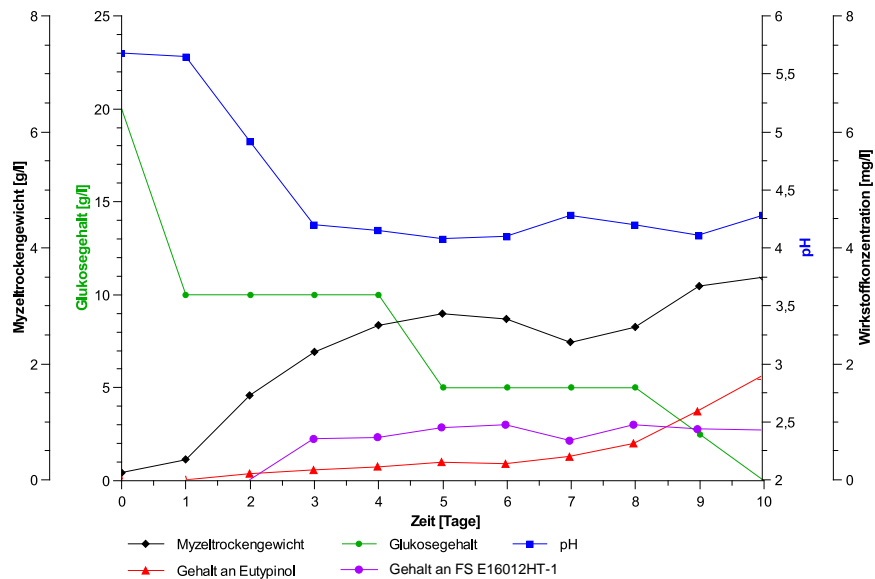


Abb. 3.5: Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16012HT im 20 l-Maßstab in **M2**.

3.1.1.2.1 Isolierung von Eutypinol und FS E16012HT-1

Die Fermentation von IBWF E16012HT wurde nach 10 Tagen beendet. Die Kulturbrühe wurde filtriert und die resultierenden 16 l Kulturfiltrat wurden dreimal mit je 5 l EE extrahiert. Das resultierende Rohextrakt wurde anschließend mit Hilfe einer Festphasenextraktion fraktioniert (siehe 2.4.2.2). Aus einem Zwischenprodukt wurden mittels präparativer HPLC schließlich 4,4 mg Eutypinol (**2**) und 2,5 mg FS E16012HT-1 (**20**) isoliert (siehe 2.4.3). Die anderen Zwischenprodukte wurden verworfen. Das gesamte Aufreinigungsschema ist in Abb. 3.6 gezeigt.

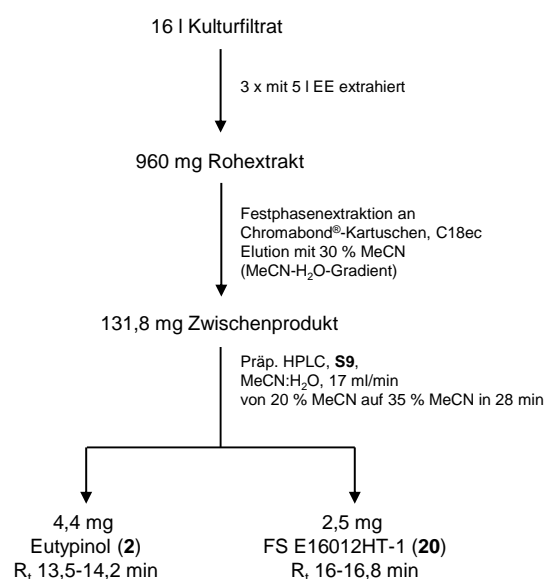


Abb. 3.6: Aufreinigungsschema von Eutypinol und FS E16012HT-1 aus 16 l Kulturfiltrat einer 20 l-Fermentation von IBWF E16012HT in **M2**.

3.1.1.2.2 Physikalisch-chemische Charakterisierung von Eutypinol und FS E16012HT-1

Die chemischen Strukturen von Eutypinol (**2**) und FS E16012HT-1 (**20**) sind in der Abb. 3.7 dargestellt. **2** ist ein acetyliertes Phenol mit einer ähnlichen Grundstruktur wie beispielsweise **1**, **9** oder **10** (siehe Abb. 1.4). **2** ist der korrespondierende Alkohol zu **1** und wurde erstmals 1989 nach der Isolation aus *E. lata* von Renaud *et al.* zusammen mit weiteren acetylenischen Verbindungen beschrieben. Es handelt sich um eine gelbe amorphe Verbindung, die gut in MeCN löslich ist. Die Summenformel von **2** lautet $C_{12}H_{12}O_2$ und das Molekulargewicht beträgt 188 g/mol. Mithilfe einer Vergleichsprobe, die freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt wurde, konnte aufgrund der gleichen Masse und dem UV/Vis-Spektrum die Struktur als **2** identifiziert werden.

Trotz ähnlicher Grundstruktur besitzt **20** (4-Hydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-yl)benzene methanol) lediglich eine Doppelbindung und keine Dreifachbindung in der Seitenkette. Zusätzlich fehlt eine Ketogruppe. Die Verbindung **20** ist ein prenylierter 4-Hydroxybenzylalkohol, die zum ersten Mal in *Hericium erinaceus* nachgewiesen werden konnte (Wu *et al.*, 2019). Es ist ein brauner amorpher Feststoff, gut in MeCN löslich und hat ein Molekulargewicht von 192 Da und besitzt eine Summenformel von $C_{12}H_{16}O_2$. In Kapitel 7.1.2 befinden sich die HPLC/MS Chromatogramme mit den Massen- und UV-Spektren der beiden Naturstoffe.

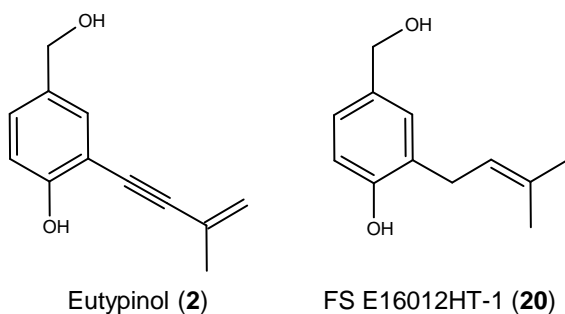


Abb. 3.7: Strukturformeln von Eutypinol und FS E16012HT-1.

3.1.1.3 Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16121

Die Fermentation des Stammes IBWF E16121 wurde bei 22 °C im 20 l-Maßstab in **M2** durchgeführt. In Abb. 3.8 ist das Fermentationsdiagramm dargestellt. Das Myzeltrockengewicht stieg dabei bis an Tag sechs kontinuierlich bis auf einen Wert von etwa 6 g/l und sank schließlich bis zum Ende der Fermentation auf 3 g/l. Ein Grund für die geringe und abfallende Biomassenkonzentration könnte eine fehlerhafte Probenahme sein. Der pH-Wert fiel im Verlauf der gesamten Fermentation von 4,8 auf unter 3,5. O-Methylmellein (**21**) konnte nach zwei Tagen erstmals im Kulturfiltrat nachgewiesen werden. Der Gehalt an **21** stieg in den

weiteren drei Tagen bis auf ein Maximum von etwa 10 mg/l an. Am Tag acht wurde die Fermentation beendet, da die Konzentration von O-Methylmellein (**21**) bis zu diesem Zeitpunkt nicht weiter anstieg und die freie Glukose verbraucht war.

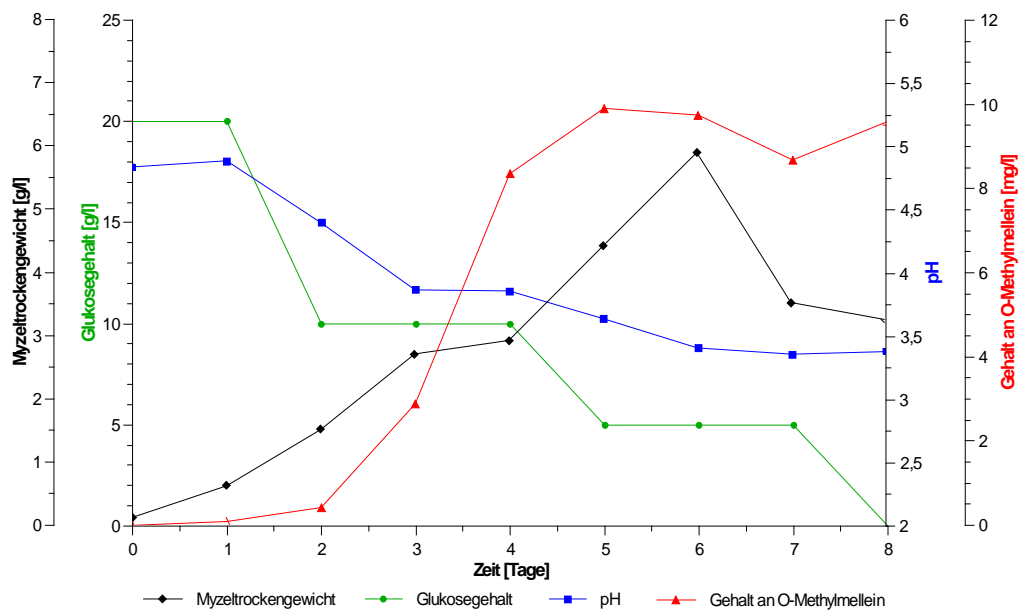


Abb. 3.8: Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16121 im 20 l-Maßstab in M2.

3.1.1.3.1 Isolierung von O-Methylmellein

Nach Beenden der Fermentation wurde das Kulturfiltrat vom Myzel durch Filtration getrennt. Danach wurden 12 l Kulturfiltrat mit Et₂O extrahiert. Zur weiteren Aufreinigung des Kulturfiltratextrakts erfolgte eine Festphasenextraktion mit dem gewonnenen Rohextrakt (siehe 2.4.2.2). Aus 304,9 mg eines öligen Zwischenprodukts wurden insgesamt 65,5 mg O-Methylmellein (**21**) isoliert. Die anderen Zwischenprodukte wurden verworfen. Das Aufreinigungsschema der Verbindung **21** ist in Abb. 3.9 zu sehen.

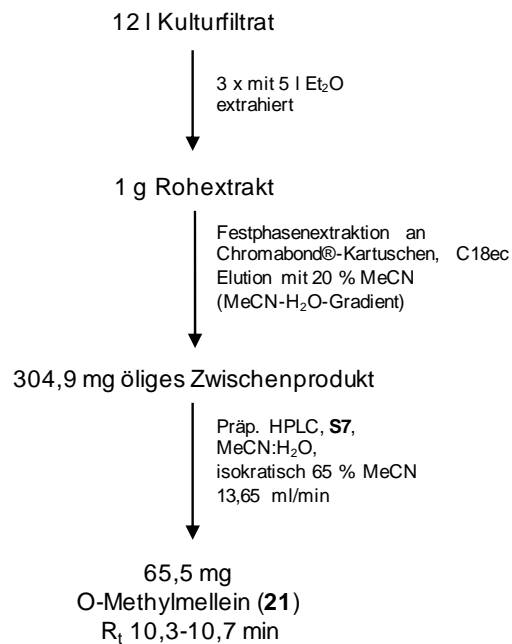
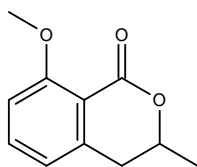


Abb. 3.9: Aufreinigungsschema von O-Methylmellein aus 12 l Kulturfiltrat einer 20 l-Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16121 in **M2**.

3.1.1.3.2 Physikalisch-chemische Charakterisierung von O-Methylmellein

Die chemische Struktur von O-Methylmellein (**21**) ist in Abb. 3.10 dargestellt. Es ist ein Vertreter der Dihydroisocumarine und ist zusätzlich an der Hydroxygruppe des Benzolrings methyliert. Die Verbindung ist ein klarer öliger Feststoff, der gut in polaren Lösungsmitteln wie MeCN löslich ist. **21** hat eine chemische Zusammensetzung von C₁₁H₁₂O₃ und ein Molekulargewicht von 192 g/mol. Die Strukturaufklärung erfolgte durch die Arbeitsgruppe von [REDACTED]. Das HPLC/MS-Chromatogramm, das UV- sowie die Massenspektren zu dieser Verbindung sind in Kapitel 7.1.3 zu finden.



O-Methylmellein (**21**)

Abb. 3.10: Strukturformel von O-Methylmellein.

3.1.1.4 Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16123 im 500 ml Maßstab

Bei einer Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16123 in **M2** im 500 ml Maßstab wurden bisher unbekannte Sekundärmetabolite nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde zunächst in dieser Form mit mehreren Ansätzen fermentiert. Dazu wurden 5 ml einer gut angewachsenen Vorkultur zur Inokulation von je 500 ml **M2** in zehn 1-l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane

verwendet. Nach 7-tägiger Inkubation bei RT und 120 rpm wurden im Kulturfiltrat Sekundärmetabolite in hoher Konzentration detektiert und die Fermentation wurde beendet.

3.1.1.4.1 Isolierung von Eutypinol, FS E16123-1, FS E16123-3, FS E16123-4, FS E16123-5 und FS E16123-6

Nach der Fermentation wurde das Kulturfiltrat vom Myzel separiert und mit EE extrahiert. Anschließend wurden 2,1 mg FS E16123-1 (**15**), 1,9 mg Eutypinol (**2**), 10,4 mg FS E16123-3 (**22**), 4,7 mg FS E16123-4 (**23**), 4,3 mg FS E16123-5 (**24**) und 2,9 mg FS E16123-6 (**25**) aus 4,5 l Kulturfiltrat aufgereinigt. Das Aufreinigungsschema ist in Abb. 3.11 dargestellt.

3.1.1.4.2 Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Sekundärmetabolite

FS E16123-1 (**15**) ist ein allenisches Epoxycyclohexan. Die Strukturformel ist in Abb. 3.12 dargestellt. Die physikalisch-chemische Charakterisierung von Eutypinol (**2**) wurde bereits unter Kapitel 3.1.1.2.2 beschrieben.

Die Verbindung **15** (5-(3-Methylbuta-1,3-dienylidene)-2,3-epoxycyclohexane-1,4-diol) wurde bisher lediglich aus *Eutypa lata* isoliert (Tsoupras *et al.*, 1988; Renaud *et al.*, 1989). Das Molekül hat ein Molekulargewicht von 194 g/mol und die Summenformel lautet C₁₁H₁₄O₃. **15** ist ein brauner amorpher Feststoff, der gut in MeCN löslich ist.

Zusätzlich konnten die vier Naturstoffe FS E16123-3 (**22**), FS E16123-4 (**23**), FS E16123-5 (**24**) und FS E16123-6 (**25**) isoliert werden, die jedoch kaum Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften zeigten. Es handelt sich um gelb-braune amorphe Substanzen, die sich gut in polaren Lösungsmitteln wie MeCN lösen. Die Daten zu den HPLC/MS-Chromatogrammen, UV/Vis- und den Massenspektren der isolierten Verbindungen sind in Kapitel 7.1.4 zu finden. Bei allen Verbindungen wurde das gleiche UV-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 220 nm detektiert. Auch die Massenspektren der vier Verbindungen **22-25** waren bei positiver wie negativer Ionisierung nahezu identisch und zeigten Signale an, die auf ein Molekulargewicht von entweder 388 g/mol oder 564 g/mol hindeuten. Bei einer HPLC/MS-Analyse der einzelnen Verbindungen wichen lediglich die Retentionszeiten unter der Verwendung von Gradient **G1** und Säule **S3** geringfügig voneinander ab. Da die Verbindungen nicht stabil blieben und es sich vermutlich um Diastereomere mit sehr ähnlichen physikochemischen Eigenschaften handelt, war die Strukturaufklärung nicht erfolgreich.

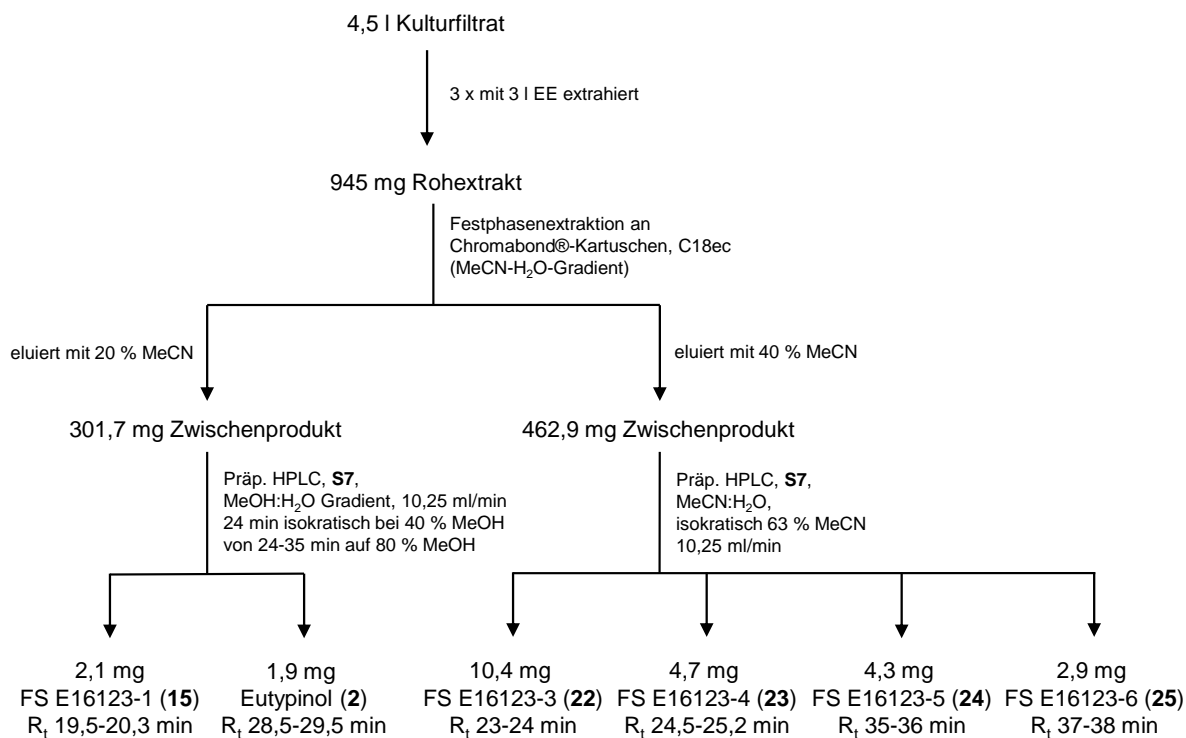


Abb. 3.11: Aufreinigungsschema von FS E16123-1, Eutypinol, FS E16123-3, -4, -5 und -6 aus 4,5 l Kulturfiltrat von 10 x 500 ml Fermentationen in je 1 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane von *Eutypa lata* IBWF E16123 in **M2**.

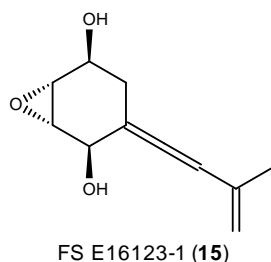


Abb. 3.12: Strukturformel von FS E16123-1.

3.1.1.5 Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16123 im 20 l-Maßstab

Um eine größere Menge des allenischen Epoxycyclohexans FS E16123-1 (**15**) zu isolieren, wurde der *E. lata*-Stamm IBWF E16123 bei 22 °C im 20 l-Maßstab in **M2** fermentiert. Nach 11-tägiger Inkubation wurde die Fermentation beendet. In Abb. 3.13 ist das Fermentationsdiagramm abgebildet. Das Myzeltrockengewicht nahm von Beginn der Fermentation bis Tag acht stets zu und erreichte an Tag zehn ein Maximum bei einem Wert von etwa 5,5 g/l. Im Vergleich dazu sank der pH-Wert im Verlauf der Fermentation von über 5 auf unter 4 und die freie Glukose war an Tag neun vollständig vom Pilz metabolisiert. Das allenische Epoxycyclohexan FS E16123-1 (**15**) sowie O-Methylmellein (**21**) konnten an Tag vier erstmals im Kulturfiltrat detektiert werden und an Tag sieben wurde die Produktion der Naturstoffe

Eutypinol (**2**) und Siccayne (**9**) nachgewiesen. Am Ende der Fermentation lagen im Kulturfiltrat die Verbindungen **2**, **9**, **15** und **21** in einer Konzentration zwischen 1 bis 2,2 mg/l vor.

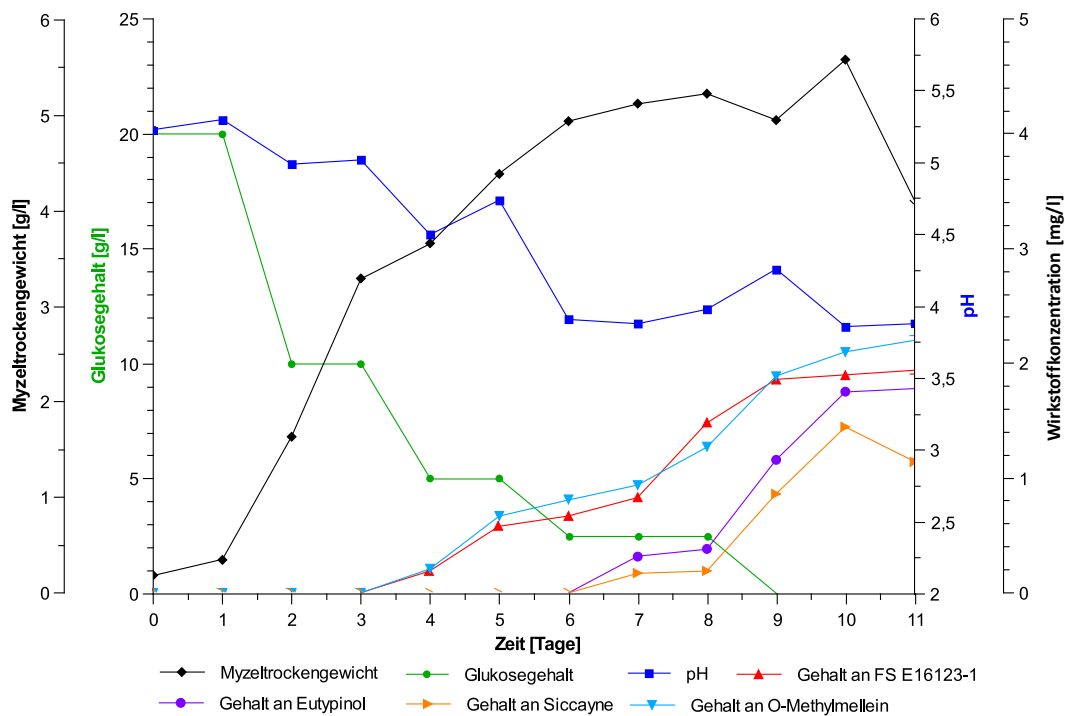


Abb. 3.13: Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16123 im 20 l-Maßstab in M2.

3.1.1.5.1 Isolierung von Tyrosol, FS E16123-1, N-Acetyltyramine, FS E16123-8 und O-Methylmellein

Nach der Fermentation wurde die Kulturbrühe filtriert und das Kulturfiltrat mit EE extrahiert. Darauf folgte eine Festphasenextraktion mit dem Rohextrakt (siehe 2.4.2.2), bei der besonders die Aufreinigung von FS E16123-1 (**15**) im Fokus stand. Ausgehend von 770 mg Rohextrakt wurden 259,4 mg eines Zwischenprodukts erhalten, das im Anschluss weiter aufgearbeitet wurde. Die weiteren Zwischenprodukte wurden verworfen. Mittels präparativer HPLC konnten neben FS E16123-1 (**15**, 6,5 mg) zusätzlich O-Methylmellein (**21**, 24,6 mg), Tyrosol (**26**, 14,2 mg), N-Acetyltyramine (**27**, 8,5 mg) und FS E16123-8 (**28**, 4,4 mg) isoliert werden. Die Vorgehensweise der Naturstoffisolierung ist in dem Aufreinigungsschema in Abb. 3.14 dargestellt.

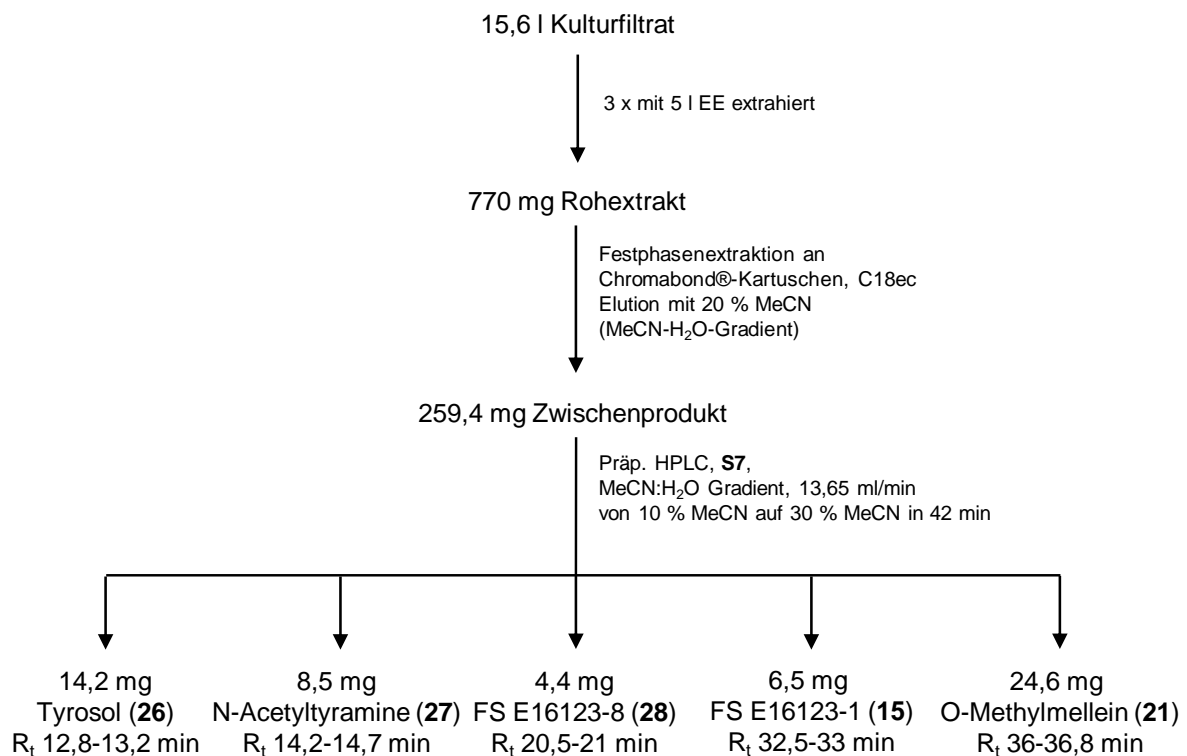


Abb. 3.14: Aufreinigungsschema von Tyrosol, N-Acetyltyramine, FS E16123-8, FS E16123-1 und O-Methylmellein aus 15,6 l Kulturfiltrat einer 20 l-Fermentation von *Eutypa lata* IBWF E16012 in **M2**.

3.1.1.5.2 Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Sekundärmetabolite

In Abb. 3.15 sind die Strukturformeln von Tyrosol (**26**), N-Acetyltyramine (**27**) und FS E16123-8 (**28**) zu sehen. Die chemischen Strukturen sowie die physikochemischen Eigenschaften von FS E16123-1 (**15**) und O-Methylmellein (**21**) sind bereits in Kapitel 3.1.1.4.2 und 3.1.1.3.2 beschrieben.

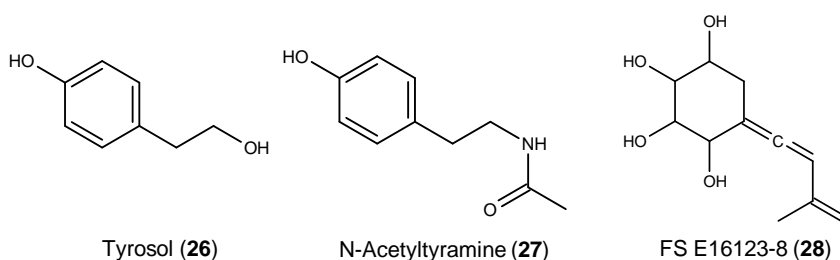


Abb. 3.15: Strukturformeln von Tyrosol, N-Acetyltyramine und FS E16123-8.

26 ist ein Naturstoff, der von zahlreichen Pilzen und Pflanzen produziert wird. So konnte **26** bereits aus *Ligustrum ovalifolium* (Veer *et al.*, 1957), *Fusarium fujikuroi* ehemals *Gibberella fujikuroi* (Cross *et al.*, 1963), *Candida albicans* (Lingappa *et al.*, 1969), *Pyricularia oryzae* (Devys *et al.*, 1980), *Ceratocystis* sp. (Ayer *et al.*, 1986) und *Xylaria longipes* (Schneider *et al.*,

1996) isoliert werden. Das Molekulargewicht von **26** beträgt 138 g/mol und die Summenformel lautet $C_8H_{10}O_2$.

N-Acetyltyramine (**27**) wurde zuerst aus *Mycobacterium tuberculosis* isoliert (Shirai, 1955). **27** ist ein gelb-brauner, öliges Feststoff, der gut in MeCN löslich ist. Das Molekül hat eine chemische Zusammensetzung von $C_{10}H_{13}NO_2$ und eine molare Masse von 179 g/mol.

FS E16123-8 (**28**) ist eine neue Verbindung, die bisher nicht in der Literatur beschrieben wurde. Die Strukturformel von **28** ist vergleichbar mit **15**, allerdings wurde in diesem Fall das Epoxid durch Hydroxylierung geöffnet. Die Summenformel des Moleküls lautet $C_{11}H_{16}O_4$ und das Molekulargewicht beträgt 212 g/mol. Es handelt sich um einen gelb-braunen, öligen Feststoff, der gut in MeCN löslich ist.

3.1.2 Biochemisches Potential verschiedener *Eutypa lata* Stämme

Da verschiedene *Eutypa lata*-Isolate bei der Kultivierung in artifiziellem Medium eine große Variabilität im Profil der produzierten Sekundärmetabolite sowie in der Ausbeute zeigen (Mahoney *et al.*, 2003; Molyneux *et al.*, 2002) und auch die Stämme in dieser Arbeit bei der Fermentation im 20 l-Maßstab unterschiedliche Naturstoffe produzierten, wurde das biochemische Potential von fünf verschiedenen *E. lata*-Stämmen (IBWF E16012, IBWF E16012HT, IBWF E16121, IBWF E16122 und IBWF E16123) analysiert und miteinander verglichen. Dazu wurden sie jeweils in 500 ml **M2** in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane für acht Tage bei RT und 120 rpm inkubiert. Nach Beenden der Fermentation wurden die Kulturfiltratextrakte angefertigt, wie unter Kapitel 2.3.2 beschrieben. Anschließend wurden sie an der HPLC mit der Säule **S5** und dem Gradient **G2** analysiert (siehe 2.4.1). Die HPLC-Chromatogramme der gemessenen Kulturfiltratextrakte und die nachgewiesenen Naturstoffe sind in Abb. 3.16 dargestellt.

Bei dem *E. lata*-Isolat IBWF E16012 wurden im Kulturfiltratextrakt die vier acetylierten Phenole Eutypin (**1**), Eutypinol (**2**), Sicayne (**9**) und Eulatinol (**10**) detektiert. Obwohl der Stamm IBWF E16012HT durch Selektion von IBWF E16012 generiert wurde und theoretisch das gleiche Potential zur Sekundärmetabolitproduktion besitzen müsste, wurde lediglich die Anwesenheit von **2** und von FS E16012HT-1 (**20**) im Kulturfiltrat nachgewiesen. Interessanterweise wurde die Verbindung **20** im Vergleich zu den anderen Stämmen nur von dem Hygromycin B-toleranten Stamm produziert. Bei dem *E. lata*-Stamm IBWF E16121 konnte wiederum hauptsächlich O-Methylmellein (**21**) und eine geringe Menge **9** nachgewiesen werden. Das allenische Epoxycyclohexan FS E16123-1 (**15**) wurde durch die Stämme IBWF E16122 und IBWF E16123 produziert, welche auch das Potential zur Biosynthese von **2** hatten. Zusätzlich konnte **21** in IBWF E16122 und **9** in IBWF E16123

nachgewiesen werden. Das unterschiedliche biochemische Potential der bearbeiteten *E. lata*-Stämme ist dabei eine gute Voraussetzung Informationen zur Biosynthese von acetylierten Phenolen zu erhalten. Durch diese Beobachtungen konnten vergleichende Transkriptomanalysen durchgeführt werden, um beteiligte Gene und deren korrespondierende Genprodukte zu enthüllen (siehe 3.1.5).

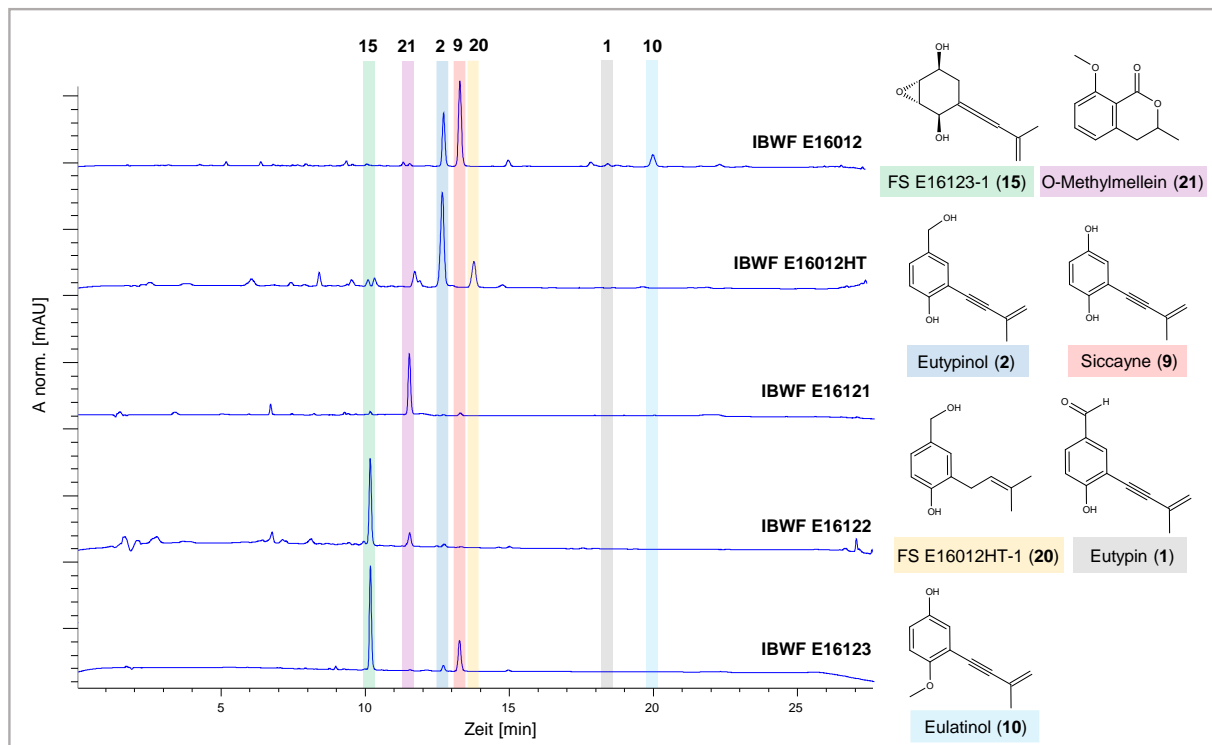


Abb. 3.16: HPLC-Chromatogramme der Kulturfiltratextrakte von fünf verschiedenen *E. lata*-Stämmen nach acht Tagen Inkubation in **M2** bei RT und 120 rpm. Die Strukturen der identifizierten Naturstoffe sind nummeriert und mit einem Farbcode versehen. HPLC, Gradient **G2**, Säule **S5**, Wellenlänge 230 nm.

3.1.3 Biologische Charakterisierung der aus *Eutypa lata* isolierten Naturstoffe

Nach dem 13 Sekundärmetabolite aus vier verschiedenen *Eutypa lata*-Stämmen isoliert werden konnten, wurde das bioaktive Potential dieser Naturstoffe bestimmt. Dazu wurden die Verbindungen auf phytotoxische, antimikrobielle und zytotoxische Aktivitäten überprüft.

3.1.3.1 Untersuchungen zur Phytotoxizität der Naturstoffe aus *Eutypa lata*

In der Literatur wurden bereits mehrere Sekundärmetabolite aus *Eutypa lata* beschrieben, die das Potential haben Nekrosen an Weinpflanzenblättern zu induzieren. Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit isolierten Verbindungen ebenfalls Nekrosen an Blättern verursachen, wurde ein Blattrondelltest durchgeführt (siehe 2.5.5), der in Anlehnung an Mahoney *et al.* (2003) etabliert wurde. Die Dokumentation des Blattrondelltests erfolgte nach 24 h Inkubation und ist in Abb. 3.17 dargestellt.

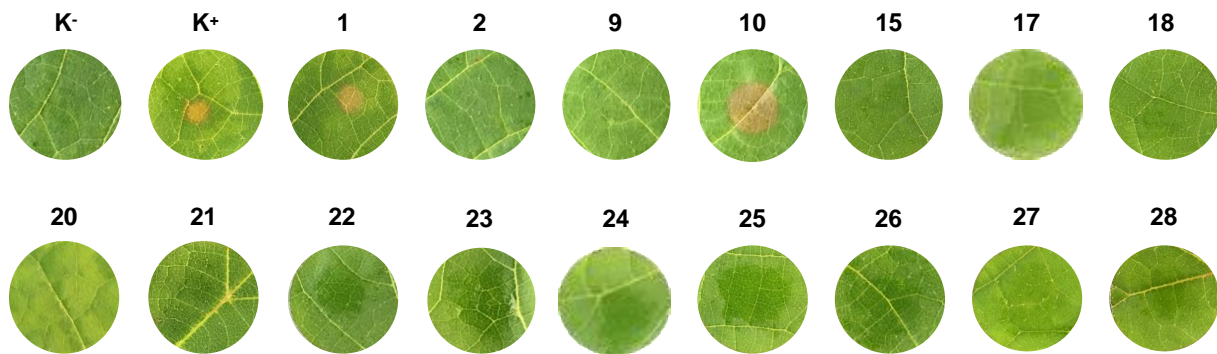


Abb. 3.17: Blattrondelltest mit Blättern von *Vitis vinifera* cv. ‚Riesling‘ zur Untersuchung von phytotoxischen Eigenschaften der aus *Eutypa lata* isolierten Naturstoffe. Es wurden jeweils 50 µg der Verbindungen appliziert und für 24 h bei RT inkubiert. K⁻ = Negativkontrolle mit MeCN. K⁺ = Positivkontrolle mit 5 % H₃PO₄.

Als Positivkontrolle (K⁺) wurden 5 % H₃PO₄ verwendet, wodurch nach 24 h Inkubationszeit auf der Weinblattoberfläche eine leichte Nekrose verursacht wurde. Die Nekrosenbildung wurde durch eine Braunfärbung des Pflanzengewebes sichtbar. Die Negativkontrolle (K⁻), welche mit MeCN durchgeführt wurde, blieb dagegen symptomfrei. Eutypin (1) und besonders Eulatinol (10) verursachten eine starke Nekrosenbildung an Weinblättern, während die Applikation mit den anderen acetylierten Phenolen Eutypinol (2) und Siccayne (9) keinen Einfluss auf gesundes Blattgewebe hatte. Diese Ergebnisse stimmen mit den beschriebenen Erkenntnissen von Mahoney *et al.* (2003) überein. Bei den isolierten Sekundärmetaboliten 15, 17, 18, 20-28 wurden ebenfalls keine Nekrosen beobachtet. Die Verbindung 19 konnte aufgrund zu geringer Ausbeute nicht getestet werden.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die isolierten Naturstoffe eine Hemmung bei der Keimung von Pflanzensamen verursachen. Die Durchführung der Tests mit *Setaria italica*, *Lepidium sativum* und *Agrostis capillaris* sind in Kapitel 2.5.4 beschrieben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen befinden sich in Tab. 7.9 in Kapitel 7.6. In Bezug auf eine Hemmung der Pflanzensamenkeimung zeigten allerdings keine der aus *E. lata* isolierten Sekundärmetabolite eine Wirkung. Lediglich Eutypin (1) war in der Lage das Wachstum von *S. italica* nach der Samenkeimung einzuschränken. Die Samenkeimung war hingegen nicht beeinträchtigt.

3.1.3.2 Untersuchungen zur antimikrobiellen und cytotoxischen Wirkung der Naturstoffe aus *Eutypa lata*

Um das bioaktive Potential der Naturstoffe weiter zu untersuchen, wurde die minimale Hemmkonzentration gegen Bakterien und Pilze in einem Reihenverdünnungstest bestimmt (siehe 2.5.2). Dabei zeigten Eutypin (1) und Siccayne (9) beginnend bei 150 µg/ml und Eulatinol (10) bei 250 µg/ml eine Wachstumshemmung gegen den eigenen Organismus. Gegen alle weiteren Bakterien- und Pilzstämmen wurden die Naturstoffe bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml getestet. Die Naturstoffe zeigten allerdings keine Wirkung gegen

diese Stämme. Die Ergebnisse des Reihenverdünnungstest sind in Kapitel 7.6 unter Tab. 7.8 zusammengefasst.

Die Untersuchung auf Sporenkeimungshemmung wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben. Eutypin (**1**) zeigte als einziger Naturstoff das Potential ab einer Konzentration von 25 µg/ml die Sporenkeimung bei *Pyricularia oryzae* (H₂O, CM) und das Myzelwachstum von *Phytophthora infestans* zu inhibieren. Da die Ausbeute bei einigen Naturstoffen sehr gering ausfiel, konnten nicht alle Verbindungen in dem Assay eingesetzt werden. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt (siehe 7.6, Tab. 7.10). Auch bei der Untersuchung auf Cytotoxizität gegen die Zelllinie HeLa-S3 zeigten die Naturstoffe bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml keine Wirkung (siehe 2.5.7 und Tab. 7.11).

3.1.3.3 Stabilität von Eutypin und Eulatinol nach Reaktion mit L-Cystein

Da Eutypin (**1**) und Eulatinol (**10**) im Blattrondelltest aktiv waren und Nekrosen auf der Weinblattoberfläche verursachten (siehe Abb. 3.17), wurde überprüft, ob die Verbindungen mit L-Cystein reagieren oder stabil bleiben. Die Durchführung der Reaktion mit L-Cystein ist dabei unter Kapitel 2.5.8 näher beschrieben. Im Anschluss wurde erneut ein Blattrondelltest durchgeführt, um nachzuweisen, ob der Naturstoff nach der Reaktion weiterhin phytotoxisch ist. In Abb. 3.18 sind die HPLC-Chromatogramme von Cystein (A), Eutypin (B) und Eutypin nach der Reaktion mit L-Cystein (C) im Vergleich dargestellt. Durch das Integral der Absorptionsmaxima konnte ermittelt werden, dass 93,7 % des Eutypins nach der Reaktion mit L-Cystein stabil blieb. Lediglich 6,3 % des Eutypins reagierte mit L-Cystein und wurde dadurch inaktiviert. Im Blattrondelltest konnte die Phytotoxizität bei beiden Ansätzen bestätigt werden, obwohl die Ausprägung der Nekrose durch die Anwesenheit von L-Cystein wesentlich geringer war.

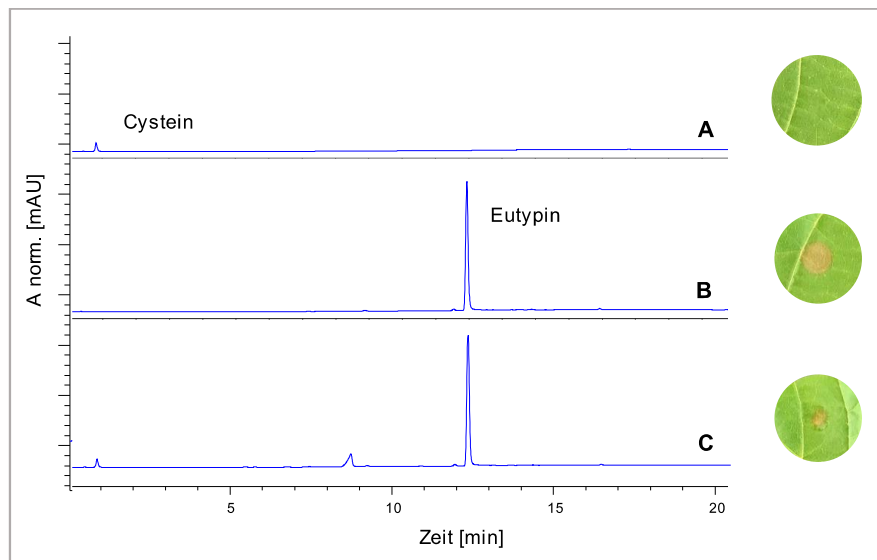


Abb. 3.18: Stabilität von Eutypin nach 6 h Inkubation bei RT mit L-Cystein in äquimolarem Verhältnis. Zusätzlich wurde die Phytotoxizität von Eutypin nach der Behandlung mit L-Cystein in einem Blatttrondelltest überprüft. **A:** Cystein, **B:** Eutypin, **C:** Eutypin+Cystein, HPLC/MS, Gradient **G1**, Säule **S3**, Wellenlänge 210 nm.

Die HPLC-Chromatogramme zur Untersuchung der Stabilität von Eulatinol sind in Abb. 3.19 dargestellt. Durch das Integral der Absorptionsmaxima konnte ermittelt werden, dass 97,8 % des Eulatinols nach der 6-stündigen Inkubation mit L-Cystein stabil geblieben sind und eine vergleichbare Ausprägung der Nekrosen an Weinblattscheiben verursachte, wie die Negativkontrolle ohne Cystein.

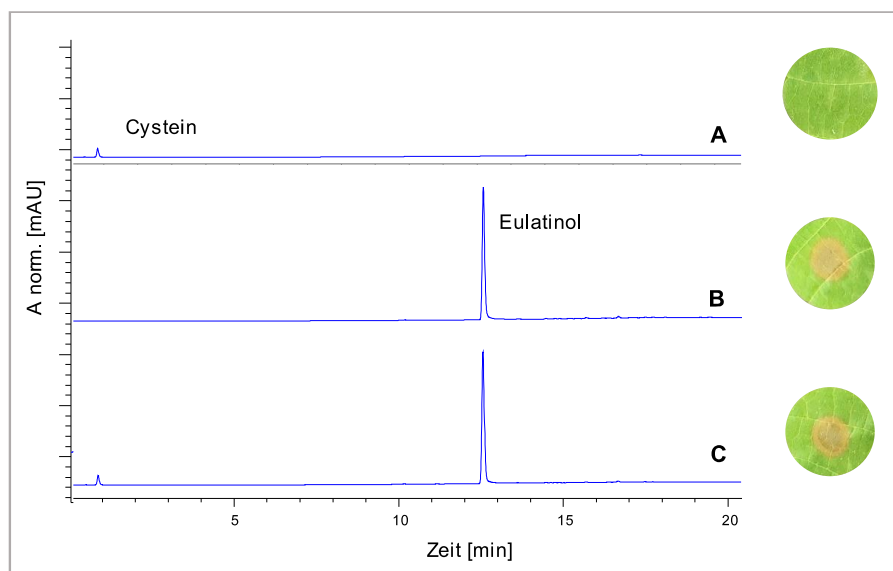


Abb. 3.19: Stabilität von Eulatinol nach 6 h Inkubation bei RT mit Cystein in äquimolarem Verhältnis. Zusätzlich wurde die Phytotoxizität von Eulatinol nach der Behandlung mit Cystein in einem Blatttrondelltest überprüft. **A:** Cystein, **B:** Eulatinol, **C:** Eulatinol+Cystein, HPLC/MS, Gradient **G1**, Säule **S3**, Wellenlänge 210 nm.

3.1.4 Supplementation von putativen Vorstufen zur Produktionssteigerung von Eutypinol durch *Eutypa lata* IBWF E16012

Die Biosynthese der acetylierten Phenole, wie Eutypin (**1**), Eutypinol (**2**), Siccayne (**9**) und Eulatinol (**10**) konnte bisher nicht aufgeklärt werden (Jiménez-Teja *et al.*, 2006). Dennoch könnten Arbeiten an analogen Naturstoffen aus anderen Organismen einen Hinweis auf den potentiellen Biosyntheseweg liefern. Untersuchungen zur Biosynthese von Chromenen und Isopropenylbenzofurane, die mit Eulatachromene (**13**) und 2-Iso-propenyl-5-formylbenzofuran (**16**) strukturverwandt sind, enthüllten, dass der aromatische Ring dieser Verbindungen aus dem Shikimisäureweg entsteht. Bei Inkorporationsstudien mit [¹⁴C]-L-Phenylalanin wurde zusätzlich festgestellt, dass L-Phenylalanin eine Vorstufe im Biosyntheseweg dieser Verbindungen ist und weiter zu Zimtsäure katalysiert wird (Siebertz *et al.*, 1990). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei Naturstoffen gemacht, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu den acetylierten Phenolen besitzen. So werden Naturstoffe aus *Trametes suaveolens*, *Bjerkandera adusta* und *Streptomyces xanthochromogenus* ebenfalls aus dem Shikimisäureweg abgeleitet (Cho *et al.*, 1993; Jiménez-Teja *et al.*, 2006; Lomascolo *et al.*, 2001; Nielsen und Møller, 1999; Silk und Macaulay, 2003).

Um Informationen zur Biosynthese acetylierter Phenole zu eruieren, wurden Supplementationsexperimente mit *Eutypa lata* und putativen Vorstufen, wie in 2.3.5 beschrieben, durchgeführt. Die Kultivierung von IBWF E16012 erfolgte in **M19**, da nur Eutypinol (**2**) als acetyliertes Phenol produziert wurde und angenommen wurde, dass ein Produktionsunterschied zwischen den unsupplementierten (K-) und supplementierten Ansätzen nachweisbar sein könnte. Dabei wurde untersucht, ob die Produktion von **2** durch die Zugabe von potentiellen Vorstufen gesteigert werden kann. Um eine Umsetzung der Vorstufen durch den Pilz nachzuweisen, wurden 500 µM und 2 mM der jeweiligen Chemikalien eingesetzt. Denn bei weniger als 500 µM wurde keine Produktionssteigerung beobachtet und bei mehr als 2 mM wurde das Myzelwachstum durch die Vorstufe gehemmt. Die Menge des im Kulturfiltrat gebildeten Eutypinols (**2**) wurde mittels analytischer HPLC (siehe 2.4.1) und mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden quantitativ bestimmt (siehe 2.3.4.4). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.20 dargestellt. Die höchste Konzentration von **2** konnte 48 h nach der Supplementation mit 500 µM Zimtaldehyd mit einem Wert von ca. 1,5 mg/l nachgewiesen werden. Auch nach 24 h wurden bereits mehr als 0,9 mg/l Eutypinol im Kulturfiltrat detektiert. Im Vergleich zur Kontrolle wurde so ein Produktionsanstieg von 9-15 fach beobachtet. Bei der Zugabe einer erhöhten Zimtaldehydkonzentration (2 mM) wurde nach 48 h dagegen nur etwas mehr als 0,2 mg/l produziert. Die Supplementation von Zimtsäure, Benzaldehyd, Benzylalkohol und p-Cumarsäure führte lediglich zu einer Produktionssteigerung zwischen 0,1 und 0,4 mg/l. Darüber hinaus wurden die beiden Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin supplementiert.

Allerdings führte eine Zugabe der beiden Verbindungen nicht zu einer Produktionssteigerung von **2**. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse nicht in der Abb. 3.20 aufgeführt.

