

Siderophor-Biosynthese in Esca- und Wurzelfäule- assoziierten Pilzen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

eingereicht von

Isabell Büttel

geb. am 17.08.1990 in Worms

Mainz, Februar 2021

Siderophor-Biosynthese
in Esca- und Wurzelfäule-
assoziierten Pilzen

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Mai 2021

Erklärung

Hiermit versichere ich, Isabell Büttel, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszweck gedient.

Mainz, 2021

Isabell Büttel

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	i
II.	Summary	iii
III.	Abkürzungsverzeichnis	iv
IV.	Abbildungsverzeichnis	ii
V.	Tabellenverzeichnis	vi
1	Einleitung	1
1.1	Wirtschaftliche Bedeutung von Krankheiten an der Weinrebe	1
1.2	Die <i>Grapevine trunk diseases</i>	2
1.2.1	Esca	4
1.2.2	<i>Eutypa dieback</i>	11
1.3	Die Wurzelfäule der Weinrebe	12
1.3.1	<i>Roesleria subterranea</i>	12
1.4	Die Siderophor-Biosynthese in filamentösen Pilzen	14
1.4.1	Chemische Struktur der pilzlichen Siderophore	14
1.4.2	Gene der Siderophor-Biosynthese	16
1.4.3	Funktion der Siderophore	18
1.5	Ziele der Arbeit	19
2	Material und Methode	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Chemikalien und Medienbestandteile	20
2.1.2	Lösungen und Puffer	20
2.1.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte	23
2.1.4	Kulturmedien	24
2.1.5	Organismen	26
2.1.6	Enzyme	28
2.1.7	Reaktionskits	28
2.1.8	Oligonukleotid-Primer	28
2.1.9	Plasmide	29
2.1.10	Software und Datenbanken	29
2.1.11	Mikroskopie und Dokumentation	30
2.2	Isolierung phytopathogener Pilze	30
2.3	Molekularbiologische Methoden	31
2.3.1	Präparation von Nukleinsäure	31
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion	32
2.3.3	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren	35
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von Nukleinsäuren	36
2.3.5	Klonierungsstrategien	36
2.3.6	Gibson Assembly	37
2.3.7	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	37
2.3.8	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38

2.3.9	Transformation von <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i>	39
2.3.10	Southern Blot Analyse.....	40
2.4	Phänotypische Charakterisierung	42
2.4.1	Analyse der Konidiogenese.....	42
2.4.2	Analyse des Wachstumsverhaltens unter Anwesenheit von oxidativem Stress.....	43
2.4.3	Analyse des Wachstumsverhaltens unter Eisenmangelbedingungen.....	43
2.4.4	Analyse des Wachstumsverhaltens unter Kokultivierungsbedingung	43
2.4.5	Infektionsuntersuchung der generierten „ <i>loss-of-function</i> “-Mutanten an Weinrebenstecklingen	44
2.5	Fermentation und analytische Methoden.....	45
2.5.1	Fermentation in Submerskulturen zur Identifizierung von extrazellulären Siderophoren	45
2.5.2	Fermentation in Submerskulturen zur Identifizierung von intrazellulären Siderophoren	46
2.5.3	Identifizierung von pilzlichen Siderophoren in der Weinrebenpflanze	46
2.5.4	Analytische, präparative HPLC, HPLC-MS, LC-MS/MS	47
3	Ergebnisse	51
3.1	Identifizierung der synthetisierten Siderophore von Esca- und Wurzelfäule-assoziierten Pilzen	51
3.1.1	Siderophore der Esca-assoziierten Pilze.....	52
3.1.2	Siderophore des Wurzelfäule-assoziierten Pilzes <i>Roesleria subterranea</i>	68
3.2	Identifizierung der Esca-assoziierten Siderophore aus Weinrebenpflanzen	71
3.3	Identifizierung der in der Siderophor-Biosynthese involvierten Genen in Esca-assoziierten Pilzen	71
3.3.1	Identifizierung der an der Siderophor-Biosynthese beteiligten Genen und Gencluster in <i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	72
3.3.2	Identifizierung der an der Siderophor-Biosynthese beteiligten Genen und Gencluster in <i>Phaeoacremonium minimum</i>	89
3.3.3	Infektionsuntersuchung der generierten Siderophor-Biosynthese-Mutanten von <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i> an Weinrebenstecklingen	101
3.4	Identifizierung der an der Siderophor-Biosynthese beteiligten Gene und Gencluster in <i>Roesleria subterranea</i>	103
4	Diskussion.....	105
4.1	Siderophor-Produktion in Esca- und Wurzelfäule-assoziierten Pilzen	106
4.1.1	Siderophore aus <i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	106
4.1.2	Siderophore aus <i>Phaeoacremonium minimum</i>	109
4.1.3	Siderophore aus <i>Fomitiporia mediterranea</i>	110
4.1.4	Siderophore aus <i>Eutypa lata</i>	111
4.1.5	Siderophore aus <i>Roesleria subterranea</i>	112
4.1.6	Detektion der von Esca-assoziierten Pilzen produzierten Siderophore in Weinreben.....	113
4.2	Siderophor-Biosyntheseweg in Esca- und Wurzelfäule-assoziierten Pilzen.....	116
4.2.1	Siderophor-Biosyntheseweg in <i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	116

4.2.2	Siderophor-Biosyntheseweg in <i>Phaeoacremonium minimum</i>	120
4.2.3	Molekulargenetische Manipulation von <i>Roesleria subterranea</i>	123
4.3	Einfluss der Siderophor-Biosynthese auf die Vitalität und Virulenz der Esca-assozierten Pilze	125
4.3.1	Die Siderophor-Biosynthese ist nicht essenziell für die Konidiogenese und Resistenz gegenüber oxidativem Stress von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i>	126
4.3.2	Kein Einfluss der Siderophor-Produktion von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i> auf Interaktionen zwischen den Esca-assozierten Pilzen	127
4.3.3	Kein Einfluss der Siderophor-Produktion von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i> auf die frühe Entwicklungsphase der Weinrebe.....	129
5	Ausblick	131
6	Literaturverzeichnis	133
7	Anhang	144
7.1	Oligonukleotid-Primer.....	144
7.1.1	Oligonukleotid-Primer zur Generierung der Geninaktivierungsvektoren.....	144
7.1.2	Oligonukleotid-Primersequenz für das Screening potenzieller Geninaktivierungs- und Komplementationsmutanten.....	146
7.1.3	Oligonukleotid-Primersequenz zur Bestätigung der Geninaktivierungsmutanten über Southern Blot Analyse.....	147
7.2	Plasmidkonstruktion für die zielgerichtete Geninaktivierung und Komplementation der zu untersuchenden Gene der Esca-assozierten Pilze.....	148
7.2.1	<i>PchOMOI</i>	148
7.2.2	<i>PchOMOII</i>	149
7.2.3	<i>PchOMOII/PchOMOI</i>	150
7.2.4	<i>PchNRPSI</i>	150
7.2.5	<i>PchNRPSII</i>	150
7.2.6	<i>PchNRPSIII</i>	151
7.2.7	<i>PchACEII</i>	152
7.2.8	<i>PchACEIII</i>	153
7.2.9	<i>PmiOMO</i>	153
7.2.10	<i>PmiNRPSI</i>	154
7.2.11	<i>PmiNRPSII</i>	155
7.2.12