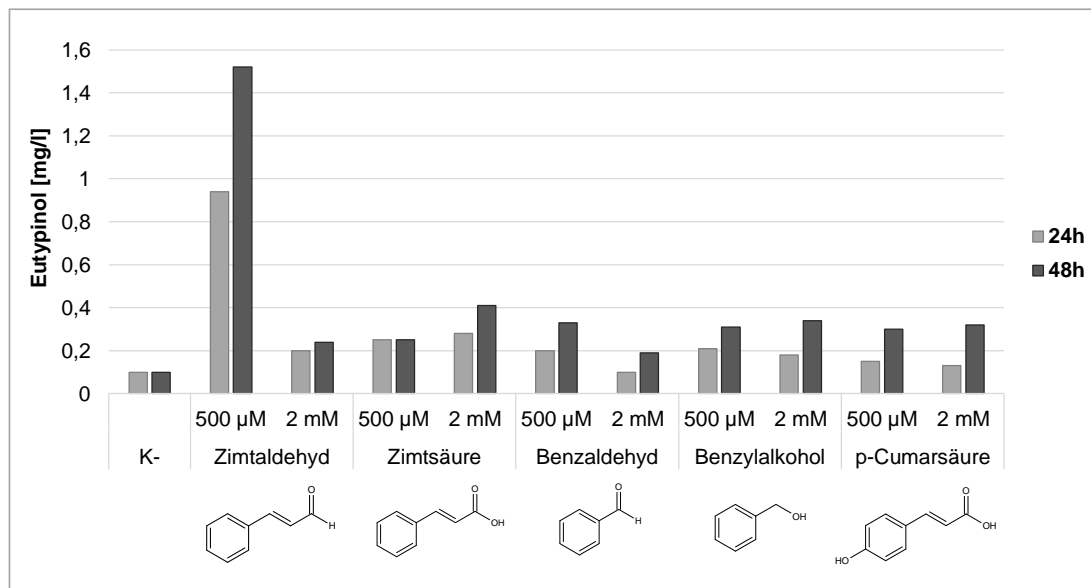


Abb. 3.20: Produktionssteigerung von Eutypinol unter Zugabe von 500 µM bzw. 2 mM putativer Vorstufen durch *Eutypa lata* IBWF E16012. Die Eutypinolkonzentration wurde im Kulturfiltrat mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden bestimmt.

3.1.5 Vergleichende Transkriptomanalysen zur Identifikation von Genen, die an der Biosynthese acetylierter Phenole beteiligt sind

Um Gene zu identifizieren, die an der Biosynthese von acetylierten Phenolen beteiligt sind, wurden in einem ersten Schritt die Genome von zwei unterschiedlichen *E. lata*-Stämmen sequenziert und assembliert (siehe 3.1.5.1). Im darauffolgenden zweiten Schritt wurden schließlich Transkriptome dieser Stämme bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht (siehe 3.1.5.3). Dazu wurden RNA-Sequenzierungen durchgeführt, die eine genomweite Genexpressionsanalyse erlauben. Danach wurden die Transkriptome miteinander verglichen, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Die Prozessierung der Daten ist in Kapitel 2.7 beschrieben.

3.1.5.1 De novo Genom Assemblierung

Um die Genome der beiden *E. lata*-Stämme IBWF E16012 und IBWF E16121 analysieren zu können, wurde jeweils die genomische DNA isoliert und anschließend sequenziert (siehe 2.6.1.2 und 2.6.5). Die gDNA reads wurden danach weiterverarbeitet und durch *de novo* Assemblierung zu einem Genom zusammengeführt, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben. In Tab. 3.1 sind die Genomdaten der untersuchten Pilzstämme im Vergleich zu der Genomsequenzierung von UCR-EL1 (Blanco-Ulate *et al.*, 2013) dargestellt. Die Genomgröße von IBWF E16012 ist mit seinen 53,9 Mbp ähnlich groß wie das vom Stamm UCR-EL1 mit 54,0

Mbp. Dagegen ist das Genom von IBWF E16121 mit 58,6 Mbp um 4,7 Mbp größer als das von IBWF E16012. Die GC-Gehalte der assemblierten Genome variieren dabei allerdings nur sehr wenig. Die Werte liegen zwischen 46,6 und 47,9 %. Größere Unterschiede zwischen den untersuchten Genomen konnten bei der *in silico* Vorhersage der *open reading frames* (ORFs) gefunden werden. Bei dem Referenzstamm UCR-EL1 wurden die wenigsten ORFs (11685) vorhergesagt, während bei IBWF E16012 schon 13804 und bei IBWF E16121 sogar 18635 ORFs identifiziert wurden. Das liegt vor allem daran, dass die Genomgröße von IBWF E16121 ca. 8 % mehr Informationen enthält als die Vergleichsgenome.

Tab. 3.1: Vergleich der Genomdaten für die *E. lata*-Stämme IBWF E16012, IBWF E16121 und UCR-EL1. Die Daten von UCR-EL1 stammen aus der Veröffentlichung von Blanco-Ulate *et al.* (2013). Mbp: Megabasenpaare; Kbp: Kilobasenpaare; ORFs: *open reading frames*.

Stamm	Größe [Mbp]	GC [%]	N50 Statistik [Kbp]	ORFs
IBWF E16012	53,9	47,2	76,4	13804
IBWF E16121	58,6	47,9	66,7	18635
UCR-EL1	54,0	46,6	68,3	11685

3.1.5.2 antiSMASH Analyse der sequenzierten *E. lata* Genome

Nach der Sequenzierung und anschließender Assemblierung der untersuchten Genome wurde mit den generierten Daten jeweils eine antiSMASH Analyse durchgeführt (siehe 2.7.4). Die identifizierten Biosynthesecluster wurden zu den verschiedenen Kategorien PKS, NRPS, Indole-PKS, Indole, Terpene, Siderophore, Arylpolyene, Fettsäuren, Andere und Putative zugeordnet. In Tab. 3.2 ist die Anzahl der Biosynthesecluster für die jeweilige Stoffklasse sowie der direkte Vergleich der verschiedenen *E. lata* Genome dargestellt. Insgesamt wurden zwischen 137 und 153 Biosynthesecluster in den untersuchten *E. lata*-Stämmen identifiziert. Die größte Gruppe stellen dabei die putativen Cluster mit 70-85 dar, die nicht zu den anderen Klassen zugeordnet werden konnten, gefolgt von den PKS-Clustern (29-33).

Tab. 3.2: Die Anzahl der identifizierten Biosynthesecluster wurden den jeweiligen Sekundärmetabolitgruppen zugeordnet.

Genom	PKS	NRPS	Indole-PKS	Indole	Terpene	Siderophore	Arylpolyene	Fatty acid	Other	Putative	Gesamt
IBWF E16012	33	8	4	1	7	1	0	3	11	85	153
IBWF E16121	29	8	4	2	6	0	1	4	11	72	137
UCR-EL1	29	7	6	1	7	0	0	3	15	70	138

3.1.5.3 Vergleichende Transkriptomanalyse von *Eutypa lata* IBWF E16012 und *Eutypa lata* IBWF E16121

Aufgrund des unterschiedlichen biochemischen Potentials der beiden *E. lata*-Stämme IBWF E16012 und IBWF E16121 (siehe 3.1.2) wurden sie für die Kultivierung mit anschließender RNA-Sequenzierung ausgewählt. In **M2** kultiviert, produzierte der Stamm IBWF E16012 die acetylierten Phenole Eutypin (**1**), Eutypinol (**2**), Sicayne (**9**) und Eulatinol (**10**), während der

Stamm IBWF E16121 in diesem Medium lediglich O-Methylmellein (**21**) und eine geringe Menge an Siccayne (**9**) produzierte. In **M22** war der Stamm IBWF E16121 allerdings ebenfalls in der Lage die angegebenen acetylierten Phenole zu produzieren. Die Stämme wurden dazu jeweils in 500 ml Medium in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane für 8 Tage bei 22 °C und 120 rpm kultiviert. Die HPLC-Chromatogramme zu den Fermentationen sind im Anhang unter Kapitel 7.8 dargestellt. Die Herangehensweise und Durchführung der Methode ist in Kapitel 2.6.13 beschrieben. Die weitere bioinformatische Auswertung der Daten wurde freundlicherweise von [REDACTED] und [REDACTED] durchgeführt. Es wurde TopHat und Cuffdiff für die Erkennung von Genen und die Genexpressionsanalyse der RNA-seq Daten verwendet. Um die Transkriptomdaten von zwei verschiedenen Stämmen miteinander vergleichen zu können, wurden die RNA-Seq *reads* mit Hilfe des Aligningtools TopHat auf das Genom von IBWF E16121 zugeordnet. Denn dieser Stamm besitzt zum einen die genetische Voraussetzung für die Produktion von acetylierten Phenolen und zum anderen konnte unter der Verwendung von zwei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen ein produzierender und ein nicht-produzierender Zustand nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung der *aligned reads* und zur Bestimmung der differentiell exprimierten Gene (DE Gene) wurde das statistische Analysetool Cuffdiff verwendet. Die resultierenden DE Gene wurden entsprechend der *Gene Ontology* (GO) Funktionskriterien und gemäß der JGI Genom Annotationsdaten klassifiziert. Bei diesem Experiment mit drei Transkriptomdatensätzen wurden insgesamt 621 signifikant regulierte Gene identifiziert (Abb. 3.21). Als signifikant wurden dabei nur diejenigen bezeichnet, deren durchschnittliche Expression einen Faktor von 2,5x in mindestens einem Fall des paarweisen Vergleichs über alle untersuchten Stämme hatte und unter Berücksichtigung des q-Wertes von weniger oder gleich 0,05. Der q-Wert stellt die Falscherkennungsrate des P-Wertes dar. Die Klassifizierung der DE Gene erfolgte entsprechend ihrer biologischen Funktion in 10 funktionelle Kategorien, die in Übereinstimmung mit den annotierten GO und KOG (*eukaryotic orthologous groups*) Daten vom JGI erhalten wurden. Bei der Kategorisierung wurden zusätzlich die Ergebnisse aus der BLASTp und InterProScan Analyse berücksichtigt. Die GO Daten wurden im Anschluss mit einer Blast2GO Analyse erweitert und überarbeitet. In dieser Analyse konnten 224 Gene (36,1 %) deutlich zu funktionellen Kategorien zugewiesen werden (Abb. 3.21). Die größte Kategorie mit 15,1 % der DE Gene wurde zu metabolischen Prozessen zugeordnet. Darauf folgten 5,95 % der DE Gene, die an Transport relevanten Prozessen beteiligt sind und 4,18 % die Transkriptionsfaktoren codieren. Für weitere 257 Gene (41,4 %) konnte die Funktion nicht bestimmt werden. Diese werden in der Kategorie „andere“ zusammengefasst. Die verbleibenden 140 Gene (22,5 %) codieren hypothetische Proteine und wurden als „unbekannt“ bezeichnet, da keine GO Annotationen gefunden werden konnten.

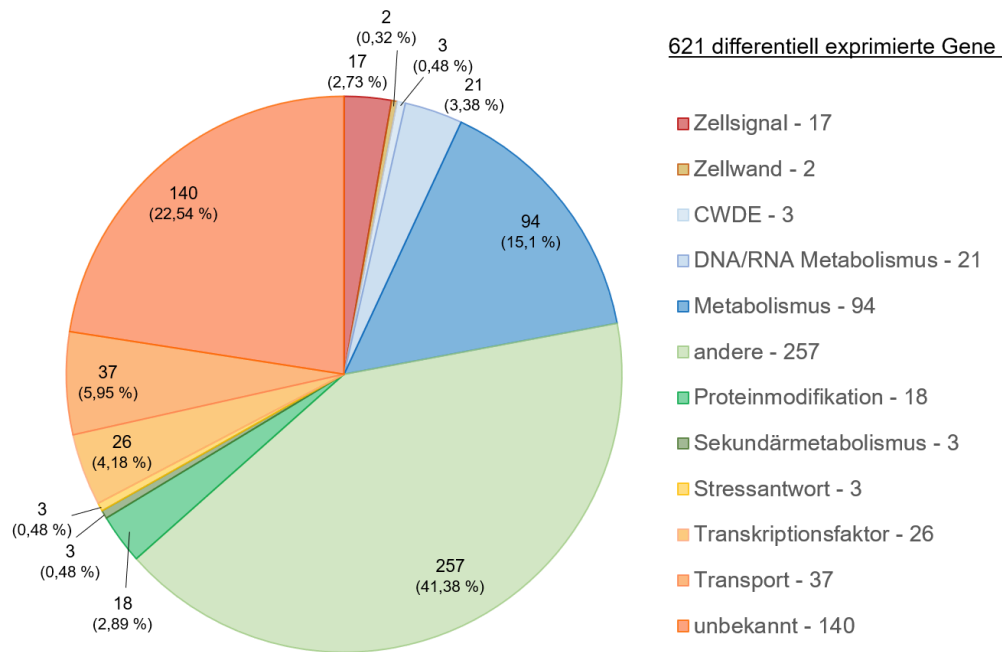


Abb. 3.21: Auswertung der Transkriptomanalyse der untersuchten *E. lata*-Stämme, die eine unterschiedliche Produktion von acetylierten Phenolen zeigten (IBWF E16012 in BAF, produzierend; IBWF E16121 in BAF, nicht-produzierend; IBWF E16121 in PDA, produzierend). Die dazugehörigen HPLC-Chromatogramme sind in Abb. 7.97: Metabolische Unterschiede von drei verschiedenen Fermentationen, die als Grundlage für die Transkriptomanalyse dienten (siehe 3.1.5.3). Es sind HPLC-Chromatogramme von Kulturfiltratextrakten dargestellt, die bei einer Fermentation nach acht Tagen Inkubation in **M2** bei RT und 120 rpm gewonnen wurden. Der Ansatz IBWF E16012 BAF (oben,) produzierte eine große Menge an acetylierten Phenolen, der Ansatz IBWF E16121 PDA eine mittlere Menge an acetylierten Phenolen (unten,) und IBWF E16121 BAF produzierte keine acetylierten Phenole (mitte,). Die Strukturen der identifizierten Naturstoffe sind nummeriert und mit einem Farbcode versehen. HPLC, Gradient **G2**, Säule **S5**, Wellenlänge 230 nm. dargestellt. Das Kreisdiagramm stellt die 621 DE Gene, die aus den drei Transkriptomdatensätze erhalten wurden, in angepassten Kategorien dar, die in Übereinstimmung mit den Daten des JGI und der Blast2GO-Analyse bezeichnet wurden. Als signifikant wurden dabei nur die Gene angesehen, deren durchschnittliche Expression einen Faktor von 2,5x bei mindestens einem Fall des paarweisen Vergleichs über alle Datensätze hinweg hatte und unter Berücksichtigung des q-Wertes von weniger oder gleich 0,05.

Mit Hilfe einer Genontologie Enrichment Analyse, die auf dem REVIGO Server durchgeführt werden konnte, wurden semantisch ähnliche GO Bezeichnungen der DE Gene zu Clustern zusammengefasst. Um die maximale Bedeutung der prozessierten Daten zu extrahieren, wurden die 52 der am meisten angereicherten Gencluster berechnet. Die Auswertung der Analyse ist in Abb. 3.22 dargestellt. Die geclusterten GO Bezeichnungen beziehen sich zum größten Teil auf den Laktat Metabolismus, da die meisten DE Gene an den metabolischen und katabolischen Prozessen von Laktat (GO:0006089, GO:1903457), Homocystein (GO:0050667), Methylglyoxal (GO:0009438, GO:0019243, GO:0051596, GO:0061727), Homogentisat (GO:1901999, GO:1902000), Leucin (GO:0006551), Phenylalanin (GO:0006558, GO:0006559) und Tyrosin (GO:0006570, GO:0006572) beteiligt sind. Des Weiteren werden einige DE Gene mit regulatorischen Prozessen in Verbindung gebracht (GO:0000019, GO:0010525, GO:0010528, GO:0045911, GO:0045951, GO:1900087, GO:1902806, GO:1902808, GO:1903332, GO:1903334, GO:1903644, GO:1903646, GO:2000045). Da bei ca. 22,5 % aller DE Gene die Funktion unbekannt ist und weitere 41,4 %

zu „anderen“ zusammengefasst wurden, konnten diese nicht bei der Genontologie Enrichment Analyse berücksichtigt werden. Das bedeutet, dass die Analyse nur eine Aussage auf die bisher bekannten Gene erlaubt.

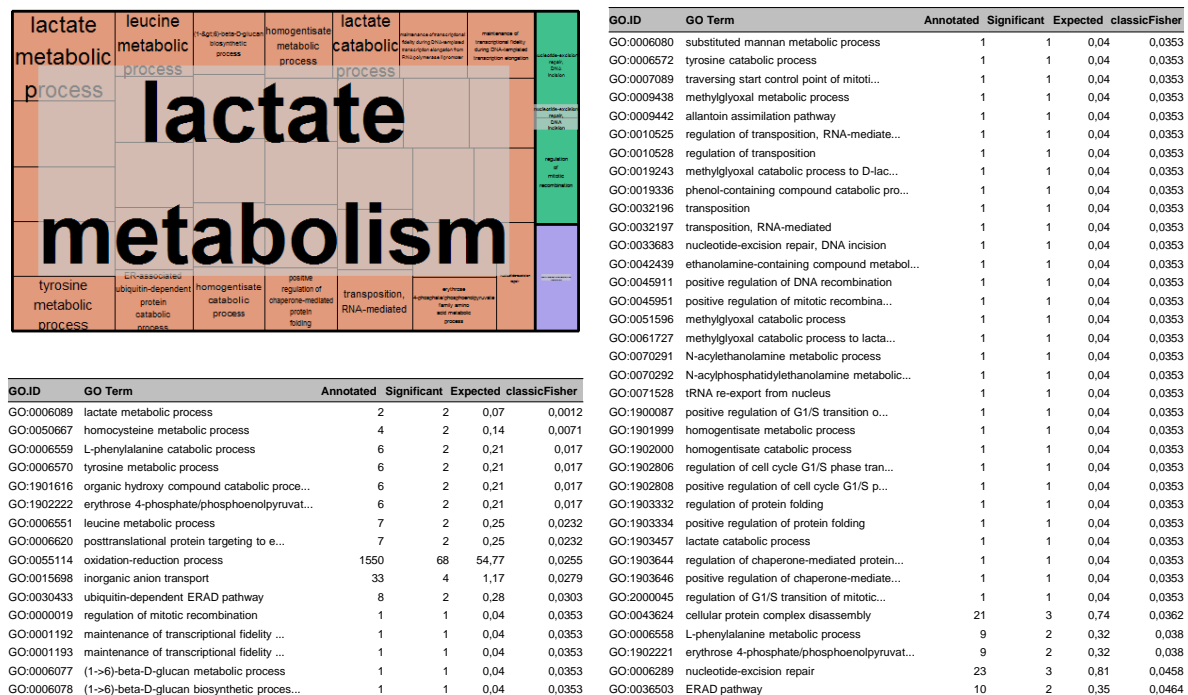


Abb. 3.22: Genontologie Enrichment Analyse der DE Gene von IBWF E16121 BAF, IBWF E16121 PDA und IBWF E16012 BAF. Die angereicherten GO Bezeichnungen der DE Gene wurden mit TopGO in R analysiert und die ersten 52 GO Cluster wurden mittels dem webbasierten Tool REVIGO prozessiert. Die redundanten GO Bezeichnungen wurden entfernt und die biologischen Prozesse wurden in einem TreeMap Plot geclustert, indem jedes Quadrat ein einzelnes Cluster repräsentiert. Bei einer semantischen Ähnlichkeit der Cluster wurden sie mit der gleichen Farbe markiert. Die Größe der Quadrate resultiert aus dem p-Value von der TopGO Analyse. Je größer das Quadrat, desto kleiner der p-Value und größer der Faktor der angereicherten GO Bezeichnungen. Für den TreeMap Plot und die dazugehörige Tabelle wurden nur die GO Bezeichnungen von der TopGO Analyse berücksichtigt, die entsprechend der classic Fisher Analyse bei einem p-Value von $\leq 0,05$ signifikant angereichert wurden.

3.1.5.4 Unterschiede und Ähnlichkeiten im Transkriptionsprofil zwischen den untersuchten Stämmen

Um weitere Informationen zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten zu erhalten, wurden die verschiedenen Transkriptomdatensätze bei produzierenden (grüne Pfeile) und nicht-produzierenden Bedingungen (rote Pfeile) auf Unterschiede und Ähnlichkeiten im Transkriptionsprofil verglichen. Dazu wurde ein Venn-Diagramm erstellt, indem die signifikant hochregulierten Gene in den einzelnen Transkriptomdatensätze überprüft wurden und gegebenenfalls übereinandergelegt wurden (Abb. 3.23 A). Besonders die beiden unteren Kreise sind in diesem Venn-Diagramm von wichtiger Bedeutung, da sie die hochregulierten Gene einer produzierenden Bedingung (IBWF E16012 BAF oder IBWF E16121 PDA) im Vergleich zur nicht-produzierenden Bedingung IBWF E16121 enthalten. Dabei überlappen sich 41 hochregulierte Gene bei dem direkten Vergleich der Transkriptomdatensätze und 4 Gene sind in allen drei Vergleichen hochreguliert (Abb. 3.23 A). Diese insgesamt 45 DE Gene

wurden in einem weiteren Kreisdiagramm erneut zu funktionellen Kategorien zugeordnet (Abb. 3.23 B) und sind in Tab. 7.10: Liste der DE Gene die bei dem Vergleich von den produzierenden Bedingungen (IBWF E16121 PDA und IBWF E16012; grüne Pfeile) mit der nicht produzierenden Bedingung (IBWF E16121 BAF; roter Pfeil) identifiziert wurden (siehe Abb. 3.23). Die angegebenen Werte sind FPKM-Werte. aufgelistet.

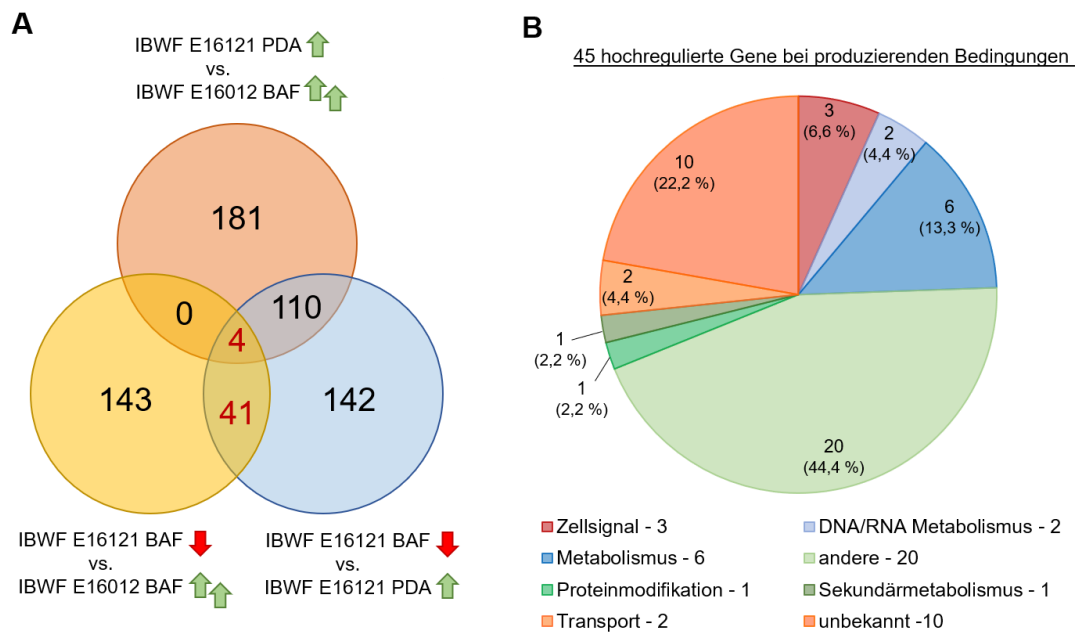


Abb. 3.23: Vergleichende Analyse der stammspezifischen Transkriptomdatensätze. **A:** Das Venn-Diagramm zeigt die DE Gene aus dem Vergleich der 3 Transkriptomdaten von IBWF E16121 BAF, IBWF E16121 PDA und IBWF E16012 BAF an und fasst überlappende DE Gene zusammen. Dabei wurde jeweils eine produzierende Bedingung (grüne Pfeile ↑) mit einer nicht- oder weniger produzierenden Bedingung verglichen (rote Pfeile ↓). Die Zahlen in jedem Segment repräsentieren die Anzahl der DE Gene. **B:** Das Kreisdiagramm klassifiziert die 45 hochregulierten Gene, welche bei produzierenden Bedingungen identifiziert wurden, in angepassten Kategorien dar (siehe Abb. 3.21).

3.1.5.5 Genexpressionsanalyse von ausgewählten Kandidatengen

Um die Genexpression von ausgewählten Kandidatengen zu analysieren, wurden qRT-PCR Experimente durchgeführt, wie in Kapitel 2.6.3.3 beschrieben. Dazu wurden für die Kultivierung der Stämme die gleichen Wachstumsparameter angewendet, wie bei den RNA-Seq-Experimenten (siehe 3.1.5.3). Verglichen wurden in diesem Fall die Stämme IBWF E16012 (produzierend) und IBWF E16121 (nicht-produzierend) jeweils in BAF (**M2**) fermentiert. Insgesamt wurden 10 Gene für die Analyse ausgewählt. Darunter sind 7 der 45 hochregulierten Gene, die bei den produzierenden Bedingungen im Vergleich zur nicht-produzierenden Bedingung nach der RNA-seq erhöhte FPKM-Werte aufwiesen (siehe Abb. 3.23). Die untersuchten Gene sind in Tab. 3.3 dargestellt, mit der jeweiligen Gen ID, Protein ID sowie die putative Funktion der entsprechenden Enzyme. In Abbildung Abb. 3.24: Genexpressionsanalyse von ausgewählten Genen in dem produzierenden Stamm IBWF E16012 im Vergleich zu dem nicht produzierenden Stamm IBWF E16121. Die Werte wurden

mit dem *housekeeping* Gen Actin normalisiert, dass konstitutiv exprimiert wird und wurden mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode berechnet. Gezeigt werden die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. ist die relative Genexpression dieser Gene im Vergleich zwischen dem produzierenden Stamm IBWF E16012 und dem nicht produzierenden Stamm IBWF E16121 dargestellt. Dabei wurden die Werte mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ermittelt. Normalisiert wurden die Daten mit dem *housekeeping* Gen Actin.

Tab. 3.3: Kandidatengene, die in der Genexpressionsanalyse untersucht wurden.

Gen ID	Protein ID	putative Funktion
g9386	9906	Transport/Protein enthält FAD Bindedomäne
g9387	1894	Para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase
g9393	1899	Phenylalanin und Histidin Ammonia Lyase
g12330	91	Kynurenine 3-monooxygenase
g2647	7516	unbekannt
g7329	7753	2-Oxoisovalerat Dehydrogenase
g6090	5114	4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
g14111	3512	Epoxidhydrolase_Hydrolase oder Acyltransferase
g8049	9011	Transport
g10986	5807	Cytochrom P450 Monooxygenase

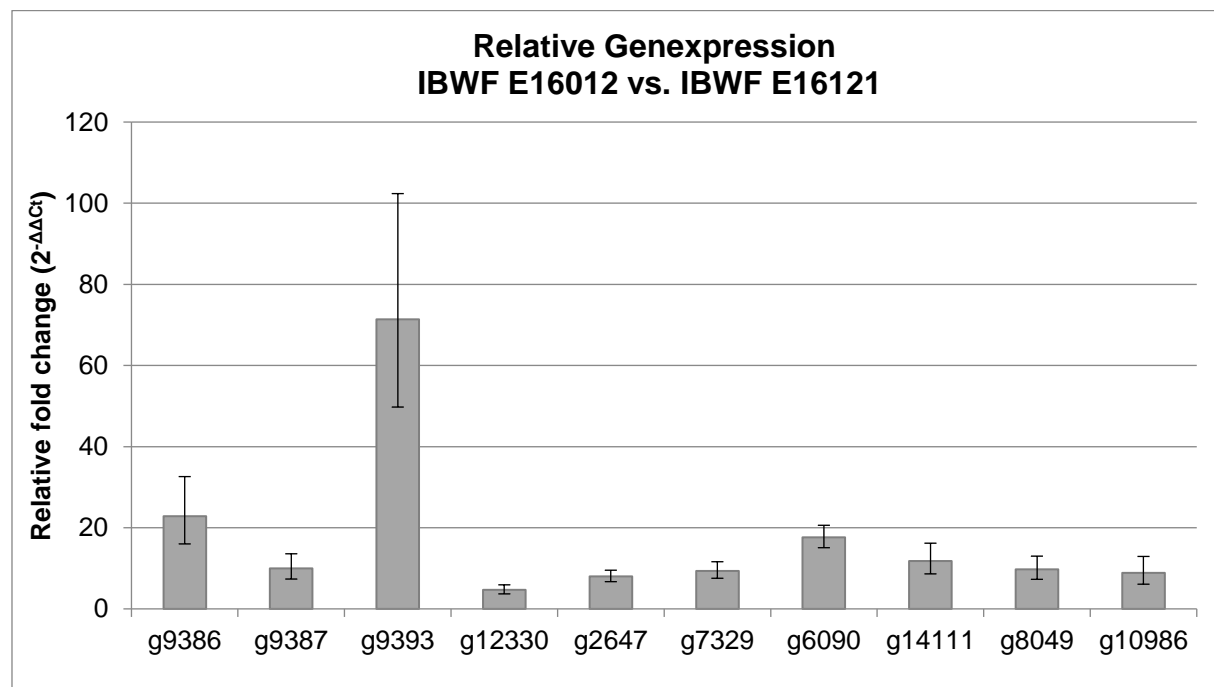


Abb. 3.24: Genexpressionsanalyse von ausgewählten Genen in dem produzierenden Stamm IBWF E16012 im Vergleich zu dem nicht produzierenden Stamm IBWF E16121. Die Werte wurden mit dem *housekeeping* Gen Actin normalisiert, dass konstitutiv exprimiert wird und wurden mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode berechnet. Gezeigt werden die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2 Molekularbiologische Manipulation von *Eutypa lata*

Die Fähigkeit Mikroorganismen genetisch manipulieren zu können, ist eine der wichtigsten Voraussetzungen um deren Stoffwechsel zu untersuchen. Da in dieser Arbeit der Biosyntheseweg der acetylenierten Phenole aufgeklärt werden sollte und bis auf eine Publikation von Bradshaw *et al.* (2005) bisher noch keine etablierte Transformationsmethode für die genetische Manipulation von *Eutypa lata* existierte, wurden dazu in diesem Teil der Arbeit verschiedene Methoden bei unterschiedlichen Parametern angewendet.

Zuerst wurde die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation (siehe 2.6.11.3) in Anlehnung an Figueiredo *et al.* (2010) und nach den Erkenntnissen von Muskat (2016) durchgeführt. Es wurde versucht GFP mit dem konstitutiven Promotor des Gens Elongationsfaktor 1 α aus *Pyricularia oryzae* mit Hilfe des Vektors pCAMB-HPT-EFA-GFP (siehe 2.1.7) durch zufällige Mutagenese in *E. lata* zu transformieren. Nach der Inkubationszeit und Regeneration des Pilzes auf Selektionsmedium, konnten jedoch nach mehrfachen Ansätzen keine Transformanten beobachtet werden. Im Anschluss wurden weitere Ansätze durchgeführt, bei denen die Parameter variiert wurden. Als zu transformierendes Material wurden dazu entweder Myzel, Konidiosporen oder Protoplasten von *E. lata* verwendet. Des Weiteren wurde die Ko-Inkubationsdauer der *A. tumefaciens*-Zellen und des Pilzmyzels von zwei Tagen auf drei bzw. sechs Tagen verlängert und es wurden verschiedene Mischungsverhältnisse (1:1, 1:2 und 2:1) angesetzt. Ein weiterer Ansatz wurde mit der doppelten Konzentration von Acetosyringon im AI-Medium (**M1**) durchgeführt und auch das Selektionsmedium bzw. der Gehalt des entsprechenden Antibiotikums wurde variiert. Die Ergebnisse sind in der Tab. 3.4 zusammengefasst. Dabei stellen die orangenen Felder die jeweils veränderten Parameter dar.

Tab. 3.4: Optimierung verschiedener Transformationsparameter bei der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation von *Eutypa lata*.

Nr.	Pilzmaterial	Verhältnis Pilzmaterial [ml] : Bakterien [ml]	AS-Konzentration [µM]	Ko-Inkubationsdauer [d]	Konzentration Hygromycin B [µg/ml]	Transformanten
1	Myzel	1:1	200	2	100	-
2	Myzel	2:1	200	2	100	-
3	Myzel	1:2	200	2	100	-
4	Myzel	1:1	400	2	100	-
5	Myzel	1:1	200	3	100	-
6	Myzel	1:1	200	6	100	-
7	Myzel	1:1	200	2	50	-
8	Myzel	1:1	200	2	200	-
9	Myzel	1:1	200	2	300	-
10	Konidiosporen	1:1	200	2	100	-
11	Konidiosporen	2:1	200	2	100	-
12	Konidiosporen	1:1	400	2	100	-
13	Konidiosporen	1:1	200	3	100	-
14	Konidiosporen	1:1	200	6	100	-
15	Konidiosporen	1:1	200	2	50	-
16	Konidiosporen	1:1	200	2	300	-
17	Protoplasten	1:1	200	2	100	-
18	Protoplasten	1:1	200	3	100	-
19	Protoplasten	1:1	200	6	100	-

Als Alternative zur Hygromycinresistenz-Kassette HPT in pCAMB-HPT-EFA-GFP wurde versucht den Selektionsmarker G418 mit dem Neomycin-Phosphotransferase Gen *nptII* aus dem Vektor pC-G418-YR in *E. lata* zu transformieren (siehe 2.1.7). Das korrespondierende Protein verleiht eine Neomycin- bzw. Geneticinresistenz. Allerdings resultierten auch aus diesen Ansätzen keine Transformanten.

Anschließend wurden zwei unterschiedliche Methoden der Protoplastentransformation angewendet. Darunter befand sich ebenfalls die Methode von Bradshaw *et al.* (2005). Die Protokolle dazu sind unter Kapitel 2.6.11.4 und 2.6.11.5 beschrieben. Dabei wurden entweder PEG 4000 oder PEG 6000 verwendet und es wurden zwischen 1 und 5 µg Vektor-DNA pro Ansatz eingesetzt. Dennoch konnten auch hier keine resistenten Kolonien beobachtet werden. Da die Optimierungen der Transformationsmethoden keinen Erfolg zeigten, sollte im darauffolgenden Schritt ein pilzeigener Promotor verwendet werden, um die Transformationseffizienz und die Expression des Selektionsmarkers zu erhöhen.

3.2.1 Optimierung der Transformation von *Eutypa lata* durch Verwendung eines pilzeigenen Promotors




Da die Transformation der Resistenzkassette HPT mit dem *trpC*-Promotor in *E. lata* bisher zu keinen resistenten Transformanten geführt hat, sollte in einem weiteren Ansatz ein alternativer Promotor vor das Gen *hpt* kloniert werden. Bei der beschriebenen Transformation von *E. lata* durch Bradshaw *et al.* (2005) wurde der Promotor des Gens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gpdA*) von *Aspergillus nidulans* verwendet (Punt und van den Hondel, 1992). Um die Transformationsmethode auf den Pilz *E. lata* anzupassen, wurden pilzeigene Promotoren für die Expression des Selektionsmarkers benötigt. Denn diese scheinen zusätzlich die Transformationseffizienz zu steigern (Bowyer, 2001). Aus diesem Grund wurden mit Hilfe der Gendatenbank des JGI und der veröffentlichten Genomsequenz des *E. lata*-Stamms UCR-EL1 die Gene Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Protein ID: 1330) und Elongationsfaktor 1 α (Protein ID: 6820) sowie deren Promotorsequenzen EI_GAPDH und EI_EF1a identifiziert. Danach wurden die beiden Promotoren jeweils in ein Transformationskonstrukt integriert, dass aus dem Plamid pSJ-basic, einer Promotorsequenz und dem Gen *hpt* besteht. Daraus resultierten die Vektoren pFS-EI_EF1a-HPT und pFS-EI_GAPDH-HPT (siehe 2.6.10.4-2.6.10.5). Nach wiederholtem Versuch das Genom von *E. lata* mit diesen beiden Vektoren und der *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation genetisch zu manipulieren, konnten keine Hygromycin B resistenten Kolonien beobachtet werden. Aufgrund dessen wurde ein Ansatz zur zielgerichteten Mutagenese von *E. lata* unternommen.

3.2.2 Zielgerichtete Mutagenese von *Eutypa lata*

Die Biosynthese von acetylierten Phenolen bei *E. lata* sollte durch Geninaktivierung von am Stoffwechsel beteiligten Gene bzw. deren korrespondierenden Proteine untersucht werden. Da zu Beginn der Arbeit keine Kandidatengene identifiziert oder vermutet werden konnten, wurden Enzyme ausgewählt, die potentiell an der Biosynthese von literaturbekannten bzw. in dieser Arbeit beschriebenen Sekundärstoffe beteiligt sein könnten. Da die acetylierten Phenole eine Dreifachbindung besitzen und strukturell sehr ähnlich sind (siehe Abb. 1.4), kann davon ausgegangen werden, dass sie alle aus einem Biosyntheseweg entstammen. Entscheidend ist hierbei die Entstehung des Alkins. Acetylene werden durch Acetylasen/Desaturasen katalysiert und sind bisher wenig erforscht (siehe 1.2.2). Ausgehend von der ersten Acetylenase, die in Pilzen beschrieben wurde (Blacklock *et al.*, 2010), konnten mit Hilfe des blastp-Programms die drei homologen Gene UCREL1_5610, UCREL1_10483 und UCREL1_10881 in *E. lata* identifiziert werden, die für putative Δ Fettsäure Desaturasen codieren (EC: 1.14.19.22). Diese Enzyme könnten verantwortlich für die Katalyse

der Dreifachbindung sein. In Tab. 3.5 sind die Daten der kodierenden Sequenzen zusammengefasst.

Tab. 3.5: Daten der Gene aus *E. lata*, die für putative Desaturasen kodieren. Die konservierten Domänen wurden mit Hilfe der Pfam Version 32.0 vorhergesagt. Bp: Basenpaare; kDa: Kilodalton.

Gen	Protein ID	genomische Sequenz [bp]	Intronlänge [bp] (Position des Introns)	Aminosäuren	Molekulargewicht [kDa]
UCREL1_5610	517	1558	100 (1046)	486	54
Konservierte Domäne					
UCREL1_10483	5833	1338	67 (863) 56 (1099)	406	45,9
Konservierte Domäne					
UCREL1_10881	6281	1616	73 (55) 72 (957) 63 (1198) 52 (1421)	453	50,8
Konservierte Domäne					

Für jedes dieser Gene wurde demnach ein Geninaktivierungsvektor konstruiert (siehe 2.6.10.1-2.6.10.3). Nach mehrmaliger *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation und Protoplastentransformation mit diesen Vektoren konnte ebenfalls kein Wachstum von genetisch veränderten *E. lata*-Mutanten beobachtet werden, die eine Hygromycinresistenz aufwiesen. Lediglich bei der Transformation des Geninaktivierungsvektors pCAMB-HPT-10483-KO mit den Parametern, die in Ansatz 1 verwendet wurden (siehe Tab. 3.4), konnten mehrere Hygromycin B-tolerante Kolonien generiert werden.

Um zu überprüfen, ob bei diesen Kolonien Fremd-DNA in ihr Genom integrierte, wurden *Southern Blot* Analysen mit genspezifischen DNA-Sonden durchgeführt (siehe 2.6.12). Dabei konnten bei den potentiellen Transformanten keine Signale mit einer DNA-Sonde in der flankierenden Genregion sowie mit einer HPT-spezifischen DNA-Sonde nachgewiesen werden. Eine Integration der HPT-Kassette in das *E. lata*-Genom wurde demnach nicht bestätigt (*Southern Blot* nicht gezeigt). Dennoch scheinen diese Transformanten eine gewisse Toleranz gegenüber Hygromycin B entwickelt zu haben. Da Wachstum nur bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml Hygromycin B und nicht bei höheren Konzentrationen beobachtet werden konnte, wird von einer Toleranz und nicht von einer Resistenz ausgegangen. In einem Plattenwachstumstest wurden der Wildtyp IBWF E16012 sowie der Hygromycin B-tolerante Stamm IBWF E16012HT jeweils für 12 Tage bei RT auf BAF-Medium (**M2**) und Selektionsmedium MM+CSH (**M20**) inkubiert (siehe Abb. 3.25). Dabei wuchs der

Wildtyp IBWF E16012 und auch der Hygromycin B-tolerante Stamm gut auf dem Vollmedium **M2**, wenn auch die Wachstumsgeschwindigkeit von IBWF E16012HT vergleichsweise geringer war. Während bei diesem Stamm auch Wachstum auf dem Selektionsmedium **M20** zu beobachten war, konnte der Wildtyp hingegen nicht auf **M20** mit 100 µg/ml Hygromycin B wachsen.

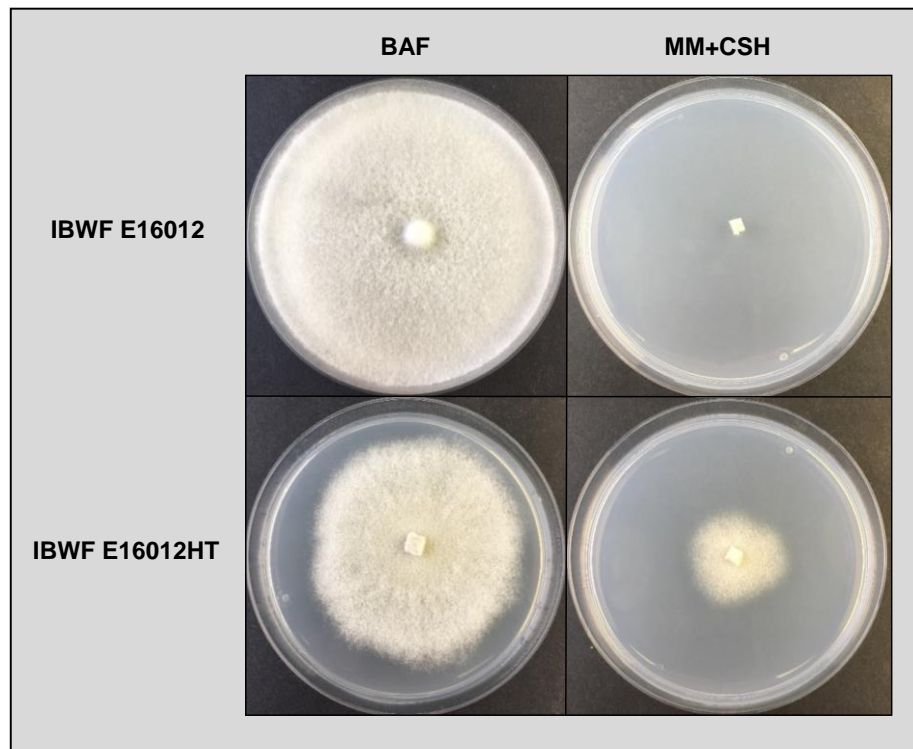


Abb. 3.25: Plattenwachstumstest mit dem *E. lata*-Wildtyp IBWF E16012 und einem Hygromycin B toleranten Stamm IBWF E16012HT auf den Medien BAF (**M2**) und MM+CSH (**M20**) mit 100 µg/ml Hygromycin B nach einer Inkubationszeit von 12 Tagen bei RT.

Um diese Toleranz gegenüber Hygromycin B und anderen Fungiziden näher zu charakterisieren, wurden weitere Wachstumstests durchgeführt (siehe Anhang, Kapitel 7.5). Dazu wurden die beiden Stämme auf Minimalmedium (**M19**) mit verschiedenen Fungiziden für 12 Tage bei RT inkubiert. Getestet wurden die Fungizide Hygromycin B, Geneticin (G418), Glufosinat-Ammonium, Blastocidin, Tebuconazol und Pyraclostrobin mit den Konzentrationen 50, 100, 150 und 200 µg/ml. Die Kontrolle wurde auf **M19** ohne zusätzliche Fungizide (0 µg/ml) durchgeführt. Da der Wildtyp IBWF E16012 bei diesen Konzentrationen nicht sensitiv auf Glufosinat-Ammonium und Blastocidin reagierte, konnten diese Antibiotika nicht zur Selektion von Transformanten verwendet werden und wurden nicht in der Abbildung dargestellt. Neben dem Wachstum des Stamms IBWF E16012HT bei einer Konzentration von 50 und 100 µg/ml Hygromycin B, war der Stamm zusätzlich bis zu einer Konzentration von 150 µg/ml tolerant gegenüber Geneticin G418. Auf den Medien mit den Fungiziden Tebuconazol und Pyraclostrobin konnten allerdings beide Stämme auch bei einer Konzentration von 50 µg/ml nicht wachsen.

Nach allen bisher durchgeführten Transformationsansätzen fand keine molekularbiologische Manipulation von *E. lata* bzw. eine zielgerichtete Mutagenese statt. Stattdessen konnte ein Hygromycin B-toleranter Stamm selektioniert werden, der auch gegenüber einem zweiten Aminoglykosid Geneticin G418 tolerant ist. Bei einer *Southern Blot* Analyse wurde zudem herausgefunden, dass dieser Stamm nicht die Resistenzkassette HPT in seinem Genom trägt. Die Gründe für diese Hygromycin B-Toleranz sind also nicht auf das Hygromycin B-Phosphotransferase Gen *hpt* zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Transformationsmethode für *E. lata* etabliert werden.

3.3 Untersuchungen zu antagonistischen Pilzstämmen und deren wachstumsinhibierenden Naturstoffen

In den folgenden Kapiteln 3.3.1-3.3.3 werden Ergebnisse von der Untersuchung verschiedener Pilzstämmen mit einer antagonistischen Wirkung auf *E. lata*, sowie die Identifizierung und Isolierung von antifungischen Sekundärmetaboliten zusammengefasst. Im Anschluss wurden diese Naturstoffe biologisch charakterisiert (siehe Kapitel 3.3.4). In einem *in vivo Vitis shoot* assay wurden die potentiellen Antagonisten schließlich auf ihre Fähigkeit zur Besiedlung einer Weinpflanze untersucht und das Potential besitzen das Wachstum des Weinrebenpathogens einzuschränken (siehe Kapitel 3.3.5).

3.3.1 Konfrontationsassay zur Identifizierung potentieller Antagonisten

Das Plattenkonfrontationsassay wurde durchgeführt, wie in 2.3.6 beschrieben. Die Ergebnisse der jeweiligen Pilzstämmen das Myzelwachstum von *E. lata* zu hemmen, werden im Anhang unter Kapitel 7.2.1 tabellarisch dargestellt. Bei der Untersuchung von 344 Endophyten konnten 21 Stämme identifiziert werden, die das Myzelwachstum von *E. lata* inhibieren. Diese Beobachtung konnte auch bei 11 von 202 getesteten Basidiomyceten gemacht werden. Demnach zeigten 5,86 % aller untersuchten Pilzstämmen das Potential zur Wachstumseinschränkung von *E. lata* im *in vitro* Assay. In Abb. 3.26 sind einige Ergebnisse des Plattenkonfrontationsassay gezeigt. Im darauffolgenden Schritt wurden die Pilzstämmen fermentiert und auf antifungische Sekundärmetabolite untersucht. Bei den Stämmen IBWF E12135, IBWF E99338, IBWF E99301 wurden antifungische Naturstoffe identifiziert, die im Anschluss isoliert wurden. Der Stamm IBWF E99255b wurde von ██████████ in ihrer Bachelorarbeit bearbeitet (Metzger, 2018). Die aus IBWF E99255b isolierten Sekundärmetabolite sind in dieser Arbeit nicht gezeigt.

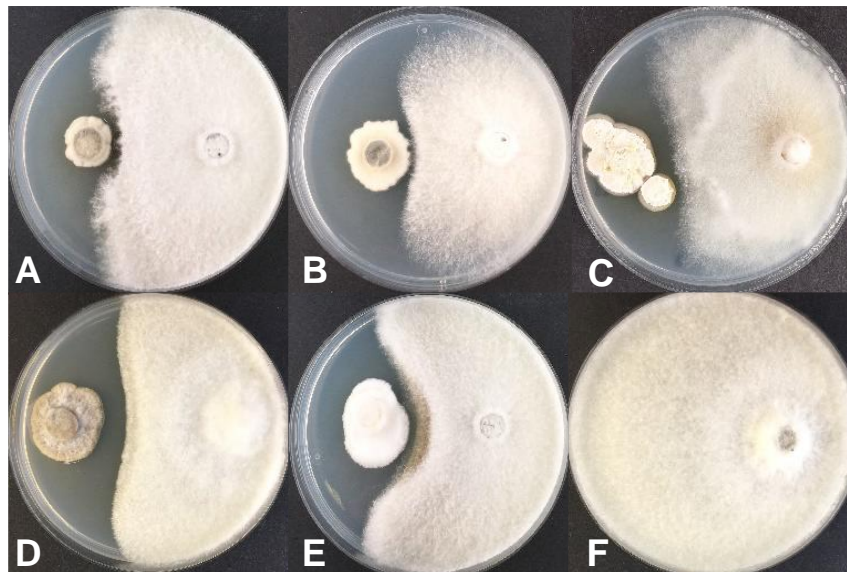


Abb. 3.26: Konfrontationsassay mit Pilzstämmen, die das Myzelwachstum von *Eutypa lata* inhibieren. Die Aufnahmen der Platten wurden nach 8 Tagen Co-Inkubation gemacht. Maßstab: 1:3. Links sind jeweils die Antagonisten und rechts *Eutypa lata* IBWF E16012 zu sehen. **A:** IBWF E12135. **B:** IBWF E99338. **C:** IBWF E99301. **D:** IBWF E99255b. **E:** IBWF 022-09. **F:** Negativkontrolle mit *Eutypa lata* IBWF E16012.

3.3.2 Fermentation der Antagonisten und Isolierung antifungischer Naturstoffe

3.3.2.1 Sekundärmetabolite aus IBWF E12135

Der Ascomycet IBWF E12135 gehört zur Familie der Mycosphaerellaceae. Die ITS-Sequenz weist eine 100 %ige Homologie zu den Spezies *Pseudocercospora tibouchinae* CBS 116462, *Amycosphaerella africana* CBS 116154 und *Mycosphaerella aurantia* CBS 110500 auf, wodurch keine eindeutige Artbestimmung erfolgen konnte. Die artspezifischen Regionen ACT und LSU der genannten Organismen enthalten ebenfalls keine Sequenzunterschiede im Vergleich zum Stamm IBWF E12135. Die Sequenzen der ITS-, ACT- und LSU-Regionen von IBWF E12135 sind im Anhang unter Kapitel 7.7.3-7.7.5 gezeigt. Da der Stamm auf artifiziellem Medium nicht in der Lage ist Konidiosporen zu produzieren, konnte keine morphologische Artbestimmung durchgeführt werden.

Der Stamm IBWF E12135 hemmte im Plattenkonfrontationsassay das Myzelwachstum von *E. lata* (siehe Abb. 3.26). Nach einer Fermentation im 500 ml-Maßstab (siehe 2.3.1) wurde im Rohextrakt des Kulturfiltrats ein rötlicher Naturstoff identifiziert, der für diese antifungische Aktivität verantwortlich war. Die anschließende Fermentation des Pilzes im größeren Maßstab und die Isolierung des Naturstoffs wurde in Zusammenarbeit mit [REDACTED] im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt (Hitzler, 2017).

3.3.2.1.1 Fermentation von IBWF E12135

Da der Stamm IBWF E12135 während einer Fermentation im 20 l-Maßstab keine antifungischen Naturstoffe produzierte, wurden sechs 5 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane für die Fermentation verwendet. Die Kolben waren jeweils mit 2 l HMG-Medium **M9** gefüllt. In Abb. 3.27 ist das Fermentationsdiagramm von IBWF E12135 verändert nach Hitzler (2017) dargestellt.

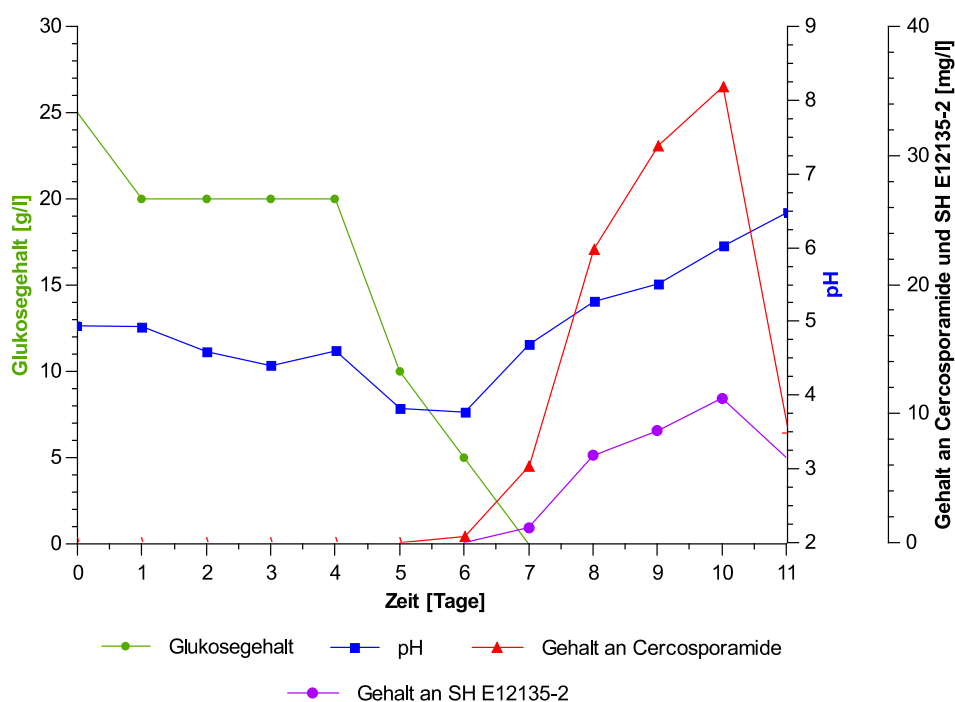


Abb. 3.27: Fermentation von IBWF E12135 im 2 l-Maßstab in **M9** Fermentationsdiagramm verändert nach Hitzler (2017).

Nach sieben Tagen Inkubation war die freie Glukose vollständig verbraucht und der pH-Wert schwankte während der gesamten Fermentation zwischen 4,0 und 6,5. Das Myzeltrockengewicht stieg an und variierte aufgrund von inhomogenem Wachstum. Es erreichte am Ende der Fermentation einen Wert von 7 g/l. Die Naturstoffe Cercosporamide (**29**) und SH E12135-2 (**30**) konnten an Tag sechs bzw. Tag sieben zum ersten Mal im Kulturfiltrat nachgewiesen werden. Die Konzentration von **29** stieg bis Tag zehn auf 35 mg/l und sank bis zum nächsten Tag auf einen Wert von 8 mg/l. Aus diesem Grund wurde die Fermentation an diesem Tag beendet. Die Verbindung **30** erreichte an Tag elf eine Konzentration von mehr als 6 mg/l.

3.3.2.1.2 Isolierung von Cercosporamide und SH E12135-2

Nach Beenden der Fermentation wurde das Kulturfiltrat vom Myzel separiert und mit EE extrahiert. Danach erfolgte die Aufarbeitung, die in Abb. 3.28 dargestellt ist. Aus 8,3 l

Kulturfiltrat wurden 690 mg Rohextrakt gewonnen. Daraus wurden schließlich 10,5 mg Cercosporamide (**29**) und 3,5 mg SH E12135-2 (**30**) isoliert.

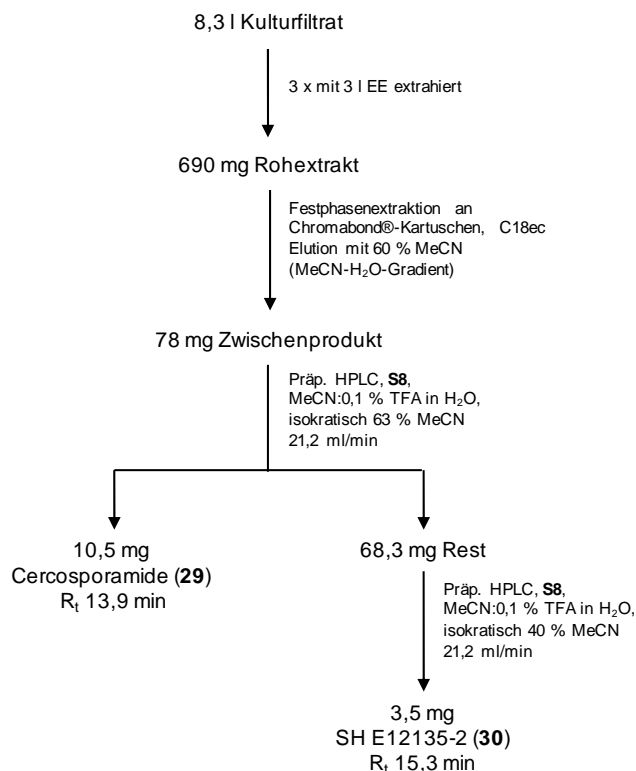


Abb. 3.28: Aufreinigungsschema von Cercosporamide und SH E12135-2 aus 8,3 l Kulturfiltrat von 6 x 2 l-Fermentationen in 5 l Schüttelkolben von IBWF E12135 in **M9** verändert nach Hitzler (2017).

3.3.2.1.3 Physikalisch-chemische Charakterisierung von Cercosporamide und SH E12135-2

Cercosporamide (**29**, siehe Abb. 3.29) hat die Grundstruktur eines Dibenzofurans. **29** wurde erstmals aus dem Pilz *Cercosporidium henningsii* isoliert und ist bekannt für sein phytotoxisches und breites, antifungisches Wirkspektrum (Conover *et al.*, 1992; Sugawara *et al.*, 1991). **29** ist ein rötlich-brauner Feststoff, der gut in MeCN löslich ist. Das Molekül hat die Summenformel C₁₆H₁₃NO₇ und besitzt ein Molekulargewicht von 331 g/mol.

Die Struktur der Verbindung SH E12135-2 (**30**) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. **30** ist ein brauner Feststoff, der gut in MeCN löslich ist. Laut dem Massenspektrum hat dieser Naturstoff ein Molekulargewicht von 390 g/mol.

Die HPLC-Chromatogramme, UV/Vis- sowie die Massenspektren von **29** und **30** sind im Anhang unter Kapitel 7.1.5 verzeichnet.

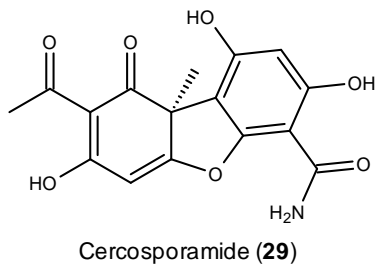


Abb. 3.29: Strukturformel von Cercosporamide.

3.3.2.2 Sekundärmetabolite aus IBWF E99338

Der Stamm IBWF E99338 wies im Plattenkonfrontationsassay gegen *E. lata* eine antifungische Aktivität auf (siehe Abb. 3.26). Bei einer Untersuchung mit dem Kulturfiltratextrakt von IBWF E99338 konnte diese Beobachtung bestätigt werden.

Zur Bestimmung der Art wurde die artspezifische ITS-Region sequenziert. Sie ist unter 7.7.6 verzeichnet und stimmt zu 99,6 % mit der Sequenz (Genbank Accession Nr.: JN120360.1) eines nicht identifizierten Ascomyceten überein, der eng mit der Familie der Leptosphaeriaceae verwandt ist. Eine hohe Übereinstimmung mit 452 von 459 bp (98,47 %) besteht auch mit dem Stamm *Acicuseptoria rumicis* CBS 522.78 (Genbank Accession Nr.: KF251144.1). Die Sequenzen der LSU- und EF1a-Region unterstützen diese Annahme. Sie sind unter 7.7.7-7.7.8 zu finden. Die Agarkultur wies keine besonderen morphologischen Merkmale auf, die für eine Bestimmung herangezogen werden könnten.

3.3.2.2.1 Fermentation von IBWF E99338

Der Stamm IBWF E99338 wurde im 20 l-Maßstab für sieben Tage in **M9** fermentiert. In Abb. 3.30 ist das Fermentationsdiagramm von IBWF E99338 dargestellt. Bis zum Ende der Fermentation stieg das Myzeltrockengewicht auf 8 g/l an, der pH-Wert pendelte sich auf ca. 4,75 ein und der Gehalt der frei verfügbaren Glukose betrug 5 g/l. Am Tag fünf konnte erstmals die Produktion von Fusidienol A (**31**) mit einem Gehalt von 15 mg/l im Kulturfiltrat nachgewiesen werden. Da die Konzentration von **31** am Tag sechs ihr Maximum mit 16 mg/l erreichte und am Tag sieben auf 11,5 mg/l sank, wurde die Fermentation an diesem Tag beendet.

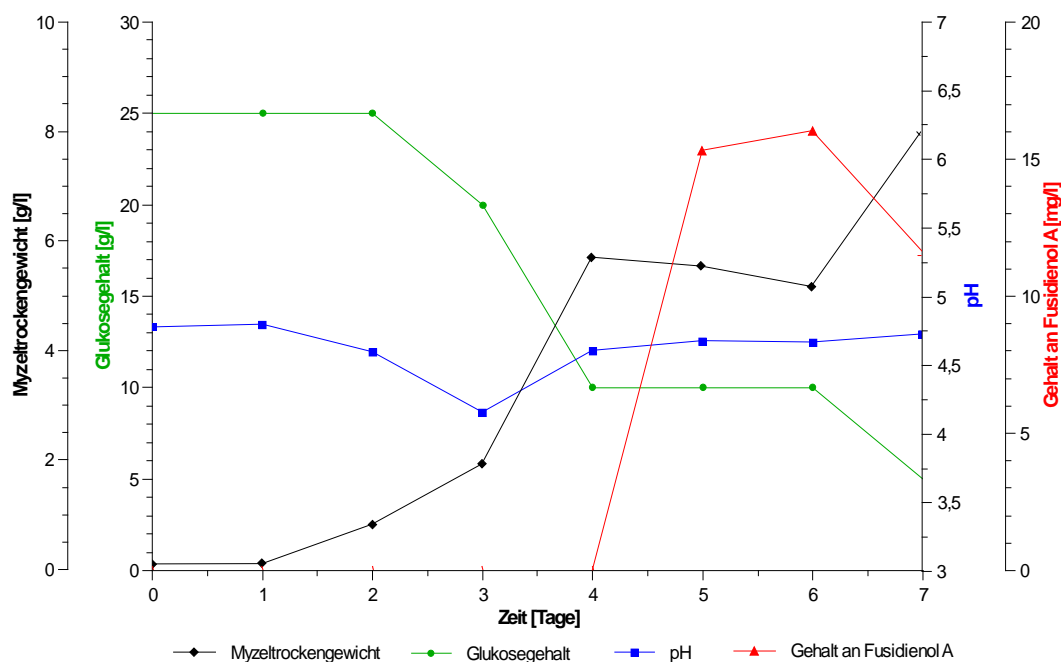


Abb. 3.30: Fermentation von IBWF E99338 im 20 l-Maßstab in M9.

3.3.2.2.2 Isolierung von Fusidienol A, Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate und Monodictyxanthone

Nach Beenden der Fermentation wurde das Kulturfiltrat vom Myzel separiert und dreimal mit 5 l EE extrahiert. Aus 16,5 l Kulturfiltrat wurden insgesamt 910 mg Rohextrakt gewonnen. Nach einer Festphasenextraktion des Rohextrakts an einer Bond Elut Chromabond®-Kartusche zeigte ein Zwischenprodukt (120 mg) in einem Screening gegen das Myzelwachstum von *E. lata* weiterhin eine antifungische Aktivität. Aus diesem Zwischenprodukt wurden mittels präparativer HPLC 17,5 mg Fusidienol A (**31**) und 3,3 mg FS E99338-2 isoliert. Bei der Strukturaufklärung von FS E99338-2 stellte sich heraus, dass es sich um ein schlecht trennbares Gemisch von zwei strukturell sehr ähnlichen Naturstoffen handelte. Aufgrund von unterschiedlichen NMR-Spektren wurde die Verbindung Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthon-1-carboxylat (**32**) als Hauptkomponente und Monodictyxanthone (**33**) als Nebenkomponente identifiziert. Das Aufreinigungsschema ist in Abb. 3.31 dargestellt.

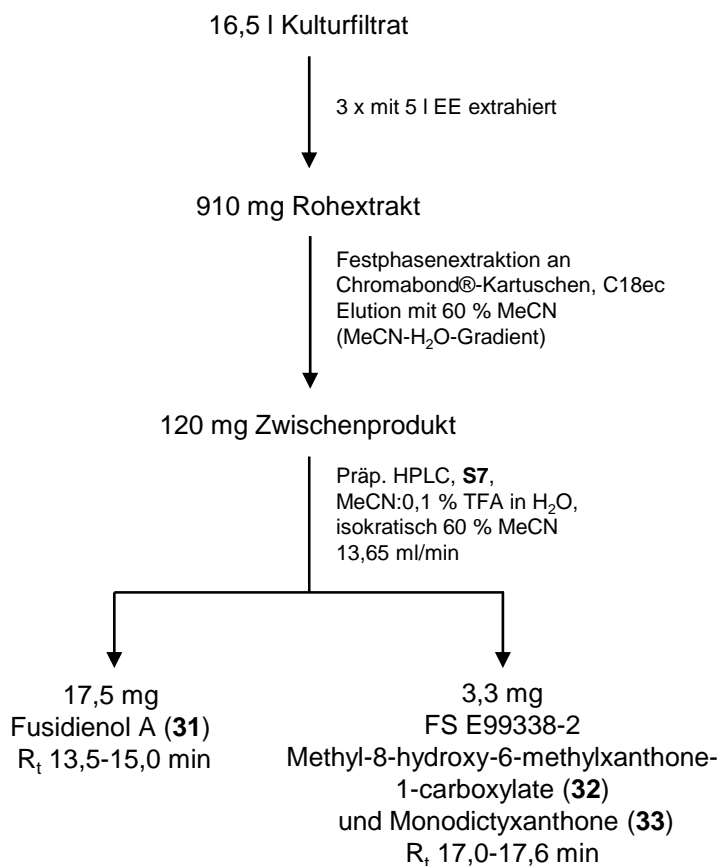


Abb. 3.31: Aufreinigungsschema von Fusidienol A, Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate und Monodictyxanthone aus 16,5 l Kulturfiltrat einer 20 l-Fermentation von IBWF E99338 in **M9**.

3.3.2.2.3 Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Sekundärmetabolite

Die Strukturformeln von Fusidienol A (**31**), Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate (**32**) und Monodictyxanthone (**33**) werden in der Abb. 3.32 gezeigt. Die HPLC-Chromatogramme, UV- und Massenspektren von **31** und dem Gemisch FS E99338-2 sind in Kapitel 7.1.6 dargestellt.

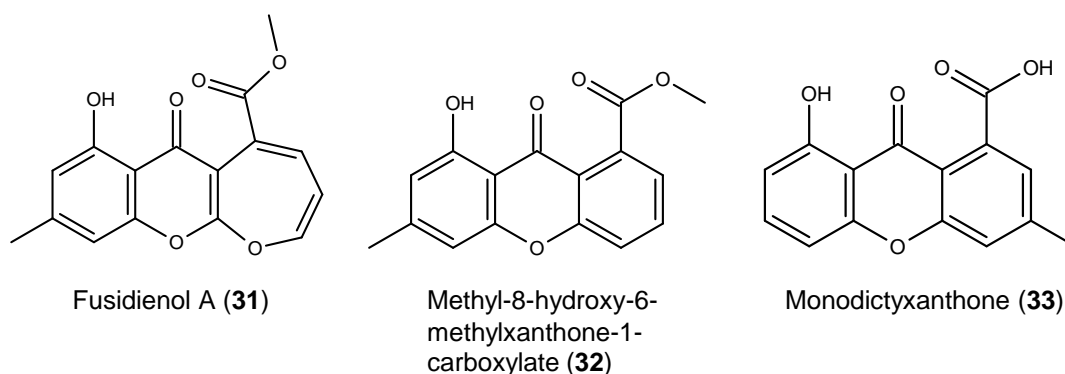


Abb. 3.32: Strukturformel von Fusidienol A, Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate und Monodictyxanthone.

Fusidienol A (**31**) wurde erstmals als Sekundärmetabolit aus *Phoma* sp. beschrieben (Singh *et al.*, 1997) und ist ein brauner Feststoff, der gut in MeCN löslich ist. **31** hat ein Molekulargewicht von 300 g/mol und die Summenformel lautet $C_{16}H_{12}O_6$.

Das schlecht trennbare Gemisch FS E99338-2 wurde als brauner Feststoff erhalten, das in MeCN gut löslich ist. In diesem Gemisch wurde die Verbindung **32** identifiziert, die von Kachi und Sassa 1986 erstmals aus dem phytopathogenen Pilz *Monilinia fructicola* isoliert wurde. Das Molekül hat ein Molekulargewicht von 284 g/mol und hat die Zusammensetzung $C_{16}H_{12}O_5$. Die zweite Verbindung, die sich in dem Gemisch befand, wurde als Monodictyxanthone (**33**) identifiziert. Dieser Naturstoff wurde zum ersten Mal aus dem Pilz *Monodictys putredinis* isoliert, was im Jahr 2007 von Krick *et al.* publiziert wurde. Dieser Organismus besiedelt marine Algen oder ist mit ihnen assoziiert. Die Summenformel von **33** lautet $C_{15}H_{10}O_5$ und das Molekül hat ein Molekulargewicht von 270 g/mol.

3.3.2.3 Sekundärmetabolite aus *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301

In einem Plattenkonfrontationsassay konnte beobachtet werden, dass der Stamm IBWF E99301 das Myzelwachstum von *E. lata* inhibierte (siehe Abb. 3.26). Nach einer Fermentation des Stamms im 500 ml-Maßstab wies auch das Rohextrakt des Kulturfiltrats in einem Screening gegen *E. lata* antifungische Eigenschaften auf (siehe 2.3.7). Anschließend wurden in Zusammenarbeit mit [REDACTED] im Rahmen ihrer Bachelorarbeit die antifungischen Sekundärmetabolite aus dem Stamm IBWF E99301 isoliert (Bauer, 2017).

Bei dem Stamm IBWF E99301 handelt es sich um *Pseudogymnoascus pannorum*. Die ITS-Sequenz von IBWF E99301 zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung mit der artspezifischen ITS-Region von *Pseudogymnoascus pannorum* var. *pannorum* CBS 103.53 (Genbank Accession Nr.: MH857112.1). Die sequenzierte ITS-Region von IBWF E99301 ist im Anhang in Kapitel 7.7.9 hinterlegt.

3.3.2.3.1 Fermentation von *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301

Da bei einer 20 l-Fermentation von *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301 im Kulturfiltrat keine Naturstoffe mit antifungischer Aktivität gegen *E. lata* nachgewiesen werden konnten, wurde der Stamm je dreimal in 2 l **M9** bei RT in 5 l Erlenmeyerkolben fermentiert. In Abb. 3.33 ist das Fermentationsdiagramm von IBWF E99301 dargestellt. Nach sechs-tägiger Inkubation war die freie Glukose verbraucht und das Myzeltrockengewicht erreichte einen Wert von ca. 6 g/l. Der pH-Wert lag zu Beginn der Fermentation bei fünf, sank bis Tag vier auf 4,25 und stieg bis Tag sechs auf über 6. Die höchste Konzentration der Naturstoffe Pannorumin A (**34**, 5,5 mg/l) und Pannorumin B (**35**, 2,8 mg/l) wurde im Kulturfiltrat an Tag fünf detektiert und

sank signifikant bis zur nächsten Messung an Tag sechs. Der Gehalt an Pannorumin C (**36**) stieg hingegen von 0,8 mg/l (Tag fünf) auf 2,0 mg/l (Tag sechs). Aus diesem Grund wurde die Fermentation beendet und der Ansatz wurde erneut durchgeführt. Bei der Nachfermentation wurde die Fermentation an Tag fünf mit der höchsten Naturstoffkonzentration beendet.

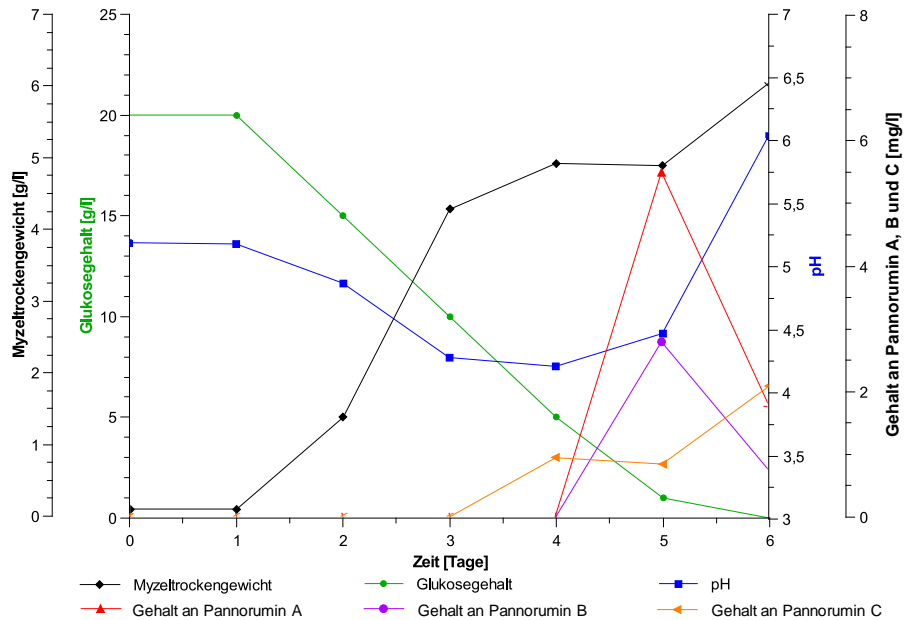


Abb. 3.33: Fermentation von *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301 im 2 l-Maßstab in **M9**.

3.3.2.3.2 Isolierung von Pannorumin A-C

Nach Beenden der Fermentation wurden die Sekundärmetabolite Pannorumin A-C (**34-36**) aus dem Kulturfiltrat von IBWF E99301 isoliert. Das Aufreinigungsschema ist in Abb. 3.34 dargestellt.

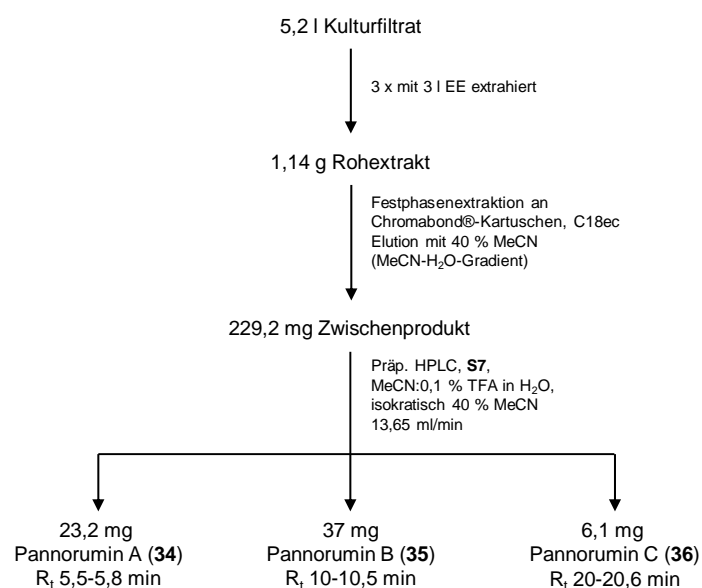


Abb. 3.34: Aufreinigungsschema von Pannorumin A, B und C aus 5,2 l Kulturfiltrat von 3 x 2 l-Fermentationen in 5 l Erlenmeyerkolben von *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301 in **M9**.

Die Kulturbrühe der Nachfermentation wurde filtriert und das Kulturfiltrat (5,2 l) wurde mit EE extrahiert. Im nächsten Schritt wurden 1,14 g Rohextrakt mittels Festphasenextraktion an einer Chromabond®-Kartusche fraktioniert. Aus 229,2 mg eines Zwischenprodukts wurden anschließend mit Hilfe von präparativer HPLC 23,2 mg Pannorumin A (**34**), 37 mg Pannorumin B (**35**) und 6,1 mg Pannorumin C (**36**) isoliert.

3.3.2.3.3 Physikalisch-chemische Charakterisierung von Pannorumin A, B und C

Pannorumin A, B und C sind bisher nicht beschriebene Verbindungen. Ihre Strukturformeln werden in Abb. 3.35 gezeigt und unterscheiden sich nur an zwei Positionen zwischen einer Hydroxygruppe und einer Carbonylgruppe. Pannorumin A (**34**) ist ein brauner Feststoff, der gut in MeCN löslich ist. Die Verbindung **34** hat ein Molekulargewicht von 359 g/mol und eine chemische Zusammensetzung von $C_{16}H_{25}NO_8$. Aufgrund der Strukturähnlichkeit haben Pannorumin B (**35**, $C_{16}H_{23}NO_8$, 357 g/mol) und Pannorumin C (**36**, $C_{16}H_{21}NO_8$, 355 g/mol) die gleichen physikochemischen Eigenschaften wie **34**. Sie lösen sich ebenfalls gut in MeCN und sind braune Feststoffe. Die Strukturaufklärung wurde durch die Arbeitsgruppe von [REDACTED] durchgeföhrt. Die HPLC-Analyse der drei Verbindungen sind zusammen mit den UV/Vis- und Massenspektren in Abb. 7.80 bis Abb. 7.90 im Anhang unter 7.1.7 zu finden.

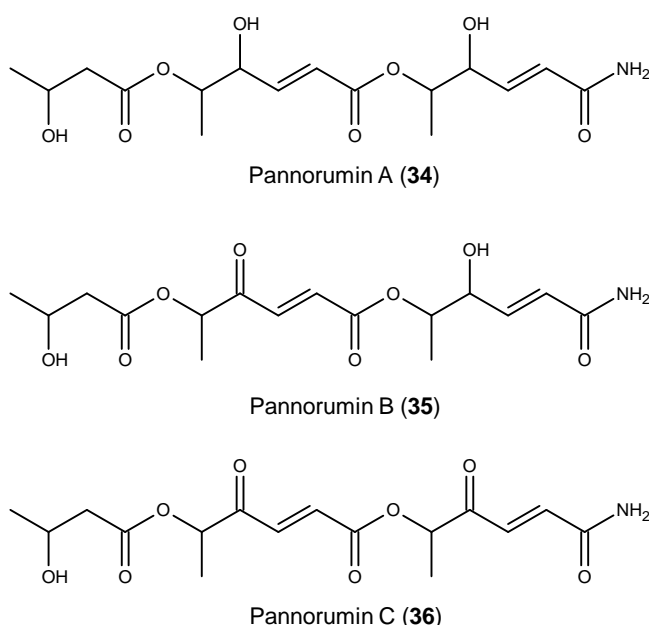


Abb. 3.35: Strukturformeln von Pannorumin A, B und C.

3.3.2.3.4 Stabilität von Pannorumin A, B und C nach Reaktion mit L-Cystein

Der L-Cystein-Test zur Untersuchung der Stabilität von Pannorumin A, B und C wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.5.8 beschrieben. Pannorumin A (**34**) zeigte keine Reaktion mit L-Cystein und blieb stabil. Durch den Vergleich der beiden Integrale konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Im Vergleich dazu reagierten Pannorumin B (**35**) und Pannorumin C (**36**) mit L-Cystein vollständig, sodass die beiden Naturstoffe im Anschluss mittels HPLC nicht detektiert werden konnten. Stattdessen wurden Abbauprodukte oder Addukte gemessen, die nicht näher bestimmt wurden. Die Ergebnisse der HPLC-Analysen sind in Abb. 3.36 bis Abb. 3.38 dargestellt.

Pannorumin C (**36**) wies eine starke antifungische Aktivität gegen *E. lata* auf und inhibierte das Myzelwachstum ab einer Konzentration von 15 µg/ml (siehe Tab. 3.6). Um zu untersuchen, ob **36** auch nach einer Inkubation mit L-Cystein noch aktiv gegen *E. lata* ist, wurde nach der Abreaktion ein Reihenverdünnungstest durchgeführt. Nach der Inkubation mit L-Cystein war **36** jedoch bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml nicht mehr gegen *E. lata* aktiv.

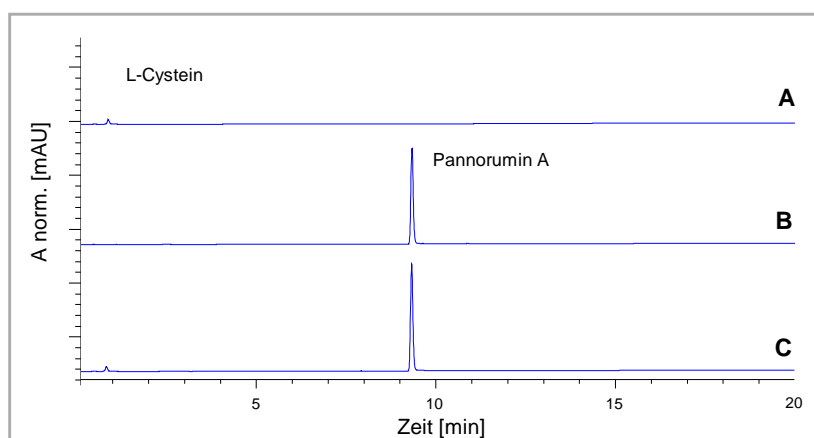


Abb. 3.36: Stabilität von Pannorumin A nach 6 h Inkubation mit L-Cystein in äquimolarem Verhältnis bei RT. HPLC/MS, Gradient **G1**, 210 nm. **A:** Cystein. **B:** Pannorumin A. **C:** Pannorumin A+L-Cystein.

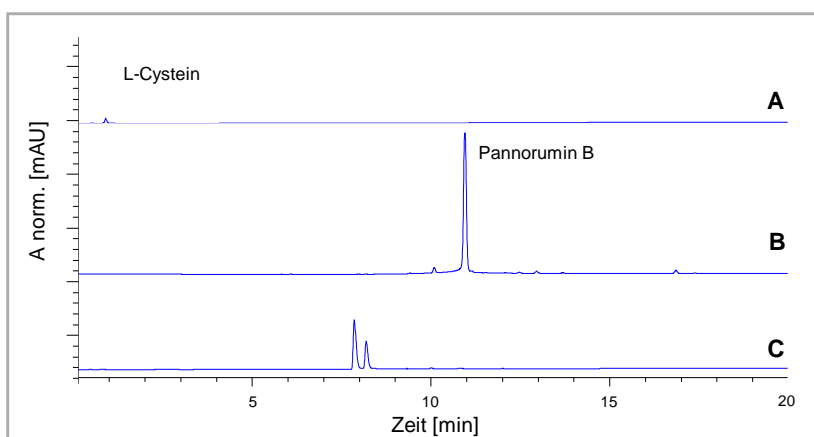


Abb. 3.37: Stabilität von Pannorumin B nach 6 h Inkubation mit L-Cystein in äquimolarem Verhältnis bei RT. HPLC/MS, Gradient **G1**, 210 nm. **A:** Cystein. **B:** Pannorumin B. **C:** Pannorumin B+L-Cystein.

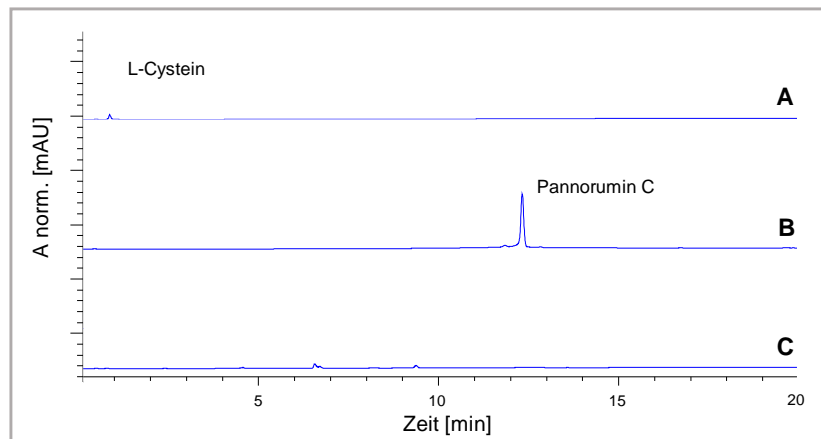


Abb. 3.38: Stabilität von Pannorumin C nach 6 h Inkubation mit L-Cystein in äquimolarem Verhältnis bei RT. HPLC/MS, Gradient G1, 210 nm. **A:** Cystein. **B:** Pannorumin C. **C:** Pannorumin C+L-Cystein.

3.3.3 Antifungische Rohextrakte, die das Wachstum von *Eutypa lata* hemmen

Zusätzlich zu den Plattenkonfrontationsassays wurden Rohextrakte von verschiedenen Pilzstämmen gegen das Myzelwachstum von *E. lata* eingesetzt, um wachstumshemmende Naturstoffe zu identifizieren. Die Durchführung ist in Kapitel 2.3.7 beschrieben und die Ergebnisse sind im Anhang unter Kapitel 7.2.2 zusammengefasst. Dabei zeigten sieben Rohextrakte eine starke Wachstumshemmung ab einer Konzentration von 125 µg/ml.

Der Stamm IBWF 144-09 wurde durch die Sequenzierung der ITS-Region zur Gattung *Pseudeurotium* sp. zugeordnet. Bei dem Sequenzvergleich konnte eine 100%ige Übereinstimmung mit den Stämmen *Pseudeurotium bakeri* CBS 128112 und *Pseudeurotium zonatum* CBS 129096 nachgewiesen werden. Die ITS-Sequenz ist unter 7.7.10 verzeichnet. Im Rohextrakt von IBWF 144-09 wurde Asperfuran (**37**, C₁₃H₁₄O₃, 218 g/mol, Abb. 3.39) als antifungischer Naturstoff detektiert. Durch den Vergleich mit einem internen Standard wurde **37** in einer HPLC-Analyse des Kulturfiltrats identifiziert. Da **37** bereits aus *Aspergillus flavus* isoliert wurde (Pfefferle *et al.*, 1990), konnte der Naturstoff der Reinsubstanzsammlung des IBWF entnommen werden, um die MHK gegenüber *E. lata* zu bestimmen. Die biologische Charakterisierung von Asperfuran (**37**) ist in Kapitel 3.3.4 beschrieben. Die Bearbeitung des Stamms IBWF 144-09 wurde in Zusammenarbeit mit [REDACTED] durchgeführt (Bauer *et al.*, 2017).

Das Rohextrakt aus dem Kulturfiltrat vom Stamm IBWF 022-09, der zur Gattung *Hypoxylon* sp. zugeordnet wurde, war bereits ab einer Konzentration von 50 µg/ml gegen das Myzel von *E. lata* aktiv. In diesem Rohextrakt wurde Sporothriolide (**38**, C₁₃H₁₈O₄, 238 g/mol, Abb. 3.39) nachgewiesen, dass für die antifungische Aktivität verantwortlich ist. **38** konnte allerdings nicht näher biologisch charakterisiert werden. Bei den fünf weiteren als aktiv identifizierten Rohextrakten konnten keine Verbindungen nachgewiesen werden, die eine Wachstumshemmung verursachten. Auch nach wiederholter Fermentation der Pilzstämmen

wurden weder im Kulturfiltrat noch im Myzel Sekundärmetabolite nachgewiesen, die gegen das Myzelwachstum von *E. lata* wirken.

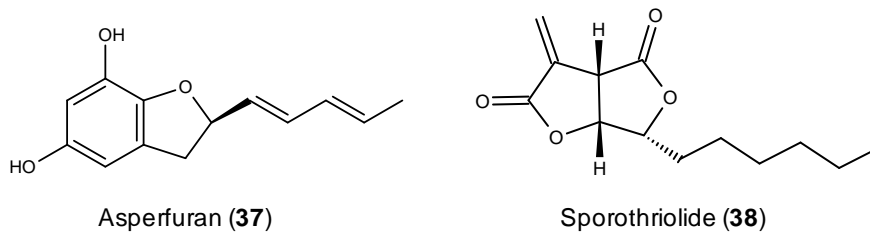


Abb. 3.39: Strukturformel von Asperfuran und Sporothriolide.

3.3.4 Biologische Charakterisierung der antifungischen Naturstoffe

Nachdem die antifungischen Naturstoffe identifiziert und isoliert werden konnten, wurde ihr bioaktives Potential bestimmt. In den folgenden Kapiteln 3.3.4.1 bis 3.3.4.4 wurde das antimikrobielle, phytotoxische und zytotoxische Wirkungsspektrum dieser Verbindungen analysiert.

3.3.4.1 Antimikrobielles Wirkungsspektrum

Der Reihenverdünnungstest zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde durchgeführt, wie unter 2.5.2 beschrieben. In Tab. 3.6 sind die MHK-Werte der Verbindungen gegen verschiedene Pilz- und Bakterienstämme verzeichnet.

Tab. 3.6: Minimale Hemmkonzentration der isolierten Naturstoffe gegen Pilz- und Bakterienstämme.

Organismus	MHK [$\mu\text{g/ml}$]							Cicl.	Tetr.
	29	31	34	35	36	37			
Pilze									
<i>Eutypa lata</i>	20	15	>50	>50	15	25	20	n.t.	
<i>Candida albicans</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	5	n.t.	
<i>Eremothecium coryli</i>	10	>50	>50	10	5	>50	5	n.t.	
<i>Rhizomucor miehei</i>	>50	>50	>50	>50	>50	50	10	n.t.	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	15	40	>50	>50	>50	50	10	n.t.	
<i>Paecilomyces variotii</i>	5	20	>50	>50	>50	>50	10	n.t.	
Bakterien									
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	>50	>50	>50	5	>50	>50	n.t.	5	
<i>Micrococcus luteus</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	10	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	1	
<i>Escherichia coli</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	1	
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	1	

Cicl.: Ciclopirox; Tetr.: Tetracyclin; n.t.: nicht getestet

Das Myzelwachstum von *Eutypa lata* wurde erfolgreich durch die Verbindungen Cercosporamide (**29**, ab 20 µg/ml), Fusidienol A (**31**, ab 15 µg/ml), Pannorumin C (**36**, ab 15 µg/ml) und Asperfuran (**37**, ab 25 µg/ml) inhibiert. Ciclopirox wurde dabei als Positivkontrolle eingesetzt und war ab 20 µg/ml aktiv. Die Naturstoffe Pannorumin A (**34**) und Pannorumin B (**35**) zeigten hingegen keine Wachstumshemmung bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml.

Cercosporamide (**29**) wies zusätzlich ein antifungisches Potential gegen die Pilzstämmen *Eremothecium coryli* (10 µg/ml), *Penicillium chrysogenum* (15 µg/ml) und *Paecilomyces variotii* (5 µg/ml) auf. Fusidienol A (**31**) zeigte ebenfalls eine Aktivität gegen *Penicillium chrysogenum* (40 µg/ml) und *Paecilomyces variotii* (20 µg/ml). Eine schwache Wachstumsinhibition bei *Rhizomucor miehei* und *Penicillium chrysogenum* konnte ab einer Konzentration von 50 µg/ml durch Asperfuran (**37**) beobachtet werden. Die beiden neuen Verbindungen Pannorumin B (**35**) und Pannorumin C (**36**) hemmten das Wachstum von *Eremothecium coryli* bei 10 µg/ml bzw. 5 µg/ml. **35** zeigte zudem als einzige der getesteten Verbindungen eine starke antibakterielle Aktivität beginnend ab einer Konzentration von 5 µg/ml gegen das Bakterium *Aneurinibacillus migulanus*. Das Wachstum der Bakterien *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Escherichia coli* und *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* konnte bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml nicht durch die Verbindungen **29**, **34**, **35**, **36** und **37** inhibiert werden.

3.3.4.2 Sporenkeimungshemmung

Der Test zur Sporenkeimungshemmung wurde durchgeführt, wie unter 2.5.3 beschrieben. Die Ergebnisse der Sporenkeimungshemmung der isolierten Naturstoffe ist in Tab. 3.7 zusammengefasst. Bei diesem Test zeigten besonders die Verbindungen Cercosporamide (**29**) und Fusidienol A (**31**) ihre antifungischen Eigenschaften. Sie hinderten die Sporenkeimung von *Pyricularia oryzae* in H₂O ab einer Konzentration von 5 µg/ml und in CM-Medium (**M3**) ab 10 µg/ml. Die Sporen von *Botrytis cinerea* wurden durch **29** beginnend bei 50 µg/ml an der Keimung gehemmt. Bei *Phytophthora infestans* waren die Sporen nicht in der Lage auszukeimen, wenn sie zusammen mit **29** bei mindestens 25 µg/ml koinkubiert wurden oder **31** mit einer Konzentration von 50 µg/ml ausgesetzt wurden. Pannorumin A (**34**) und B (**35**) wiesen keine sporenkeimenden Eigenschaften bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml gegen *Botrytis cinerea* und *Pyricularia oryzae* auf. Lediglich Pannorumin C (**36**) konnte in H₂O bei 25 µg/ml die Keimung der Sporen von *Pyricularia oryzae* inhibieren.

Tab. 3.7: Sporenkeimungshemmung der isolierten Naturstoffe.

Organismus	MHK [$\mu\text{g/ml}$]						Cicl.
	29	31	34	35	36	37	
<i>Botrytis cinerea</i>	50	>50	>50	>50	>50	>50	5
<i>Phytophthora infestans</i>	25	50	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	20
<i>Pyricularia oryzae</i> (H ₂ O)	5	5	>50	>50	25	>50	5
<i>Pyricularia oryzae</i> (CM)	10	10	>50	>50	>50	>50	5

Cicl.: Ciclopirox; n.t.: nicht getestet

3.3.4.3 Untersuchungen zur Keimungshemmung von Pflanzensamen

Die Keimungshemmung von Pflanzensamen wurde durchgeführt, wie in 2.5.4 beschrieben. In Tab. 3.8 sind die Ergebnisse des Tests zusammengefasst und damit die Wirkung der isolierten Naturstoffe auf das Auskeimen von Pflanzensamen. Während die Verbindungen **31**, **34-36** die Keimung der Pflanzensamen von *Setaria italica*, *Lepidium sativum* und *Agrostis capillaris* bis zu einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ nicht inhibieren konnten, wurde ein verzögertes Wachstum der Pflanzen durch die Einwirkung von Verbindung **29** beobachtet.

Tab. 3.8: Untersuchungen zur Pflanzensamenkeimung der isolierten Naturstoffe. + = starke Keimungshemmung. +/- = leichte Keimungshemmung. >250 = keine Keimungshemmung bis zu einer Konzentration von mindestens 250 $\mu\text{g/ml}$.

Organismus	MHK [$\mu\text{g/ml}$]					
	29	31	34	35	36	37
<i>Setaria italica</i>	+	>250	>250	>250	>250	n.t.
<i>Lepidium sativa</i>	+/-	>250	>250	>250	>250	n.t.
<i>Agrostis capillaris</i>	+	>250	>250	>250	>250	n.t.

n.t.: nicht getestet

3.3.4.4 Zytotoxizität

Die Untersuchungen auf zytotoxische Aktivitäten der isolierten Naturstoffe wurde mit der Zelllinie HeLa-S3 durchgeführt, wie in 2.5.7 beschrieben. In dem Zytotoxizitätstest zeigten die Verbindungen **29**, **31**, **34** und **36** bis zu einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ keine Wirkung in Bezug auf die Vitalität der HeLa-S3-Zellen. Bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ erreichte die Verbindung **35** ihre halbmaximale Hemmung (IC₅₀) gegen die HeLa-S3-Zellen (siehe Tab. 3.9). Die Positivkontrolle Camptothecin hatte dagegen einen IC₅₀-Wert von 1 $\mu\text{g/ml}$.

Tab. 3.9: Untersuchungen zur Zytotoxizität der isolierten Naturstoffe.

Zelllinie	IC50 [$\mu\text{g/ml}$]						Camp.
	29	31	34	35	36	37	
HeLa-S3	>50	>50	>50	10	>50	n.t.	1

Camp.: Camptothecin; n.t.: nicht getestet

3.3.5 *Vitis shoot assay* mit potentiellen Antagonisten

Das *Vitis shoot assay* wurde für jeden Ansatz im Triplikate durchgeführt, wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben. Untersucht wurden dabei die Antagonisten, die im Plattenkonfrontationsassay als wachstumshemmend auf das Myzel von *E. lata* reagierten und aus denen antifungische Sekundärmetabolite isoliert wurden. Um zu überprüfen, ob diese Pilzstämme auch in der Lage sind das Holz der Weinrebe zu besiedeln, wurden sie ohne die Anwesenheit des Pathogens auf einem Rebstück inkubiert. Bei der Auswertung dieses Experiments wurde beobachtet, dass nur der Stamm IBWF 144-09 im Durchschnitt bis zu 10 mm in das Holzgewebe von *Vitis vinifera* cv. ‚Riesling‘ gewachsen war. Die Stämme IBWF E12135, IBWF E99338 und IBWF E99301 konnten dagegen nicht in das Holzgewebe eindringen (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob diese Pilzstämme als Kontrollagenzien gegen die Eutypiose eingesetzt werden können, wurden sie in einem weiteren Experiment zusammen mit *E. lata* IBWF E16012 auf einem Rebstück koinkubiert. In Abb. 3.40 ist die Distanz des Pilzwachstums von der Inokulationsstelle bis in das Holzgewebe zu sehen. Der angezeigte Wert entspricht dabei dem Durchschnitt der Triplikate und ist in mm angegeben. Es wurde das Wachstum von *E. lata* ohne die Einwirkung von Antagonisten (Negativkontrolle IBWF E16012 [K-]) mit der präventiven Behandlung durch die Stämme IBWF E12135, IBWF E99338, IBWF E99301 und IBWF 144-09 verglichen. Nach 30 Tagen konnte das Pathogen ohne die Beteiligung von Antagonisten im Durchschnitt bis zu 20 mm in das Holz vordringen. Mit dem präventiven Einsatz der Antagonisten konnte eine Penetration von *E. lata* nicht verhindert werden. Das Wachstum des Pathogens wurde durch IBWF E12135 (13,3 mm), IBWF E99338 (10 mm), IBWF E99301 (16,6 mm) und IBWF 144-09 (11,6 mm) lediglich etwas eingeschränkt.

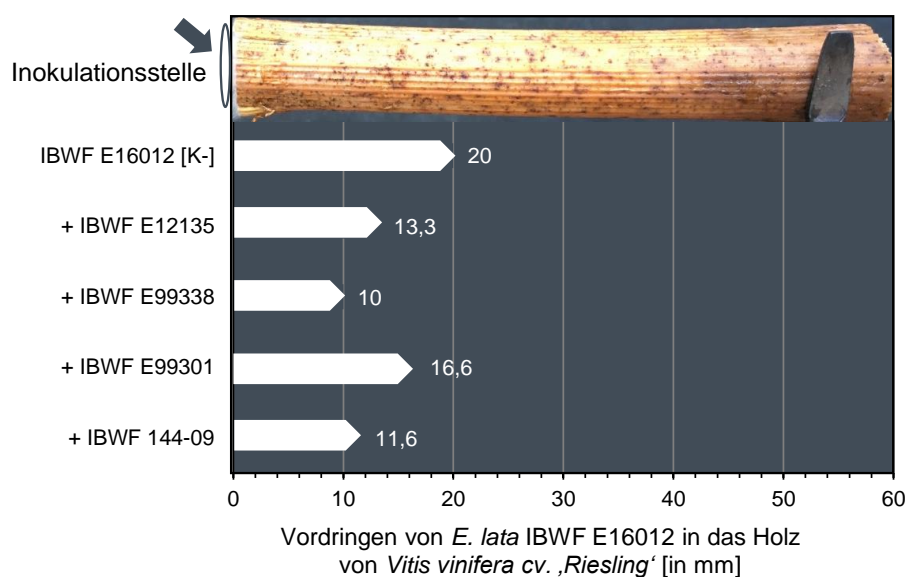


Abb. 3.40: *Vitis shoot assay* mit *Eutypa lata* und potentiellen Antagonisten. Verglichen wurden das Vordringen von *E. lata* in das Holzgewebe von *Vitis vinifera* cv. ‚Riesling‘ ohne die Einwirkung von Antagonisten [K-] mit der präventiven Behandlung durch die Antagonisten.

4 Diskussion

Der rebenpathogene Ascomycet *Eutypa lata* ist der Erreger der Eutypiose. Er verursacht eine mehrjährige Weinrebenerkrankung, die für die Pflanze letal ist. Sie wird in der Literatur auch als *Eutypa dieback* bezeichnet und gehört zu den *grapevine trunk diseases* (GTDs; Bertsch *et al.*, 2013). Es handelt sich um eine ernstzunehmende Infektionserkrankung des Stamms, die im Verlauf langsam zum Absterben der Weinpflanze führt. Da der Aufwand für die Entfernung der abgestorbenen Pflanzen, das erneute anpflanzen von Jungreben sowie der Ausfall durch die verspätete Produktivität der jungen Weinpflanzen enorm hoch sind, ist die Erkrankung und Bekämpfung aus wirtschaftlicher Sicht mit hohen Kosten verbunden. Dementsprechend hat die Erforschung des Pathogens mit seinen Virulenzfaktoren sowie die Suche nach neuen Bekämpfungsmethoden eine große Bedeutung beim Weinrebenschutz.

Von der Infektion bis zum Erscheinen von ersten Symptomen, wodurch die Krankheit letztendlich diagnostiziert werden kann, dauert es mehrere Jahre. Zu den häufigsten Symptomen zählen kleine chlorotische Blätter, verkümmerte neue Triebe, sowie eine keilförmige Nekrose im Stammquerschnitt (siehe Abb. 1.3). Je nach Ausprägung der Symptome werden weitere Wachstumseinschränkungen und Folgeerscheinungen beobachtet. Durch verkümmerte Triebe und Blätter fehlt der Pflanze der benötigte Energieeintrag um Früchte zu produzieren. Die Folge ist ein reduzierter Ernteertrag (Munkvold *et al.*, 1994). Berichte von Ernteausfällen wurden bereits 1999 in Australien für die Kultivare Shiraz und Cabernet Sauvignon beobachtet (Wicks und Davies, 1999). In Kalifornien konnte zudem eine geringere Ernte von 30-60 % bei den Kultivaren Chenin blanc oder French Columbard nachgewiesen werden. Besonders anfällig sind Weinreben, die über 20 Jahre alt sind, da sie im erkrankten Zustand und im Vergleich zur höchsten Produktionsrate bei einem Alter von 10 bis 12 Jahren eine Reduzierung der Ernte von bis zu 83 % aufweisen (Munkvold *et al.*, 1994).

Da die Anwesenheit des Myzels nur in den Stämmen von über zwei Jahre alten Pflanzen nachgewiesen werden konnte und die Blattsymptome bei der Abwesenheit von *E. lata* Myzel gebildet wurden, war die Vermutung, dass möglicherweise Toxine für diese Wirkung verantwortlich sind (Moller und Kasimatis, 1980; Tey-Rulh *et al.*, 1991). Aus diesem Grund wird angenommen, dass im fortgeschrittenen Verlauf der Erkrankung im Stamm der Weinrebe Naturstoffe von *E. lata* produziert werden, welche mit dem Pflanzensaft zu den krautigen Teilen, Blütenständen und Blättern transportiert werden. Da einige Sekundärmetabolite, darunter vor allem acetylierte Phenole, phytotoxische Eigenschaften besitzen, geht man davon aus, dass sie zur Ausbildung der Krankheitssymptome beitragen (Amborabé *et al.*, 2001). Deshalb konzentrierten sich Wissenschaftler in den letzten Jahrzehnten besonders auf

die Untersuchung dieser Phytotoxine und deren bioaktive Eigenschaften sowie auf die Pilz-Pflanze Interaktion.

4.1 Sekundärmetabolismus von unterschiedlichen *Eutypa lata*-Isolaten

Die ersten Berichte über biologisch aktive Naturstoffe in *Eutypa lata* wurden 1988 von Mauro *et al.* veröffentlicht, nachdem das Interesse an dem Weinrebenpathogen aufgrund des vermehrten Vorkommens vor allem in der Schweiz und in Frankreich, größer wurde. Daraufhin wurde der Pilz fermentiert und aus dem Kulturfiltrat wurden acht verschiedene acetylierte Phenole isoliert (Renaud *et al.*, 1989). Wenig später wurden die Naturstoffe auf ihre bioaktive Wirkung untersucht. Dabei wurde die starke phytotoxische Eigenschaft von Eutypin (**1**) in einem Bioassay mit Blättern und Protoplasten beschrieben (Tey-Rulh *et al.*, 1991). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit der Krankheitssymptome stark vom *E. lata*-Isolat abhängt. Denn die verschiedenen Isolate können sich in ihrer Fähigkeit toxische Verbindungen zu produzieren erheblich unterscheiden (Péros und Berger, 1994). Insgesamt sind bisher 16 verschiedene Naturstoffe aus *E. lata* bekannt (Andolfi *et al.*, 2011; Masi *et al.*, 2018). Jedoch sind nicht alle Verbindungen unter artifiziellen Bedingungen in den verschiedenen *E. lata*-Isolaten nachweisbar. Vielmehr zeichnen sich die Stämme durch ein eigenes metabolisches Profil aus, das von einer großen Variabilität der produzierten Naturstoffe und der Produktionsrate geprägt ist (Mahoney *et al.*, 2003; Molyneux *et al.*, 2002). Da im Rahmen dieser Arbeit die Biosynthese der acetylierten Phenole aufgeklärt werden sollte, wurde das metabolische Profil der untersuchten *E. lata*-Stämme bestimmt und auf bisher unbekannte Naturstoffe untersucht.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Produktion von Sekundärmetaboliten bei 5 verschiedenen *E. lata*-Stämmen führten zu dem Ergebnis, dass alle ein unterschiedliches biochemisches Potential besitzen, welches beeinflusst werden kann (siehe Abb. 3.16). Das bedeutet, dass die Zusammensetzung der Naturstoffe, die in das Medium sekretiert wurden, bei jedem Stamm verschieden war. Die Beobachtungen von Mahoney *et al.* (2003) und Molyneux *et al.* (2002) konnten demnach bestätigt werden. Insgesamt wurden 17 verschiedene Sekundärmetabolite aus den *E. lata*-Stämmen isoliert. Davon wurden sechs Naturstoffe in Publikationen bereits im Zusammenhang mit *E. lata* veröffentlicht, drei sind in der Literatur bisher nicht beschrieben, vier konnten nicht bestimmt werden und die restlichen vier Verbindungen sind aus anderen Organismen bekannt.

4.1.1 Naturstoffe aus IBWF E16012

Der *E. lata* Stamm IBWF E16012 war in der Lage vier bekannte acetylierte Phenole zu produzieren, die als Eutypin (**1**), Eutypinol (**2**), Siccayne (**9**) und Eulatinol (**10**) identifiziert wurden. IBWF E16012 produzierte in einer Fermentation die phytotoxischen Sekundärmetabolite **1** und **10** bis zu einer Konzentration von 3,5 mg/l. Die Naturstoffe **2** und **9**, die keine Phytotoxizität bei Weinreben verursachen, wurden bis zu einer Konzentration von 7 mg/l produziert (Abb. 3.2). Nach der Fermentation gelang es die Sekundärmetabolite **1** (45,2 mg), **9** (75,7 mg) und **10** (45,6 mg) aus dem Kulturfiltrat zu isolieren. Zusätzlich wurden der Naturstoff FS E16012-3 (**17**, 2,2 mg), sowie die neuen Verbindungen Eulaglycosid (**18**, 2,0 mg) und FS E16012-7 (**19**, 2,3 mg) isoliert (Abb. 3.3).

4.1.1.1 Eutypin

Eutypin (**1**) ist der bekannteste Naturstoff aus *Eutypa lata*, der häufig in Zusammenhang mit der Eutypiose gebracht wurde. Er wurde im Pflanzensaft und in den Blütenständen von infizierten Pflanzen mittels GC/MS und MS/MS-Analysen nachgewiesen. In gesundem Material wurde er hingegen nicht detektiert (Tey-Rulh *et al.*, 1991). Bei Untersuchungen mit Zellsuspensionen von *Vitis vinifera* cv. ‚Gamay‘ und ¹⁴C-markiertem Eutypin wurde der Wirkmechanismus beschrieben. **1** wurde schnell von den Zellen aufgenommen und akkumulierte gegen den Konzentrationsgradienten, was für einen passiven Diffusionsmechanismus spricht. Zusätzlich wurden Moleküle in zelluläre Lipide und in Zellmembranen eingelagert. Die größte Wirkung entfaltet Eutypin bei den Mitochondrien der *Vitis*-Zellen durch einen Entkopplungseffekt und durch die Hemmung der Succinatdehydrogenaseaktivität (Deswarte *et al.*, 1996a). Diese protonophore Aktivität konnte in einer weiteren Arbeit bestätigt werden, da Eutypin die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien entkoppelte, indem der Durchlass von Protonen erhöht wurde (Deswarte *et al.*, 1996b).

In den in dieser Arbeit durchgeführten biologischen Tests konnte mit Eutypin eine Hemmung der Sporenkeimung bei *Pyricularia oryzae* in H₂O und in CM (**M3**) sowie eine Hemmung des Myzelwachstums bei *Phytophthora infestans* ab einer Konzentration von 25 µg/ml beobachtet werden. Beim Toxizitätstest gegen den eigenen Organismus *Eutypa lata* betrug die minimale Hemmkonzentration (MHK) 150 µg/ml. Keine Wirkung zeigte Eutypin gegenüber den untersuchten Bakterien- und Pilzstämmen, sowie gegenüber den HeLaS3-Zellen bis zu 50 µg/ml. Bei dem Test zur Pflanzensamenkeimung wurde durch Eutypin eine geringe Hemmung bei *Setaria italica* verursacht. Auf das Auskeimen und Anwachsen von *Lepidium sativum* und *Agrostis capillaris* zeigte **1** allerdings keine Wirkung (siehe Kapitel 7.6).

Mahoney *et al.* demonstrierte 2003 in einem Blattrondelltest mit Blättern von *Vitis vinifera* die phytotoxische Eigenschaft von Eutypin, indem nach Auftropfen auf der Blattoberfläche eine

Nekrose gebildet wurde. Diese Wirkung konnte in dieser Arbeit nach der Applikation von 50 µg Eutypin auf ein Blattrondell und 24-stündiger Inkubation bestätigt werden (siehe Abb. 3.17). Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass *E. lata* durch die Sekretion von **1** in die krautigen Teile der Pflanze zumindest einen Anteil an der Bildung der Blattsymptome hat.

In einer weiteren Untersuchung wurde die Stabilität von Eutypin mit einer Koinkubation mit L-Cystein überprüft. Obwohl Eutypin einen Michael-Akzeptor an der Aldehydgruppe besitzt, konnte die nukleophile Sulfhydrylgruppe des L-Cysteins nicht mit **1** reagieren. Bis auf einen kleinen Teil blieb **1** stabil und war immer noch in der Lage Nekrosen auf der Weinblattoberfläche zu induzieren (siehe Abb. 3.18).

4.1.1.2 Eutypinol

Eutypinol (**2**) ist der korrespondierende Alkohol von **1** und hat keine direkte phytotoxische Wirkung auf *Vitis vinifera*-Zellen (Molyneux *et al.*, 2002). Mit dieser Information und der Beobachtung, dass einige Weinsorten eine Toleranz gegenüber Eutypin besitzen (Péros und Berger, 1994), wurde eine NADPH-abhängige Reduktase aus *Vigna radiata* isoliert, die in der Lage ist **1** zu detoxifizieren. Die Expression des Gens in *Vitis vinifera* verlieh den Zellen eine Resistenz gegenüber dem Toxin (Fallot *et al.*, 1997; Guillén *et al.*, 1998; Colrat *et al.*, 1999). Durch diese Entdeckung und mit Hilfe von biotechnologischen Methoden können in Zukunft Weinsorten modifiziert werden, um eine Resistenz gegen *Eutypa dieback* zu entwickeln.

Bisherige Untersuchungen zur Bioaktivität von **2** zeigten weder phytotoxische noch andere antimikrobielle Eigenschaften (Mahoney *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen wurden im Rahmen dieser Arbeit bei der biologischen Charakterisierung von **2** bestätigt (siehe Kapitel 7.6). Bei einem Blattrondelltest wurde auch keine Nekrose durch die Applikation von **2** auf der Weinblattoberfläche gebildet (siehe Abb. 3.17).

4.1.1.3 Siccayne

Siccayne (**9**) ist ein acetyliertes Phenol, das zuerst aus dem Ascomyceten *Helminthosporium siccans* isoliert wurde (Ishibashi *et al.*, 1968), welcher zu *Pyrenophora lolii* umbenannt wurde (Dovaston, 1948). Einige Jahre später wurde die Verbindung auch aus dem marinen Basidiomyceten *Halocyphina villosa* gewonnen (Kupka *et al.*, 1981). Erst 1989 wurde veröffentlicht, dass **9** zusammen mit vielen weiteren acetylierten Phenolen von *Eutypa lata* produziert wurde (Renaud *et al.*, 1989a). Des Weiteren wurde die Produktion von **9** aus folgenden Mikroorganismen beschrieben: *Parastagonospora nodorum* SN15, *Drechslera* sp., *Pestalotiopsis fici*, *Anthostomella brabeji* (El-Demerdash *et al.*, 2019; Silless *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2018; De Amorim *et al.*, 2016). Des Weiteren führte bei *Pestalotiopsis fici* die Deletion des Gens *iacE* in dem Biosynthesecluster von Iso-A82775C, einem Prenylepoxycyclohexan, zu einer Akkumulation von **9** (Pan *et al.*, 2018). Dadurch wurde zum ersten Mal beschrieben,

dass **9** auch als Vorstufe bzw. als Zwischenstufe für größere und komplexere Moleküle dient. Diese Beobachtungen belegen, dass der Biosyntheseweg von acetylierten Phenolen nicht spezifisch für *Eutypa lata* ist und auch in anderen Organismen vorkommt.

Ähnlich wie **2** hat **9** keine phytotoxische Wirkung gegen Weinreben (Mahoney *et al.*, 2003). Bestätigt wurde dies bei einem durchgeführten Blattrondelltest (Abb. 3.17). In der Literatur sind allerdings Berichte über moderate antibiotische Wirkungen gegen Gram-positive Bakterien sowie einige Pilze bei einer Konzentration von 10-50 µg/ml zu finden (Kupka *et al.*, 1981). Auch eine moderate antibiotische Aktivität gegen *Saccharomyces cerevisiae* (Kim *et al.*, 2004) und eine cytotoxische Aktivität gegen die humanen Krebszelllinien HeLa und HT29 wurden beobachtet (Guerrero-Vásquez *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen waren jedoch bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml keine Wachstumshemmung nachzuweisen (siehe Kapitel 7.6).

4.1.1.4 Eulatinol

Eulatinol (**10**) wurde im Vergleich zu den anderen acetylierten Phenole erst im Jahr 2002 als Naturstoff von *E. lata* entdeckt (Molyneux *et al.*, 2002). Inzwischen wurde die Verbindung **10** zusätzlich aus *Phaeolus schweinitzii* isoliert (Guo *et al.*, 2014).

Eulatinol zeigte in einem Blattrondelltest eine phytotoxische Aktivität bei Weinpflanzenblätter, wodurch das Alleinstellungsmerkmal von **1** als einziges Toxin, dass verantwortlich für die Blattsymptome gemacht wurde, aufgehoben wurde. In diesem Test wurde die Nekrose-induzierende Wirkung von **10** demonstriert (Mahoney *et al.*, 2003). Die Wirkung fiel im Vergleich zu Eutypin etwas stärker aus (Abb. 3.17). Seitdem wird das biochemische Potential von jedem Isolat einzeln bewertet (Lardner *et al.*, 2006). Bei einem Stabilitätstest konnte zudem gezeigt werden, dass **10** nicht mit L-Cystein reagiert und die Fähigkeit zur Bildung von Nekrosen auf Weinblattoberflächen nicht verliert (Abb. 3.19). Weitere biologische Aktivitäten konnten nicht beobachtet werden (siehe Kapitel 7.6).

4.1.1.5 FS E16012-3

FS E16012-3 (**17**) ist eine Verbindung, die nicht durch *E. lata* oder einen anderen Organismus produziert wurde. Da die Verbindung **17** nicht im Kulturfiltrat von *E. lata* mittels einer HPLC/MS-Messung detektiert werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Artefakt handelt, dass durch die Aufreinigung entstanden ist. Nach der Extraktion des Kulturfiltrats wurde das Extrakt mit MeOH aufgenommen, wodurch Eulatinol möglicherweise methyliert wurde. Bisher konnte **9** lediglich durch chemische Synthese produziert werden (Guerrero-Vásquez *et al.*, 2014; Ishibashi *et al.*, 1968). Biologische Aktivitäten von diesem Naturstoff sind nicht bekannt. Bei der Bestimmung des antimikrobiellen Wirkungsspektrums zeigte **17** keine Wirkung bei den untersuchten Bakterien- und Pilzstämmen.

4.1.1.6 Eulaglycosid

Eulaglycosid (**18**) ist ein neues acetyliertes Phenol, das die gleiche Grundstruktur wie Siccayne (**9**) hat und an einer Hydroxygruppe mit einer β -D-Ribofuranose glykosyliert ist. In der Literatur wurden kürzlich strukturell sehr ähnliche Naturstoffe beschrieben. Conoideoglucoside A (**37**) und B (**38**) wurden aus dem insektenpathogenen Pilz *Conoideocrella krungchingensis* BCC53666 isoliert (Sadorn *et al.*, 2019). Die beiden Verbindungen bestehen ebenfalls zu einem Teil aus einem acetylierten Phenol und tragen an der Hydroxygruppe das Molekül 4-O-Methyl- β -Glucopyranose. Während bei **37** die Grundstruktur Eutypinsäure (**5**) ist, hat **38** Eutypinol (**2**) als Grundlage. In Abb. 4.1 befinden sich in der oberen Reihe die Struktur von **18** sowie die strukturverwandten glykosylierten Verbindungen **37** und **38**. In der unteren Reihe sind die jeweils dazugehörigen acetylierten Phenole **9**, **5** und **2** dargestellt.

Bei einer ausführlichen Untersuchung zur Bioaktivität von Conoideoglucoside B (**38**) wurden keine Wirkungen gegen die Erreger von Malaria und Tuberkulose, sowie gegen ausgewählte Bakterien, Pilze und humane Zelllinien beobachtet. Conoideoglucoside A (**37**) konnte aufgrund von zu geringer Ausbeute nicht analysiert werden (Sadorn *et al.*, 2019). Für die neue Verbindung **17** konnten ebenfalls keine bioaktiven Eigenschaften bei der biologischen Charakterisierung nachgewiesen werden (Kapitel 7.6). Dadurch scheint die Glykosylierung eines acetylierten Phenols auch nicht zu einer erhöhten biologischen Aktivität zu führen.

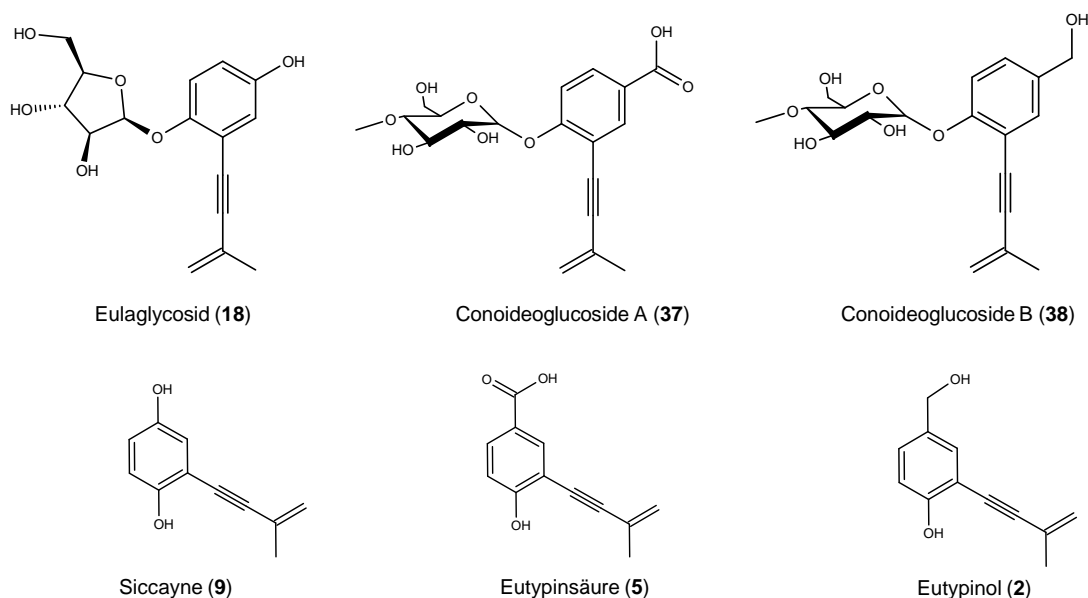


Abb. 4.1: Verwandte Strukturen zur Verbindung Eulaglycosid (**18**).

4.1.1.7 FS E16012-7

FS E16012-7 (**19**) ist eine neue Verbindung, die einige Abweichungen zur Grundstruktur der anderen acetylierten Phenole hat. Verwandte Strukturen wurden bisher lediglich durch chemische Synthese beschrieben (Guerrero-Vásquez *et al.*, 2014; Klyatskaya *et al.*, 2001). Aufgrund der geringen Ausbeute bei der Isolation von **19** konnte die antimikrobielle Aktivität nicht getestet werden.

4.1.2 Naturstoffe aus IBWF E16012HT

Der Stamm IBWF E16012HT wurde durch eine Transformation mit anschließender Selektion auf **M20** erhalten. Obwohl keine Donor-DNA in den Organismus integriert wurde, hatte der Stamm bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml eine Toleranz gegenüber Hygromycin B entwickelt (siehe Kapitel 3.2.2 und Abb. 3.25). Um das metabolische Profil von diesem Stamm mit dem Wildtyp zu vergleichen, wurden die Kulturfiltratextrakte mit Hilfe der HPLC/MS gemessen. Dabei wurde der Naturstoff FS E16012HT-1 (**20**) detektiert, der bisher von keinem *E. lata*-Isolat produziert wurde (Abb. 3.16). Auch während der 20-l Fermentation wurden lediglich die Naturstoffe Eutypinol (**2**) und **20** produziert, die nachfolgend mit einer Ausbeute von 4,4 mg (**2**) und 2,5 mg (**20**) erfolgreich isoliert werden konnten. Interessanterweise war der Stamm IBWF E16012HT nicht in der Lage die Naturstoffe Siccayne, Eutypin und Eulatinol zu produzieren, obwohl diese Verbindungen zuverlässig und reproduzierbar bei dem Wildtyp IBWF E16012 detektiert wurden. Dieses Phänomen wurde mit großer Wahrscheinlichkeit durch den Einfluss von Hygromycin B verursacht und persistiert nachhaltig. Sehr auffällig hingegen ist die strukturelle Ähnlichkeit von **2** und **20**, was einen gemeinsamen biosynthetischen Ursprung vermuten lässt (siehe Kapitel 4.2.3 Möglicher Biosyntheseweg von acetylierten Phenolen in *Eutypa lata*).

4.1.2.1 FS E16012HT-1

FS E16012HT-1 (**20**) fand bisher vor allem in der chemischen Synthese von Benzopyranen eine Anwendung und wurde dazu erstmals im Jahr 2000 von Nicolaou *et al.* synthetisiert. In einer weiteren Arbeit wurde **20** als Zwischenprodukt in dem Biosyntheseweg von Vibralactonen durch den Basidiomycet *Boreostereum vibrans* vermutet. Um dies zu bestätigen, wurde die Verbindung ebenfalls chemisch hergestellt und diente als Standard. Allerdings konnte während dem gesamten zeitlichen Verlauf des Experiments in keiner Probe, die Verbindung **20** detektiert werden. Der Grund dafür ist möglicherweise die transiente Eigenschaft des Moleküls in dem Stoffwechselweg des Pilzes. Dennoch scheint **20** als Zwischenstufe an der Biosynthese von Vibralactonen beteiligt zu sein (Yang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2013). Als Sekundärmetabolit wurde **20** zum ersten Mal aus dem Kulturfiltrat von

Hericium erinaceus, einem medizinisch verwendeten Vertreter der Agaricomycetes, gewonnen. Die Ausbeute war mit 1,0 mg aus 28 l Kulturfiltrat vergleichsweise gering, was für eine schnelle metabolische Umsetzung in einen weiteren Naturstoff spricht. Abgesehen davon wurden zusätzlich die Naturstoffe Erinachromane A und B, Erinaphenol A sowie Eulatachromene (**13**) nachgewiesen (Wu *et al.*, 2019). Die Anwesenheit von **20** und **13** im Kulturfiltrat von einem Organismus, der nicht wie *Eutypa lata* bekannt für die Produktion von diesen Naturstoffen ist, belegt den Zusammenhang im Stoffwechselweg beider Moleküle.

Aufgrund der direkten Umsetzung von **20** in andere Moleküle, konnten bisher keine Untersuchungen zur Bioaktivität durchgeführt werden. Auch in dieser Arbeit reichte die isolierte Menge lediglich zur Aufklärung der Struktur.

4.1.3 Naturstoffe aus IBWF E16121

Bei der Fermentation vom Stamm IBWF E16121 wurden kaum acetylierte Phenole detektiert, nur eine sehr geringe Menge Siccayne (9), die etwas über der Nachweisgrenze lag (siehe Abb. 3.16). Stattdessen wurde die Verbindung O-Methylmellein (**21**) bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml im Kulturfiltrat gemessen (siehe Abb. 3.8). Bei der Aufreinigung konnten anschließend 65,5 mg O-Methylmellein isoliert werden (siehe Abb. 3.9).

4.1.3.1 O-Methylmellein

O-Methylmellein (**21**) ist ein Derivat von (R)-Mellein und gehört zu den Dihydroisocumarinen. (R)-Mellein wurde 1933 zum ersten Mal aus *Aspergillus melleus* isoliert (Nishikawa, 1933). Die Struktur sowie die Stereochemie wurde allerdings erst später bestimmt (Arakawa *et al.*, 1969; Blair und Newbold, 1955). Seitdem wurde die Produktion von Mellein und seinen Derivaten in vielen Pilzstämmen nachgewiesen (Chooi *et al.*, 2015). Dazu gehören vor allem *Parastagonospora nodorum* (Devys *et al.*, 1980), *Cercospora taiwanensis* (Camarda *et al.*, 1976), *Botryosphaeria* spp. (Pongcharoen *et al.*, 2007; Rukachaisirikul *et al.*, 2009), *Phoma tracheiphila* (Parisi *et al.*, 1993), *Xylaria longiana* (Edwards *et al.*, 1999), *Microsphaeropsis* sp. (Höller *et al.*, 1999), *Sphaeropsis sapinea* (Cabras *et al.*, 2006), *Nigrospora* sp. (Zhao *et al.*, 2012), *Apiospora montagnei* (Ramos *et al.*, 2013) und *Cryptosporiopsis* spp. (Krohn *et al.*, 1997). Des Weiteren wurde davon berichtet, dass auch *Eutypa lata* in der Lage ist Mellein zu produzieren (De Angelis, 1990).

O-Methylmellein wurde bisher lediglich in einer Konfrontationszone von *Botryosphaeria obtusa* und *E. lata* detektiert (Glauser *et al.*, 2009). Bei der Untersuchung dieser beiden Pilzstämmen waren die Extrakte der Reinkulturen inaktiv gegenüber *Lepidium sativum*. In der Konfrontationszone wurde hingegen die Produktion der Verbindung **21** durch die Anwesenheit von beiden Stämmen stark induziert. Im Anschluss wurde die Aktivität von **21** bei *Lepidium*

sativum getestet. Dabei wurde eine starke Samenkeimungshemmung bei sehr geringer Konzentration demonstriert, wodurch eine phytotoxische Eigenschaft von **21** bestätigt wurde. Auch gegen *B. obtusa* wurde eine hohe antifungische Aktivität nachgewiesen. Bis zu diesem Zeitpunkt waren keine Bioaktivitäten von diesem Naturstoff bekannt. Aber durch die starke Induktion in der Konfrontationszone wird vermutet, dass die Verbindung einen Einfluss beim Konkurrenzkampf zwischen Pilzen hat (Glauser *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit konnte die phytotoxische Eigenschaft von **21** nicht bestätigt werden. Die Verbindung induzierte weder Nekrosen auf Weinblättern (siehe Abb. 3.17), noch konnte sie die Samenkeimung von *Setaria italica*, *Lepidium sativum* und *Agrostis capillaris* bis 250 µg/ml hemmen. Eine antifungische, antibakterielle oder cytotoxische Wirkung wurden ebenfalls nicht beobachtet (siehe Kapitel 7.6). Aus diesen Gründen kann die Verbindung **21** in dieser Arbeit nicht als Phytotoxin eingestuft werden, wobei der Einfluss bei der Symptombildung der Eutypiose weiterhin ungeklärt bleibt.

4.1.4 Naturstoffe aus IBWF E16123

Das Sekundärmetabolitspektrum von Stamm IBWF E16123 ist von einer hohen Diversität gekennzeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden neben Eutypinol (**2**) die Naturstoffe FS E16123-1 (**15**), O-Methylmellein, (**21**), FS E16123-3 (**22**), FS E16123-4 (**23**), FS E16123-5 (**24**), FS E16123-(**25**), Tyrosol (**26**), N-Acetyltyramine (**27**) und FS E16123-8 (**28**) isoliert. Die Strukturen der Verbindungen **22**, **23**, **24** und **25** konnten allerdings nicht aufgeklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die Verbindungen **26**, **27** und **28** als Naturstoff von *Eutypa lata* beschrieben.

4.1.4.1 FS E16123-1

FS E16123-1 (**15**) ist ein allenisches Epoxycyclohexan, das als Naturstoff bisher ausschließlich bei *E. lata* vorkommt. Es wird vermutet, dass die Verbindung das Zwischenprodukt von einem acetylierten Phenol und den Tetrahydrochromanon-Derivaten ist (Renaud *et al.*, 1989b). Danach wurde **15** auch chemisch synthetisiert (Gordon und Tabacchi, 1992).

Laut Literatur ist für **15** eine geringe antimitotische und antibakterielle Aktivität beschrieben. Eine Phytotoxizität ist hingegen nicht bekannt (Renaud *et al.*, 1989b). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls keine phytotoxischen Eigenschaften oder andere Bioaktivitäten beobachtet.

4.1.4.2 Tyrosol

Tyrosol (**26**) ist ein häufig auftretender Naturstoff, der vor allem von Pilzen, wie *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Ceratocystis* sp., produziert wird (Chen *et al.*, 2004;

Sentheshanmuganathan und Elsdén, 1958; Ayer *et al.*, 1986). Jedoch ist er ebenso ein wichtiger Bestandteil von Olivenöl (Di Benedetto *et al.*, 2007). **26** ist schon seit 1907 durch die Entdeckung der Aminosäuregärung von Felix Ehrlich bekannt. Die Verbindung entsteht durch eine Desaminierung, Decarboxylierung und Reduktion von L-Tyrosin zu Tyrosol (Chen *et al.*, 2004; Narayanan und Rao, 1976; Sentheshanmuganathan und Elsdén, 1958).

Tyrosol ist ein Naturstoff mit einem pharmazeutischen Interesse, da er eine antioxidative Aktivität hat und in der Behandlung von Arteriosklerose verwendet wird (Guzmán-López *et al.*, 2007; Lamuela-Raventós *et al.*, 2004; Ramos-Comerzana und Monteoliva-Sánchez, 2000). Des Weiteren wurden eine Phytotoxizität gegenüber Salatblättern und eine Toxizität bei Mäusen beobachtet (Ayer *et al.*, 1986). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch keine antimikrobiellen, phytotoxischen oder cytotoxischen Aktivitäten beobachtet (siehe Kapitel 7.6).

4.1.4.3 N-Acetyltyramine

N-Acetyltyramine (**27**) wurde bereits aus *Mycobacterium tuberculosis* isoliert (Shirai, 1955), aber die Verbindung wurde auch von anderen Mikroorganismen produziert, wie z. B. *Fusarium* sp., *Streptomyces* sp. und *Alternaria tenuissima* (Maehr und Berger, 1969; Sobolevskaya *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2012). Des Weiteren wurde die Verbindung beschrieben, als das Zwischenprodukt bei der Biosynthese von N-Acetyldopamine durch die Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* (Mir und Vaughan, 1981). Da in dieser Arbeit zum ersten Mal die strukturverwandten Metabolite **26** und **27** auch in *E. lata* detektiert wurden, wird davon ausgegangen, dass die Biosynthese von **27** über den Naturstoff **26** bzw. über die Aminosäure L-Tyrosin verläuft.

27 ist ein Tyraminalkaloid das verschiedene Bioaktivitäten hat, wie eine antitumorale Wirkung gegen humane Leukämiezellen K562, humane Melanomzellen A375 (Kanou *et al.*, 1998) und eine antifungische Wirkung gegen *Cladosporium sphaerospermum* (Garcez *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2010). Allerdings konnten im Rahmen dieser Arbeit bei der biologischen Charakterisierung des Naturstoffs keine biologisch aktiven Wirkungen beobachtet werden (siehe Kapitel 7.6).

4.1.4.4 FS E16123-8

FS E16123-8 (**28**) ist ein neuer Naturstoff, der nicht in der Literatur beschrieben wurde. Der biosynthetische Ursprung entstammt vermutlich durch die Hydroxylierung von **15**. Eine biologische Aktivität durch **28** konnte nicht beobachtet werden.

4.2 Hinweise zur Aufklärung der Biosynthese von acetylierten Phenolen in *Eutypa lata*

Acetylierte Metabolite sind Naturstoffe, die eine Dreifachbindung enthalten und in der Natur vor allem sehr häufig bei Pilzen und Pflanzen vorkommen. Mehr als 2000 Acetylene und Polyacetylene sind bisher bekannt (Minto und Blacklock, 2008). Sie verfügen über wichtige biologische Aktivitäten, unter anderem für einen Einsatz als Pflanzenschutzmittel oder als pharmakologischen Wirkstoff. Aufgrund der natürlichen Quelle dieser Naturstoffe und einer unbekanntem Biosynthese konnten bisher nur eine limitierte Anzahl an Metabolite in präklinischen und klinischen Studien untersucht werden (Kuklev *et al.*, 2013). Die erste biosynthetische Studie von Polyacetylenen wurde von Bu'Lock und Smalley 1962 veröffentlicht. In den vergangenen 30 Jahren ermöglichte die Revolution der Molekularbiologie die Untersuchung der Biosynthese von Polyacetylenen durch Klonierung von am Stoffwechsel involvierten Genen. Dadurch wurden einige Fortschritte bei der Entdeckung gemacht (Minto und Blacklock, 2008). Dennoch sind wenige Kenntnisse über Acetylen-bildende Enzyme und deren codierende Gene bekannt (siehe 1.2.2) und die Aufklärung von Biosynthesewegen bleibt weiterhin eine große Herausforderung für Naturwissenschaftler.

Neben den acetylierten Phenolen Eutypin (**1**), Eutypinol (**2**), Sicayne (**9**) und Eulatinol (**10**) gibt es weitere strukturverwandte Metabolite, wie Eulatachromene (**13**) und das Benzofuran-Derivat 2-Iso-propenyl-5-formylbenzofuran (**16**), die auch von anderen Organismen produziert werden und die vermutlich einen ähnlichen biosynthetischen Ursprung besitzen. So wurden **13** und **16** aus dem gewöhnlichen Leberbalsam *Ageratum houstonianum* isoliert. Studien mit C¹⁴-markierten L-Phenylalanin enthüllten, dass der aromatische Ring aus dem Shikimisäureweg stammt. Dies widerlegte die Annahme von Acetat als Ursprung. Als Zwischenprodukt kamen zum einen Zimtsäure und zum anderen Phenylethylamine in Frage. Nach der Verwendung von Phenylalaninhemmstoffen (Aminooxyessigsäure, AOA und Aminooxyphenylpropansäure, AOPP) konnte im Anschluss der Shikimisäureweg mit der Zimtsäure als Vorstufe bestätigt werden (Siebertz *et al.*, 1990; Jiménez-Teja *et al.*, 2006). Ausgehend von diesen Beobachtungen wird ein Biosyntheseweg für acetylierte Phenole vorgeschlagen der über L-Phenylalanin und Zimtsäure verläuft.

In einer weiteren Studie wurde die Biosynthese von Fomannoxin (**39**) mit Hilfe von C¹³-markierter Glukose untersucht. Das ist ein Benzofuran-Derivat aus *Heterobasidion occidentale*, das eine ähnliche Struktur hat wie **16**. Für diesen Naturstoff wurde ebenfalls ein Stoffwechselweg vorgeschlagen, der über den Shikimisäureweg geht und in Abb. 4.2 gezeigt ist (Hansson *et al.*, 2012). Dabei wird aus Chorismat die 4-Hydroxybenzoesäure und Pyruvat und danach wird 4-Hydroxybenzoesäure zu 4-Hydroxybenzaldehyde reduziert. Im nächsten Schritt wird 4-Hydroxybenzaldehyd dann durch eine Prenyltransferase mit

Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), das aus dem Mevalonatweg stammt, kovalent gebunden. Danach finden bis zur Bildung von Fomannoxin noch eine Oxidation und eine Abspaltung von H_2O statt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu **16** kann der vermutete Stoffwechselweg von Fomannoxin auch bei *E. lata* für die Synthese von acetylierten Phenolen in Frage kommen.

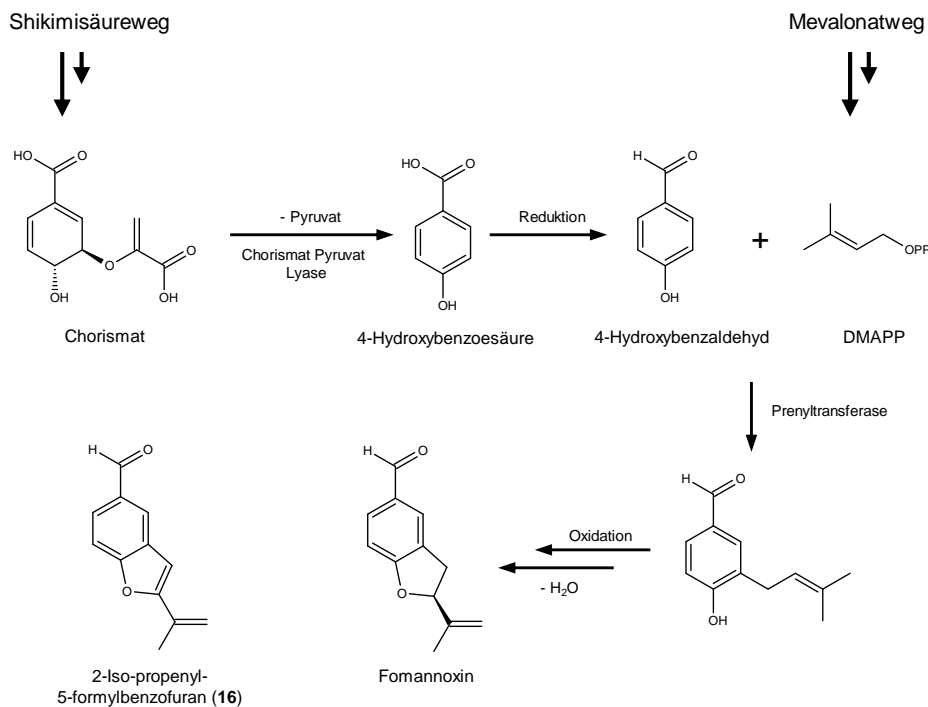


Abb. 4.2: Vorgeschlagener Biosyntheseweg für Fomannoxin aus *Heterobasidion occidentale* TC122-12. (verändert nach Hansson *et al.* (2012)).

Eine ähnliche Beobachtung machten Prompanya *et al.* (2016) bei der Isolation von mehreren Benzofuran-Derivaten aus *Neosartorya quadricincta*, welcher aktuell als *Aspergillus quadricinctus* bezeichnet wird. Auch hier wird die Biosynthese über den Shikimisäureweg mit 4-Hydroxybenzoic acid und der Fusion mit DMAPP aus dem Mevalonatweg vermutet. Da das Enzym Chorismate Pyruvate Lyase (EC-Nr: 4.1.3.40) bisher in *E. lata* nicht nachgewiesen wurde, kann der Biosyntheseweg für die acetylierten Phenole nur vermutet werden.

Des Weiteren wird angenommen, dass der Naturstoff Gaudichaudiansäure in der Pflanze *Piper gaudichaudianum* über den eben beschriebenen Weg biosynthetisch hergestellt wird. Allerdings wird Chorismate nicht mit der Chorismate Pyruvate Lyase katalytisch aufgespalten, sondern weiter verstoffwechselt über Phenylpyruvate, L-Phenylalanin, Zimtsäure und p-Coumaroyl-CoA bis hin zu 4-Hydroxybenzoic acid. Im Anschluss wird mit Hilfe einer Polyprenyltransferase Geranylpyrophosphate kovalent an 4-Hydroxybenzoic acid gebunden. Darauf folgen dann noch wenige Schritte bis zur Gaudichaudiansäure (Abb. 4.3; Batista *et al.*, 2018). Ob und vor allem welche Enzyme *E. lata* für die Bildung von 4-Hydroxybenzoic acid

besitzt, kann an dieser Stelle nicht eindeutig beantwortet werden. Jedoch wurde 4-Hydroxybenzoesäure mit Hilfe eines Standards im Kulturfiltrat von *E. lata* IBWF E16012 nachgewiesen.

Diese Beobachtungen aus anderen Organismen geben einen Einblick in die generelle Biosynthese von Benzofuran-Derivaten, die den acetylierten Phenolen strukturell sehr ähnlich sind.

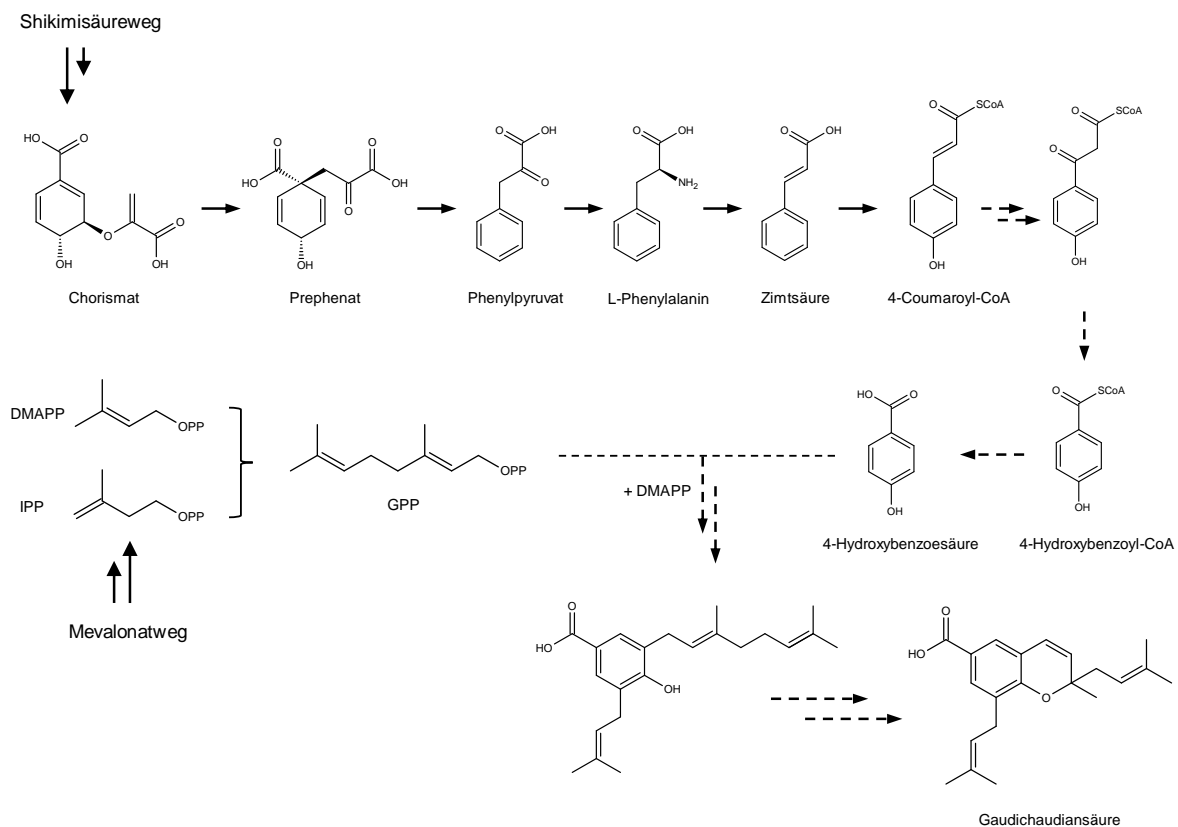


Abb. 4.3: Vorgeschlagener Biosyntheseweg von Gaudichaudiansäure in *Piper gaudichaudianum*. Verändert nach Batista *et al.* (2018). Die beteiligten Proteine wurden in einer Transkriptomanalyse identifiziert und führten zu dieser Annahme.

4.2.1 Potentielle Vorstufen von acetylierten Phenolen

Um Zwischenprodukte bei der Biosynthese von acetylierten Phenolen zu identifizieren, wurden dem *E. lata* Stamm IBWF E16012 mögliche Vorstufen bei der Fermentation zugeführt. Dabei wurde durch den Zusatz von Zimtaldehyd (500 μ M und 2 mM) eine neun bis 15-fache Produktionssteigerung an Eutypinol beobachtet (Abb. 3.20). Im Vergleich dazu konnten die strukturverwandten Substanzen Zimtsäure, Benzaldehyd, Benzylalkohol und p-Cumarsäure nur zu einer geringen Produktionssteigerung beitragen. Der Grund dafür kann die antifungische Eigenschaft von Zimtaldehyd sein. Denn Zimtaldehyd ist als Hemmstoff für bakterielles Wachstum sowie hefeartiges und filamentöses Wachstum von Pilzen bekannt, dass die Aktivität von ATPasen und der Zellwandbiosynthese inhibiert. Des Weiteren wird die

Struktur und Integrität von Membranen verändert (Cheng *et al.*, 2008; Shreaz *et al.*, 2016). Als Antwort darauf scheint *E. lata* mit einer erhöhten Eutypinolproduktion zu reagieren. Die basale Produktionssteigerung durch die anderen Vorstufen kann demnach mit der zusätzlich verfügbaren Kohlenstoffquelle zusammenhängen. An dieser Stelle wurden lediglich Naturstoffe getestet, die im erweiterten Rahmen des Shikimisäurewegs vorkommen. Zur biosynthetischen Herstellung von acetylierten Phenolen werden vermutlich zusätzlich noch Vorstufen, wie DMAPP aus dem Mevalonatweg benötigt. Diese können limitiert vorkommen, da sie auch zu Ubichinon verstoffwechselt werden. Um direkte Vorstufen in der Biosynthese von Eutypinol und ähnlichen Verbindungen zu identifizieren, werden weitere Studien mit C¹³-markierter Kohlenstoffquelle durchgeführt werden müssen.

4.2.2 Transkriptomanalyse enthüllt entscheidende Erkenntnisse zur Biosynthese von acetylierten Phenolen

Um einen Einblick in das regulatorische Netzwerk von Genen zu bekommen, die potentiell an der Biosynthese von acetylierten Phenolen beteiligt sind, wurden die Transkriptionsprofile von produzierenden *E. lata* Stämmen (IBWF E16012 in BAF, IBWF E16121 in PDA) und nicht produzierendem *E. lata* Stamm (IBWF E16121) in einer RNA-Seq-Analyse untersucht und miteinander verglichen (siehe Kapitel 3.1.5 und 7.8). Die Grundlage dafür, war eine Genomsequenzierung der jeweiligen Stämme mit anschließender *de novo* Assemblierung. Dabei wurden die einzelnen reads auf das Genom von IBWF E16121 referenziert, da im Vergleich zu dem Genom von IBWF E16012 ca. 5200 ORFs mehr vorhergesagt wurden, das Genom um ca. 5,3 Mpb größer ist und der Stamm bei produzierenden und nicht-produzierenden Bedingungen kultiviert werden konnte.

Da Genom- und Transkriptomsequenzierungen in den letzten Jahren wesentlich kostengünstiger wurden und auch in der Zukunft weiter im Preis sinken werden, wird die Untersuchung von genetischen Informationen erleichtert und ist besser verfügbar. In Kombination mit der Software antiSMASH wurden in der Literatur bereits mehrere Biosynthesegencluster (BGC) von Sekundärmetaboliten vorhergesagt. So konnte ein Cluster aus Genen in dem roten Schimmelpilz *Monascus purpureus* identifiziert werden, welche Proteine codieren, die an der Biosynthese des roten Monascus-Pigments beteiligt sind (Yang *et al.*, 2015). Weitere Beispiele sind die BGC für Pneumocandin aus dem Pilz *Glarea lozoyensis* und für Citrinin aus *Penicillium citrinum* (Chen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017; Schmidt-Heydt *et al.*, 2019).

Bei dem *E. lata*-Stamm IBWF E16121 konnten insgesamt 137 BGC vorhergesagt werden, was im Vergleich zu anderen filamentösen Pilzen eine sehr hohe Zahl ist. Die antiSMASH-Analyse

von *Penicillium citrinum* ergab, dass der Pilz 29 putative BGC enthält, die für die Produktion von Naturstoffen verantwortlich sind (Schmidt-Heydt *et al.*, 2019). Aufgrund der vielen BGC in *E. lata* und den bisher fehlenden Informationen zu einem Biosynthesecluster für acetylierte Phenole, ist eine einfache Zugehörigkeit von den produzierten Naturstoffen zu den BGC nicht möglich. Dennoch konnten über die Auswertung der Transkriptomanalysen einige Gene aufgrund des log2fold-Wertes (>5) bzw. FPKM-Wertes identifiziert werden, die zum einen in der produzierenden Bedingung signifikant hochreguliert waren und zum anderen gemeinsam in einem vorhergesagten BGC vorhanden sind. Diese Gene und das dazugehörige BGC Nummer 91 sind in Abb. 4.4 dargestellt.

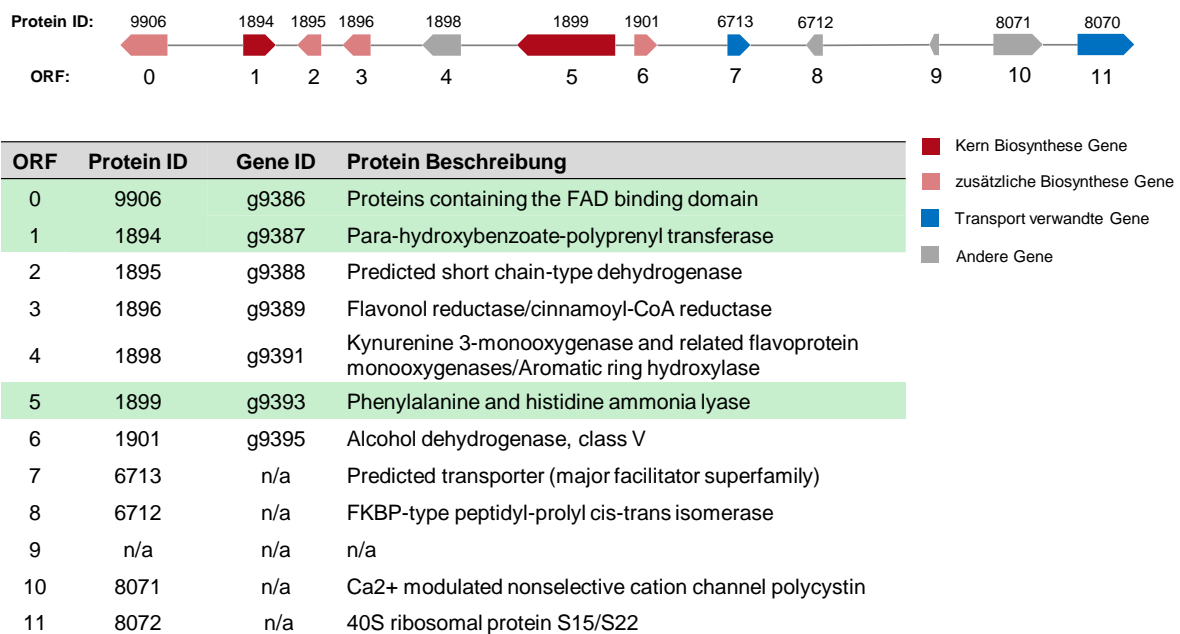


Abb. 4.4: Das vorhergesagte Biosynthesecluster 91 aus dem *E. lata* Stamm IBWF E16121 (oben) sowie eine Tabelle mit den enthaltenen Genen und der jeweiligen putativen Funktion des Proteins (unten). Die hellgrün hinterlegten Gene waren in der Transkriptomanalyse bei der produzierenden Bedingung hochreguliert. n/a: nicht angegeben.

Abgesehen davon wurden weitere DE Gene identifiziert und klassifiziert (Abb. 3.21). Mit Hilfe der Genontologie Enrichment Analyse wurde diesen Genen ein Prozess zugeordnet, in dem diese beteiligt sind (Abb. 3.22). Daraus geht hervor, dass besonders metabolische, katabolische und regulatorische Prozesse um die Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin, sowie um den Mevalonatweg eine hohe Relevanz bei der Biosynthese von acetylierten Phenolen haben könnten. Bei dem direkten Vergleich von produzierenden und nicht-produzierenden Bedingungen konnten insgesamt 45 Gene identifiziert werden, die mit der Produktion von acetylierten Phenolen in Verbindung gebracht werden (Abb. 3.23). In Tab. 7.10: Liste der DE Gene die bei dem Vergleich von den produzierenden Bedingungen (IBWF E16121 PDA und IBWF E16012; grüne Pfeile) mit der nicht produzierenden Bedingung (IBWF E16121 BAF; roter Pfeil) identifiziert wurden (siehe Abb. 3.23). Die angegebenen Werte sind

FPKM-Werte. sind die Gene mit den jeweiligen FPKM-Werten angegeben. In dieser Liste befinden sich zudem auch die Gene g9386 und g9387, die im Cluster 91 vorhanden sind. Zur Bestätigung von diesen Beobachtungen wurde mit diesen und weiteren potentiell involvierten Genen eine Genexpressionsanalyse durchgeführt (Abb. 3.24). Dabei wurde eine relative Genexpression für diese Gene bei der produzierenden Bedingung im Vergleich zur nicht-produzierenden Bedingung zwischen 8 und 72-fach nachgewiesen. Eine Beteiligung dieser Genprodukte in der Biosynthese ist demnach möglich.

4.2.3 Möglicher Biosyntheseweg von acetylierten Phenolen in *Eutypa lata*

Aufgrund der bisher beschriebenen Beobachtungen ergibt sich ein vorgeschlagener Biosyntheseweg für acetylierte Phenole in *E. lata*, der rein hypothetisch ist und als Hilfe für weitere Untersuchungen dienen kann. Der vorgeschlagene Biosyntheseweg ist in Abb. 4.5 dargestellt und die beteiligten Enzyme sind in Tab. 4.1 aufgelistet.

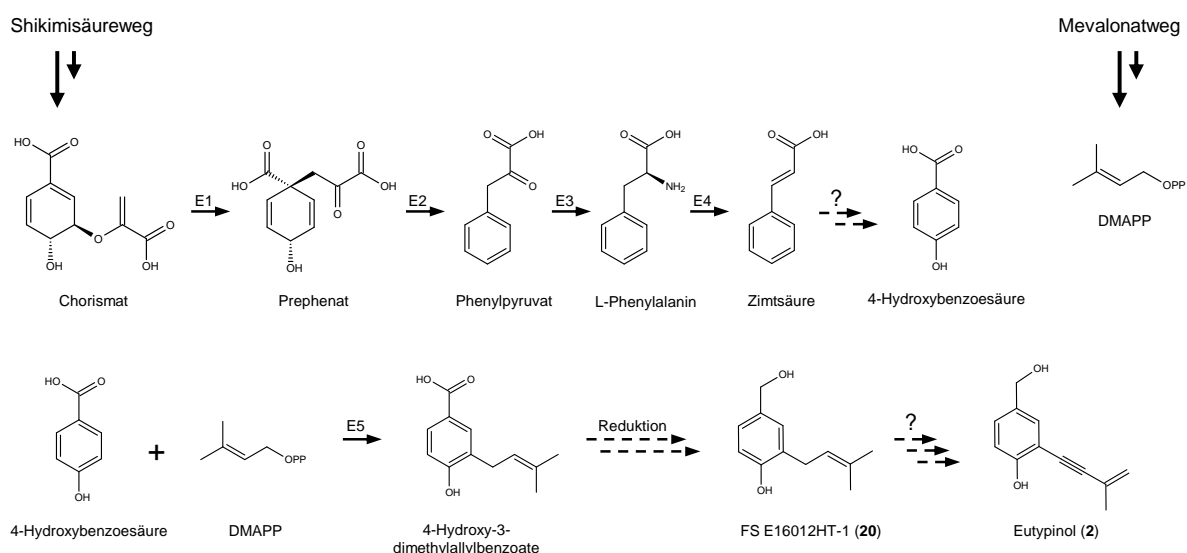


Abb. 4.5: Vorgeschlagener Biosyntheseweg für acetylierte Phenole in *Eutypa lata*.

Tab. 4.1: Die an der Biosynthese beteiligten Gene mit der jeweiligen Beschreibung, Protein ID und EC-Nr.

Enzym	Beschreibung	Protein ID	EC-Nr.
E1	Chorismat Mutase	10117	5.4.99.5
E2	Prephenat Dehydratase	5879	4.2.1.51
E3	Aspartat Aminotransferase	9789	2.6.1.1
E4	Phenylalanin/Hisitidin Ammonia Lyase	1899	4.3.1.24
E5	4-Hydroxybenzoate Polyprenyltransferase	1894	2.5.1.39

Da die Enzyme von dem Shikimisäureweg und dem Mevalonatweg bereits im *E. lata* Genom UCR-EL1 annotiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass diese ins Genom

integriert sind. Allerdings konnte keine Chorismat-Pyruvat Lyase identifiziert werden. Aus diesem Grund und dadurch dass die Enzyme E1-E3 ebenfalls bereits in *E. lata* annotiert wurden, wird unter anderem vermutet, dass die Biosynthese über L-Phenylalanin verläuft. Der nächste Schritt geht über die Phenylalanin/Histidin Ammonia Lyase (E4) von L-Phenylalanin zu Zimtsäure, bei der eine erhöhte Transkriptmenge in der produzierenden Bedingung nachgewiesen wurde (Abb. 4.4). Da die 4-Hydroxybenzoesäure im Kulturfiltrat von *E. lata* detektiert werden konnte, wird angenommen, dass diese Verbindung ein Zwischenprodukt ist, das vermutlich über mehrere Schritte aus der Zimtsäure entsteht und als Edukt fungiert. Das zweite Edukt ist DMAPP aus dem Mevalonatweg, gehört zu dem Primärmetabolismus und ist ein Zwischenprodukt bei der Bildung von Ubichinon. Durch das Enzym E5 werden die Edukte 4-Hydroxybenzoesäure und DMAPP zu dem Zwischenprodukt 4-Hydroxy-3-dimethylallylbenzoate fusioniert. Auch dieses Enzym ist in dem Cluster 91 enthalten und war bei produzierender Bedingung hochreguliert (Abb. 4.4). Danach wird der Naturstoff zu FS E16012HT-1 (**20**) reduziert. In der Literatur wurde diese Verbindung auch bei der Biosynthese von Vibralactonen als Zwischenstufe identifiziert, die ebenfalls aus den beiden Edukten entstanden ist (Zhao *et al.*, 2013). Da in dieser Arbeit zum ersten Mal davon berichtet wurde, dass **20** aus dem Kulturfiltrat von einem im Wachstum eingeschränkten *E. lata*-Stamm isoliert werden konnte, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass diese Verbindung die direkte Vorstufe für Eutypinol (**2**) ist. Allerdings sind keine Informationen zu den Enzymen bekannt, die eine Umsetzung zu einem acetylierten Phenol katalysieren. Dazu wird eine Acetylenase benötigt, die die Dreifachbindung bildet. Des Weiteren sind vor allem die Enzyme interessant, die eine Derivatisierung zu den strukturverwandten Verbindungen Eutypine (**1**), Siccayne (**9**), Eulatinol (**10**) katalysieren. Um weitere Erkenntnisse zu erhalten, die den Biosyntheseweg betreffen, werden weitere Untersuchungen besonders mit C¹³-markierten Molekülen durchgeführt werden müssen. Denn nur durch die Zuweisung der markierten Positionen kann eine detaillierte Aufzeichnung des Biosynthesewegs angefertigt werden.

4.3 Genetische Manipulation von *Eutypa lata*

Die genetische Manipulation von Bakterien und Pilzen ist ein wichtiges Werkzeug, um die Physiologie dieser Organismen zu untersuchen. Durch Geninaktivierung, Genüberexpression oder heterologe Genexpression können Informationen zu Stoffwechselwegen und Signaltransduktionswegen gewonnen werden. Durch die Veröffentlichung des *E. lata*-Genoms im Jahr 2013 wurde der Zugriff auf genetische Informationen zugänglich gemacht, wodurch das Weinrebenpathogen auch auf molekularbiologischer Ebene untersucht werden kann (Blanco-Ulate *et al.*, 2013). Obwohl bisher wenig über die Pathogenität oder die Biosynthese der Naturstoffe von *E. lata* bekannt ist, wurden seitdem jedoch sehr wenige Studien zur

genetischen Modifikation oder einer Geninaktivierung in *E. lata* publiziert. Dadurch sind molekularbiologische Methoden zur Untersuchung von *E. lata* nur begrenzt verfügbar aber die Etablierung eines erfolgreichen Transformationssystems ist von großer Bedeutung. Die Entwicklung eines stabilen Transformationssystems ist jedoch für jede Spezies individuell und stellt eine große Herausforderung dar. Häufig wird dazu auf Methoden von artverwandten Spezies zurückgegriffen, die modifiziert und optimiert werden, bis der gewünschte Zielorganismus erfolgreich manipuliert werden kann (Buckel, 2015; Meyer, 2008; Ruiz-Díez, 2002). Bei filamentösen Pilzen werden verschiedene Transformationsmethoden angewendet, wie z. B. die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (ATMT) und die Protoplastentransformation (Michielse *et al.*, 2005b; Ruiz-Díez, 2002).

4.3.1 Optimierung der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation

A. tumefaciens ist ein gram-negatives Bodenbakterium, dass die Bildung von Wurzelhalsgallentumore bei Pflanzen verursacht (Stafford, 2000). Die Grundlage für den Pflanzenkrebs ist ein Tumor-induzierendes (Ti-) Plasmid, das in dem Bakterium enthalten ist. Das Ti-Plasmid besteht aus der Transfer-DNA (T-DNA), die von einer Signalsequenz (*right* und *left border*) flankiert wird, den Virulenzgenen, die für die Übertragung der T-DNA in das Pflanzengenom verantwortlich sind und weiteren regulatorischen Gensequenzen. Nachdem die T-DNA erfolgreich in das Pflanzengenom integriert wurde, werden die übertragenen Gene exprimiert, was schließlich zum unkontrollierten Wachstum der infizierten Pflanzenzellen führt (Buckel, 2015; Zhu *et al.*, 2000).

Bundock *et al.* (1995) berichtete erstmals darüber, dass es mit Hilfe der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation (ATMT) möglich ist, neben Pflanzenzellen auch weitere eukaryotische Organismen, wie *Saccharomyces cerevisiae* genetisch zu modifizieren. In den nachfolgenden Jahren wurde die Methode ausgeweitet und an filamentöse Pilze angepasst (de Groot *et al.*, 1998). Dabei findet der DNA-Transfer bei einer Co-Kultivierung mit dem Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* und dem zu transformierenden Pilz statt. Dazu verwendet man ein sogenanntes binäres Vektorsystem, bei dem das Bakterium zwei Vektoren besitzt. Das erste Plasmid ist etwas kleiner und enthält die zu integrierende T-DNA zwischen den beiden Bordersequenzen und das zweite Plasmid beinhaltet die Virulenzgene, die für den DNA-Transfer wichtig sind (Michielse *et al.*, 2008).

Die ATMT ist eine von vielen Wissenschaftlern bevorzugte Transformationsmethode für filamentöse Pilze. Denn sie konnte sogar für Pilze angepasst werden, bei denen konventionelle Transformationssysteme nicht zum Erfolg führten (Michielse *et al.*, 2005b). Ein weiterer Vorteil ist, dass hier eine mehrfache ektopische Integration von DNA Molekülen selten

vorkommt, wodurch die zielgerichtete Integration verbessert ist oder auch die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination erhöht ist. Als Ausgangsmaterial können zudem unterschiedliche Zelltypen verwendet werden, wie z. B. Konidien und Myzel. Jedoch ist diese Methode zeitaufwändiger als andere und wird durch viele verschiedene Parameter bei der Co-Kultivierung beeinflusst (Meyer, 2008; Michielse *et al.*, 2005b).

Dieser Arbeit vorausgehend wurden erste Erkenntnisse zu einer erfolgreichen genetischen Manipulation von *E. lata* mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation gewonnen, die von [REDACTED] im Rahmen ihrer Masterarbeit beschrieben wurden. Nach Angaben von Muskat (2016) konnten dabei *das green fluorescent protein* (GFP) sowie Expressionskonstrukte zufällig in das Genom von *E. lata* integriert werden. Die Methode wurde dabei nach Figueiredo *et al.* (2010) durchgeführt. Allerdings war die Transformationseffizienz sehr gering und die Mutanten blieben nicht stabil. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Strategien verfolgt, um die ATMT experimentell durch verändern von Parametern zu optimieren (siehe Tab. 3.4). Zu Beginn wurde dazu der Vektor pCAMB-HPT-EFA-GFP für eine zufällige Mutagenese eingesetzt. Als Ausgangsmaterial wurden Konidien, Myzel und Protoplasten verwendet. Konidien eignen sich in der Regel gut als Startmaterial und führen z. B. bei *Pyricularia oryzae* und *Aspergillus awamori* zu reproduzierbaren Transformationsergebnissen (Michielse *et al.*, 2008; Rho *et al.*, 2001). Jedoch keimten die Konidisporen von *E. lata* auf artifiziellem Medium sehr schlecht aus. In der Literatur wird ebenfalls von einer sehr geringen Keimungsrate berichtet (Živković *et al.*, 2012). Sie sind deshalb in diesem Fall nicht besonders gut für eine ATMT geeignet. Dennoch wurden die Konidiosporen, ebenso wie das Myzel als zu transformierendes Material in verschiedenen Ansätzen verwendet. Darüberhinaus wurden Protoplasten von *E. lata* in der ATMT eingesetzt. Denn bei mehreren Organismen, wie z. B. bei *Septoria tritici*, *Aspergillus awamori* und *Coccidiodes immitis* konnte bereits eine erfolgreiche Transformation von Protoplasten durch *A. tumefaciens* beobachtet werden (Zwiers und de Waard, 2001; de Groot *et al.*, 1998; Abuodeh *et al.*, 2000; Michielse *et al.*, 2005a). Neben dem eingesetzten Pilzmaterial kann auch die Wahl des *A. tumefaciens*-Stamms einen erheblichen Einfluss auf die Transformationseffizienz haben. Häufig wird der aus dem supervirulenten Stamm A281 weiterentwickelte Stamm AGL-1 verwendet, der auch bei der Transformation von *E. lata* eingesetzt wurde. Dieser Stamm hat im Vergleich zu anderen *A. tumefaciens* Stämmen, wie LBA 1100 und LBA 4404 bei vielen Pilzen zu einer höheren Transformationsrate geführt, da die Expressionsrate der Virulenzgene erhöht ist (Buckel, 2015; Campoy *et al.*, 2003; Park und Kim, 2004). Als weiterer Parameter wurde das Mischungsverhältnis (1:1, 2:1 und 1:2) von Pilzmaterial zu Bakterien verändert. Eine optimale Balance zwischen beiden Konzentrationen vermeidet ein großes Hintergrundwachstum vom Pilz oder von den Bakterien (Michielse *et al.*, 2008). Die Dauer der Co-Kultivierung ist ebenfalls ein kritischer Schritt in dem

Transformationsprozess. Dabei hat sich bei Protokollen für andere Pilze ein Zeitraum von 2-3 Tagen als erfolgreich gezeigt (Michielse *et al.*, 2008; Rho *et al.*, 2001).

Nachdem die Anpassungen der Transformationsparameter nicht zur erfolgreichen Integration der Resistenzkassette HPT führten, wurde der Promotor der Kassette durch einen pilzeigenen ersetzt. Denn die Verwendung von Promotoren des zu transformierenden Organismus hilft bei der Expression des Resistenzgens sowie bei der Transformationseffizienz (Bowyer, 2001). Die hier verwendete Resistenzkassette HPT enthält das Hygromycin B Phosphotransferase Gen *hpt*, das durch den konstitutiven *trpC*-Promotor aus *Aspergillus nidulans* reguliert wird. Der *trpC*-Promotor ist in seiner biologischen Funktion verantwortlich für die Expression von Genen, die an der Tryptophanbiosynthese beteiligt sind (Hamer und Timberlake 1987). Er wird häufig als Werkzeug bei der Transformation von verschiedenen Pilzstämmen eingesetzt, da er zusätzlich in der Lage ist, die Expression von Selektionsmarkern zu regulieren (Mullaney *et al.*, 1985; Rho *et al.*, 2001). Dennoch ist nicht bekannt, ob der Promotor auch für eine Transformation von *E. lata* geeignet ist. Aus diesem Grund wurden jeweils die pilzeigenen Promotorregionen der Gene, die die Proteine Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Elongationsfaktor 1 α (EF1a) codieren, vor das resistenzverleihende *hpt* Gen kloniert. Da der Promotor von GAPDH aus *Aspergillus nidulans* (Punt und van den Hondel, 1992) auch bei der ersten und bisher einzigen erfolgreichen genetischen Manipulation von *E. lata* (Bradshaw *et al.*, 2005) zum Einsatz kam, diente dieser Promotor als gutes Beispiel für die Erhöhung der Transformationseffizienz. Der Promotor des Gens EF1a aus *E. lata* wurde aufgrund der starken Aktivität ausgewählt, die bereits in anderen Organismen beobachtet wurde (Kitamoto *et al.*, 1998; Schirmaier und Philippsen, 1984) Die beiden konstruierten Vektoren pFS-EI_GAPDH-HPT und pFS-EI_EF1a-HPT führten bei der ATMT allerdings nicht zu resistenten Kolonien.

4.3.2 Zielgerichtete Mutagenese in *Eutypa lata* mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation

Die zielgerichtete Mutagenese ist bei filamentösen Pilzen sehr effizient und wird durch homologe Rekombination erzielt. Sie unterscheidet sich im Vergleich zur zufälligen Mutagenese dadurch, dass auf dem Vektor die zu integrierende DNA aus zwei zum Genom homologen Bereiche bestehen, die von einem Selektionsmarker getrennt werden. Bei einer Geninaktivierung stellen dabei die homologen Sequenzen die 5' und 3' flankierende Region des zu inaktivierenden Gens dar, welches durch eine Resistenzkassette ersetzt wird. Die Effizienz der gezielten Mutagenese von filamentösen Pilzen ist von der Länge der homologen Sequenz abhängig. Während bei *Saccharomyces cerevisiae* schon eine homologe Sequenz von bis zu 100 bp für eine homologe Rekombination ausreicht, erfordern einige filamentöse

Pilze eine homologe Sequenzlänge von mindestens 1 kb (Weld *et al.*, 2006). Jedoch scheint eine Sequenzlänge der homologen Bereiche von mindestens 400 bp die homologe Rekombination zu begünstigen, wodurch die Transformationseffizienz gesteigert wird (Meng *et al.*, 2007).

Um eine Geninaktivierung bei *E. lata* durchzuführen, wurden in dieser Arbeit flankierende Bereiche von ca. 500 bp verwendet. Eine Transformation mit den konstruierten Geninaktivierungsvektoren pCAMB-HPT-5610-KO, pCAMB-HPT-10483 und pCAMB-HPT-10881-KO führte allerdings nicht zu einer erfolgreichen genetischen Manipulation von *E. lata* (siehe 3.2.2). Die zu inaktivierenden Gene codieren putative Δ Fettsäure-Desaturasen, die höchstwahrscheinlich eine katalytische Funktion im Fettsäuremetabolismus haben. Ob diese auch zusätzlich eine Funktion bei der Bildung der Dreifachbindung von Eutypin übernehmen, konnte nicht überprüft werden. Aus diesem Grund sollte in weiterführenden Ansätzen die Länge der flankierenden Bereiche erhöht werden, um die Transformationseffizienz zu optimieren.

Obwohl bei der Transformation von *E. lata* mit den Geninaktivierungskonstrukten keine Transformanten entstanden sind, konnten während des Regenerationsprozesses dennoch einige *E. lata*-Kolonien beobachtet werden, die in der Lage waren auf dem Selektionsmedium **M20** zu wachsen (siehe Abb. 3.25). Bei einer *Southern Blot* Analyse mit diesen Kolonien wurde allerdings bestätigt, dass das resistenzverleihende Gen *hpt* nicht in das Genom integriert wurde. Demnach handelt es sich nicht um eine Resistenz, sondern lediglich um eine konzentrationsabhängige Toleranz gegenüber Hygromycin B. Ein ähnliches Phänomen wurde auch von Konishi *et al.* (2015) bei der Transformation des Basidiomyceten *Pseudozyma hubeiensis* beobachtet. Dabei wuchsen nach der Elektroporation Hygromycin B-tolerante Kolonien, die jedoch kein GFP exprimierten. Das bedeutet, dass auch hier bei der Transformation keine Integration des *hpt* Gens in das Genom stattfand. Bei einem Plattenwachstumstest mit den Hygromycin B-toleranten *E. lata*-Kolonien und dem Wildtyp wurde die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Fungiziden untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass der Stamm IBWF E16012HT bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B nicht im Wachstum beeinträchtigt ist. Interessanterweise wurde zusätzlich bis 150 $\mu\text{g/ml}$ eine Toleranz gegenüber Geneticin G418 nachgewiesen. Dadurch dass diese beiden Fungizide zu den Aminoglykosiden gehören, kann davon ausgegangen werden, dass während des Transformations- und Regenerationsprozesses die tolerantesten und am besten angepassten Kolonien gegenüber Aminoglykosiden überlebt haben und selektioniert wurden. Denn auf Tebuconazol- und Pyraclostrobin-haltigen Medien konnte kein Wachstum beobachtet werden.

4.3.3 Protoplastentransformation von *Eutypa lata*

Die erste genetische Modifikation von einem *Eutypa lata*-Stamm gelang Bradshaw *et al.*, (2005) mit Hilfe einer Protoplastentransformation durch zufällige Mutagenese. Dabei wurde ein Plasmid mit der kodierenden Gensequenz für das *green fluorescent protein* (GFP) sowie das Hygromycin B Phosphotransferase Gen *hpt* in *E. lata* transformiert. Die Mutanten wurden dabei über Hygromycin B-haltiges Regenerationsmedium selektioniert und waren in der Lage GFP zu exprimieren. Einige Jahre später wurden dann mit dieser Mutante *in vivo* Infektionsstudien auf frischen Schnittwunden von einjährigen Cabernet Sauvignon-Pflanzen gemacht (Mutawila *et al.*, 2011).

Die Protoplastentransformation, die auch als PEG-vermittelte Transformation bezeichnet wird, ist eine häufig angewendete Methode zur genetischen Manipulation von Pilzen (Hynes, 1996). In einem ersten Schritt wird die Zellwand der Konidien oder des Myzels mit Hilfe von *cell wall degrading enzymes* degradiert, wodurch Protoplasten entstehen, die mit einer osmotischen Lösung stabilisiert werden. Diese Lösung besteht hauptsächlich aus Sorbitol und wird je nach Organismus mit einer Konzentration zwischen 0,8 und 1,2 M verwendet. Die Aufnahme der DNA in das Genom des Organismus erfolgt im Anschluss über die Zugabe von Polyethylenglykol und CaCl₂ (Buckel, 2015; Ruiz-Díez, 2002). Diese Vorgehensweise kann zwar zu einer Integration der DNA führen, allerdings werden häufig mehrfache ektopische DNA-Integrationen beobachtet. Durch die mehrfache Kopienzahl ist eine gezielte Geninaktivierung nicht möglich. Zusätzlich erfordert die Methode einen Regenerationsprozess, der auf die Bedürfnisse des Organismus abgestimmt werden muss. Ein weiterer Nachteil sind unterschiedliche *Batches* der lytischen Enzyme, die für die Präparation der Protoplasten benötigt werden. Diese können in ihrer Zusammensetzung und dadurch in der Enzymaktivität variieren, was einen Einfluss auf die Transformationseffizienz haben kann (Fincham, 1989; Meyer, 2008; Ruiz-Díez, 2002).

In dieser Arbeit wurde die Protoplastentransformation von *E. lata* jeweils nach den beiden Methoden von Bradshaw *et al.*, (2005) und Fischer (2014) durchgeführt. Allerdings konnten keine genetisch veränderten *E. lata*-Kolonien generiert werden. Um eine erfolgreiche Transformationsmethode für *E. lata* zu entwickeln, können in weiteren Ansätzen zusätzliche Parameter optimiert werden. Kritische Bedingungen sind in diesem Zusammenhang die Dauer der Lyse, die Osmolytkonzentration der Stabilisierungslösung, die Wahl des PEG sowie das Regenerationsmedium und die Regenerationszeit.

4.4 Antifungische Naturstoffe aus Endophyten

Die Tatsache, dass die Bekämpfung der Eutypiose bisher nicht kurativ erfolgen kann, sondern lediglich durch präventive Maßnahmen und Wundschutz mit Fungiziden eingeschränkt werden kann, sorgt bei Weinbauern für einen großen Arbeitsaufwand. Hinzu kommt, dass effektive Fungizide, wie die Benzimidazole Benomyl und Carbendazim, aufgrund von gesundheitlichen Bedenken vom Markt genommen wurden (Sosnowski *et al.*, 2013). Deshalb stellt die Suche nach neuen antifungischen Naturstoffen eine wichtige Grundlage im Pflanzenschutz dar. Darüber hinaus können Sekundärmetabolite mit gewissen bioaktiven Eigenschaften als Leitstrukturen für synthetische Modifikationen oder Wirkstoffen dienen, um zu einem späteren Zeitpunkt als Pflanzenschutzmittel formuliert zu werden (Bano *et al.*, 2016).

Endophyten werden als produktive Quelle für solche bioaktiven Naturstoffe betrachtet und konnten in jeder bisher untersuchten Pflanze gefunden werden (Schulz *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2008). Diese Mikroorganismen besiedeln die inneren Schichten des Pflanzengewebes ohne dabei sichtbare Symptome einer Infektion zu hinterlassen (Aly *et al.*, 2010). Dennoch bieten endophytische Pilze einen diversen Sekundärmetabolismus, der Teil ihrer Überlebensstrategie ist und im Verlauf der Evolution aufgrund der Anpassung an die Lebensumstände sowie durch Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen oder der Pflanzenabwehr entwickelt wurde (Schüffler *et al.*, 2009). Obwohl die erste Entdeckung von Endophyten bereits im Jahr 1904 war, blieb die pharmazeutische und agrochemische Bedeutung lange Zeit verborgen. Erst mit der Entwicklung und dem Erscheinen von neuen Screeningmethoden wurde das große Potential erkannt (Aly *et al.*, 2011). In den letzten Jahrzehnten ist das Interesse an pilzlichen Endophyten und der damit assoziierten Entdeckung von neuartigen Verbindungen erheblich gestiegen. Dies kann anhand der erhöhten Anzahl von Publikationen mit verwandten Themen beobachtet werden. Zwischen den Jahren 2000 und 2001 wurden lediglich 18 Forschungsartikel über Sekundärmetabolite aus *endophytischen* Pilzen veröffentlicht, während im Zeitraum 2008-2009 bereits 113 Artikel erschienen sind (Aly *et al.*, 2010). Dieser Trend wird sich in der nahen Zukunft fortsetzen, besonders bei Endophyten aus unerschlossenen Reservoiren und aufgrund der Tatsache, dass Naturstoffe vielversprechender als die kombinatorische Chemie ist (Schulz *et al.*, 2002).

4.4.1 Naturstoffe aus IBWF E12135

Die Artbestimmung von IBWF E12135 ließ sich aufgrund von fehlenden molekulargenetischen Unterschieden zu anderen Spezies lediglich auf die Familie der Mycosphaerellaceae einordnen. Zu dieser Familie sind zahlreiche Naturstoffe beschrieben, die hier im Einzelnen nicht diskutiert werden.

Nachdem der Stamm IBWF E12135 im Konfrontationsassay gegen *E. lata* einen Hemmhof gebildet hatte, wurde der Stamm auf antifungische Naturstoffe untersucht. Bei der Fermentation vom Stamm IBWF E12135 wurden die zwei Naturstoffe Cercosporamide (**29**) und SH E12135-2 (**30**) im Kulturfiltrat nachgewiesen (siehe Abb. 3.27). Bei der anschließenden Aufreinigung konnten 10,5 mg von **29** und 3,5 mg von **30** isoliert werden (siehe Abb. 3.28). Allerdings war es nicht möglich die Struktur von **30** aufzuklären.

4.4.1.1 Cercosporamide

Cercosporamide (**29**) wurde erstmals aus *Cercosporidium henningsii* isoliert (Sugawara *et al.*, 1991; Conover *et al.*, 1992). Diese Art wird heute als *Claro hilum henningsii* bezeichnet (Videira *et al.*, 2017). Des Weiteren wurde die Verbindung auch von *Phoma* sp. produziert (Hoffman *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). **29** ist ein Dibenzofuran und hat eine strukturelle Ähnlichkeit zur Usninsäure. Usninsäure wurde sogar schon im Jahr 1844 zum ersten Mal isoliert und ist besonders in Flechten zu finden. Die Verbindung zeichnet sich durch zahlreiche bioaktive Eigenschaften aus. Zum Beispiel wurde antimikrobielle Aktivität gegen Pflanzenpathogene, aber auch antivirale, antiprotozoale, antiproliferative und entzündungshemmende Wirkungen beschrieben. Viele Flechten und deren Extrakte enthalten Usninsäure und wurden aus diesem Grund in medizinischen, kosmetischen sowie ökologischen Anwendungen verwendet (Ingólfssdóttir, 2002).

Cercosporamide (**29**) hat ebenfalls verschiedene Bioaktivitäten. Es wurden phytotoxische und antifungische Eigenschaften beobachtet (Conover *et al.*, 1992). Zusätzlich wurde eine zytotoxische Aktivität gegen sechs Tumorzelllinien nachgewiesen (Wang *et al.*, 2012). **29** hat außerdem eine selektive Aktivität als Pkc1 Kinase Inhibitor (Sussman *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnten ebenfalls phytotoxische Wirkungen gegen *Setaria italica*, *Lepidium sativum* und *Agrostis capillaris* beobachtet werden, wenn auch in dieser Arbeit keine Nekrose auf einer Weinblattoberfläche induziert wurde (siehe Tab. 3.8). Auch eine antifungische Aktivität gegen *Eutypa lata*, *Eremothecium coryli*, *Penicillium chrysogenum* und *Paecilomyces variotii* konnten bei verschiedenen Konzentrationen nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.6). Eine Hemmung der Sporenkeimung wurde bei *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* und *Pyricularia oryzae* festgestellt (siehe Tab. 3.7). Obwohl **29** das Wachstum von *E. lata* ab einer Konzentration von 20 µg/ml inhibiert, ist die Verbindung nicht als Fungizid geeignet, da auch phytotoxische Nebeneffekte auftreten können. Dennoch kann diese Verbindung als Leitstruktur dienen, um neue Wirkstoffe zu entwickeln.

4.4.2 Naturstoffe aus IBWF E99338

Aufgrund von molekulargenetischen Untersuchungen wurde der Stamm IBWF E99338 der Familie der Leptosphaeriaceae zugeordnet (siehe Kapitel 3.3.2.2). Eine genauere Identifizierung der Spezies konnte auch durch morphologische Eigenschaften nicht erzielt werden.

Da der Stamm IBWF E99338 im Plattenkonfrontationsassay gegen *E. lata* eine antifungische Wirkung hatte, wurde untersucht, ob die produzierten Naturstoffe für diese Wirkung verantwortlich sind. Nach der Fermentation von Stamm IBWF E99338 wurden 17,5 mg der Verbindung Fusidienol A (**31**) isoliert. Des Weiteren konnten die Xanthon Derivate Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate (**32**) und Monodictyxanthone (**33**) als nicht trennbares Gemisch (3,3 mg) aus dem Kulturfiltrat gewonnen werden (siehe Abb. 3.31).

4.4.2.1 Fusidienol A

Fusidienol A (**31**) wurde bereits in einem Screening für neue FPTase (Farnesyl-protein Transferase) Inhibitoren entdeckt und aus *Phoma* sp. isoliert (Singh *et al.*, 1997). FPTasen farnesylieren Ras (p21) Proteine C-terminal am Cysteinrest. Da vermutet wird, dass mutierte Ras Onkogene Darm- bzw. Bauchspeicheldrüsenkrebs verursachen, können die FPTase Inhibitoren potentiell als Wirkstoff für Krebsmedikamente in Frage kommen. Darüber hinaus wurde **31** in großen Mengen aus dem Endophyten *Microsphaeropsis* sp. isoliert (Krohn *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der biologischen Charakterisierung von **31** eine starke Wachstumshemmung gegen das Myzelwachstum von *Eutypa lata* ab einer Konzentration von 15 µg/ml beobachtet (siehe Tab. 3.6). Die Bildung des Hemmhofs im Plattenkonfrontationsassay ist demnach auf die Wirkung von **31** zurückzuführen. Ob diese Wirkung zur Eindämmung und Bekämpfung der Eutypiose ausreicht, sollte weiter überprüft bzw. chemisch weiter optimiert werden. Des Weiteren konnten antifungische Eigenschaften nachgewiesen werden, indem eine minimale Hemmkonzentration gegen die Pilze *Penicillium chrysogenum* bei 40 µg/ml und *Paecilomyces variotii* bei 20 µg/ml bestimmt wurden. Auch eine Hemmung der Sporenkeimung von *Pyricularia oryzae* und *Phytophthora infestans* wurde durch **31** verursacht (siehe Tab. 3.7). Hinweise auf antibakterielle, phytotoxische oder zytotoxische Eigenschaften konnten nicht gefunden werden.

Strukturell ist **31** eng verwandt mit dem Isomer Fusidienol B. Beide konnten vor kurzem aus *Dictyosporium* sp. isoliert werden (Tran *et al.*, 2019). Die Namensgebung und die Grundstruktur des Moleküls gehen jedoch auf Fusidienol zurück, dass aus *Fusidium griseum* gewonnen wurde (Singh *et al.*, 1994). Weitere sehr ähnliche Strukturen sind Xantheponone

aus *Phoma medicaginis* (Liermann *et al.*, 2009) und die Isofusidienole A-D aus *Chalara sp.* (Lösgen *et al.*, 2008). Die Strukturen der Verbindungen sind in Abb. 4.6 dargestellt.

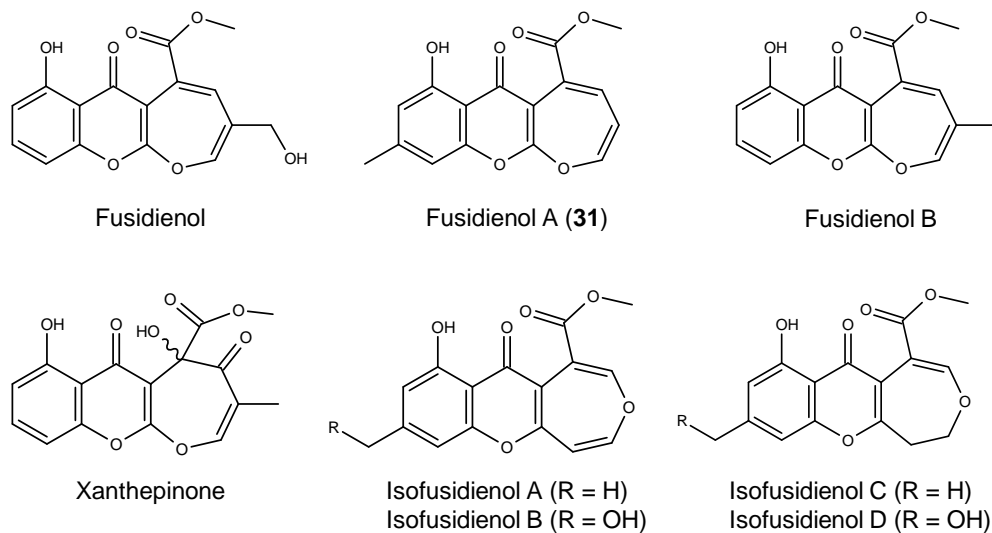


Abb. 4.6: Verwandte Strukturen zu Fusidienol A (31).

Ähnlich wie bei **31** wurde bei Xantheponone eine starke antifungische Aktivität nachgewiesen, indem die Sporenkeimung bei *Pyricularia oryzae*, *Phytophthora infestans* und *Botrytis cinerea* gehemmt wurde. Dagegen konnte lediglich eine schwache antibakterielle Wirkung beobachtet werden und eine zytotoxische Aktivität konnte bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml nicht nachgewiesen werden (Liermann *et al.*, 2009).

Isofusidienol A und B zeigten in einem Agardiffusionstest gegen *Bacillus subtilis* eine starke antibakterielle Aktivität. Zusätzlich war Isofusidienol A in der Lage das Wachstum von *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* moderat zu inhibieren. Bei Isofusidienol C und D konnte hingegen nur eine schwache Wirkung gegen *B. subtilis* beobachtet werden (Lösgen *et al.*, 2008).

4.4.2.2 Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate und Monodictyxanthone

Die Naturstoffe Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate (**32**) und Monodictyxanthone (**33**) besitzen das Kerngerüst von Xanthon. Moleküle mit dieser Grundstruktur werden zahlreich und divers von Pilzen, Flechten und Bakterien als Sekundärmetabolite produziert, die mehrfach substituiert vorliegen können. Die Wirkstoffklasse der Xanthone ist sehr interessant für medizinische Anwendungen, da diese eine ausgeprägte biologische Aktivität haben können (Masters und Bräse, 2012).

Der Naturstoff **32** wurde zum ersten Mal aus dem Pilz *Monilinia fructicola* isoliert (Kachi und Sassa, 1986). Danach wurde die Produktion dieser Verbindung auch bei den Mikroorganismen

Penicillium citrinum, *Guanomyces polythrix*, *Astrocystis* sp. BCC 22166 und *Aspergillus sydowii* PSU-F154 nachgewiesen und ist demnach häufig als Naturstoff anzutreffen (Khamthong *et al.*, 2012; Macías *et al.*, 2001; Kornsakulkarn *et al.*, 2014; Trisuwan *et al.*, 2014). In bisherigen Studien wurden keine Hinweise auf eine antibakterielle, antifungische oder zytotoxische Aktivität gefunden (Khamthong *et al.*, 2012; Kornsakulkarn *et al.*, 2014). Macías *et al.* (2001) berichteten von einer sehr starken Hemmung des radialen Wachstums bei der Hülsenhirse *Echinochloa crusgalli* und hat demnach potentielle phytotoxische Eigenschaften.

Monodictyranthone (**33**) wurde bereits aus dem Pilz *Monodictys putredinis* isoliert (Krick *et al.*, 2007). Informationen zu biologischen Aktivitäten wurde bisher nicht veröffentlicht.

Da die beiden Naturstoffe in dieser Arbeit nur als Gemisch aus dem Kulturfiltrat gewonnen wurden, konnte keine biologische Charakterisierung für die einzelnen Verbindungen durchgeführt werden. Allerdings wurde das Gemisch auf eine antifungische Aktivität gegen das Myzelwachstum von *E. lata* untersucht. Dabei konnte bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml keine Wachstumshemmung beobachtet werden.

4.4.3 Naturstoffe aus *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301

Die Identifizierung von *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301 konnte aufgrund von molekulargenetischen Merkmalen durchgeführt werden (siehe Kapitel 3.3.2.3). *P. pannorum* ist ein saprophytischer filamentöser Pilz, der häufig bei kälteren Temperaturen zu finden ist. Er ist überall verbreitet und konnte bereits aus dem arktischen Permafrost, einigen Böden aus Gletscherufern in asiatischen Ländern, aber auch aus Blättern und Wurzeln von Pflanzen isoliert werden (Wang *et al.*, 2017; Figueroa *et al.*, 2015; Parish *et al.*, 2009; Bergero *et al.*, 2000). Neben der Fähigkeit neugebildete Wurzeln von *Rhododendron* und *Vaccinium* Pflanzen zu kolonisieren (Vohník *et al.*, 2007), gibt es auch Berichte, dass der Pilz selten Infektionen auf der Haut und Nägeln von Menschen verursacht (Gianni *et al.*, 2003).

Aus dem Pilz *Geomyces pannorum* wurde bisher lediglich der Naturstoff Pannomycin isoliert, der eine cis-Decalin Grundstruktur besitzt (siehe Abb. 4.7). Bei Pannomycin konnte eine schwache antibakterielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* und *Bacillus subtilis* beobachtet werden (Parish *et al.*, 2009). Seit einer phylogenetischen Analyse, bei der die Verwandtschaftsverhältnisse der Gattungen *Geomyces* und *Pseudogymnoascus* auf molekularer Ebene untersucht wurden, wird *G. pannorum* der Gattung *Pseudogymnoascus* zugeordnet (Minnis und Lindner, 2013).

Weitere bekannte Sekundärmetabolite aus Pilzen der Gattungen *Pseudogymnoascus* bzw. *Geomyces* sind mehrere Geomycin-Derivate und Asterric acid Derivate, wie die drei Pseudogymnoascine A-C. Eine genaue Artbestimmung wurde bei diesen Stämmen nicht durchgeführt (Li *et al.*, 2008; Figueroa *et al.*, 2015). Die Strukturen von einigen Vertretern sind in Abbildung Abb. 4.7 dargestellt.

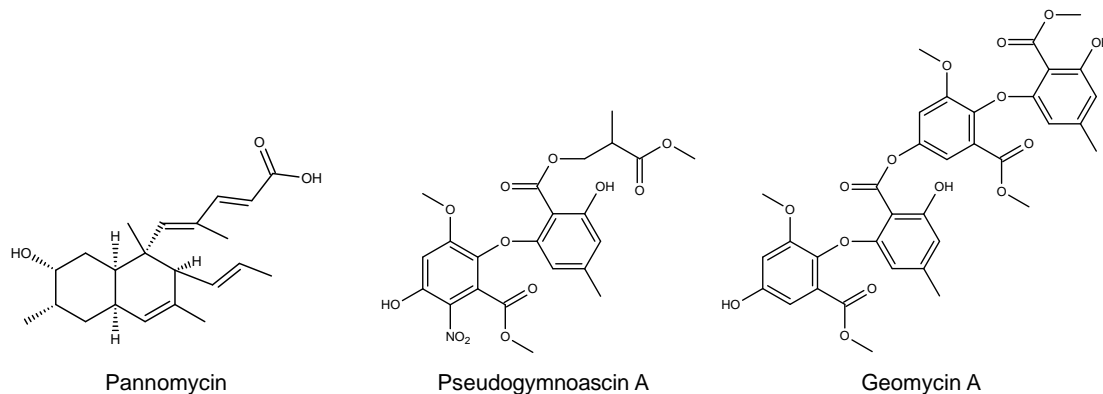


Abb. 4.7: Strukturen von Pannomycin, Pseudogymnosascin A und Geomycin A.

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei neuen Sekundärmetabolite Pannorumin A (**34**, 23,2 mg), Pannorumin B (**35**, 37 mg) und Pannorumin C (**36**, 6,1 mg) aus dem Pilz *P. pannorum* IBWF E99301 isoliert, die bisher nicht in der Literatur beschrieben sind.

4.4.3.1 Pannorumin A-C

Die Grundstruktur von Pannorumin enthält zwei Ester-Verbindungen und kann aufgrund ihrer Neuartigkeit nicht zu anderen Stoffklassen zugeordnet werden. Die Pannorumine A (**34**), B (**35**) und C (**36**) unterscheiden sich lediglich in der Substitution von zwei Positionen. Bei **34** sind an diesen Positionen zwei Hydroxygruppen, bei **35** befindet sich eine Hydroxygruppe und eine Carbonylgruppe und bei **36** sind zwei Carbonylgruppen vertreten. Da bei **35** und **36** durch die Anwesenheit einer Carbonylgruppe an diesen Positionen ein Michael-Akzeptor entsteht, wurde die Stabilität in einem Inkubationstest mit L-Cystein überprüft. Nach der Zugabe von L-Cystein konnte bei **34** keine Veränderung an dem Molekül festgestellt werden. Bei **35** und **36** konnten nach der Inkubation hingegen die Naturstoffe nicht mehr nachgewiesen werden. Stattdessen reagierte die Thiolgruppe von L-Cystein mit den Michael-Akzeptoren, wodurch aus dem Naturstoff **35** zwei Addukte und aus dem Naturstoff **36** mehrere Moleküle entstanden sind.

Bei der Untersuchung auf Wachstumshemmung gegen *Eutypa lata* wurde bei **36** eine starke Wirkung beobachtet, die allerdings aufgrund der beschriebenen Instabilität fungistatisch wirkte. Die antifungische Eigenschaft des Pilzes, die im Plattenkonfrontationsassay

nachgewiesen wurde, geht demnach auf diesen Sekundärmetaboliten zurück. Eine zusätzliche fungizide Aktivität von **36** wurde gegen *Eremothecium coryli* nachgewiesen.

Die Verbindung **35** war ebenfalls gegen *E. coryli* aktiv, konnte allerdings das Wachstum von *E. lata* nicht hemmen. Besonders beachtenswert war eine sehr starke antibakterielle Aktivität gegen *Aneurinibacillus migulanus*, wobei die anderen getesteten Bakterienstämme nicht sensitiv reagierten, sowie eine starke zytotoxische Aktivität gegen HeLa-S3-Zellen. Bei der Verbindung **34** wurden hingegen keine biologischen Aktivitäten beobachtet.

4.4.4 Naturstoffe aus IBWF 144-09 und IBWF 022-09

Der Stamm IBWF 144-09 konnte durch die molekulargenetische Untersuchung der ITS-Sequenz zur Gattung *Pseudeurotium* sp. zugeordnet werden (siehe Kapitel 3.3.3). Eine genauere Identifizierung der Spezies konnte auch durch morphologische Eigenschaften nicht erzielt werden. Nach der Fermentation von IBWF 144-09 im 1 L-Kolben konnte der Naturstoff Asperfuran (**37**) im Kulturfiltrat nachgewiesen werden, der als einziger Naturstoff im Rohextrakt eine fungizide Wirkung gegen *E. lata* hatte. **37** inhibierte das Myzelwachstum von *E. lata* ab einer Konzentration von 25 µg/ml sowie bei *Rhizomucor miehei* und *Penicillium chrysogenum* ab einer Konzentration von 50 µg/ml. Weitere biologische Aktivitäten wurden von Pfefferle *et al.* (1990) beschrieben, nachdem Asperfuran aus *Aspergillus oryzae* (aktueller Name: *Aspergillus flavus*) isoliert wurde. Neben weiteren fungiziden Wirkungen gegen eine Reihe von ausgewählten Pilzstämmen, wurde beobachtet, dass **37** ein Potential hat die Aktivität der Chitinsynthese zu reduzieren. Dagegen konnte keine antibakterielle Aktivität nachgewiesen werden.

Der Stamm IBWF 022-09 wurde bereits am Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung gGmbH anhand von morphologischen Merkmalen und einer ITS-Sequenzierung zur Gattung *Hypoxylon* sp. zugeordnet. Die ITS-Sequenz ist nicht in dieser Arbeit aufgeführt. Nach der Fermentation von IBWF 022-09 im 1 L-Kolben konnte der antifungische Naturstoff Sporothriolide (**38**) im aufgearbeiteten Rohextrakt nachgewiesen werden. Jedoch war es nicht möglich **38** näher biologisch zu charakterisieren. Sporothriolide wurde laut Krohn *et al.* 1994 erstmals aus *Sporothrix* sp. isoliert und wies eine herbizide Aktivität gegen *Lepidium sativum* und *Medicago sativa* auf, sowie weitere antifungische und antibakterielle Wirkungen gegen eine Reihe von Mikroorganismen. Die beste Wirkung hatte der Naturstoff gegen *Botrytis cinerea*. In einer Arbeit von Surup *et al.* (2014) wurde **38** ebenfalls in einer *Hypoxylon* Spezies nachgewiesen. Es wurde postuliert, dass **38** ein spezies-spezifischer Naturstoff ist, da lediglich in mehreren *H. monticulosum*-Stämmen die Produktion von **38** beobachtet werden konnte. In verwandten *Hypoxylon*-Arten war das hingegen nicht möglich. Außerdem wurde der

biologische Ursprung von **38** durch *Sporothrix* sp. in Frage gestellt, da eine erneute Untersuchung des Stamms eine Produktion nicht bestätigen konnte. Vielmehr wurde von einer Kontamination durch einen anderen Pilzstamm ausgegangen. Die antifungischen Aktivitäten von **38**, die von Krohn *et al.* (1994) beschrieben wurden, konnten jedoch von Surup *et al.* (2014) bestätigt werden. Besonders gegen filamentöse Pilze und Hefen, wie *Candida albicans*, wurde eine starke fungizide Wirkung beobachtet.

4.4.5 Überprüfung der antagonistisch wirkenden Endophyten als potentielle biological control agents gegen *Eutypa lata*

Die Landwirtschaft hat in den letzten 100 Jahren, durch die Erforschung und Verwendung von chemischen Düngern und Pestiziden, wesentlich von einer verbesserten Pflanzenproduktivität und Erntequalität profitiert. Jedoch wurde die Umwelt durch eine übermäßige Nutzung, aber auch durch Missbrauch von Agrochemikalien stark belastet. Dies führte zu einer erheblichen Veränderung in der Wahrnehmung und Einstellung von Teilen der Bevölkerung, die den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln einschränken bzw. verbieten möchten. Als Konsequenz wurden strenge Regularien für die Verwendung von Pflanzenschutzmitteln eingeführt und potentiell schädliche Wirkstoffe wurden vom Markt genommen (Pal und McSpadden Gardener, 2006). Dennoch stellt die Ausbreitung von Pflanzenkrankheiten ein großes Problem für die Landwirtschaft dar. Aus diesem Grund werden Alternativen gesucht, die sich auf eine biologische Bekämpfung konzentrieren. Dazu werden *biological control agents* (BCAs) als präventiven Schutz auf Pflanzen appliziert, die normalerweise Pilze, Bakterien oder Viren enthalten. Der größte Vorteil von BCAs ist, dass sie sehr spezifisch gegen das zu bekämpfende Pathogen wirken und dadurch keinen Schaden an anderen Organismen oder den Agrarpflanzen verursachen. In den letzten Jahrzehnten wurden viele Berichte über die Identifizierung von effektiven BCAs publiziert. Einige davon wurden sogar für die kommerzielle Nutzung zugelassen (O'Brien, 2017).

Obwohl seit dem Jahr 2000 mehr als 40 BCAs gegen die Pathogene der Pflanzenkrankheiten Esca, *Botryosphaeria dieback* und *Eutypa dieback* eingesetzt wurden, waren nur wenige Spezies aus den Gattungen *Bacillus* und *Trichoderma* in der Lage das Wachstum dieser Pathogene zu hemmen (Mondello *et al.*, 2018). In Feldexperimenten wurde das antifungische Potential von einem *Bacillus subtilis* Isolat und von den *Trichoderma* Produkten T77 und Trichoseal-Spray überprüft. Diese Anwendungen führten dabei jeweils zu einer signifikanten Reduktion von *E. lata* Infektionen (Ferreira *et al.*, 1991; Kotze, 2008; Halleen *et al.*, 2010). Da der Bedarf an wirksamen BCAs in Zukunft weiter ansteigen wird, ist die Suche nach antagonistischen Mikroorganismen Gegenstand aktueller Forschung. Besonders Organismen aus weitgehend unerschlossenen Quellen, wie z. B. Endophyten, bieten großes Potential für

die biologische Bekämpfung von Schädlingen und Krankheitserregern (Hodkinson *et al.*, 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Identifikation von potentiellen BCAs Plattenkonfrontationsassays mit dem Pathogen *E. lata* und endophytischen Pilzen durchgeführt. Dabei wurde unter anderem bei den Stämmen IBWF E12135, IBWF E99338, *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301 und IBWF 144-09 eine antagonistische Wirkung beobachtet, die sich in der Bildung eines Hemmhofs äußerte (siehe Abb. 3.26). Im Anschluss wurden, wie bereits in Kapitel 4.4.1 bis 4.4.3 beschrieben, antifungische Sekundärmetabolite aus diesen Pilzen isoliert, die nachweislich für diesen Hemmhof verantwortlich waren. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch *in planta* zu beobachten ist, wurde ein *Vitis shoot assay* durchgeführt. Nach 4-wöchiger Inkubationszeit wurde das Rebstück im Durchschnitt 20 mm weit durch das Myzel von *E. lata* kolonisiert. Bei der Koinkubation mit den Antagonisten IBWF E12135, IBWF E99338, IBWF E99301 und IBWF 144-09 konnte durch deren Anwesenheit diese Distanz auf 10 bis 16,6 mm reduziert werden. Allerdings ist dies nicht ausreichend, um die Weinpflanze vor einer Infektion mit *E. lata* zu schützen. Die schlechte präventive Wirkung der Stämme hat mehrere Gründe. Zum einen benötigt ein BCA die Fähigkeit den Wirt zu besiedeln, ohne ihn selbst zu schädigen. Bei den hier untersuchten Stämmen war lediglich IBWF 144-09 in der Lage in das Holz vorzudringen. Dadurch haben diese Pilze den Nachteil weniger effizient Nährstoffe erschließen zu können, wodurch sie wenig Biomasse aufbauen oder auch antifungische Sekundärmetabolite nicht in ausreichender Menge produzieren können. Zum anderen wurde im Vergleich zum Pathogen bei den Antagonisten *in vitro* ein langsames Wachstum beobachtet. Das bedeutet, dass die Antagonisten einen Wettbewerbsnachteil bei der Konkurrenz um den Lebensraum haben. Demnach sind die getesteten Pilzstämme nicht geeignet, um die Weinpflanzen als BCA vor einer Infektion mit *E. lata* zu schützen.

In einer Studie von John *et al.* (2008) wurde die Kolonisation von Weinpflanzen mit *Trichoderma harzianum* untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass *T. harzianum* nach 12-wöchiger Inkubation aus dem gesamten Rebstück isoliert werden konnte, aber auch nach 20 Monaten noch nachweisbar war. Demnach hat der Mikroorganismus die Fähigkeit Weinreben schnell zu kolonisieren und persistiert in der Pflanze. Bei einer weiteren Untersuchung wurde zudem beobachtet, dass *T. harzianum* eine Infektion durch *E. lata* signifikant reduziert. Durch diese Erkenntnisse sind die verschiedenen *Trichoderma*-Stämme ein potentielles Mittel, um die Infektionskrankheit *Eutypa dieback* einzudämmen.

5 Zusammenfassung

Untersuchungen zur Aufklärung der Biosynthese von acetylierten Phenolen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Aufklärung der Biosynthese von acetylierten Phenolen durchgeführt, die von dem Weinrebenpathogen *Eutypa lata* produziert werden. Zu Beginn wurde das Potential von vier verschiedenen *E. lata*-Stämmen bezüglich der Produktion von unterschiedlichen Naturstoffen analysiert. Dabei wurden 16 Sekundärmetabolite isoliert, die bei einer ausreichenden Menge auf verschiedene Bioaktivitäten überprüft wurden.

Aus dem Stamm *E. lata* IBWF E16012 wurden die acetylierten Phenole Eutypin, Sicayne, Eulatinol und FS E16012-3 isoliert. Die Phytotoxine Eutypin und Eulatinol zeigten in einem Blattrondelltest eine Nekrose-induzierende Wirkung an Weinblättern und blieben auch nach der Inkubation mit L-Cystein nachweislich stabil. Zudem wurden die bisher unbekanntes Verbindungen Eulaglycosid und FS E16012-7 erstmals isoliert und die Struktur konnte aufgeklärt werden. Bei dem Versuch den Stamm IBWF E16012 molekulargenetisch zu manipulieren, wurde ein Hygromycin B-toleranter Stamm beobachtet, der als IBWF E16012HT bezeichnet wurde. Obwohl im Vergleich zum Wildtyp keine genetische Veränderung nachgewiesen werden konnte, wurden dennoch signifikante Unterschiede in der Sekundärmetabolitproduktion detektiert. Aus diesem Stamm wurden nach einer Fermentation ausschließlich die Verbindungen Eutypinol und FS E16012HT-1 isoliert. Durch diese Beobachtung wird eine direkte Beteiligung von FS E16012HT-1 als Zwischenstufe in der Biosynthese von acetylierten Phenolen vermutet.

Aus dem Stamm IBWF E16121 wurde lediglich die Verbindung O-Methylmellein isoliert und aus dem Stamm IBWF E16123 wurde das allenische Epoxycyclohexan FS E16123-1, Eutypinol, Tyrosol, N-Acetyltyramine, O-Methylmellein und der bisher unbekanntes Naturstoff FS E16123-8 isoliert. Die Struktur von vier weiteren Naturstoffen konnte aufgrund ihrer physikochemischen Ähnlichkeit und vermutlichen Diastereomerie nicht identifiziert werden.

Bei Supplementationsstudien zur Identifizierung von potentiellen Zwischenstufen induzierte die Zugabe von Zimtaldehyd eine neun bis 15-fache Produktionssteigerung von Eutypinol. Diese Beobachtung kann mit der antifungischen Eigenschaft von Zimtaldehyd zusammenhängen, auf die der Organismus mit einer erhöhten Eutypinolproduktion reagiert. Denn strukturverwandte Substanzen konnten nur zu einer geringen Produktionssteigerung beitragen. Außerdem wird vermutet, dass bei der Biosynthese von acetylierten Phenolen weitere Vorstufen aus dem Mevalonatweg benötigt werden.

Nachdem signifikante Unterschiede im Metabolismus der Stämme IBWF E16012 und IBWF E16121 beobachtet werden konnten, wurde eine vergleichende Transkriptomanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Transkriptome bei produzierenden und nicht-produzierenden Bedingungen sequenziert und anschließend auf das sequenzierte und assemblierte Genom referenziert. Mit Hilfe von bioinformatischen Methoden wurden potentielle Biosynthesecluster identifiziert. Nach der Auswertung der Daten konnten einige Gene, die bei der produzierenden Bedingung eine hohe Expressionsrate aufwiesen, einem Biosynthesecluster zugeordnet werden. Aufgrund von diesen Beobachtungen wurde ein möglicher Biosyntheseweg für die acetylierten Phenole postuliert. Darin besteht die Zwischenstufe dieser Naturstoffe aus 4-Hydroxybenzoesäure (Shikimisäureweg) und DMAPP (Mevalonatweg), die enzymatisch zu 4-Hydrox-3-dimethylallylbenzoate fusionieren und über mehrere Schritte über FS E16012HT-1 zu Eutypinol katalysiert werden.

Suche nach antagonistischen Pilzstämmen und Isolation von antifungischen Naturstoffen

In einem Plattenkonfrontationsassay wurden 21 Pilzstämmen identifiziert, die in der Lage sind das Myzelwachstum von *E. lata* zu hemmen. Davon wurden drei Endophyten auf ihre antifungische Aktivität untersucht, was zur Isolation von acht Naturstoffen führte. Diese Organismen als Ganzes eigneten sich jedoch nicht als wirksames „*biological control agent*“, da eine Kolonisierung der Pflanze durch *E. lata* nicht verhindert werden konnte. Die isolierten Sekundärmetabolite weisen allerdings interessante fungizide Aktivitäten auf.

Aus IBWF E12135 wurde Cercosporamide und SH E12135-2 isoliert. Cercosporamide ist für die fungizide Aktivität verantwortlich und inhibierte *E. lata* im Wachstum und andere Pilze bei der Sporenkeimung.

Aus IBWF E99338 wurde Fusidienol A isoliert, das eine antifungische Wirkung gegen die untersuchten Pilze hat und auch die Sporenkeimung von Pilzen hemmt. Monodictyranthone und Methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate wurden in einem nicht trennbaren Gemisch isoliert, wodurch eine biologische Charakterisierung nicht möglich war.

Aus *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301 wurden drei neue Verbindungen isoliert, die als Pannorumin A, B und C bezeichnet wurden. Während Pannorumin C eine starke Wachstumshemmung gegen *E. lata* zeigte, wurde bei Pannorumin B eine starke antibakterielle Aktivität gegen *Aneurinibacillus migulanus* und cytotoxische Aktivität gegen die Zelllinie HeLa-S3-Zellen beobachtet. Nach der Zugabe von L-Cystein zeigte Pannorumin C gegen das Myzelwachstum von *E. lata* keine Aktivität.

Summary

Investigations to reveal the biosynthesis of acetylenic phenols

In this work, investigations were performed to elucidate the biosynthesis of acetylenic phenols produced by the grapevine pathogen *Eutypa lata*. The potential of four different *E. lata* strains was analysed with respect to the production of different natural compounds. Within the scope of this study, 16 secondary metabolites were isolated and, if they were sufficiently present, were screened for various bioactivities.

From the strain *E. lata* IBWF E16012 the acetylenic phenols eutypine, sicayne, eulatinol and FS E16012-3 were isolated. The phytotoxins eutypine and eulatinol demonstrated a necrosis-inducing effect on vine leaves and remained stable even after incubation with L-cysteine. In addition, the previously unknown compounds eulaglycoside and FS E16012-7 were isolated for the first time and their structure could be elucidated. During the trial to manipulate the strain IBWF E16012 genetically, a hygromycin B tolerant strain was observed, which was designated IBWF E16012HT. Although the strain showed no genetic modification compared to the wild type, significant differences in secondary metabolite production were detected. Only the compounds eutypinol and FS E16012HT-1 were isolated from this strain after fermentation. This observation suggests a presumed involvement of FS E16012HT-1 as an intermediate in the biosynthesis of the acetylenated phenols.

From the strain IBWF E16121 only the compound O-methylmellein was isolated and from the strain IBWF E16123 the allenic epoxycyclohexane FS E16123-1, eutypinol, tyrosol, N-acetyltyramine, O-methylmellein and the previously unknown natural compound FS E16123-8 were isolated. The structure of four other natural compounds could not be identified due to their physicochemical similarity and suspected diastereomerism.

In supplementation studies to identify potential intermediates, the addition of cinnamaldehyde induced a nine to 15-fold increase in the production of eutypinol. This observation may be related to the antifungal property of cinnamaldehyde, on which the organism reacts with increased eutypinol production. Structurally related compounds could only contribute to a small increase in production. In addition, it is assumed that the biosynthesis of acetylenated phenols requires further precursors from the mevalonate pathway.

After observing significant differences in the metabolism of the strains IBWF E16012 and IBWF E16121, a comparative transcriptome analysis was performed. For this purpose, the transcriptomes were sequenced under producing and non-producing conditions and subsequently referenced to the sequenced and assembled genome. Potential biosynthesis clusters were identified using bioinformatics methods. After evaluation of the data, some genes

that showed a high expression rate under the producing condition could be assigned to a biosynthesis cluster. Based on these observations a possible biosynthetic pathway for the acetylenated phenols was postulated. The intermediate of these natural products consists of 4-hydroxybenzoic acid (shikimic acid pathway) and DMAPP (mevalonate pathway), which react enzymatically to 4-hydrox-3-dimethylallylbenzoates and are catalyzed in several steps via FS E16012HT-1 to eutypinol.

Screening for antagonistic fungal strains and isolation of antifungal natural products

In a plate confrontation assay 21 fungal strains were identified that are able to inhibit mycelial growth of *E. lata*. Three of these endophytes were examined for their antifungal activity, which led to the isolation of eight natural compounds. However, these organisms were not suitable as effective "biological control agents", since colonisation of the plant by *E. lata* could not be prevented. Nevertheless, the isolated secondary metabolites exhibit interesting fungicidal activities.

From IBWF E12135 cercosporamide and SH E12135-2 were isolated. Cercosporamide is responsible for fungicidal activity and inhibited *E. lata* in growth and other fungi in spore germination.

From IBWF E99338 fusidienol A was isolated, which has an antifungal effect against the investigated fungi and also inhibits the spore germination of fungi. Monodictyranthone and methyl-8-hydroxy-6-methylxanthone-1-carboxylate were isolated in an inseparable mixture, making a biological characterization impossible.

Three new compounds were isolated from *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301, which were designated pannorumin A, B and C. While pannorumin C showed a strong growth inhibition against *E. lata*, pannorumin B showed a strong antibacterial activity against *Aneurinibacillus migulanus* and cytotoxic activity against the HeLa-S3 cell line. After the addition of L-cysteine, pannorumin C exhibited no activity against mycelial growth of *E. lata*.

6 Literaturverzeichnis

- Abuodeh, R.O., Orbach, M.J., Mandel, M.A., Das, A. und Galgiani, J.N. (2000).** Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Infectious Diseases*, 181(6): 2106–2110.
- Alexa, A. und Rahnenfuhrer, J. (2016).** topGO: Enrichment analysis for Gene Ontology. R package version 2.28.0. *BioConductor*.
- 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*, 41(1): 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0034-4>
- Aly, A.H., Debbab, A. und Proksch, P. (2011).** Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6): 1829–1845. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3270-y>
- 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*, 39(1): 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01216-X](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01216-X)
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A. und Evidente, A. (2011).** Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins*, 3(12): 1569–1605 <https://doi.org/10.3390/toxins3121569>
- Arakawa, H., Torimoto, N. und Masui, Y. (1969).** Bestimmung der absoluten Konfiguration von Agrimonolid und Mellein. *Liebigs Annalen Der Chemie*, 728, 152–157.
- Ayer, W.A., Browne, L.M., Feng, M.C., Orszanska, H. und Saeedi-Ghomi, H. (1986).** The chemistry of the blue stain fungi. Part 1. Some metabolites of *Ceratocystis* species associated with mountain pine beetle infected lodgepole pine. *Canadian Journal of Chemistry*, 64(5): 904–909. <https://doi.org/10.1139/v86-149>
- Bano, N., Rizvi, I.F., Sharma, N., Siddiqui, M.H., Kalim, M., Khan, A. und Akhtar, S. (2016).** Production of bioactive secondary metabolites from endophytic fungi. *International Research Journal of Engineering and Technology*, 3(6): 1859–1866.
- Batista, A.N., Batista Jr, J.M., Souza-Moreira, T.M., Valentini, S.R., Kato, M.J., Zanelli, C.F. und Furlan, M. (2018).** Biosynthetic insights into p-Hydroxybenzoic Acid-Derived Benzopyrans in *Piper gaudichaudianum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(5): 1105–1114.
- Bauer, C. (2017).** Identifizierung neuartiger Wirkstoffe aus Pilzen gegen *Eutypa lata*. Bachelorarbeit am Fachbereich der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Belarbi, B. und Mur, G. (1983).** Observations sur la germination des conidies ou stylospores du champignon *Eutypa armeniacae*. *Prog. Agric. Vitic.*, 24: 636–637.
- Bergero, R., Perotto, S., Girlanda, M., Vidano, G. und Luppi, A.M. (2000).** Ericoid mycorrhizal fungi are common root associates of a mediterranean ectomycorrhizal plant (*Quercus ilex*). *Molecular Ecology*, 9(10): 1639–1649.
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C. und Fontaine, F. (2013).** Grapevine trunk diseases: Complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62(2): 243–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x>
- Blacklock, B.J., Scheffler, B.E., Shepard, M.R., Jayasuriya, N. und Minto, R.E. (2010).** Functional diversity in fungal fatty acid synthesis: The first acetylenase from the pacific golden chanterelle, *Cantharellus formosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(37): 28442–28449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.151498>
- Blair, J. und Newbold, G.T. (1955).** Lactones. Part II. The structure of mellein. *Journal of the Chemical Society*, 2871–2875.
- Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P.E. und Cantu, D. (2013).** Draft genome sequence of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* UCR-EL1. *Genome Announcements*, 1(3): e00228-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00228-13>. Copyright

- Blin, K., Kim, H.U., Medema, M.H. und Weber, T. (2019).** Recent development of antiSMASH and other computational approaches to mine secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4): 1103-1113.
- Bowyer, P. (2001).** DNA-mediated transformation of fungi. *Molecular and cellular biology of filamentous fungi: a practical approach*. Talbot, N.J. (Hrsg.), Oxford: Oxford University Press: 33–46.
- Bradshaw, R.E., Duan, G. und Long, P.G. (2005).** Transformation of fungal grapevine trunk disease pathogens with the green fluorescent protein gene. *Phytopathologia Mediterranea*, 44(2): 162–168. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1792
- Bu'Lock, J.D. und Smalley, H.M. (1962).** 898. The biosynthesis of polyacetylenes. Part V. The role of malonate derivatives, and the common origin of fatty acids, polyacetylenes, and "acetate-derived" phenols. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 4662–4664.
- Buckel, I. (2015).** Beschreibung von phytotoxischen Dioxolanonen als konstitutive Virulenzfaktoren und Etablierung eines Transformationssystems zur zielgerichteten Mutagenese in *Guignardia bidwellii*, Dissertation am Fachbereich der Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987).** XL1-Blue: a high efficiency transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*, 5(4): 367–379.
- 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*, 14(13): 3206–3214. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07323.x>
- BVL. (2011).** *Shirlan PSM-Zulassungsbericht*.
- BVL. (2018).** *Vintec - Zulassungsverfahren für Pflanzenschutzmittel*.
- Cabras, A., Mannoni, M.A., Serra, S., Andolfi, A., Fiore, M. und Evidente, A. (2006).** Occurrence, isolation and biological activity of phytotoxic metabolites produced in vitro by *Sphaeropsis sapinea*, pathogenic fungus of *Pinus radiata*. *European Journal of Plant Pathology*, 115(2): 187–193. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9006-7>
- Camarda, L., Merlini, L. und Nasini, G. (1976).** Metabolites of *Cercospora*. Taiwapyrone, an α -pyrone of unusual structure from *Cercospora taiwanensis*. *Phytochemistry*, 15(4): 537–539. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88966-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88966-9)
- Campoy, S., Pérez, F., Martín, J.F., Gutiérrez, S. und Liras, P. (2003).** Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Current Genetics*, 43(6): 447–452. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0417-0>
- Carbone, I. und Kohn, L.M. (1999).** A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3): 553–556.
- Carter, M.V. (1957).** *Eutypa armeniaca* Hansf. & Carter, sp. nov., an airborne vascular pathogen of *Prunus armeniaca* L. in southern Australia. *Australian Journal of Botany*, 5(1): 21–35.
- Carter, M.V. und Moller, W.J. (1977).** *Eutypa* Canker and Dieback of Apricots. *EPPO Bulletin*, 7(1): 85–94.
- Carter, M.V. (1978).** *Eutypa* dieback ("dying arm") disease of vines - progress towards control. *The Australian Grapegrower and Winemaker*, 172: 27–28.
- Carter, M.V., Bolay, A. und Rappaz, F. (1983).** An annotated host list and bibliography of *Eutypa armeniaca*. *Rev. Plant Pathology*, 62: 251–258.
- Carter, M.V., Bolay, A., English, H. und Rumbos, I. (1985).** Variation in the pathogenicity of *Eutypa lata* (= *E. armeniaca*). *Australian Journal of Botany*, 33(3): 361–366.
- Carter, M.V. (1988).** *Eutypa* dieback. *Compendium of Grape Diseases*, 32–33.
- Carter, M.V. (1991).** The status of *Eutypa lata* as a pathogen. CAB International.
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J. und Fink, G.R. (2004).** Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(14): 5048–5052. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401416101>

- Chen, L., Yue, Q., Zhang, X., Xiang, M., Wang, C., Li, S., Che, Y., Ortiz-López, F.J., Bills, G.F., Liu, X. und An, Z. (2013).** Genomics-driven discovery of the pneumocandin biosynthetic gene cluster in the fungus *Glarea lozoyensis*. *BMC Genomics*, 14(1): 1–18.
- Cheng, S.S., Liu, J.Y., Chang, E.H. und Chang, S.T. (2008).** Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*, 99(11): 5145–5149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.013>
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(7): 4060–4064.
- Cho, H., Beale, J.M., Graff, C., Mocek, U., Nakagawa, A., Omura, S. und Floss, H.G. (1993).** Studies on the biosynthesis of the antibiotic reduciomycin in *Streptomyces xanthochromogenus*. *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 12296–12304.
- Chooi, Y.H., Krill, C., Barrow, R.A., Chen, S., Trengove, R., Oliver, R.P. und Solomon, P.S. (2015).** An in planta-expressed polyketide synthase produces (R)-mellein in the wheat pathogen *Parastagonospora nodorum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1): 177–186. <https://doi.org/10.1128/AEM.02745-14>
- Colrat, S., Deswarte, C., Latche, A., Kläebe, A., Bouzayen, M., Fallot, J. und Roustan, J.P. (1999).** Enzymatic detoxification of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, by *Vitis vinifera* cells: Partial purification of an NADPH-dependent aldehyde reductase. *Planta*, 207(4): 544–550. <https://doi.org/10.1007/s004250050516>
- Conesa, A. und Götz, S. (2008).** Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*.
- Conover, M.A., Mierzwa, R., King, A., Loebenberg, D., Bishop, W.R., Puar, M., Patel, M., Coval, S.J., Hershenhorn, J. und Strobel, G.A. (1992).** Usnic acid amide, a phytotoxin and antifungal agent from *Cercosporidium henningsii*. *Phytochemistry*, 31(9): 2999–3001.
- Cross, B.E., Galt, R.H.B., Hanson, J.R., Curtis, P.J., Grove, J.F. und Morrison, A. (1963).** New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part II. The isolation of fourteen new metabolites. *J. Chem. Soc.*, 2937–2943.
- Cullen, D., Leong, S.A., Wilson, L.J. und Henner, D.J. (1987).** Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, hph. *Gene*, 57: 21–26.
- Darling, D.C. und Brickell, P.M. (1994).** *Nucleic acid blotting: The basics*. IRL Press Ltd.
- de Amorim, M.R., Somensi, A., Araujo, A.R., Bonifácio, B.V., Bauab, T.M. und dos Santos, L.C. (2016).** Compounds of *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(6): 1048–1054. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150362>
- de Angelis, P. (1990).** Isolement et caractérisation de l'Eutypine et d'autres métabolites secondaires d'*Eutypa lata* (Pers: Fr.) Tul., parasite de la vigne. Université de Neuchâtel.
- de Groot, M.J.A., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J. und Beijersbergen, A.G.M. (1998).** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 16(9): 839–842.
- de Vries, J. und Wackernagel, W. (1998).** Detection of nptII (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Molecular and General Genetics*, 257(6): 606–613.
- Deswarte, C., Rouquier, P., Roustan, J.P., Dargent, R. und Fallot, J. (1994).** Ultrastructural changes produced in plantlet leaves and protoplasts of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon by eutypine, a toxin from *Eutypa lata*. *Vitis*, 33(4): 185–188.
- Deswarte, C., Canut, H., Kläebe, A., Roustan, J.-P. und Fallot, J. (1996a).** Transport, cytoplasmic accumulation and mechanism of action of the toxin eutypine in *Vitis vinifera* cells. *Journal of Plant Physiology*, 149(3–4): 336–342. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80131-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80131-3)
- Deswarte, C., Eychenne, J., de Virville, J.D., Roustan, J.-P., Moreau, F. und Fallot, J. (1996b).** Protonophoric activity of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, in plant mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 334(2): 200–205. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0447>

- Devys, M., Bousquet, J.F., Kollmann, A. und Barbier, M. (1980).** Dihydroisocoumarins and mycophenolic acid of the culture medium of the plant pathogenic fungus *Septoria nodorum*. *Phytochemistry*, 19(10): 2221–2222.
- Di Benedetto, R., Vari, R., Scazzocchio, B., Filesi, C., Santangelo, C., Giovannini, C., Matarrese, P., D'Archivio, M. und Masella, R. (2007).** Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17(7): 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.03.005>
- DLR Rheinpfalz (2019).** Rebschutz- und Weinbauinformationsdienst Pfalz. Neustadt.
- Dovaston, H.F. (1948).** A new species of *Pyrenophora* from Italian Ryegrass. *Transactions of the British Mycological Society*, 31(3–4).
- Edwards, R.L., Maitland, D.J., Oliver, C.L., Pacey, M.S., Shields, L. und Whalley, A.J.S. (1999).** Metabolites of the higher fungi. Part 31. 1 Longianone, a C₇H₆O₄ spiro bicyclic lactone from the fungus *Xylaria longiana* (Rehm.). *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1*, (6): 715–720. <https://doi.org/10.1039/a808845d>
- Ehrlich, F. (1907).** Conditions governing the formation of fusel oil and their relation to the production of albuminoids in the yeast. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 40: 1027–1047.
- Ei-Demerdash, A., Genta-Jouve, G., Bärenstrauch, M., Kunz, C., Baudouin, E. und Prado, S. (2019).** Highly oxygenated isoprenylated cyclohexanoids from the fungus *Parastagonospora nodorum* SN15. *Phytochemistry*, 166: 112056. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112056>
- Fallot, J., Deswarte, C., Dalmayrac, S., Colrat, S. und Roustan, J.P. (1997).** Eutypa dieback of grapevine: isolation of a molecule synthesized by *Eutypa lata* and toxic for grapevine. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences Series III Sciences de La Vie*, 2(320): 149–158.
- Fang, Z.F., Yu, S.S., Zhou, W.Q., Chen, X.G., Ma, S.G., Li, Y. und Qu, J. (2012).** A new isocoumarin from metabolites of the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) Wiltshire. *Chinese Chemical Letters*, 23(3): 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2011.11.021>
- Ferreira, J.H.S., Matthee, F.N. und Thomas, A.C. (1991).** Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 81(3): 283–287.
- Fiedler, S. und Wirth, R. (1988).** Transformation of Bacteria with Plasmid DNA by Electroporation. *Analytical Biochemistry*, 170(1): 38–44.
- Figueiredo, J.G., Goulin, E.H., Tanaka, F., Stringari, D., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L.V., Staats, C.C. Schrank, A. und Glienke, C. (2010).** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. *Journal of Microbiological Methods*, 80(2), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.014>
- Figueroa, L., Jiménez, C., Rodríguez, J., Areche, C., Chávez, R., Henríquez, M., de la Cruz, M., Díaz, C., Segade, Y. und Vaca, I. (2015).** 3-Nitroasteric acid derivatives from an antarctic sponge-derived *Pseudogymnoascus* sp. fungus. *Journal of Natural Products*, 78(4): 919–923. <https://doi.org/10.1021/np500906k>
- Fincham, J.R.S. (1989).** Transformation in Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(1): 148–170.
- Fischer, M. und Kassemeyer, H.H. (2003).** Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis*, 42(3): 109–116.
- Fischer, J. (2014).** Untersuchungen zur Esca-Erkrankungen von Weinpflanzen: Pilz-Pflanze und antagonistische Interaktionen. Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Fischer, J. und Thines, E. (2017).** Secondary metabolites of fungal vine pathogens. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. S. 165–185. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5>
- Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z.A., Borgo, M., Rego, C. und Corio-Costet, M.-F. (2016).** Grapevine Trunk Diseases: A Review. *OIV Publications*.

- Garcez, W.S., Martins, D., Garcez, F.R., Marques, M.R., Pereira, A.A., Oliveira, L.A., Rondon, J.N. und Peruca, A.D. (2000).** Effect of spores of saprophytic fungi on phytoalexin accumulation in seeds of frog-eye leaf spot and stem canker-resistant and-susceptible soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8): 3662-3665.
- Gianni, C., Caretta, G. und Romano, C. (2003).** Skin infection due to *Geomyces pannorum* var. *pannorum*. *Mycoses*, 46(9–10): 430–432.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A. und Smith, H.O. (2009).** Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5): 343–347. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1318>
- Glauser, G., Gindro, K., Fringeli, J., De Joffrey, J.P., Rudaz, S. und Wolfender, J. (2009).** Differential analysis of mycoalexins in confrontation zones of grapevine fungal pathogens by ultrahigh pressure liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and capillary nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4): 1127–1134. <https://doi.org/10.1021/jf8033539>
- Glawe, D.A. und Rogers, J.D. (1982).** Observations on the anamorphs of six species of *Eutypa* and *Eutypella*. *Mycotaxon*, 14(1): 334–346.
- Gordon, J. und Tabacchi, R. (1992).** Stereospecific synthesis of a novel allenic cyclohexanoid epoxide from the fungus *Eutypa lata*. *The Journal of Organic Chemistry*, 57(17): 4728–4731.
- Green, M.R. und Sambrook, J. (2012).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.
- 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*, 25(2–3): 179–188. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90223-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90223-8)
- Gubler, W.D. und Leavitt, G.M. (1992).** *Eutypa* dieback of grapevines. In *Grape Pest Management, 2nd ed. DL Flaherty, LP Christensen, WT Lanini, JJ Marois, PA Phillips and LT Wilson, eds.* The Regents of the University of California: 71-75.
- Guerrero-Vásquez, G.A., Chinchilla, N., Molinillo, J.M.G. und Macías, F.A. (2014).** Synthesis of bioactive speciosins G and P from *Hexagonia speciosa*. *Journal of Natural Products*, 77(9): 2029–2036. <https://doi.org/10.1021/np500341q>
- Guillén, P., Guis, M., Martínez-Reina, G., Colrat, S., Dalmayrac, S., Deswarte, C., Bouzayen, M., Roustan, J.-P., Fallot, J., Pech, J.-C. und Latché, A. (1998).** A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Vigna radiata* confers resistance to the grapevine fungal toxin eutypine. *The Plant Journal*, 16(3): 335–343. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00303.x>
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X. und Tang, K. (2008).** Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2): 136–142. <https://doi.org/10.1134/S0003683808020026>
- Guo, H., Feng, T., Li, Z.-H. und Liu, J.-K. (2014).** Chemical constituents of the fermentation broth of *Phaeolus schweinitzii*. *Natural Product Research and Development*, (11): 1749–1752.
- Guzmán-López, O., Trigos, Á., Fernández, F.J., de Jesús Yañez-Morales, M. und Saucedo-Castañeda, G. (2007).** Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(10): 1473–1477. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9392-9>
- Hajek, A.E. und Eilenberg, J. (2018).** Natural enemies: an introduction to biological control. Cambridge University Press.
- 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 of Enology and Viticulture*, 31(2): 125–132.
- Hamer, J.E. und Timberlake, W. E. (1987).** Functional organization of the *Aspergillus nidulans* trpC promoter. *Molecular and cellular biology*, 7(7): 2352–2359.
- Hansson, D., Menkis, A., Olson, Å., Stenlid, J., Broberg, A. und Karlsson, M. (2012).** Biosynthesis of fomannoxin in the root rotting pathogen *Heterobasidion occidentale*. *Phytochemistry*, 84: 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.08.008>

- 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*, 62: 184–192. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.09054>
- Hitzler, S. (2017).** Isolierung und Charakterisierung antibiotisch-aktiver Sekundärmetabolite aus Ascomyceten. Bachelorarbeit am Fachbereich der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Hodkinson, T.R., Doohan, F.M., Saunders, M.J. und Murphy, B.R. (2019).** Endophytes for a growing world. Cambridge University Press.
- Hoffman, A.M., Mayer, S.G., Strobel, G.A., Hess, W.M., Sovocool, G.W., Grange, A.H., Harper, J.K., Arif, A.M., Grant, D.M. and Kelley-Swift, E.G. (2008).** Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. *Phytochemistry*, 69(4): 1049–1056. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.031>
- Höller, U., König, G.M. und Wright, A.D. (1999).** Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. *Journal of Natural Products*, 62(1): 114–118. <https://doi.org/10.1021/np980341e>
- Hynes, M. (1996).** Genetic transformation of filamentous fungi. *Journal of Genetics*, 75(3): 297–311.
- Ingólfssdóttir, K. (2002).** Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7): 729–736.
- Ishibashi, K., Nose, K., Shindo, T., Arai, M. und Mishima, H. (1968).** Siccayne: a novel acetylenic metabolite of *Helminthosporium siccans*. *Ann Sankyo Res Lab*, 20: 76–79.
- Jiménez-Teja, D., Hernández-Galán, R. und Collado, I.G. (2006).** Metabolites from *Eutypa* species that are pathogens on grapes. *Natural Product Reports*, 23(1): 108–116. <https://doi.org/10.1039/B514891J>
- John, S., Wicks, T.J., Hunt, J.S., Lorimer, M.F., Oakey, H. und Scott, E.S. (2005).** Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Australasian Plant Pathology*, 34(4): 569-575.
- John, S., Wicks, T.J., Hunt, J.S. und Scott, E.S. (2008).** Colonisation of grapevine wood by *Trichoderma harzianum* and *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14(1): 18–24. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00003.x>
- Ju, Y.M., Glawe, D.A. und Rogers, J.D. (1991).** Conidial germination in *Eutypa armeniaca* and selected other species of Diatrypaceae: Implications for the systematics and biology of Diatrypaceous fungi. *Mycotaxon*, 41(1): 311–320.
- Kachi, H. und Sassa, T. (1986).** Isolation of moniliphenone, a key intermediate in xanthone biosynthesis from *Monilinia fruticola*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(6): 1669–1671. <https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867632>
- Kanou, M., Ohta, Y., Tanaka, S., Yokoyama, Y., Tanba, M. und Seawa, T. (1998).** New compound, its production and anticancer agent. Japanese Patent.
- Kasimatis, A.N. und Moller, W.J. (1978).** *Eutypa* fungus causes grapevine dieback. *California Agriculture*, 32(5): 8–9.
- Khamthong, N., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Preedanon, S. und Sakayaroj, J. (2012).** Bioactive polyketides from the sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51. *Tetrahedron*, 68(39): 8245–8250. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.07.060>
- Kim, J.H., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R.J. und Campbell, B.C. (2004).** Secondary metabolites of the grapevine pathogen *Eutypa lata* inhibit mitochondrial respiration, based on a model bioassay using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Microbiology*, 49(4): 282–287. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4349-9>
- Kitamoto, N., Matsui, J., Kawai, Y., Kato, A., Yoshino, S., Ohmiya, K. und Tsukagoshi, N. (1998).** Utilization of the TEF1-a gene (TEF1) promoter for expression of polygalacturonase genes, pgaA and pgaB, in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(1): 85–92.
- Klyatskaya, S.V., Tretyakov, E.V. und Vasilevsky, S.F. (2001).** Specific features of the chemical behavior of acetylenic derivatives of benzocrown ethers. *Russian Chemical Bulletin*, 50(5): 868–873. <https://doi.org/10.1023/A:1011367311643>

- Konishi, M., Yoshida, Y., Ikarashi, M. und Horiuchi, J.I. (2015).** Efficient and simple electro-transformation of intact cells for the basidiomycetous fungus *Pseudozyma hubeiensis*. *Biotechnology Letters*, 37(8): 1679–1685. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1837-x>
- Kornsakulkarn, J., Saepua, S., Komwijit, S., Rachtawee, P. und Thongpanchang, C. (2014).** Bioactive polyketides from the fungus *Astrocystis* sp. BCC 22166. *Tetrahedron*, 70(12): 2129–2133. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.02.004>
- Kotze, C. (2008).** Biological control of the grapevine trunk disease pathogens: pruning wound protection, *Doctoral dissertation*. Stellenbosch University.
- Krick, A., Kehraus, S., Gerhäuser, C., Klimo, K., Nieger, M., Maier, A., Fiebig, H.-H., Atodiresei, I., Raabe, G., Fleischhauer, J. und König, G.M. (2007).** Potential cancer chemopreventive in vitro activities of monomeric xanthone derivatives from the marine algicolous fungus *Monodictys putredinis*. *Journal of Natural Products*, 70(3): 353–360. <https://doi.org/10.1021/np060505o>
- Krohn, K., Ludewig, K., Aust, H.J., Draeger, S. und Schulz, B. (1994)** Biologically active metabolites from fungi. 3. Sporothriolide, discosiolide, and 4-epi-ethisolide New furofuraniones from *Sporothrix* sp., *Discosia* sp., and *Pezizula livida*. *The Journal of Antibiotics*, 47(1): 113-118.
- Krohn, K., Bahramsari, R., Flörke, U., Ludewig, K., Kliche-Spory, C., Michel, A., Aust, H.-J., Draeger, S., Schulz, B. und Antus, S. (1997).** Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry*, 45(2): 313–320.
- Krohn, K., Kouam, S.F., Kuigoua, G.M., Hussain, H., Cludius-Brandt, S., Flörke, U., Kurtán, T., Pescitelli, G., Di Bari, L., Draeger, S. und Schulz, B. (2009).** Xanthones and oxepino [2, 3-b] chromones from three endophytic fungi. *Chemistry - A European Journal*, 15(44): 12121–12132. <https://doi.org/10.1002/chem.200900749>
- Kuklev, D.V, Domb, A.J. und Dembitsky, V.M. (2013).** Bioactive acetylenic metabolites. *Phytomedicine*, 20(13): 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.06.009>
- Kupka, J., Anke, T., Steglich, W. und Zechlin, L. (1981).** Antibiotics from basidiomycetes. XI The biological activity of sicayne, isolated from the marine fungus *Halocyphina villosa*. *Journal of Antibiotics*, 34(3): 298–304. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.34.298>
- Lamuela-Raventós, R.M., Gimeno, E., Fitó, M., Castellote, A.I., Covas, M., de la Torre-Boronat, M.C. und López-Sabater, M.C. (2004).** Interaction of olive oil phenol antioxidant components with low-density lipoprotein. *Biological Research*, 37(2): 247–252.
- Landi, L., Murolo, S. und Romanazzi, G. (2012).** Colonization of *Vitis* spp. wood by sGFP-transformed *Phaeoemoniella chlamydospora*, a tracheomycotic fungus involved in esca disease. *Phytopathology*, 102(3): 290–297. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-11-0165>
- Lardner, R., Mahoney, N., Zanker, T.P., Molyneux, R.J. und Scott, E.S. (2006).** Secondary metabolite production by the fungal pathogen *Eutypa lata*: Analysis of extracts from grapevine cultures and detection of those metabolites in planta. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2): 107–114. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00049.x>
- Larignon, R. und Dubos, B. (1997).** Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103(2): 147–157. <https://doi.org/10.1023/A:1008638409410>
- Lazo, G.R., Stein, P.A. und Ludwig, R.A. (1991).** A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology*, 9: 963–967. <https://doi.org/10.1038/nm0798-822>
- Lecomte, P., Laveau, E., Laterriere, S.G., Dewasme, C. und Clerjeau, M. (2003).** Optimisation of pruning wound protection for the control of *Eutypa dieback* of grapevine in France. *IOBC WPRS BULLETIN*, 26(8): 95–96.
- Li, T., Jiang, G., Qu, H., Wang, Y., Xiong, Y., Jian, Q., Wu, Y., Duan, X., Zhu, X., Hu, W., Wang, J., Gong, L und Jiang, Y. (2017).** Comparative transcriptome analysis of *Penicillium citrinum* cultured with different carbon sources identifies genes involved in citrinin biosynthesis. *Toxins*, 9(2): 69. <https://doi.org/10.3390/toxins9020069>
- Li, Y., Sun, B., Liu, S., Jiang, L., Liu, X., Zhang, H. und Che, Y. (2008).** Bioactive asterric acid derivatives from the antarctic ascomycete fungus *Geomyces* sp. *Journal of Natural Products*, 71(9): 1643–1646.

- Liermann, J.C., Kolshorn, H., Opatz, T., Thines, E. und Anke, H. (2009).** Xantheponone, an antimicrobial polyketide from a soil fungus closely related to *Phoma medicaginis*. *Journal of Natural Products*, 72(10): 1905–1907. <https://doi.org/10.1021/np9005234>
- Lingappa, B.T., Prasad, M. und Lingappa, Y. (1969).** Phenylethylalcohol and tryptophol: Autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science*, 163: 192–194.
- Liu, S., Guo, L., Che, Y. und Liu, L. (2013).** Pestaloficiols Q-S from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Fitoterapia*, 85: 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.01.010>
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lomascolo, A., Asther, M., Navarro, D., Antona, C., Delattre, M. und Lesage-Meessen, L. (2001).** Shifting the biotransformation pathways of L -phenylalanine into benzaldehyde by *Trametes suaveolens* CBS 334.85 using HP20 resin. *Letters in Applied Microbiology*, 32: 262–267.
- Lösgen, S., Magull, J., Schulz, B., Draeger, S. und Zeeck, A. (2008).** Isofusidienols: Novel chromone-3-oxepines produced by the endophytic fungus *Chalara* sp. *European Journal of Organic Chemistry*, 4: 698–703. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200700839>
- Macías, M., Gamboa, A., Ulloa, M., Toscano, R.A. und Mata, R. (2001).** Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry*, 58(5): 751–758. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00278-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00278-3)
- Maehr, H. und Berger, J. (1969).** The production, isolation, and characterization of a grisein-like sideromycin complex. *Biotechnology and Bioengineering*, 11(6): 1111–1123. <https://doi.org/10.1002/bit.260110608>
- Magarey, P.A. und Carter, M.V. (1986).** New technology facilitates control of *Eutypa dieback* in apricots and grapevines. *Plant Protection Quarterly*, 1: 156–159.
- Mahoney, N., Lardner, R., Molyneux, R.J., Scott, E.S., Smith, L.R. und Schoch, T.K. (2003).** Phenolic and heterocyclic metabolite profiles of the grapevine pathogen *Eutypa lata*. *Phytochemistry*, 64(2): 475–484. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00337-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00337-6)
- Masi, M., Cimmino, A., Reveglia, P., Mugnai, L., Surico, G. und Evidente, A. (2018).** Advances on fungal phytotoxins and their role in grapevine trunk diseases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24): 5948–5958. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00773>
- Masters, K.S. und Bräse, S. (2012).** Xanthenes from fungi, lichens, and bacteria: the natural products and their synthesis. *Chemical Reviews*, 112(7): 3717–3776. <https://doi.org/10.1021/cr100446h>
- Mauro, M.C., Vaillant, V., Tey-Rulh, P., Mathieu, Y. und Fallot, J. (1988).** In vitro study of the relationship between *Vitis vinifera* and *Eutypa lata* (Pers.: Fr.) Tul. I. Demonstration of toxic compounds secreted by the fungus. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(3): 200–204.
- Meng, Y., Patel, G., Heist, M., Betts, M.F., Tucker, S.L., Galadima, N., Donofrio, N.M., Brown, D., Mitchell, T.K., Li, L., Xu, J.-R., Orbach, M., Thon, M., Dean, R.A. und Farman, M.L. (2007).** A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(10): 1050–1064.
- Metzger, T.T. (2018).** Identifizierung und Isolation von Naturstoffen aus Antagonisten von *Eutypa lata*. Bachelorarbeit am Fachbereich der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Meyer, V. (2008).** Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*, 26(2): 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.001>
- Michielse, C.B., Arentshorst, M., Ram, A.F.J. und van den Hondel, C.A.M.J.J. (2005a).** *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(1): 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.06.009>
- Michielse, C.B., Hooykaas, P.J.J., van den Hondel, C.A.M.J.J. und Ram, A.F.J. (2005b).** *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 48(1): 1–17.
- Michielse, C.B., Hooykaas, P.J.J., van den Hondel, C.A.M.J.J. und Ram, A.F.J. (2008).** *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols*, 3(10): 1671–1678. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.154>

- Minnis, A.M. und Lindner, D.L. (2013).** Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biology*, 117(9): 638–649. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.07.001>
- Minto, R.E. und Blacklock, B.J. (2008).** Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. *Progress in Lipid Research*, 47(4): 233–306. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.02.002>
- Mir, A.K. und Vaughan, P.F. (1981).** The conversion of N-acetyltyramine to N-acetyldopamine by *Schistocerca gregaria* thoracic ganglia. *Insect Biochemistry*, 11(5): 571–577.
- Moller, W.J. und Carter, M.V. (1965).** Production and dispersal of ascospores in *Eutypa armenicae*. *Aust. J. Biol. Sci.*, 18(1): 67–80.
- Moller, W.J., Kasimatis, A.N. und Kissler, J.J. (1974).** A dying arm disease of grape in California. *Plant Disease Reporter*, 58, 869–871.
- Moller, W.J. und Kasimatis, A.N. (1978).** Dieback of grapevines caused by *Eutypa armenicae*. *Plant Disease Reporter*, 62(3): 254–258.
- Moller, W.J. und Kasimatis, A.N. (1980).** Protection of grapevine pruning wounds from *Eutypa* dieback. *Plant Disease*, 64(3): 278–280. <https://doi.org/10.1094/PD-64-278>
- Molyneux, R.J., Mahoney, N., Bayman, P., Wong, R.Y., Meyer, K. und Irelan, N. (2002).** *Eutypa* dieback in grapevines: differential production of acetylenic phenol metabolites by strains of *Eutypa lata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6): 1393–1399.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., Clément, C., Mugnai, L. und Fontaine, F. (2018).** Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease*, 102(7): 1189–1217. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1181-FE>
- Mugnai, L., Graniti, A. und Surico, G. (1999).** Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *The American Phytopathological Society*, 83(5): 404–418.
- Mülhardt, C. (2007).** Klonierung von cDNA. In *Gentechnische Methoden*. Jansohn, M. (Hrsg.), 4. Auflage: 207–244. München: Elsevier GmbH.
- Mullaney, E.J., Hamer, J.E., Roberti, K.A., Yelton, M.M. und Timberlake, W.E. (1985).** Primary structure of the trpC gene from *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics*, 199(1): 37–45.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R.K., Horn, G.T. und Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 51: 263–273.
- Munkvold, G.P. und Marois, J.J. (1993).** Efficacy of natural epiphytes and colonizers of grapevine pruning wounds for biological control of *Eutypa* dieback. *Phytopathology*, 83(6): 624–629.
- Munkvold, G.P., Duthi, J.A. und Marois, J.J. (1994).** Reductions in yield and vegetative growth of grapevines due to *Eutypa* dieback. *Phytopathology*, 84(2): 186–192.
- Munkvold, G.P. und Marois, J.J. (1995).** Factors associated with variation in susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Eutypa lata*. *The American Phytopathological Society*, 85(2): 249–256.
- Munkvold, G.P. (2001).** *Eutypa* dieback of grapevine and apricot. *Plant Health Progress*, 2(1): 9 <https://doi.org/10.1094/PHP-2001-0219-01-DG>
- Muskat, L. (2016).** Untersuchungen zum Sekundärmetabolismus des Rebenpathogenen Ascomyceten *Eutypa lata* - Isolation biologisch aktiver Naturstoffe aus Pilzen. Masterarbeit am Fachbereich der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Mutawila, C., Fourie, P.H., Halleen, F. und Mostert, L. (2011).** Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeoemoniella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(4): 46–60. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8643
- Mutawila, C., Halleen, F. und Mostert, L. (2015).** Development of benzimidazole resistant *Trichoderma* strains for the integration of chemical and biocontrol methods of grapevine pruning wound protection. *BioControl*, 60(3): 387–399. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9647-y>

- Narayanan, T.K. und Rao, G.R. (1976).** Beta-indoleethanol and beta-indolelactic acid production by *Candida* species: their antibacterial and autoantibiotic action. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 9(3): 375–380.
- Nicolaou, K.C., Pfefferkorn, J.A. und Cao, G.Q. (2000).** Selenium-based solid-phase synthesis of benzopyrans I: Applications to combinatorial synthesis of natural products. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(4): 734–739.
- Nielsen, J.S. und Møller, B.L. (1999).** Biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Triglochin maritima* and the involvement of cytochrome P450 enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368(1): 121–130.
- Nishikawa, H. (1933).** Biochemistry of filamentous fungi. II: A metabolic product of *Aspergillus melleus*. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 9(7–9): 107–109. <https://doi.org/10.1080/03758397.1933.10857042>
- O'Brien, P.A. (2017).** Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46(4): 293–304. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>
- Octave, S., Amborabé, B.-E., Luini, E., Ferreira, T., Fleurat-Lessard, P. und Roblin, G. (2005).** Antifungal effects of cysteine towards *Eutypa lata*, a pathogen of vineyards. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(10-11): 1006–1013. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.10.003>
- Pal, K.K. und McSpadden Gardener, B. (2006).** Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1–25. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02.Biological>
- Pan, Y., Liu, L., Guan, F., Li, E., Jin, J., Li, J., Che, Y. und Liu, G. (2018).** Characterization of a prenyltransferase for Iso-A82775C biosynthesis and generation of new congeners of chloropestolides. *ACS Chemical Biology*, 13(3): 703–711. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b01059>
- Parish, C.A., de la Cruz, M., Smith, S.K., Zink, D., Baxter, J., Tucker-Samaras, S., Collada, J., Platas, G., Bills, G., Díez, M.T., Vicente, F., Peláez, F. und Wilson, K. (2009).** Antisense-guided isolation and structure elucidation of pannomycin, a substituted cis-decalin from *Geomyces pannorum*. *Journal of Natural Products*, 72(1): 59–62.
- Parisi, A., Piattelli, M., Tringali, C. und di San Lio, G.M. (1993).** Identification of the phytotoxin mellein in culture fluids of *Phoma tracheiphila*. *Phytochemistry*, 32(4): 865–867. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85221-C](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85221-C)
- Park, S.-M. und Kim, D.-H. (2004).** Transformation of a filamentous fungus *Cryphonectria parasitica* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9(3): 217–222.
- Pearson, R.C. (1980).** Discharge of ascospores of *Eutypa armeniacae* in New York. *Plant Disease*, 64(2): 171–174.
- Péros, J.P. und Berger, G. (1994).** A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa* dieback. *Agronomie*, 14(8): 515–523. <https://doi.org/10.1051/agro:19940804>
- Pfaffl, M.W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 16–21.
- Pfefferle, W., Anke, H., Brossn, M., Steffan, B., Viandenn, R. und Steglich, W. (1990).** Asperfuran, a novel antifungal metabolite from *Aspergillus oryzae*. *The Journal of Antibiotics*, 43(6): 648–654.
- Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S. und Sakayaroj, J. (2007).** A new dihydrobenzofuran derivative from the endophytic fungus *Botryosphaeria mamane* PSU-M76. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(9): 1404–1405. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.1404>
- Prompanya, C., Dethoup, T., Gales, L., Lee, M., Pereira, J.A.C., Silva, A.M.S., Pinto, M.M.M. und Kijjoa, A. (2016).** New polyketides and new benzoic acid derivatives from the marine sponge-associated fungus *Neosartorya quadricincta* KUFA 0081. *Marine Drugs*, 14(7): 134. <https://doi.org/10.3390/md14070134>
- Punt, P.J. und van den Hondel, C.A. (1992).** Transformation of filamentous fungi based on hygromycin b and phleomycin resistance markers. *Methods in Enzymology*, 216: 447–457.
- Ramos-Comerzana, A. und Monteoliva-Sánchez, M. (2000).** Biopharmaceutical potencial of olive industrial wastes. *Ars Pharmaceutica (España)*.

- Ramos, D.E., Moller, W.J. und English, H. (1975). Production and dispersal of ascospores of *Eutypa armeniaca* in California. *Phytopathology*, 65: 1364–1371.
- Ramos, H.P., Simão, M.R., de Souza, J.M., Magalhães, L.G., Rodrigues, V., Ambrósio, S.R. und Said, S. (2013). Evaluation of dihydroisocoumarins produced by the endophytic fungus *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* against *Schistosoma mansoni*. *Natural Product Research*, 27(23): 2240–2243. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.811659>
- Renaud, J.-M., Tsoupras, G. und Tabacchi, R. (1989a). Biologically active natural acetylenic compounds from *Eutypa lata* (Pers: F.) TUL. *Helvetica Chimica Acta*, 72(5): 929–932.
- Renaud, J.-M., Tsoupras, G., Stoeckli-Evans, H. und Tabacchi, R. (1989b). A novel allenic epoxycyclohexane and related compounds from *Eutypa lata* (Pers: F.) Tul. *Helvetica Chimica Acta*, 72(6): 1262–1267.
- Rho, H.-S., Kang, S. und Lee, Y.-H. (2001). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and Cells*, 12(3): 407-411.
- Rolshausen, P.E., Greve, L.C., Labavitch, J.M., Mahoney, N.E., Molyneux, R.J. und Gubler, W.D. (2008). Pathogenesis of *Eutypa lata* in grapevine: identification of virulence factors and biochemical characterization of cordon dieback. *Phytopathology*, 98(2): 222–229. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-2-0222>
- Ruiz-Díez, B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of applied microbiology*, 92(2): 189–195.
- Rukachaisirikul, V., Arunpanichlert, J., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S. und Sakayaroj, J. (2009). Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. *Tetrahedron*, 65(51): 10590–10595. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.10.084>
- Ferreira, J.H.S. (1991). Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 81(3): 283-287. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-283>
- Sadorn, K., Saepua, S., Boonyuen, N., Komwijit, S., Rachtawee, P. und Pittayakhajonwut, P. (2019). Phenolic glucosides and chromane analogs from the insect fungus *Conoideocrella krungchingensis* BCC53666. *Tetrahedron*, 75(25): 3463–3471. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.05.007>
- Samuel, G. (1933). “Gummosis” or “dieback” in apricot trees. *J. Dep. Agric. South Australia*, 36, 979–980.
- Schirmaier, F. und Philippsen, P. (1984). Identification of two genes coding for the translation elongation factor EF-1 alpha of *S. cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 3(13): 3311–3315.
- Schmidt-Heydt, M., Stoll, D. und Geisen, R. (2019). Whole-genome sequencing of the fungus *Penicillium citrinum* reveals the biosynthesis gene cluster for the mycotoxin citrinin. *Microbiology Resource Announcements*, 8: e01419-18
- 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*, 149(7–8): 427–435. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00658.x>
- Schneider, G., Anke, H. und Sterner, O. (1996). Xylaramide , a new antifungal compound, and other secondary metabolites from *Xylaria longipes*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 51(11–12): 802–806.
- Schöffler, A., Kautz, D., Liermann, J.C., Opatz, T. und Anke, T. (2009). Allantofuranone, a new antifungal antibiotic from *Allantophomopsis lycopodina* IBWF58B-05A. *The Journal of Antibiotics*, 62(3): 119–121. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.21>
- 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*, 106(9): 996–1004. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006342>
- Selim, K.A., El-Beih, A.A., AbdEl-Rahman, T.M. und El-Diwany, A.I. (2012). Biology of endophytic fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2(1): 31–82. <https://doi.org/10.5943/cream/2/1/3>
- Sentheshanmuganathan, S. und Elsdén, S.R. (1958). The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 69(2): 210–218.

- Shimomura, O., Johnson, F.H. und Saiga, Y. (1962).** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59(3): 223–239.
- Shirai, Y. (1955).** The decomposition of l-tyrosine by tubercle bacilli (a further study); the formation of N-acetyltyramine, a new compound, from tyramine by tubercle bacilli. *Kekkaku (Tuberculosis)*, 29(8), 295-299.
- Shreaz, S., Wani, W.A., Behbehani, J.M., Raja, V., Irshad, M., Karched, M., Ali, I., Siddiqi, W.A. und Hun, L.T. (2016).** Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112: 116–131. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.016>
- Sidhu, Y.S., Cairns, T.C., Chaudhari, Y.K., Usher, J., Talbot, N.J., Studholme, D.J., Csukai, M. und Haynes, K. (2015).** Exploitation of sulfonyleurea resistance marker and non-homologous end joining mutants for functional analysis in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology*, 79: 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.015>
- Siebert, J.B. (2001).** The economic toll on vineyards. *Wines Vines April*: 50-55.
- Siebertz, R., Proksch, P. und Witte, L. (1990).** Accumulation and biosynthesis of the chromenes precocene I and II in *Ageratum houstonianum*. *Phytochemistry*, 29(7): 2135–2138. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)83022-S](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)83022-S)
- Siless, G.E., Gallardo, G.L., Rodriguez, M.A., Rincón, Y.A., Godeas, A.M. und Cabrera, G.M. (2018).** Metabolites from the dark septate endophyte *Drechslera* sp. evaluation by LC/MS and principal component analysis of culture extracts with histone deacetylase inhibitors. *Chemistry and Biodiversity*, 15(8): e1800133. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800133>
- Silk, P.J. und Macaulay, J.B. (2003).** Stereoselective biosynthesis of chloroarylpropane diols by the basidiomycete *Bjerkandera adusta*. *Chemosphere*, 52(2): 503–512.
- Singh, S.B., Jones, E.T., Goetz, M.A., Bills, G.F., Nallin-Omstead, M., Jenkins, R.G., Lingham, R.B., Silverman, K.C. und Gibbs, J.B. (1994).** Fusidienol: a novel inhibitor of Ras farnesyl-protein transferase from *Fusidium griseum*. *Tetrahedron Letters*, 35(27): 4693–4696.
- Singh, S.B., Ball, R.G., Zink, D.L., Monaghan, R.L., Polishook, J.D., Sanchez, M., Pelaez, F., Silverman, K.C. und Lingham, R.B. (1997).** Fusidienol A: A Novel Ras Farnesyl-Protein Transferase Inhibitor from *Phoma* sp. *Journal of Organic Chemistry*, 62(21): 7485–7488.
- 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*, 66(2): 169–176.
- Sobolevskaya, M.P., Denisenko, V.A., Moiseenko, A.S., Shevchenko, L.S., Menzorova, N.I., Sibirtsev, Y.T., Kim, N.J. und Kuznetsova, T.A. (2007).** Bioactive metabolites of the marine actinobacterium *Streptomyces* sp. KMM 7210. *Russian Chemical Bulletin*, 56(4): 838–840. <https://doi.org/10.1007/s11172-007-0126-9>
- Sosnowski, M.R., Lardner, R., Wicks, T.J. und Scott, E.S. (2007).** The influence of grapevine cultivar and isolate of *Eutypa lata* on wood and foliar symptoms. *Plant Disease*, 91(8), 924–931.
- 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*, 14(2): 134–142. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00015.x>
- Sosnowski, M.R., Wicks, T.J. und Scott, E.S. (2011).** Control of *Eutypa dieback* in grapevines using remedial surgery. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(4), 277–284.
- Sosnowski, M.R., Loschiavo, A.P., Wicks, T.J. und Scott, E.S. (2013).** Evaluating treatments and spray application for the protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Plant Disease*, 97(12): 1599–1604.
- Sosnowski, M.R. und Mundy, D.C. (2019).** Pruning wound protection strategies for simultaneous control of *Eutypa* and *Botryosphaeria dieback* in New Zealand. *Plant Disease*, 103(3): 519-525.
- Stafford, H.A. (2000).** Crown gall disease and *Agrobacterium tumefaciens*: A study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. *The Botanical Review*, 66(1): 99–118.

- Sugawara, F., Strobel, S., Strobel, G., Larsen, R.D., Berglund, D.L., Gray, G., Takahashi, N., Coval, S.J., Stout, T.J. und Clardy, J. (1991).** The structure and biological activity of cercosporamide from *Cercosporidium henningsii*. *The Journal of Organic Chemistry*, 56(3): 909–910.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N. und Šmuc, T. (2011).** REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*, 6(7), e21800.
- Surup, F., Kuhnert, E., Lehmann, E., Heitkämper, S., Hyde, K.D., Fournier, J. und Stadler, M. (2014).** Sporothriolide derivatives as chemotaxonomic markers for *Hypoxylon monticulosum*. *Mycology*, 5(3): 110-119.
- Sussman, A., Huss, K., Chio, L.-C., Heidler, S., Shaw, M., Ma, D., Zhu, G., Campbell, R.M., Park, T.-S., Kulanthaivel, P., Scott, J.E., Carpenter, J.W., Strege, M.A., Belvo, M.D., Swartling, J.R., Fischl, A., Yeh, W.-K., Shih, C. und Ye, X.S. (2004).** Discovery of cercosporamide, a known antifungal natural product, as a selective Pkc1 kinase inhibitor through high-throughput screening. *Eukaryotic Cell*, 3(4): 932–943. <https://doi.org/10.1128/EC.3.4.932-943.2004>
- Sweigard, J.A., Chumley, F., Carroll, A., Farrall, L. und Valent, B. (1997).** A series of vectors for fungal transformation. *Fungal Genetics Reports*, 44(1): 52-53. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1287>
- Tey-Rulh, P., Phillippe, I., Renaud, J.-M., Tsoupras, G., de Angelis, P., Fallot, J. und Tabacchi, R. (1991).** Eutypine, a phytotoxin produced by *Eutypa lata* the causal agent of dying-arm disease of grapevine. *Phytochemistry*, 30(2): 471–473.
- Tran, T.D., Wilson, B.A.P., Henrich, C.J., Staudt, L.M., Krumpe, L.R.H., Smith, E.A., King, J., Wendt, K.L., Stchigel, A.M., Miller, A.N., Cichewicz, R.H., O'Keefe, B.R. und Gustafson, K.R. (2019).** Secondary metabolites from the fungus *Dictyosporium* sp. and their MALT1 inhibitory activities [Review-article]. *Journal of Natural Products*, 82(1): 154–162. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00871>
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Borwornwiriyan, K., Phongpaichit, S. und Sakayaroj, J. (2014).** Benzopyranone, benzophenone, and xanthone derivatives from the soil fungus *Penicillium citrinum* PSU-RSPG95. *Tetrahedron Letters*, 55(7): 1336–1338. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.01.017>
- Tsoupras, G., Angelis, P.D., Zesiger, T., Renaud, J.-M., Tabacchi, R. (1988).** Biologically-active natural acetylenes from the culture medium of *Eutypa lata*. *Bioactive Molecules*: 93-100.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. und Rozen, S.G. (2012).** Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15): 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- van Niekerk, J.M., Bester, W., Halleen, F., Crous, P.W. und Fourie, P.H. (2011).** The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. *Phytopathologia Mediterranea*, 50: S98–S111. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9604-2>
- Veer, W.L.C., Oud, P.J. und Ribbers, J.E. (1957).** The isolation of 2-(4'-hydroxyphenyl)ethanol from *Ligustrum ovalifolium* Hassk. leaves. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 76(10): 810–812.
- Videira, S.I.R., Groenewald, J.Z., Nakashima, C., Braun, U., Barreto, R.W., de Wit, P.J. und Crous, P.W. (2017).** Mycosphaerellaceae—Chaos or clarity. *Studies in Mycology*, 87: 257–421. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.09.003>
- Vilgalys, R. und Hester, M. (1990).** Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172(8): 4238–4246.
- Vohník, M., Fendrych, M., Albrechtová, J. und Vosátka, M. (2007).** Intracellular colonization of *Rhododendron* and *Vaccinium* roots by *Cenococcum geophilum*, *Geomyces pannorum* and *Meliniomyces variabilis*. *Folia Microbiologica*, 52(4): 407–414.
- Wang, L.W., Xu, B.G., Wang, J.Y., Su, Z.Z., Lin, F.C., Zhang, C.L. und Kubicek, C.P. (2012).** Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3): 1231–1239. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3472-3>
- Wang, M., Tian, J., Xiang, M. und Liu, X. (2017).** Living strategy of cold-adapted fungi with the reference to several representative species. *Mycology*, 8(3): 178–188. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1370429>

- Weber**, E.A., Trouillas, F.P. und Gubler, W.D. (2007). Double pruning of grapevines: a cultural practice to reduce infections by *Eutypa lata*. *American journal of enology and viticulture*, 58(1): 61–66.
- Weld**, R.J., Plummer, K.M., Carpenter, M.A. und Ridgway, H.J. (2006). Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research*, 16(1): 31–44. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310006>
- White**, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. und Taylor, J.L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1): 315–322.
- Wicks**, T. und Davies, K. (1999). The effect of *Eutypa* on grapevine yield. *Australian Grapegrower and Winemaker*. 15–17.
- Widholm**, J.M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, 47(4): 189–194.
- Wu**, J., Uchida, K., Ridwan, A.Y., Kondo, M., Choi, J.H., Hirai, H. und Kawagishi, H. (2019). Erinachromanes A and B and Erinaphenol A from the culture broth of *Hericium erinaceus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(11): 3134–3139. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06050>
- Yang**, Y., Liu, B., Du, X., Li, P., Liang, B., Cheng, X., Liangcheng, D.D., Wang, L. und Wang, S. (2015). Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. *Scientific Reports*, 5(1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep08331>
- Yang**, Y.-L., Zhou, H., Du, G., Feng, K.-N., Feng, T., Fu, X.-L., Liu, J.-K. und Zeng, Y. (2016). A monooxygenase from *Boreostereum vibrans* catalyzes oxidative decarboxylation in a divergent vibrilactone biosynthesis pathway. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(18): 5463–5466. <https://doi.org/10.1002/anie.201510928>
- Yemelin**, A. (2017). Identification and characterization of novel factors involved in dimorphism and pathogenicity of fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. Dissertation am Fachbereich der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Zähner**, H. (1965). Biologie der Antibiotika. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Zhao**, W.Y., Zhu, T.J., Fan, G.T., Liu, H.B., Fang, Y.C., Gu, Q.Q. und Zhu, W.M. (2010). Three new dioxopiperazine metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus* Fres. *Natural Product Research*, 24(10): 953–957. <https://doi.org/10.1080/14786410902726134>
- Zhao**, J.H., Zhang, Y.L., Wang, L.W., Wang, J.Y. und Zhang, C.L. (2012). Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5): 2107–2112. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1015-4>
- Zhao**, P.-J., Yang, Y.-L., Du, L., Liu, J.-K. und Zeng, Y. (2013). Elucidating the biosynthetic pathway for vibrilactone: A pancreatic lipase inhibitor with a fused bicyclic beta-Lactone. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(8): 2298–2302. <https://doi.org/10.1002/anie.201208182>
- Zhu**, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., Farrand, S.K. und Winans, S.C. (2000). The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*, 182(14): 3885–3895.
- Zhu**, X., Su, M., Manickam, K. und Zhang, W. (2015a). Bacterial genome mining of enzymatic tools for alkyne biosynthesis. *ACS Chemical Biology*, 10(12): 2785–2793. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00641>
- Zhu**, X., Liu, J. und Zhang, W. (2015b). De novo biosynthesis of terminal alkyne-labeled natural products. *Nature Chemical Biology*, 11(2): 115. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1718>
- Zhu**, X. und Zhang, W. (2018). Terminal alkyne biosynthesis in marine microbes. In *Methods in enzymology*. 604: 89–112. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.01.040>
- Živković**, S., Vasić, T., Trkulja, V., Krnjaja, V. und Markovic, J. (2012). Pathogenicity on grapevine and sporulation of *E. lata* isolates originating from Serbia. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(3): 7379–7388.
- Zwiers**, L.-H. und de Waard, M.A. (2001). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics*, 39(5–6): 388–393. <https://doi.org/10.1007/s002940100216>

7 Anhang

7.1 HPLC/MS-Chromatogramme, UV/Vis- und Massenspektren der isolierten Naturstoffe

Die Messungen der Reinsubstanzen wurden an der HPLC/MS mit der Säule **S3** und dem Gradienten **G1** durchgeführt (siehe Tab. 2.1 und Kapitel HPLC- und HPLC/MS Analysen).

7.1.1 Verbindungen aus *Eutypa lata* IBWF E16012

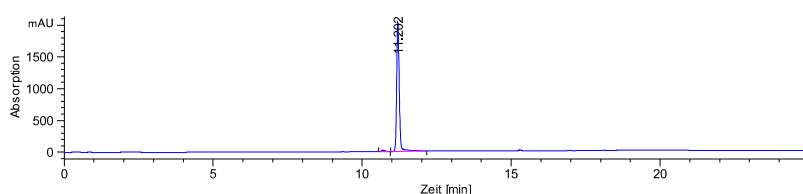


Abb. 7.1: HPLC-Chromatogramm von Eutypin bei 210 nm.

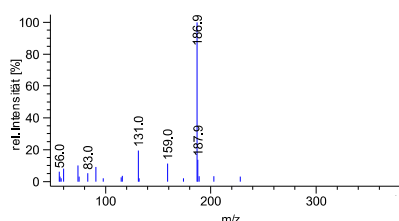


Abb. 7.2: Massenspektrum (positive Ionisierung) von Eutypin.

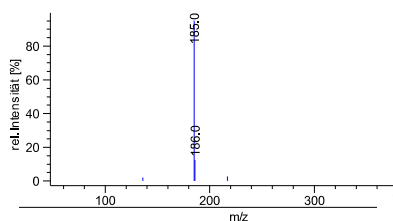


Abb. 7.3: Massenspektrum (negative Ionisierung) von Eutypin.

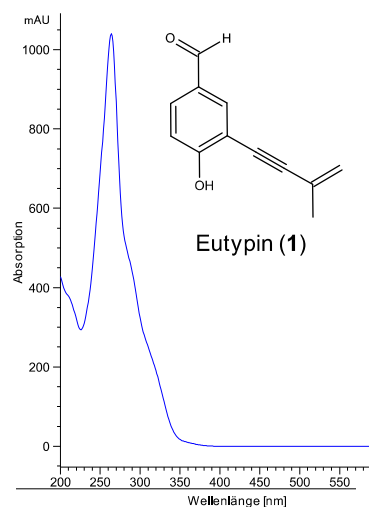


Abb. 7.4: UV-Spektrum von Eutypin.

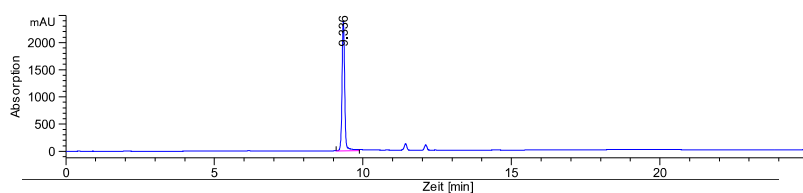


Abb. 7.5: HPLC-Chromatogramm von Siccayne bei 210 nm.

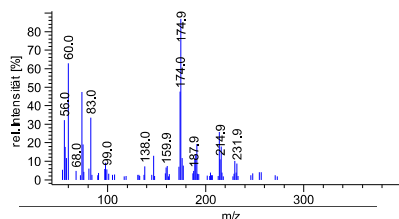


Abb. 7.6: Massenspektrum (positive Ionisierung) von Siccayne.

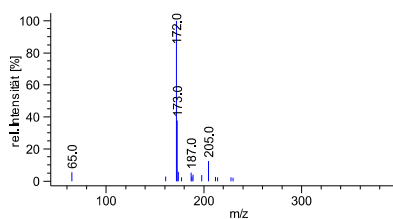


Abb. 7.7: Massenspektrum (negative Ionisierung) von Siccayne.

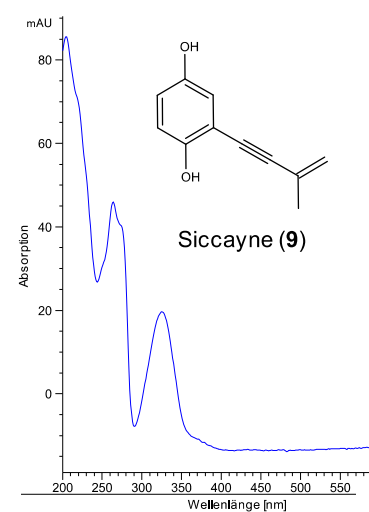


Abb. 7.8: UV-Spektrum von Siccayne.

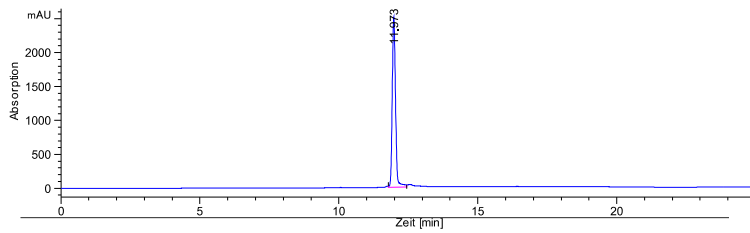


Abb. 7.9: HPLC-Chromatogramm von Eulatinol bei 210 nm.

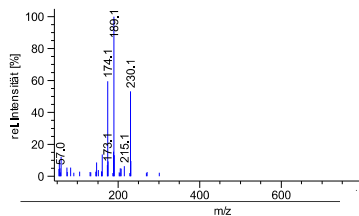


Abb. 7.10: Massenspektrum (positive Ionisierung) von Eulatinol.

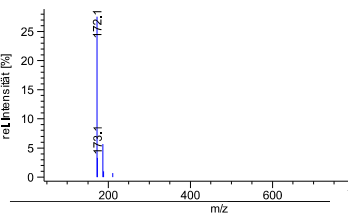


Abb. 7.11: Massenspektrum (negative Ionisierung) von Eulatinol.

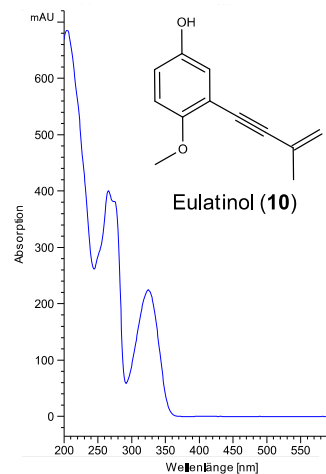


Abb. 7.12: UV-Spektrum von Eulatinol.

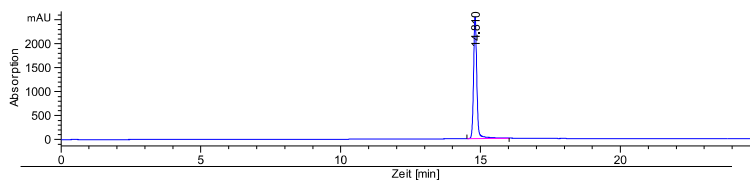


Abb. 7.13: HPLC-Chromatogramm von FS E16012-3 bei 210 nm.

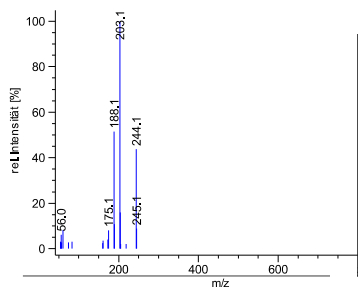


Abb. 7.14: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E16012-3.

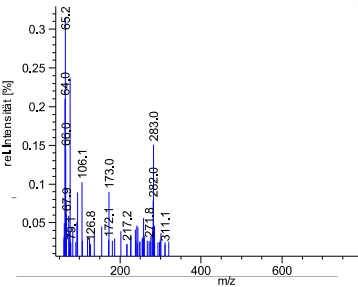


Abb. 7.15: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E16012-3.

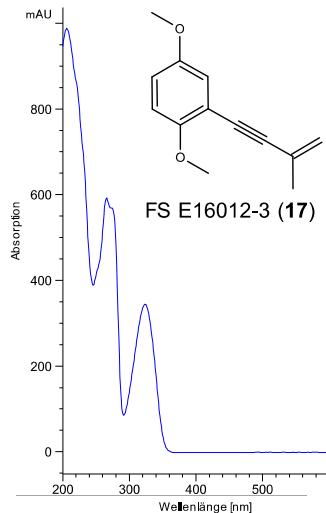


Abb. 7.16: UV-Spektrum von FS E16012-3.

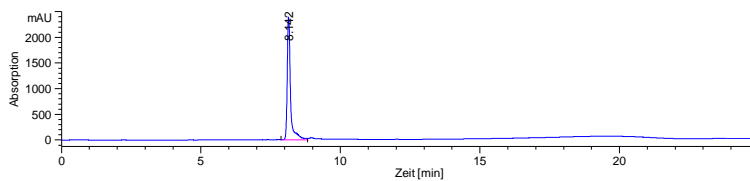


Abb. 7.17: HPLC-Chromatogramm von Eulaglycosid bei 210 nm.

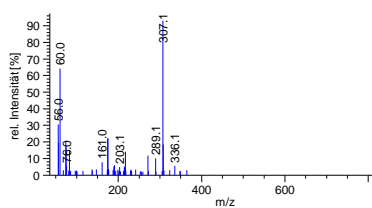


Abb. 7.18: Massenspektrum (positive Ionisierung) von Eulaglycosid.

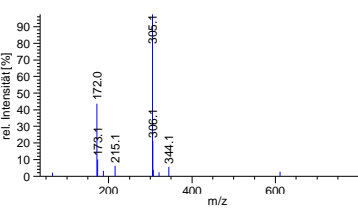


Abb. 7.19: Massenspektrum (negative Ionisierung) von Eulaglycosid.

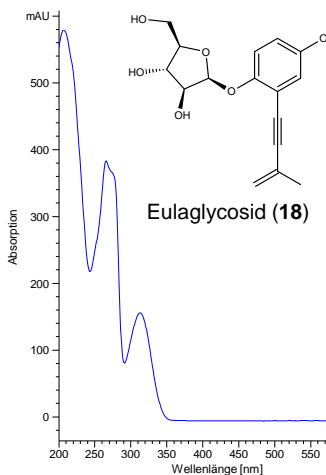


Abb. 7.20: UV-Spektrum von Eulaglycosid.

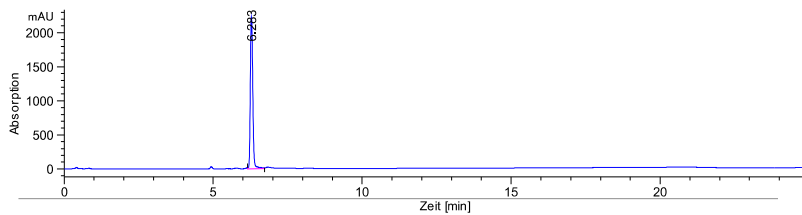


Abb. 7.21: HPLC-Chromatogramm von FS E16012-7 bei 210 nm.

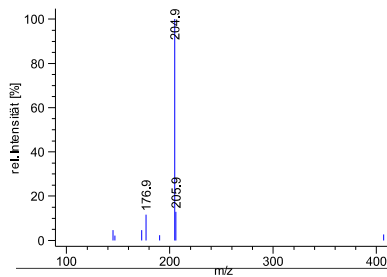


Abb. 7.22: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E16012-7.

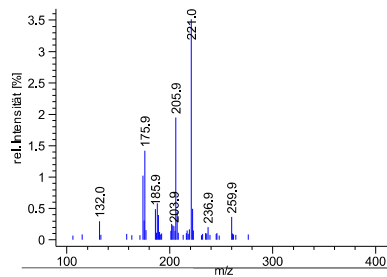


Abb. 7.23: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E16012-7.

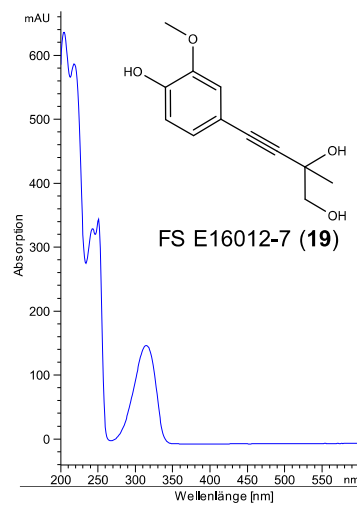


Abb. 7.24: UV-Spektrum von FS E16012-7.

7.1.2 Verbindungen aus *Eutypa lata* IBWF E16012HT

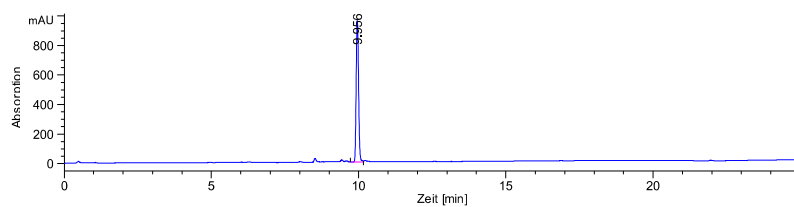


Abb. 7.25: HPLC-Chromatogramm von Eutypinol bei 210 nm.

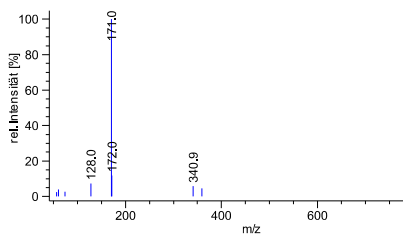


Abb. 7.26: Massenspektrum (positive Ionisierung) von Eutypinol.

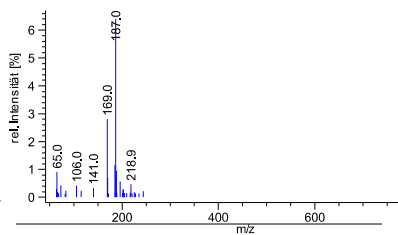


Abb. 7.27: Massenspektrum (negative Ionisierung) von Eutypinol.

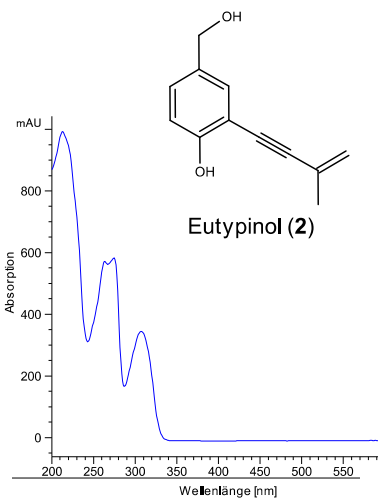


Abb. 7.28: UV-Spektrum von Eutypinol.

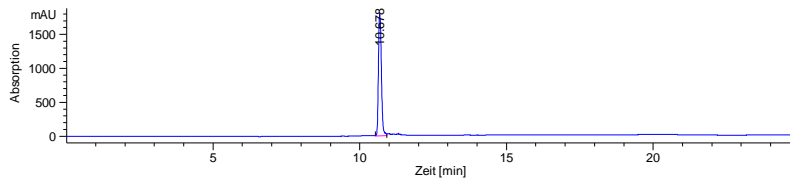


Abb. 7.29: HPLC-Chromatogramm von FS E16012HT-1 bei 210 nm.

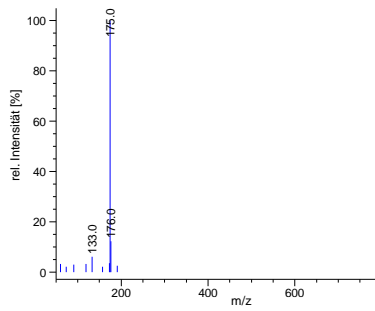


Abb. 7.30: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E16012HT-1.

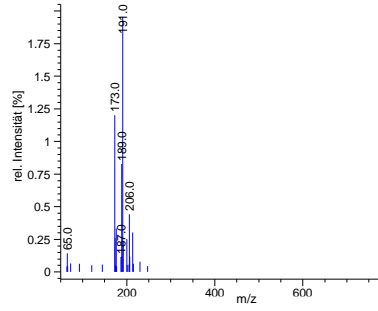


Abb. 7.31: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E16012HT-1.

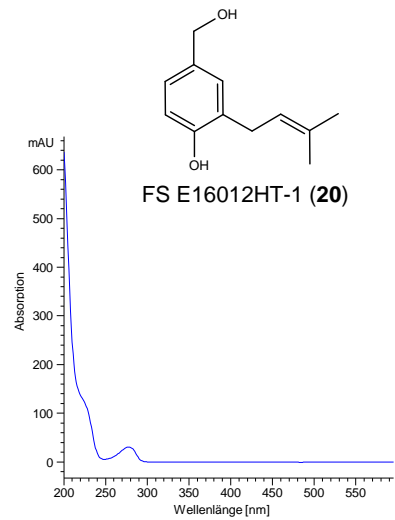


Abb. 7.32: UV-Spektrum von FS E16012HT-1.

7.1.3 Verbindungen aus *Eutypa lata* IBWF E16121

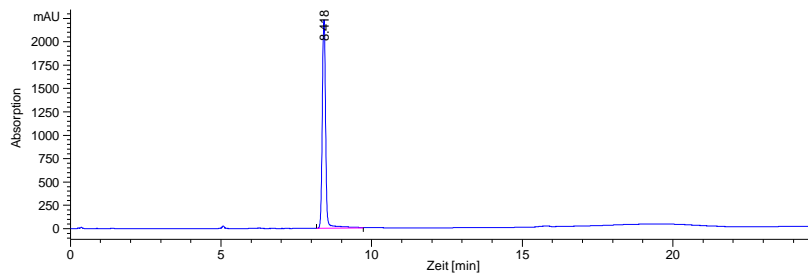


Abb. 7.33: HPLC-Chromatogramm von O-Methylmellein bei 210 nm.

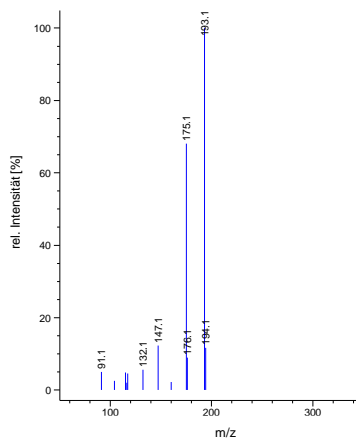


Abb. 7.34: Massenspektrum (positive Ionisierung) von O-Methylmellein.

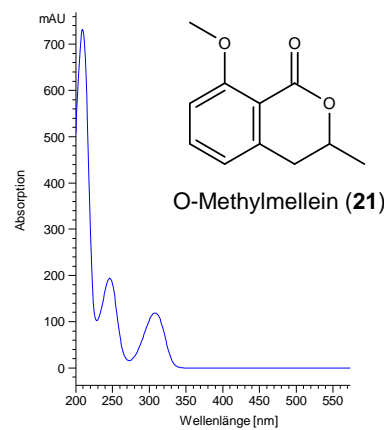


Abb. 7.35: UV-Spektrum von O-Methylmellein.

7.1.4 Verbindungen aus *Eutypa lata* IBWF E16123

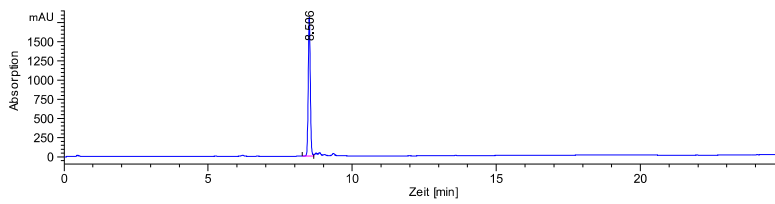
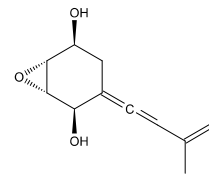


Abb. 7.36: HPLC-Chromatogramm von FS E16123-1 bei 210 nm.



FS E16123-1 (15)

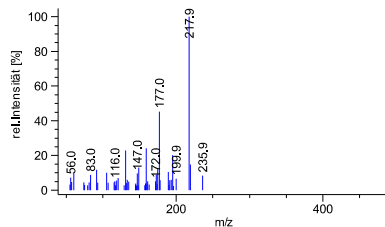
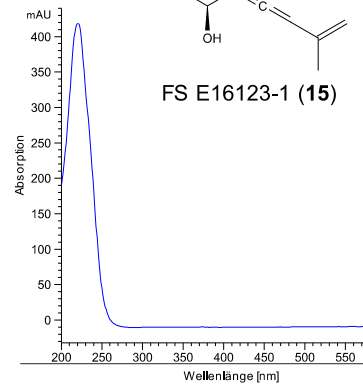


Abb. 7.37: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E16123-1.

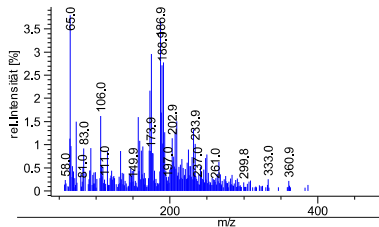


Abb. 7.38: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E16123-1.

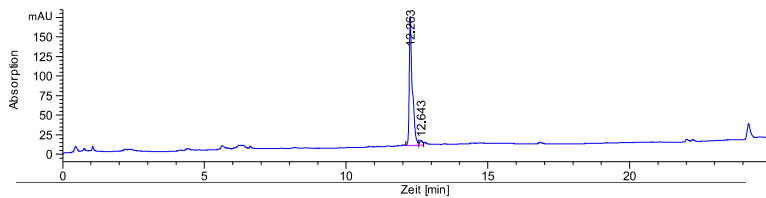


Abb. 7.40: HPLC-Chromatogramm von FS E16123-3 bei 210 nm.

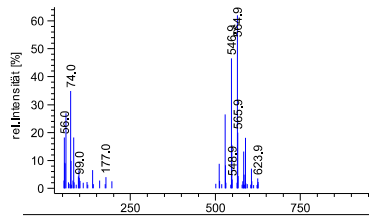


Abb. 7.41: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E16123-3.

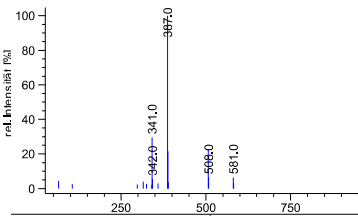


Abb. 7.42: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E16123-3.

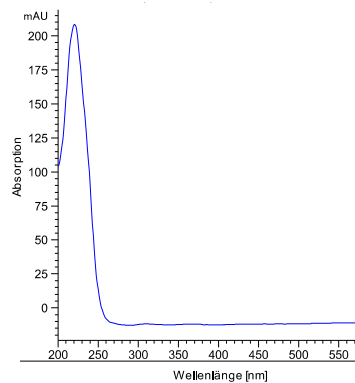


Abb. 7.43: UV-Spektrum von FS E16123-3.

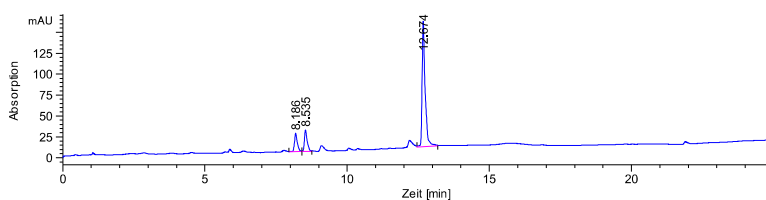


Abb. 7.44: HPLC-Chromatogramm von FS E16123-4 bei 210 nm.

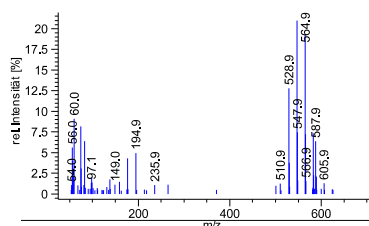


Abb. 7.45: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E16123-4.

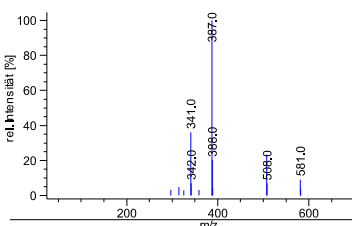


Abb. 7.46: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E16123-4.

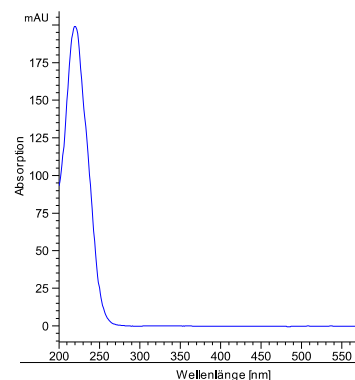


Abb. 7.47: UV-Spektrum von FS E16123-4.

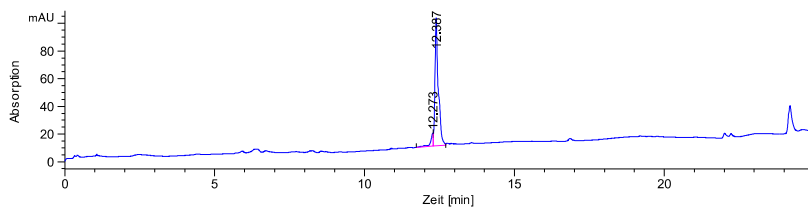


Abb. 7.48: HPLC-Chromatogramm von FS E16123-5 bei 210 nm.

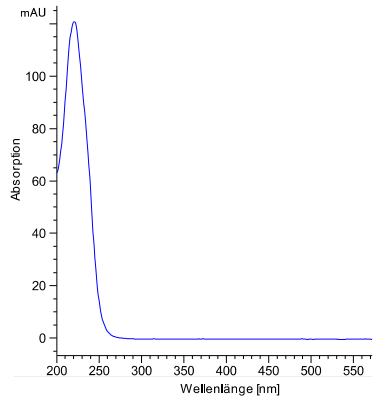


Abb. 7.51: UV-Spektrum von FS E16123-5.

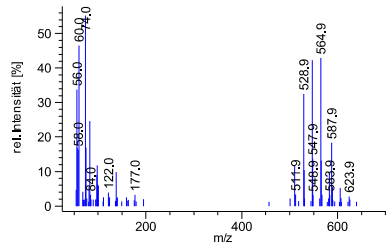


Abb. 7.49: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E16123-5.

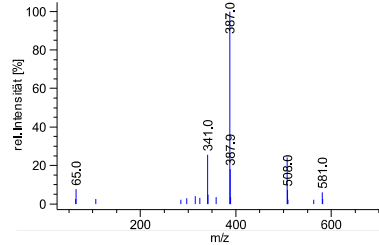


Abb. 7.50: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E16123-5.

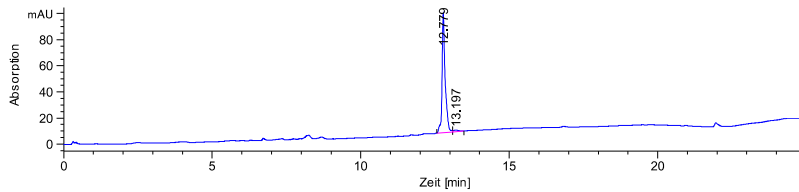


Abb. 7.52: HPLC-Chromatogramm von FS E16123-6 bei 210 nm.

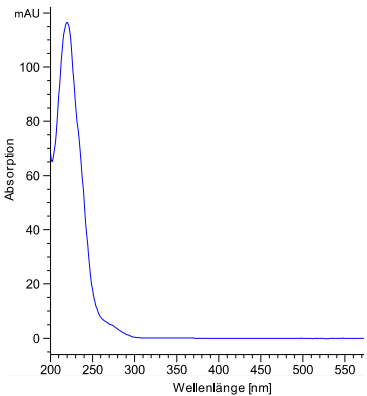


Abb. 7.55: UV-Spektrum von FS E16123-6.

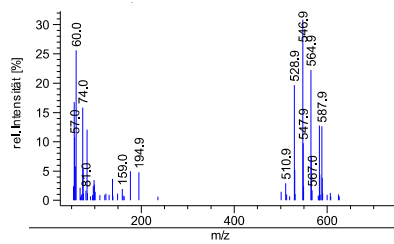


Abb. 7.53: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E16123-6.

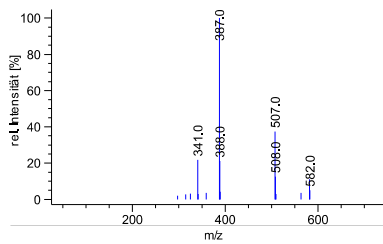


Abb. 7.54: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E16123-6.

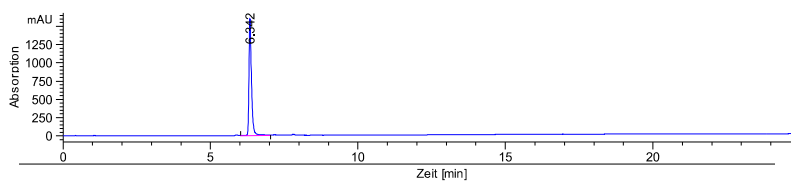


Abb. 7.56: HPLC-Chromatogramm von FS E16123-7 bei 210 nm.

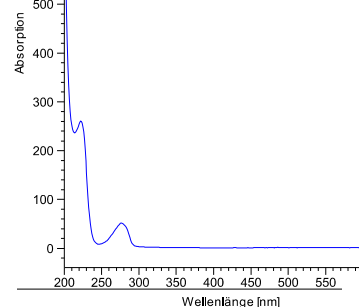
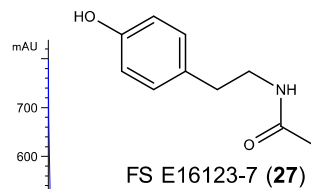


Abb. 7.59: UV-Spektrum von FS E16123-7.

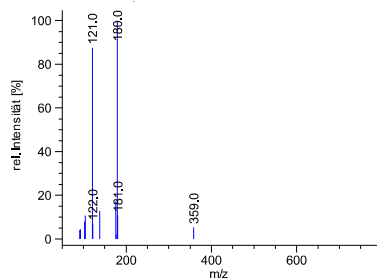


Abb. 7.57: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E16123-7.

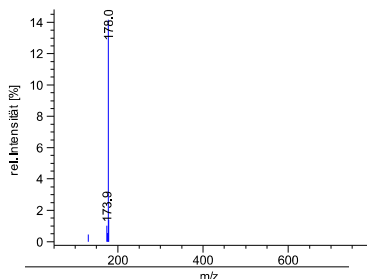


Abb. 7.58: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E16123-7.

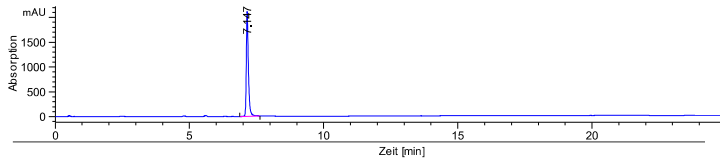
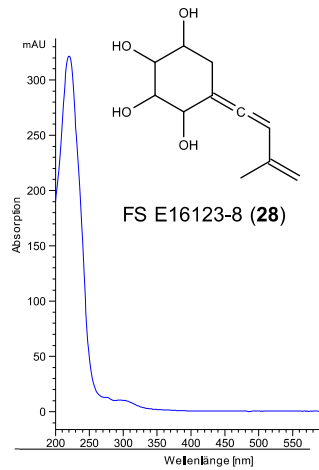


Abb. 7.60: HPLC-Chromatogramm von FS E16123-8 bei 210 nm.



FS E16123-8 (28)

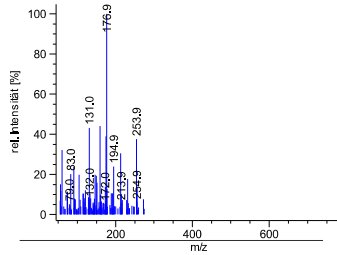


Abb. 7.61: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E16123-8.

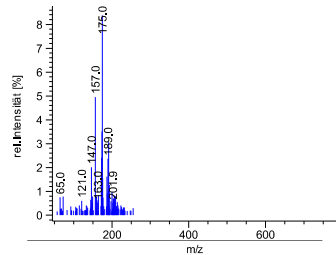


Abb. 7.62: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E16123-8.

7.1.5 Verbindungen aus IBWF E12135

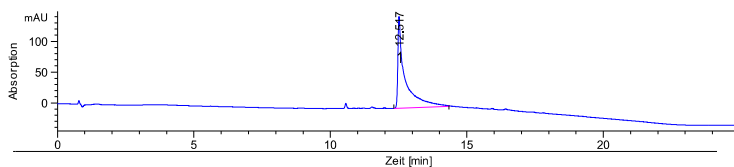
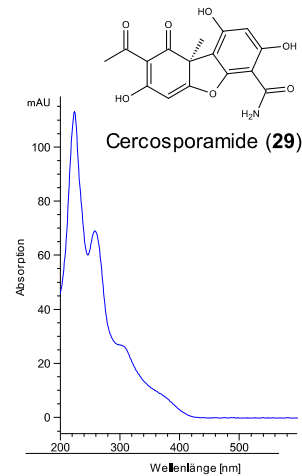


Abb. 7.64: HPLC-Chromatogramm von Cercosporamide bei 250 nm.



Cercosporamide (29)

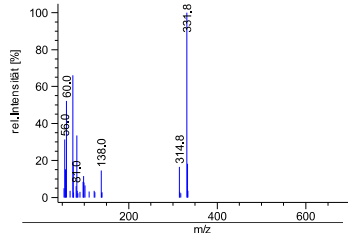


Abb. 7.65: Massenspektrum (positive Ionisierung) von Cercosporamide.

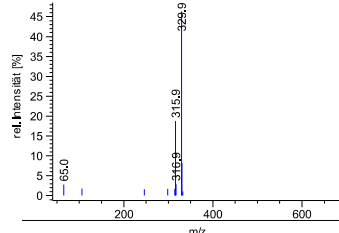


Abb. 7.66: Massenspektrum (negative Ionisierung) von Cercosporamide.

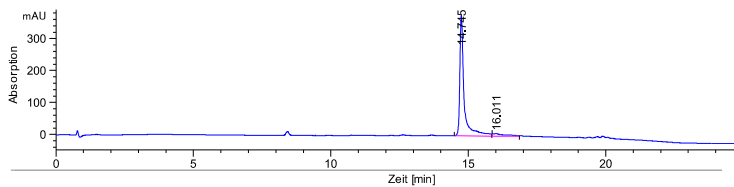


Abb. 7.68: HPLC-Chromatogramm von SH E12135-2 bei 250 nm.

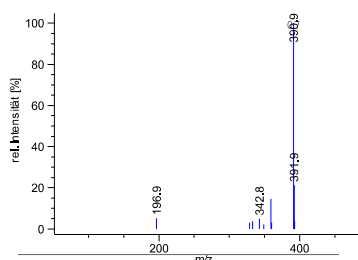
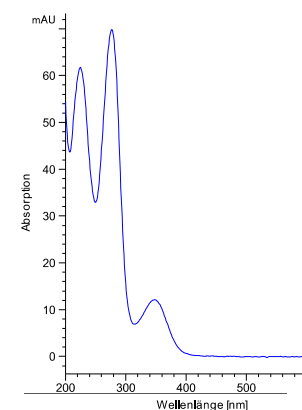


Abb. 7.69: Massenspektrum (positive Ionisierung) von SH E12135-2.

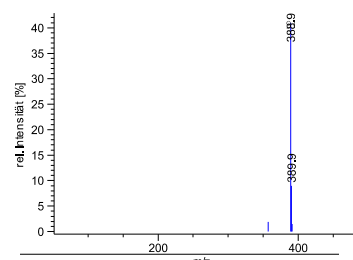


Abb. 7.70: Massenspektrum (negative Ionisierung) von SH E12135-2.

Abb. 7.71: UV-Spektrum von SH E12135-2.

7.1.6 Verbindungen aus IBWF E99338

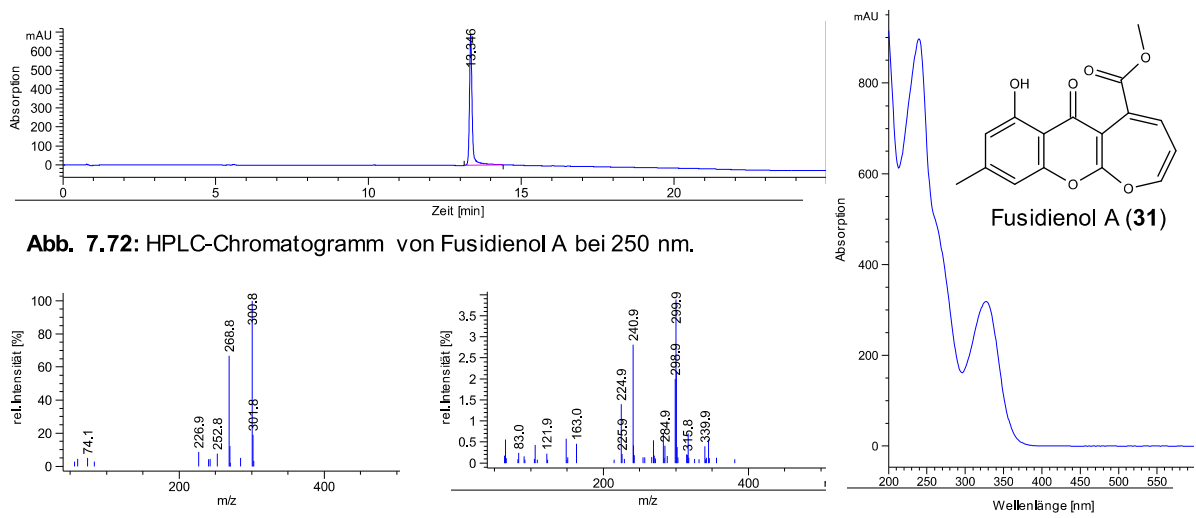


Abb. 7.72: HPLC-Chromatogramm von Fusidienol A bei 250 nm.

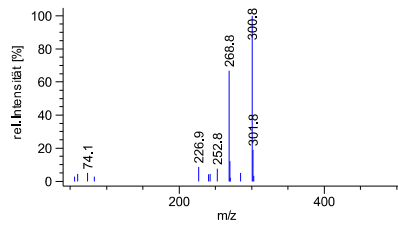


Abb. 7.73: Massenspektrum (positive Ionisierung) von Fusidienol A.

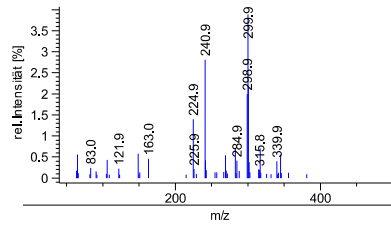


Abb. 7.74: Massenspektrum (negative Ionisierung) von Fusidienol A.

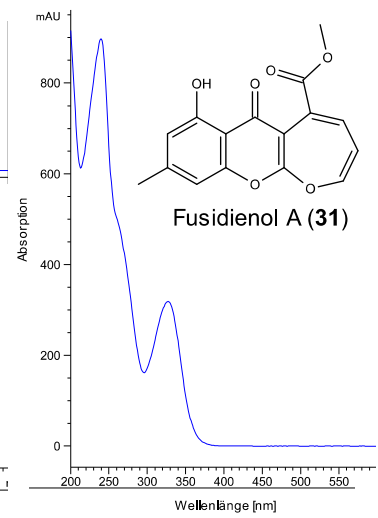


Abb. 7.75: UV-Spektrum von Fusidienol A.

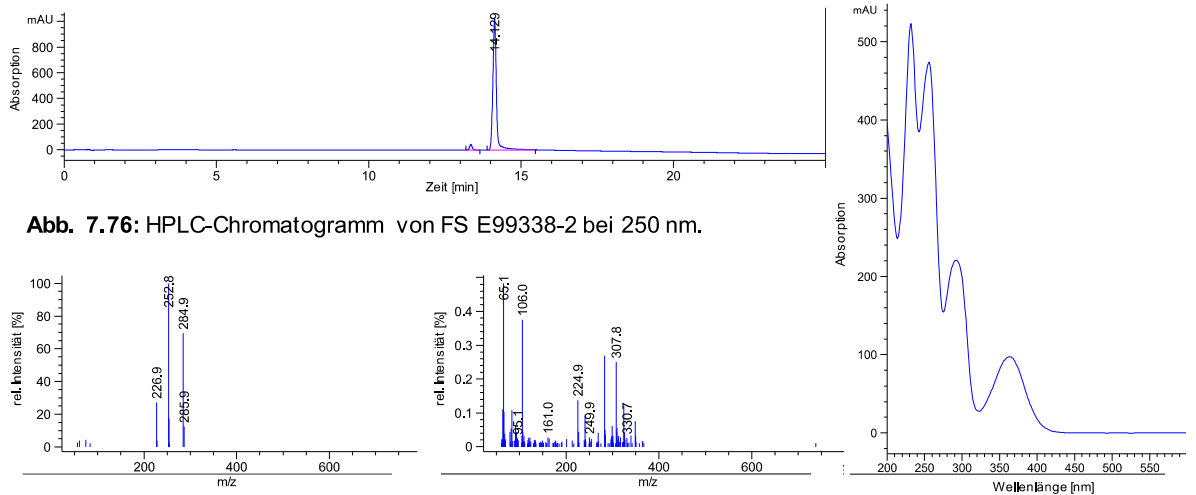


Abb. 7.76: HPLC-Chromatogramm von FS E99338-2 bei 250 nm.

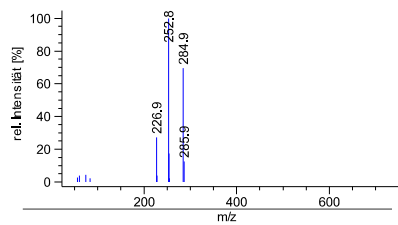


Abb. 7.77: Massenspektrum (positive Ionisierung) von FS E99338-2.

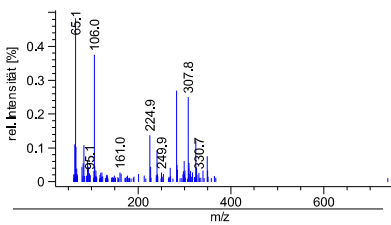


Abb. 7.78: Massenspektrum (negative Ionisierung) von FS E99338-2.

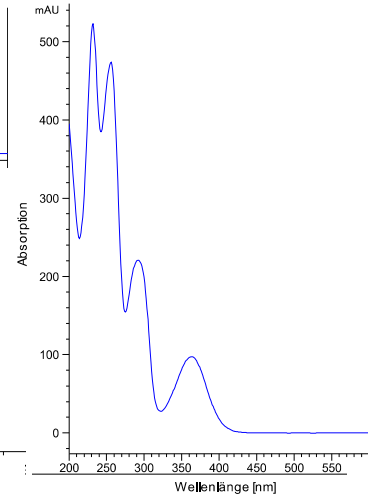


Abb. 7.79: UV-Spektrum von FS E99338-2.

7.1.7 Verbindungen aus *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301

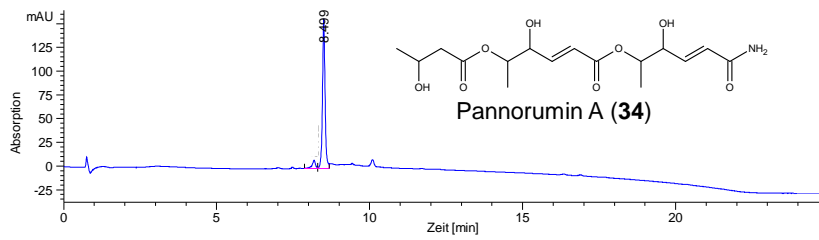


Abb. 7.80: HPLC-Chromatogramm von Pannorumin A bei 250 nm.

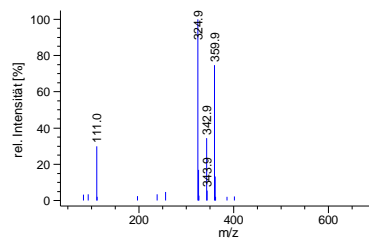


Abb. 7.81: Massenspektrum (positive Ionisierung) von Pannorumin A.

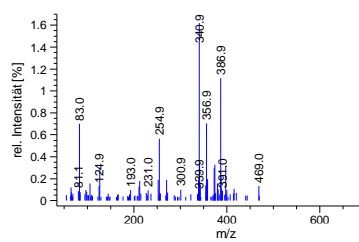


Abb. 7.82: Massenspektrum (negative Ionisierung) von Pannorumin A.

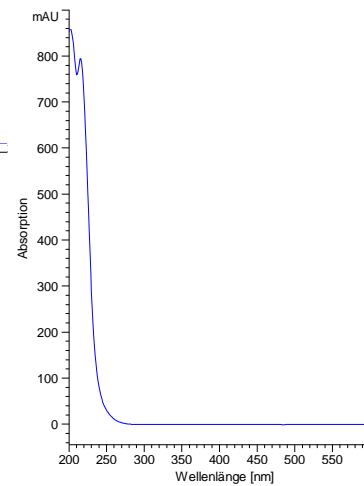


Abb. 7.83: UV-Spektrum von Pannorumin A.

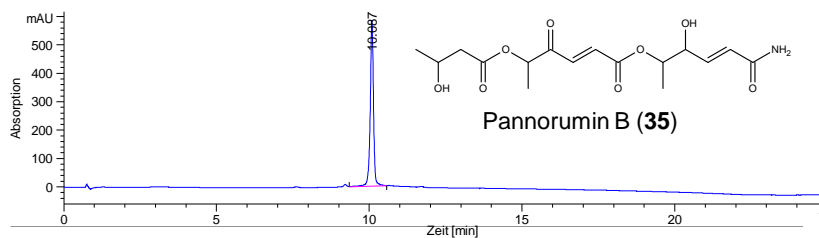


Abb. 7.84: HPLC-Chromatogramm von Pannorumin B bei 250 nm.

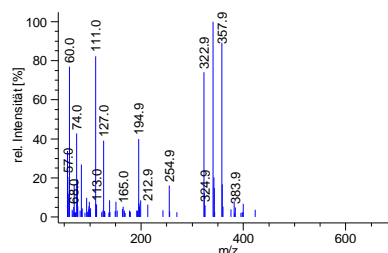


Abb. 7.85: Massenspektrum (positive Ionisierung) von Pannorumin B.

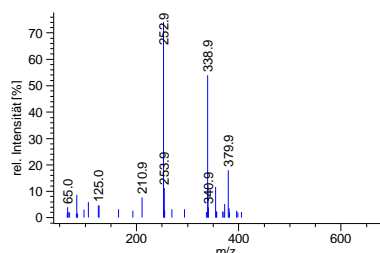


Abb. 7.86: Massenspektrum (negative Ionisierung) von Pannorumin B.

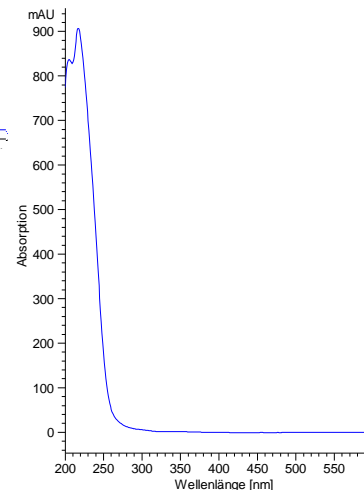


Abb. 7.87: UV-Spektrum von Pannorumin B.

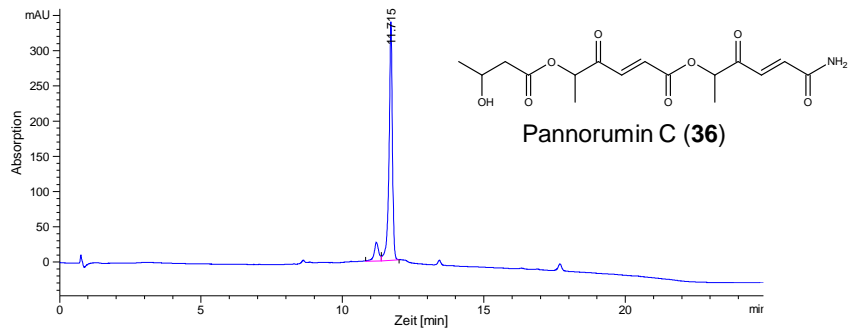


Abb. 7.88: HPLC-Chromatogramm von Pannorumin C bei 250 nm.

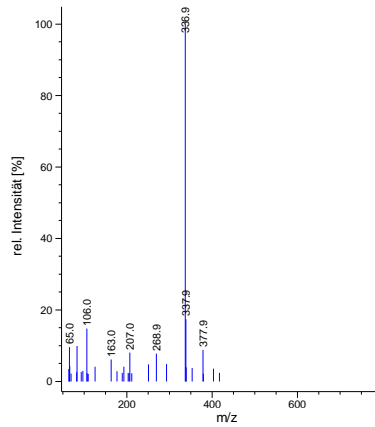


Abb. 7.89: Massenspektrum (negative Ionisierung) von Pannorumin C.

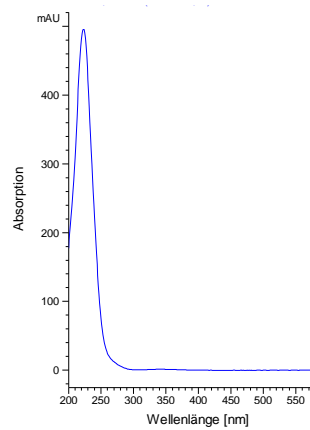


Abb. 7.90: UV-Spektrum von Pannorumin C.

7.2 Untersuchte Pilzstämme

7.2.1 Alle Pilzstämme, die im Konfrontationsassay gegen *E. lata* getestet wurden

Tab. 7.1: Liste aller Basidiomyceten, die im Konfrontationsassay gegen *E. lata* getestet wurden. Die Aktivität wurde dabei in drei Kategorien eingeteilt (++ sehr gute Wachstumshemmung, + moderate Wachstumshemmung und - keine Wachstumshemmung).

IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität
08004	-	77227	-	82066	-	83066	-	84122	-	87230	-
08005	-	77239	-	82067	-	83085	-	84123	-	87231	-
08010	-	77240	-	82068	-	83100	-	85008	-	87235	-
08011	-	77241	-	82070	-	83101	-	85011	-	87236	-
08013	-	79058	-	82077	-	83103	-	85013	-	87240	-
08015	-	79065	-	82082	-	83109	-	85018	-	87249	-
08018	-	79084	-	82088	-	83117	-	85020	-	88018	++
08019	-	79118	-	82096	-	83118	-	85023	++	88057	++
08020	-	79200	++	82106	-	83127	-	85028	-	88066	-
08024	+	81084	-	82109	-	84039	-	85029	-	88068	-
08025	-	81089	-	82110	-	84046	-	85042	-	88071	-
08026	-	81092	-	82111	-	84060	-	85046	-	87011	-
08027	-	81098	-	82113	-	84064	-	85047	-	87017	-
08031	-	81103	-	82116	-	84065	-	85048	-	87018	-
08036	-	81122	++	82127	-	84066	-	85051	-	87023	-
08040	-	81125	-	82136	++	84067	-	85055	-	87107	-
08046	-	81142	-	82139	-	84068	-	85070	-	87108	-
76021	-	81145	-	82140	-	84070	-	85073	-	87110	-
76036	++	81150	-	82157	++	84073	-	86038	-	87119	-
76038	-	81159	++	82166	-	84074	-	82170a	-	87124	-
77009	-	81161	++	82242	-	84075	-	82172a	-	87188	-
77055	-	82020	-	83006	-	84081	-	85062d	-	87196	-
77062	-	82021	-	83018	-	84082	-	85062h	-	87203	-
77075	-	82030	-	83022	-	84083	-	87022	-	87209	-
77093	-	82031	-	83027	-	84087	-	87061	-	87210	-
77094	-	82034	-	83030	-	84094	-	87066	-	87213	-
77095	-	82038	-	83034	-	84098	-	87067	-	87218	-
77097	-	82039	-	83039	-	84099	-	87085	-	87219	-
77103	-	82040	-	83040	-	84101	-	87088	-	87220	-
77106	-	82046	-	83054	-	84107	-	87172	-	87226	-
77120	-	82048	-	83056	-	84108	-	87175	-	88014	-
77158	-	82050	-	83061	-	84110	-	87206	-	88016	-
77180	-	82060	-	83062	-	84112	-	87221	-	88019	-
77207	-	82063	-	83065	-	84113	-				

Tab. 7.2: Liste aller Endophyten, die im Konfrontationsassay gegen *E. lata* getestet wurden. Die Aktivität wurde dabei in drei Kategorien eingeteilt (++ sehr gute Wachstumshemmung, + moderate Wachstumshemmung und - keine Wachstumshemmung).

IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität
E00198	-	E01074	-	E07112	-	E07178	-	E12325	-	E99269	-
E01001	+	E01075	-	E07115	-	E07179	-	E12332	-	E99270	-
E01002	-	E01076	-	E07117	-	E07180	-	E12333	-	E99271	-
E01003	-	E01077	-	E07118	-	E07181	-	E12334	-	E99272	-
E01005	-	E01078	-	E07119	-	E07182	-	E12335	-	E99274	-
E01007	-	E01079	-	E07120	+	E07183	-	E12337	-	E99275	-
E01010	-	E01080	-	E07122	-	E07184	-	E12340	-	E99276	-
E01011	-	E01081	-	E07123	-	E07185	-	E12341	+	E99277	-
E01013	-	E01082	-	E07124	-	E07186	-	E12342	-	E99278	-
E01014	-	E01083	++	E07125	-	E10038	-	E12344	-	E99279	-
E01017	-	E01085	-	E07128	-	E10054	-	E12345	-	E99280	-
E01019	-	E01086	-	E07129	-	E11373	+	E12350	-	E99282	-
E01021	-	E01089	-	E07131	-	E11374	-	E12351	-	E99283	-
E01022	-	E01090	+	E07133	-	E11375	++	E12352	-	E99284	-
E01023	-	E01091	-	E07135	-	E11376	+	E12355	-	E99285	-
E01026	-	E01093	++	E07136	-	E11377	+	E12359	-	E99286	-
E01027	-	E01118	-	E07137	-	E11380	-	E12360	-	E99287	-
E01028	-	E01121	-	E07138	-	E11381	-	E12361	-	E99288	-
E01029	-	E01122	-	E07139	-	E11382	+	E12362	++	E99289	-
E01030	-	E01129	-	E07140	-	E12094	-	E12363	-	E99293	-
E01031	-	E01130	-	E07141	-	E12135	++	E12364	-	E99294	-
E01032	-	E01133	-	E07142	-	E12148	-	E12366	-	E99295	-
E01033	-	E01135	+	E07143	-	E12149	-	E12369	-	E99297	-
E01034	-	E01137	-	E07144	-	E12150	-	E12370	-	E99298	-
E01036	-	E01139	-	E07145	-	E12153	-	E99131	-	E99299	-
E01037	-	E01140	-	E07147	-	E12154	-	E99235	-	E99300	-
E01038	-	E01142	-	E07148	-	E12155	-	E99236	-	E99301	++
E01039	-	E01143	-	E07149	-	E12156	-	E99237	-	E99302	-
E01041	-	E01145	-	E07150	-	E12157	-	E99240	-	E99303	-
E01043	-	E01146	-	E07151	-	E12158	-	E99241	-	E99304	-
E01045	-	E07085	-	E07152	-	E12159	-	E99242	-	E99305	-
E01046	-	E07086	-	E07153	-	E12160	-	E99243	-	E99306	-
E01047	-	E07087	-	E07154	-	E12173	-	E99245	-	E99307	-
E01049	-	E07088	-	E07156	-	E12177	-	E99246	-	E99308	-
E01050	-	E07089	-	E07157	-	E12179	-	E99248	++	E99309	-
E01051	-	E07090	-	E07158	-	E12180	-	E99249	-	E99310	-
E01052	-	E07091	-	E07160	-	E12183	-	E99250	-	E99311	-
E01053	+	E07092	-	E07161	-	E12184	-	E99252	-	E99312	-
E01054	-	E07093	-	E07162	-	E12310	-	E99253	-	E99313	-
E01055	-	E07094	-	E07165	-	E12311	-	E99255	++	E99314	-
E01057	-	E07095	-	E07166	-	E12312	-	E99258	-	E99315	-
E01058	-	E07096	-	E07167	-	E12314	-	E99259	-	E99316	-
E01059	-	E07097	-	E07168	-	E12315	-	E99260	-	E99318	-
E01062	-	E07098	-	E07169	-	E12316	-	E99261	-	E99319	-
E01063	-	E07099	-	E07170	-	E12317	-	E99262	-	E99320	-
E01065	-	E07100	-	E07171	-	E12318	-	E99264	-	E99321	-
E01066	-	E07103	-	E07172	-	E12319	-	E99265	-	E99322	-
E01067	-	E07106	-	E07173	-	E12320	-	E99266	-	E99323	-
E01069	-	E07109	-	E07176	++	E12321	-	E99267	-	E99326	-
E01072	-	E07111	-	E07177	-	E12322	-	E99268	-	E99327	-

Tab. 7.2 (fortgesetzt).

IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität	IBWF	Aktivität
E99327	-	E99335	-	E99343	-	E99352	-	E99361	-	E99385	-
E99328	-	E99336	-	E99344	-	E99354	-	E99362	-	E99388	-
E99329	-	E99337	++	E99345	-	E99355	-	E99364	-	E99392	-
E99330	-	E99338	++	E99346	-	E99356	-	E99365	-	E99394	-
E99331	-	E99339	-	E99347	-	E99357	-	E99367	-	E99401	-
E99332	-	E99340	-	E99348	-	E99359	-	E99368	-	E99411	-
E99333	-	E99341	-	E99350	-	E99360	-	E99369	-	E99430	-
E99334	-	E99342	-								

7.2.2 Alle Rohextrakte, die gegen das Myzelwachstum von *Eutypa lata* getestet wurden

Tab. 7.3: Liste aller Rohextrakte, die gegen das Myzelwachstum von *E. lata* getestet wurden. KF steht dabei für Kulturfiltratextrakt und MY für Myzelextrakt. Die Aktivität wurde in drei Kategorien eingeteilt (++ sehr gute Wachstumshemmung, + moderate Wachstumshemmung und - keine Wachstumshemmung).

Imperfekte 2009 Box 1			Imperfekte 2009 Box 2			Imperfekte 2009 Box 3			Imperfekte 2009 Box 4		
IBWF	KF	MY	IBWF	KF	MY	IBWF	KF	MY	IBWF	KF	MY
001-09	-	-	033-09	-	-	069-09	-	-	101-09	-	-
002-09	-	-	034-09	-	-	070-09	-	-	102-09	-	-
003-09	-	-	039-09	-	-	071-09	-	-	103-09	-	-
004-09	-	-	040-09	-	-	072-09	-	-	104-09	-	-
005-09	-	-	041-09	-	-	073-09	-	-	105-09	-	-
006-09	-	-	042-09	-	-	074-09	-	-	106-09	-	-
007-09	-	-	043-09	-	-	075-09	-	-	107-09	-	-
008-09	-	-	044-09	-	-	076-09	-	-	108-09	-	-
009-09	-	-	045-09	-	-	077-09	-	-	109-09	-	-
010-09	-	-	046-09	-	-	078-09	-	-	110-09	-	-
011-09	-	-	047-09	-	-	079-09	-	-	111-09	-	-
012-09	-	-	048-09	-	-	080-09	-	-	112-09	-	-
013-09	-	-	049-09	-	-	081-09	-	-	113-09	-	-
014-09	-	-	050-09	-	-	082-09	-	-	114-09	-	-
015-09	-	-	051-09	-	-	083-09	-	-	115-09	-	-
016-09	-	-	052-09	-	-	084-09	-	-	116-09	-	-
017-09	-	-	053-09	++	-	085-09	-	-	117-09	-	-
018-09	-	-	054-09	-	-	086-09	-	-	118-09	-	-
019-09	-	-	055-09	-	-	087-09	-	-	119-09	-	-
020-09	-	-	056-09	-	-	088-09	-	-	120-09	-	-
021-09	-	-	057-09	-	-	089-09	-	-	121-09	-	-
022-09	++	-	058-09	-	-	090-09	-	-	122-09	-	-
023-09	-	-	059-09	-	-	091-09	-	-	123-09	-	-
024-09	-	-	060-09	-	-	092-09	-	-	124-09	-	-
025-09	-	-	061-09	-	-	093-09	-	-	125-09	-	-
026-09	-	-	062-09	-	-	094-09	-	-	126-09	-	-
027-09	-	-	063-09	-	-	095-09	-	-	127-09	-	-
028-09	-	-	064-09	-	-	096-09	-	-	128-09	-	-
029-09	-	-	065-09	-	-	097-09	-	-	129-09	-	-
030-09	-	-	066-09	-	-	098-09	-	-	130-09	-	-
031-09	-	-	067-09	++	-	099-09	-	++	131-09	-	-
032-09	-	-	068-09	-	-	100-09	-	-	132-09	-	-

Tab. 7.3 (fortgesetzt)

Imperfekte 2009 Box 5			Imperfekte 2013 Box 1			Imperfekte 2013 Box 2			Imperfekte 2013 Box 3		
IBWF	KF	MY	IBWF	KF	MY	IBWF	KF	MY	IBWF	KF	MY
133-09	-	-	001-13	-	-	033-13	-	-	065-13	-	-
134-09	-	-	002-13	-	-	034-13	-	-	066-13	-	-
135-09	-	-	003-13	-	-	035-13	-	-	067-13	-	-
136-09	-	-	004-13	-	-	036-13	-	-	068-13	-	-
137-09	-	-	005-13	-	-	037-13	-	-	069-13	-	-
138-09	-	-	006-13	-	-	038-13	-	-	070-13	-	-
139-09	-	-	007-13	-	-	039-13	-	-	071-13	-	-
140-09	-	-	008-13	-	-	040-13	-	-	072-13	-	-
141-09	-	-	009-13	-	-	041-13	-	-	073-13	-	-
142-09	-	-	010-13	-	-	042-13	-	-	074-13	-	-
143-09	-	-	011-13	-	-	043-13	-	-	075-13	-	-
144-09	-	++	012-13	-	-	044-13	-	-	076-13	-	-
145-09	-	-	013-13	-	-	045-13	-	-	077-13	-	-
146-09	-	-	014-13	-	-	046-13	-	-	078-13	-	-
147-09	-	-	015-13	-	-	047-13	-	-	079-13	-	-
148-09	-	-	016-13	-	-	048-13	-	-	080-13	-	-
149-09	-	-	017-13	-	-	049-13	-	-	081-13	-	-
150-09	-	-	018-13	-	-	050-13	-	-	082-13	-	-
151-09	-	-	019-13	-	-	051-13	-	-	083-13	-	-
152-09	-	-	020-13	-	-	052-13	-	-	084-13	-	-
153-09	-	-	021-13	-	-	053-13	-	-	085-13	-	-
154-09	-	-	022-13	-	-	054-13	-	-	086-13	-	-
155-09	-	-	023-13	-	-	055-13	-	-	087-13	-	-
156-09	-	-	024-13	-	-	056-13	-	-	088-13	-	-
157-09	-	-	025-13	-	-	057-13	-	-	089-13	-	-
158-09	-	-	026-13	-	-	058-13	-	-	090-13	-	-
163-09	-	-	027-13	-	-	059-13	-	-	091-13	-	-
160-09	-	-	028-13	-	-	060-13	-	-	092-13	-	-
161-09	-	-	029-13	-	-	061-13	-	-	093-13	-	-
162-09	++	-	030-13	-	-	062-13	-	-	094-13	-	-
			031-13	-	-	063-13	-	-	095-13	-	-
			032-13	-	-	064-13	-	-	096-13	-	-

Imperfekte 2013 Box 4			Imperfekte 2013 Box 4			Imperfekte 2014 Box 1			Imperfekte 2014 Box 1		
IBWF	KF	MY	IBWF	KF	MY	IBWF	KF	MY	IBWF	KF	MY
097-13	-	-	113-13	-	-	001-14	-	-	017-14	-	-
098-13	-	-	114-13	-	-	002-14	-	-	018-14	-	-
099-13	-	-	115-13	-	-	003-14	-	-	019-14	++	-
100-13	-	-	116-13	-	-	004-14	-	-	020-14	-	-
101-13	-	-	117-13	-	-	005-14	-	-	021-14	-	-
102-13	-	-	118-13	-	-	006-14	-	-	022-14	-	-
103-13	-	-	119-13	-	-	007-14	-	-	023-14	-	-
104-13	-	-				008-14	-	-	024-14	-	-
105-13	-	-				009-14	-	-	025-14	-	-
106-13	-	-				010-14	-	-	026-14	-	-
107-13	-	-				011-14	-	-	027-14	-	-
108-13	-	-				012-14	-	-	028-14	-	-
109-13	-	-				013-14	-	-	029-14	-	-
110-13	-	-				014-14	-	-	030-14	-	-
111-13	-	-				015-14	-	-	031-14	-	-
112-13	-	-				016-14	-	-	032-14	-	-

7.3 Zusammenfassung der verwendeten Primer

Tab. 7.4: Primer zur Konstruktion von Vektoren für die Transformation von *Eutypa lata*. Kleingeschriebene Buchstaben im Primer markieren die überhängende Region, die für die Gibson Assembly Reaktion erforderlich ist. Fett gedruckte Sequenzen markieren eine Restriktionsschnittstelle.

#	Name	Sequenz (5'→3')
P1	5610_5'-for_ <i>EcoRI</i>	GC GAATTC AGTCTCATAAGTTAGCATGACGG
P2	5610_5'-rev_ <i>BamHI</i>	GC GGATCC AAAGAATCCGAGTGAAGTTGACC
P3	5610_3'-for_ <i>SpeI</i>	GC ACTAGT TACGACTGGAATGGACTGGACT
P4	5610_3'-rev_ <i>PmlI</i>	GC CACGTG TTTCATTTCCATGCTCATGTCAG
P5	10483_5'-for_ <i>EcoRI</i>	GC GAATTC CGAAAGCCTCCGCGTACTTA
P6	10483_5'-for_ <i>BamHI</i>	GC GGATCC AGAAATGACCGTACAGCTCGG
P7	10483_3'-for_ <i>SpeI</i>	GC ACTAGT TGTTGTTCATCGCACCCATTGA
P8	10483_3'-rev_ <i>PmlI</i>	GC CACGTG TGACAGCAAGCCACACGAAG
P9	10881_5'-for_ <i>EcoRI</i>	GC GAATTC CAACCCATGTTAGACGGTGC
P10	10881_5'-rev_ <i>BamHI</i>	GC GGATCC TGCCTCGAAAGCTAATAGGTAGG
P11	10881_3'-for_ <i>SpeI</i>	GC ACTAGT CCCGATCAAATCGCATTCGT
P12	10881_3'-rev_ <i>PmlI</i>	GC CACGTG GGCAGGTGGGTACTGTCAA
P13	EL_EF1a-Prom-for	GATAAGCAACTATGCCAGCAGCAAATTC
P14	EL-EF1a-Prom-rev	GACGACGACGTTGATATGGGGCT
P15	EL_GPD-Prom_for	TTAGGCCTTCCGGGCATTTTCGTAG
P16	EL_GPD-Prom_rev	CTCGCTGTAGAAGGTCACGGTCTTG
P17	EF1a_for	ctggctggtggcaggatataatgtggtgtaaacaCTATGCCAGCAGCAAATTCGCACCT
P18	EF1a_rev	gagttcaggcttttcatTTTGAAGGATGGAAAGGTTTATGACG
P19	HPT_EFA1a_for	acctttccatccttcaaaATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGA
P20	HPT_EFA1a_rev	ctaataaacgctcttttcttaggtttacctgcaCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTG
P21	GPD_for	ctggctggtggcaggatataatgtggtgtaaacaTTAGGCCTTCCGGGCATTTTCGTAG
P22	GPD_rev	gagttcaggcttttcatGTTGTGTGGTTATGTGTGTGAGAGAGAAATC
P23	HPT_GPD_for	cacacataaccacacaacATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGA
P24	HPT_GPD_rev	ctaataaacgctcttttcttaggtttacctgcaCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTG

Tab. 7.5: Primer für die Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden.

#	Name	Sequenz (5'→3')
P25	10483_Sonde-for	GGCGTGTTTTGGGTTATGCT
P26	10483_Sonde-rev	GTGTCCTATATCAGCCTACCAGA
P27	HPT_Sonde-for	CTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATC
P28	HPT_Sonde-rev	GTATTGGGAATCCCCGAACATCGC

Tab. 7.6: Primer für Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR.

#	Name	Sequenz (5'→3')
P29	Actin_qPCR-for	GTCACTCACGTTGTCCCCAT
P30	Actin_qPCR-rev	CGCTCAGCCAGGATCTTCAT
P31	EF1a_qPCR-for	TCGCCTGCAAGTTCTCTGAG
P32	EF1a_qPCR-rev	GAAAGCCTCAACGCACATGG
P33	GAPDH_qPCR-for	GCTCAAGTACGACTCGACCC
P34	GAPDH_qPCR-rev	CTCGCTGTAGAAGGTCACGG
P35	9906_qPCR-for	CAGTGTGAGTTTCTGGCCA
P36	9906_qPCR-rev	GGGTTGGATGGTGATGTCGT
P37	1894_qPCR-for	AACGAAACCAGCCTGCTACA
P38	1894_qPCR-rev	GGAGACCAGTTACGCCACAT
P39	1896_qPCR-for	GACCCCAATCCTCACAACGT
P40	1896_qPCR-rev	CCGAAGCCTAACAACCCGAT
P41	1899_qPCR-for	CCTGAGAAGATCGCCAAGGG
P42	1899_qPCR-rev	CTCTGCTGGACCCTCTCAAC
P43	91_qPCR-for	TCACCGATCAGAGAAGCGC
P44	91_qPCR-rev	TGCGATCTTGTTGTCCCAGG
P45	5114_qPCR-for	GCCGCTACTTCACCTCCTAC
P46	5114_qPCR-rev	GGCATGTATCTCGGTGAGCA
P47	3512_qPCR-for	AATGGCTCGACTGGGTTGAC
P48	3512_qPCR-rev	CTCCGACATCTGGGTACGTG
P49	7516_qPCR-for	GAAGTCCGACAGCCCCGAGAA
P50	7516_qPCR-rev	CTTCTGGAGCTCGCCCTT
P51	7753_qPCR-for	TCAGGCGAGATGTGCTGAAG
P52	7753_qPCR-rev	GCTCTCTCATCTGGGCCTTG
P53	5807_1_qPCR-for	CGGGTAGTGGCGAAGAACAT
P54	5807_1_qPCR-rev	TGTTGCCGTCCATATAGCGT
P55	5807_2_qPCR-for	GGTGTGAGGAGCTGGTTAG
P56	5807_2_qPCR-rev	AATGTCCGGTGTCTACGGTCG
P57	9011_qPCR-for	CGAAGATGTCTCAGACCACCG
P58	9011_qPCR-rev	CCACCTTCCCTCTTGGCATA

Tab. 7.7: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung artbestimmender DNA-Regionen.

#	Name	Sequenz (5'→3')
P59	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
P60	ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
P61	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
P62	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
P63	LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC
P64	LR3	CCGTGTTTCAAGACGGG
P65	LR3R	GTCTTGAAACACGGACC
P66	LR7	TACTACCACCAAGATCT
P67	ACT-512F	ATGTGCAAGCCGGTTTTCGC
P68	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT
P69	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
P70	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC

7.4 Plasmidkarten

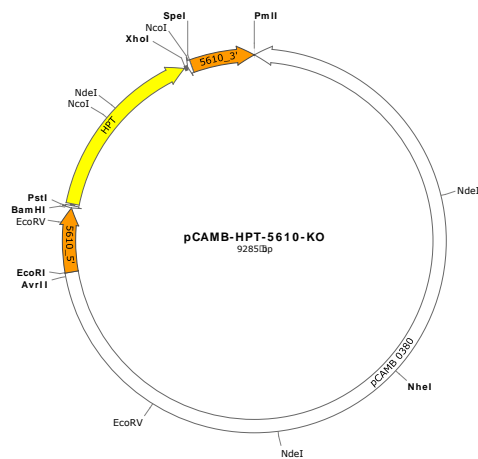


Abb. 7.91: Plasmidkarte von pCAMB-HPT-5610-KO.

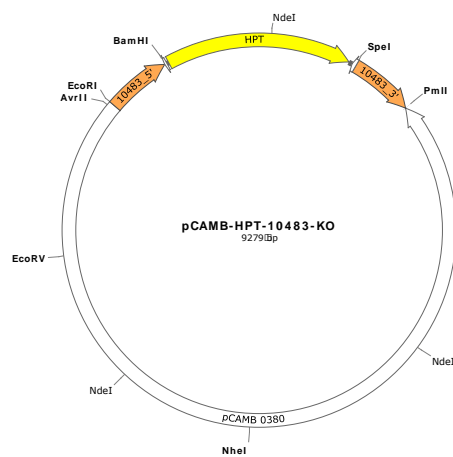


Abb. 7.92: Plasmidkarte von pCAMB-HPT-10483-KO.

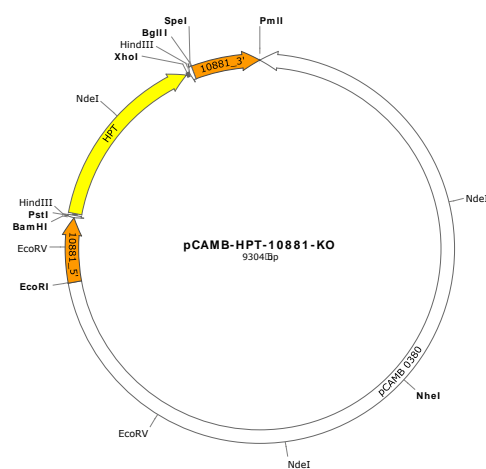


Abb. 7.93: Plasmidkarte von pCAMB-HPT-10881-KO.

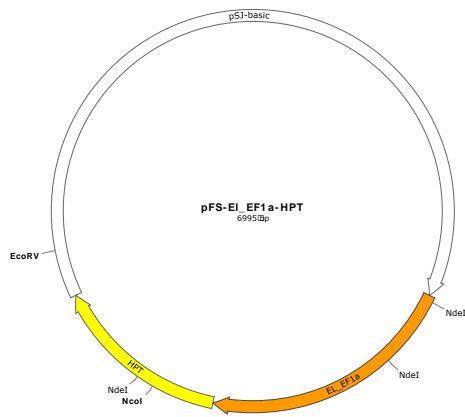


Abb. 7.94: Plasmidkarte von pFS-EI_EF1a-HPT.

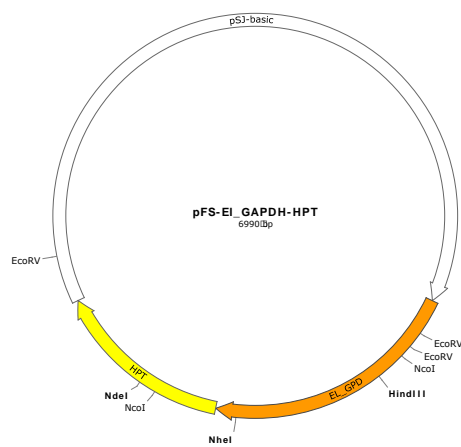
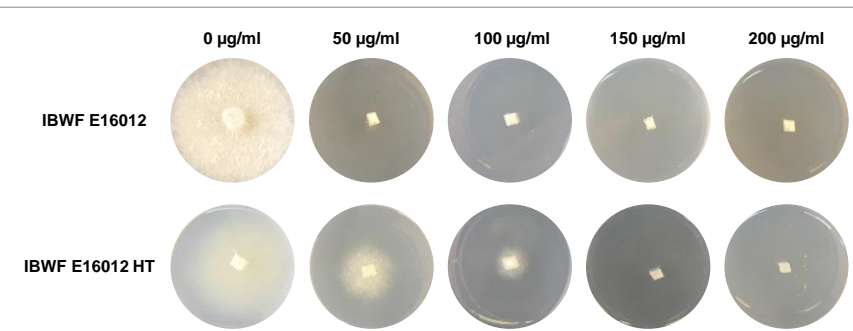


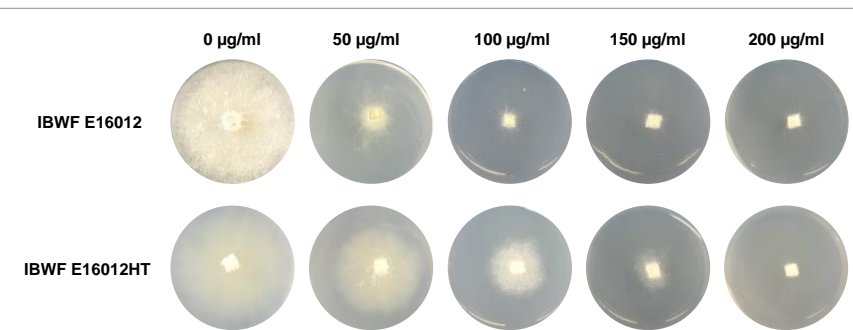
Abb. 7.95: Plasmidkarte von pFS-EI_EF1a-HPT.

7.5 Plattenwachstumstest zur Charakterisierung von IBWF E16012HT

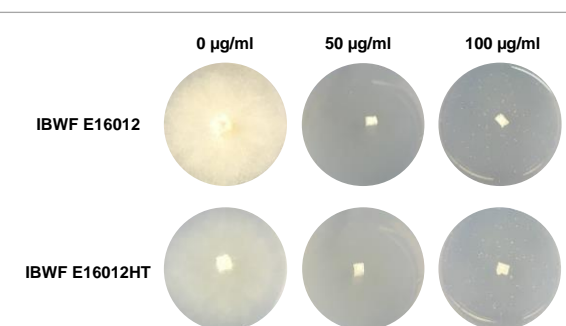
Hygromycin B



Geneticin G418



Tebuconazol



Pyraclostrobin

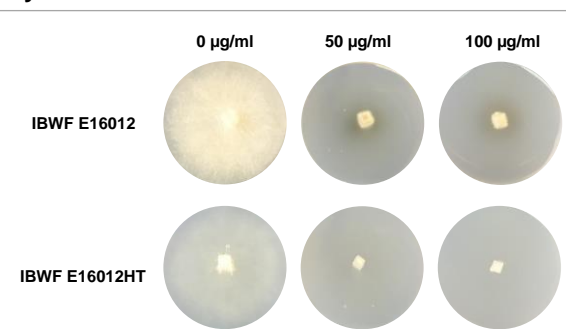


Abb. 7.96: Plattenwachstumstest zur Charakterisierung von IBWF E16012HT. Der *E. lata* Wildtyp und IBWF E16012HT wurden jeweils für 10 Tage bei RT auf **M19** mit verschiedenen Konzentrationen Hygromycin B, Geneticin G418, Tebuconazol oder Pyraclostrobin.

7.6 Ergebnisse der biologischen Charakterisierung der aus *Eutypa lata* isolierten Naturstoffe

Tab. 7.8: Antimikrobielles Wirkungsspektrum der aus *Eutypa lata* isolierten Verbindungen gegen ausgewählte Pilz- und Bakterienstämme. Die Werte geben die minimale Hemmkonzentration (MHK) an, bei der das Wachstum des jeweiligen Organismus gehemmt wurde.

Organismus	MHK [$\mu\text{g/ml}$]																											
	1	2	9	10	15	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	Cicl.	Tetr.									
Pilze																												
<i>Eutypa lata</i>	150	>300	150	>50	250	>300	>300	>50	>300	n.t.	>300	>300	>300	n.t.	n.t.	>300	>300	20	n.t.									
<i>Candida albicans</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	5	n.t.									
<i>Erenothecium coryli</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	5	n.t.									
<i>Rhizomorpha miehei</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	10	n.t.									
<i>Penicillium chrysogenum</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	10	n.t.									
<i>Paecilomyces variotii</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	10	n.t.									
Bakterien																												
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	5									
<i>Micrococcus luteus</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	10									
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	1									
<i>Escherichia coli</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	1									
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	1									

Cicl.: Ciclopirox; Tetr.: Tetracyclin; n.t.: nicht getestet

Tab. 7.9: Untersuchungen zur Pflanzenkeimungshemmung mit den aus *Eutypa lata* isolierten Naturstoffen gegen die Samen von *Setaria italica*, *Lepidium sativum* und *Agrostis capillaris*.

Organismus	MHK [$\mu\text{g/ml}$]																											
	1	2	9	10	15	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28											
<i>Setaria italica</i>	+/-	>250	>250	>250	>250	n.t.	>250	n.t.	n.t.	>250	>250	>250	>250	n.t.	>250	>250	>250											
<i>Lepidium sativa</i>	>250	>250	>250	>250	>250	n.t.	>250	n.t.	n.t.	>250	>250	>250	>250	n.t.	>250	>250	>250											
<i>Agrostis capillaris</i>	>250	>250	>250	>250	>250	n.t.	>250	n.t.	n.t.	>250	>250	>250	>250	n.t.	>250	>250	>250											

Tab. 7.10: Untersuchungen zur Sporenkeimungshemmung von filamentösen Pilzen durch die aus *Eutypa lata* isolierten Verbindungen.

Organismus	MHK [$\mu\text{g/ml}$]														Cicl.			
	1	2	9	10	15	17	18	19	20	21	22	23	24	25		26	27	28
<i>Botrytis cinerea</i>	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	n.t.	n.t.	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	5
<i>Phytophthora infestans</i>	25	n.t.	>50	>50	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	>50	>50	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	20
<i>Pyricularia oryzae</i> (H ₂ O)	25	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	n.t.	n.t.	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	5
<i>Pyricularia oryzae</i> (CM)	25	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	n.t.	n.t.	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	5

Tab. 7.11: Zytotoxisches Wirkungsspektrum der aus *Eutypa lata* isolierten Verbindungen gegen die Zelllinie HeLa-S3.

Zelllinie	IC ₅₀ [$\mu\text{g/ml}$]														Camp.			
	1	2	9	10	15	17	18	19	20	21	22	23	24	25		26	27	28
HeLa-S3	>50	>50	>50	>50	>50	n.t.	>50	>50	n.t.	>50	>50	>50	>50	n.t.	n.t.	>50	>50	1

7.7 Artspezifische DNA-Sequenzen

Die unterstrichenen DNA-Sequenzen verdeutlichen die Position der verwendeten Sequenzierprimer.

7.7.1 ITS-Sequenz von *Eutypa lata* IBWF E16012

(ITS1)-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGGngGGATCATTACAGAGTTACCTAACTCCAAACCCATGTGAACCTACCT
ATGTTGCCTCGGCGGGGAAGCCTACCCGGTACCTACCCTGTAGCTACCCGGGAGCGAGCTACCCTGTAGCC
CGCTGCAGGCCTACCCGCCGGTGGACACTTAAACTCTTGTTTTTTTTAGTGATTATCTGAGTGTATACTTAA
TAAGTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCAT
GCCTGTTGAGCGTCATTTGACCTTCAAGCCCTAGCTGCTTGGTGTGGGAGCCTATCTCCGGATAGCTCC
TGAAAAGCATTGGCGGAGTCGCGGTGACCCCAAGCGTAGTAATTCTTCTCGCTTTAGGTGTGTACGGCTGA
CGTCTTGCCGTTAAACCCCAATTTTTTAAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG
CATATCAATAAGCGGAGGA-3'-(ITS4)

7.7.2 ITS-Sequenz von *Eutypa lata* IBWF E16012HT

(ITS1-F)-5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC
ATTACAGAGTTACCTAACTCCAAACCCATGTGAACCTACCTATGTTGCCTCGGCGGGGAAGCCTACCCGGTA
CCTACCCTGTAGCTACCCGGGAGCGAGCTACCCTGTAGCCCGCTGCAGGCCTACCCGCCGGTGGACACTTA
AACTCTTGTTTTTTTTAGTGATTATCTGAGTGTATACTTAATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGACCTTCAAGCC
CTAGCTGCTTGGTGTGGGAGCCTATCTCCGGATAGCTCCTGAAAAGCATTGGCGGAGTCGCGGTGACCCC
AAGCGTAGTAATTCTTCTCGCTTTAGGTGTGTACGGCTGACGTCTTGCCGTTAAACCCCAATTTTTTAAAT
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA -3'-(ITS4)

7.7.3 ITS-Sequenz von IBWF E12135

(ITS1)-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCTCACGCCCGACCTCCAACCTTT
GTGAACCAACTCTGTTGCTTCGGGGGCGACCCCGCGTTTCGGCGACGGCGCCCCGGAGGTCATCAAAC
ACTGCATCTTTGCGTCGGAGTCTTAAAGTAAATTTAAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACATTGCGCCCGTGGTATTCCGCGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTACCACCTCAAGCCTAGCTTG
GTATTGGGCGTCGCGGTTCCGCGCGCCTTAAAGTCTCCGGCTGAGCAGTTCTGCTCTAAGCGTTGTGGCAT
ATATTTGCTGAAGAGTTGCGACGGCTTTTGGCCGTTAAATCTTTCTTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG
ATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-3'-(ITS4)

7.7.4 ACT-Sequenz von IBWF E12135

(ACT-512F)-5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGCCGGTGACGATGCGCCACGAGCTGTCTTCCGTAAGTGATTAC
AGAACGCTGCCAGCCGAAGCGAGCTGACATCCACCACAGCGTCCATTGTGGCCGACCGCGTCACCATG
GGTATGCGATCCTCCTCACTGACCCGCCGAACACATCTAACAAGAGCGCAGTATCATGATTGGTATGGGCC
AGAAGGACTCGTA-3'-(ACT-783R)

7.7.5 LSU-Sequenz von IBWF E12135

(LROR)-5'-ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCAAGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCTGGCCAGCGGCCGTTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGTGACCCGGC
 GCGCAGCCTTTACGTAGCTCCTTCGACGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGAGGTAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTG
 GAAAGAGAGTAAAAAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGAACCCAGACTTCGTAGCGATGTTCCGCTGGTCTTCTGACCCGTACTCATCGTCGCGAGGCCAACATCGTCTGGGCCCGCTGGATAAGACCTAAG
 GAATGTGGCTTCTTTCGGGGAAGTGTTATAGCCTGTGGTGATGCAGCGTGGCTCGGGCGAGGTCCGCGCTCGGCAAGGATGTTGGCGTAATGGTTGTCAGCGGCCGCTTGAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTAT
 CGAGTGTTCGGGTGTCAAACCCCTACGCGTAATGAAAGTGAAACGGAGGTGGGAAGCGAAGCTGCACCATCGACCGTACTGTCCCTCGGATGGATTGAGTAAGAGCATAGCTGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAACCTA
 TGCCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGCAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCCTGCCGAAGTTTCCCTCAG
 GATAGCAGTAACGTTTTTCAAGTTTTATGAGGTAAGCGAATGATTAGAGGCCCTGGGGTTGAAACAACCTTAACCTATTCTCAAACCTTTAAATATGTAAGAAGTCCTTGTTACTTAGTTGAACGTGGACATTTGAATGCACCGTACT
 AGTGGGCCATTTTTGGTAAGCAGAAGTGGCGATGCGGGATGAACCGAACGCGAGGTTAAGGTGCCGGAATGTACGCTCATCAGACACCACAAAAGGTGTTAGTTCATCTAGACAGCAGGACGGTGGCCATGGAAGTCGGAATC
 CGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATGAACTAGCCCTGAAAATGGATGGCGCTTAAGCGTGCTACCCATACCTCGCCGCCTGGGTAGAAACGATGCCCAGGCGAGTAGGCAGGC

7.7.6 ITS-Sequenz von IBWF E99338

(ITS1)-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCCTTCTCTCCAGGGAGAAGTCATGAATTAACCCCTCATGGCTCCTCCCATGGATTCTACCCATGTCTTTTTGCGTACTATTTGTTTCCTTGGTAGGCTTGCCTGCCGAT
 AGGACATTATAAAACCTTTTTGTAATTGCAGTCAGCGTCAGAAAAACATAATAATTACAACCTTTCAACAACCGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTAATTGCAGAATTCAGTGAAT
 CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCCCGTTTCTCGCGTGGACTCGCCTTAAAACAATTGGCAGCC
 GGCATATTGGCCTGGAGCGCAGCACATTTTGCGCCTCTTGTATGAATGTTGGCATCCATCAAGACTATTTTTGCTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-3'-(ITS4)

7.7.7 LSU-Sequenz von IBWF E99338

(LROR)-5'-ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTCAGGGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGG
 CGCTTTGGCGTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTACGTGGTCGCTGGCCCTCGCCGTGTAAGCCCCCTTCGACGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGAGG
 TAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGAATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTCAAATAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGCCAGACTTGCCTGTAG
 TTGCTCATCCGGGCTTTTGCCTGGTGCCTTCTGCGGGCAGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTTGGATAAAGGTCTCTGTCATGTACCTCTCTTCGGGGAGGCCTTATAGGGGAGACGACATGCAACCAGCCTGGACTGA

7.7.8 EF1a-Sequenz von IBWF E99338

(EF1-728F)-5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAATTCATCACTTTCTTTTACCTGGGGAACCGTTGCAATCCGGTGTCTTCTCCGAGCCTTCTGCCATTTTTGGCACTATCGCGAAGAGGGGCAAAATTGGGTAGTGGGGTTGTGCC
 AACATTTTGCCTAGCGCTAGCCCTGATCGGGACTTCGGCAACAACAACACCATGACGCACACTTCATTTTGCGCATGTAATTTTTTCAAGGCAACAGTGTGCTGACATGTCTTTCAGGAAGCCGCCGAACTCGGTAAGGG
 TTCCTTCAAGTA-3'-(EF1-986R)

7.7.9 ITS-Sequenz von *Pseudogymnoascus pannorum* IBWF E99301

(ITS1)-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTAGTCGCCCGGGTTGCCGCAAGGCCTCCCGGG
CAACCTACCACCCCTTTGTTTATTACACTTTGTTGCTTTGGCAGGCCTGCCCTCGGGCTGCTGGCTCCGGCCG
GCGAGCGTCTGCCAGAGGACCTAAACTCTGTTTGTCTATACTGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCA
ACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGT
CATTACAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGCCCCCGCCGCCCGGGCGGGCCCTAAAGTCAGTGGCGGT
GCCGTCCGGCTCCGAGCGTAGTAATTCTTCTCGCTCTGGAGGCCCGGTGCTGTGCTCGCCAGCAACCCCA
ATTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-3'-
(ITS4)

7.7.10 ITS-Sequenz von *Pseudeurotium* sp. IBWF 144-09

(ITS1)-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAGACGTTGCCCTTCGGGGTATACCTCCCACCCT
TTGTTTATTATACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCCGTCCTCGGACCACCGGCTTCGGCTGGTCAGTGCCCGCC
AGAGGACCTAAACTCTGTTTGTTCATATTGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTACAACCCTC
AAGCTCTGCTTGGTATTGGGCTCTGCCGTCCCGGCAGGCCTTAAAATCAGTGGCGGTGCCATTCGGCTTC
AAGCGTAGTAATTCTTCTCGCTTTGGAGACCCGGGTGCGTGCTTGCAGCAACCCCAATTTTTTCAGGTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-3'-(ITS4)

7.8 HPLC-Chromatogramme der Transkriptomanalysen

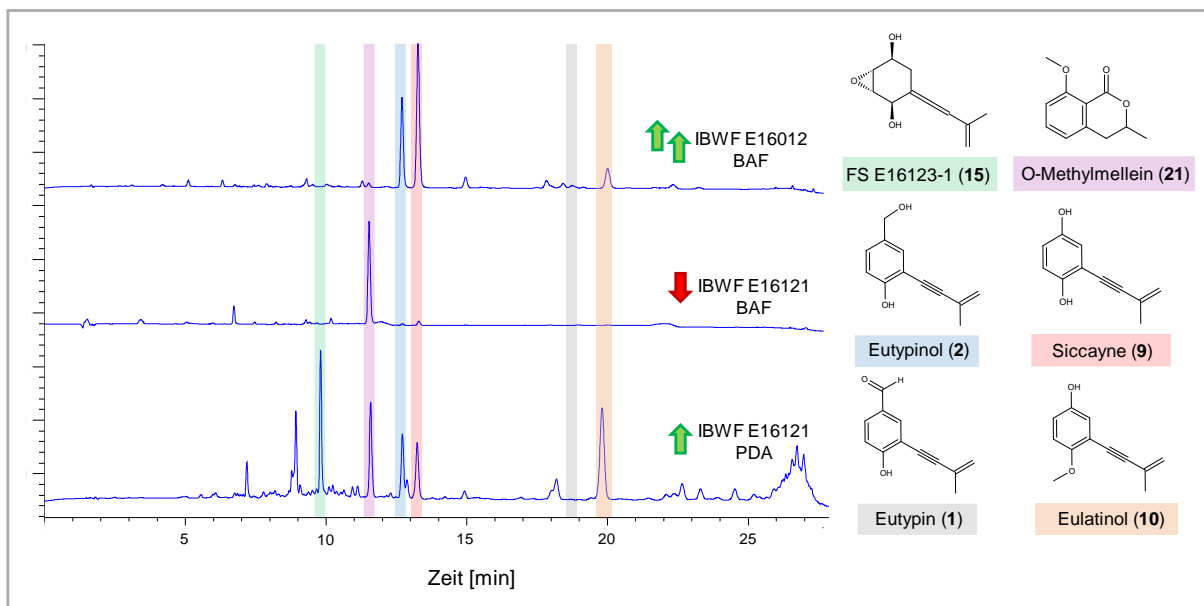





Abb. 7.97: Metabolische Unterschiede von drei verschiedenen Fermentationen, die als Grundlage für die Transkriptomanalyse dienten (siehe 3.1.5.3). Es sind HPLC-Chromatogramme von Kulturfiltratextrakten dargestellt, die bei einer Fermentation nach acht Tagen Inkubation in **M2** bei RT und 120 rpm gewonnen wurden. Der Ansatz IBWF E16012 BAF (oben, ) produzierte eine große Menge an acetylierten Phenolen, der Ansatz IBWF E16121 PDA eine mittlere Menge an acetylierten Phenolen (unten, ) und IBWF E16121 BAF produzierte keine acetylierten Phenole (mitte, ) Die Strukturen der identifizierten Naturstoffe sind nummeriert und mit einem Farbcode versehen. HPLC, Gradient **G2**, Säule **S5**, Wellenlänge 230 nm.

Tab. 7.10: Liste der DE Gene die bei dem Vergleich von den produzierenden Bedingungen (IBWF E16121 PDA und IBWF E16012; grüne Pfeile) mit der nicht produzierenden Bedingung (IBWF E16121 BAF; roter Pfeil) identifiziert wurden (siehe Abb. 3.23). Die angegebenen Werte sind FPKM-Werte.

DE Gene	IBWF E16121 BAF ↓	IBWF E16121 PDA ↑	IBWF E16012 BAF ↑↑	Kategorie
g10255	18,40	81,19	76,24	Zellsignal
g4838	1,94	44,06	180,65	Zellsignal
g7487	18,75	1872,89	186,29	Zellsignal
g10046	15,45	112,17	137,57	DNA/RNA Metabolismus
g4792	1,45	16,58	30,04	DNA/RNA Metabolismus
g10112	2,95	36,96	29,96	Metabolismus
g531	6,33	60,73	32,64	Metabolismus
g6091	19,83	394,03	125,09	Metabolismus
g6489	4,43	26,09	43,89	Metabolismus
g10189	10,58	848,09	110,20	Metabolismus
g5481	25,08	6381,64	276,68	Metabolismus
g10986	21,72	1249,43	398,96	andere
g11841	10,99	140,65	290,56	andere
g12270	5,55	53,09	94,91	andere
g12330	1,14	96,54	95,30	andere
g12748	10,44	66,04	138,23	andere
g12926	8,12	47,34	51,21	andere
g13928	1,08	12,05	9,35	andere
g1633	2,98	39,89	40,92	andere
g2013	4,66	43,64	42,78	andere
g2178	1,72	89,55	24,80	andere
g2646	3,62	78,82	68,96	andere
g4857	8,74	67,70	77,61	andere
g5377	5,21	55,10	40,67	andere
g6090	13,72	351,75	275,55	andere
g6742	3,74	17,40	87,17	andere
g727	9,23	550,08	110,96	andere
g7329	5,81	70,23	58,31	andere
g8265	5,91	44,59	27,98	andere
g9387	11,76	71,51	544,60	andere
g8901	28,44	3933,17	217,07	andere
g4946	12,52	229,00	110,58	Proteinmodifikation
g13283	41,89	253,40	179,62	Sekundärmetabolismus
g7405	12,77	228,22	103,19	Transport
g9386	2,03	107,42	212,01	Transport
g10442	91,77	765,35	802,70	unbekannt
g12626	1,24	15,66	60,46	unbekannt
g14109	3,80	38,96	30,57	unbekannt
g14916	21,40	159,23	91,17	unbekannt
g14928	3,69	49,29	30,17	unbekannt
g2647	12,31	130,28	105,66	unbekannt
g3372	20,32	546,00	193,94	unbekannt
g3667	72,49	773,59	292,83	unbekannt
g5894	6,36	174,62	82,87	unbekannt
g9428	41,69	277,64	187,44	unbekannt

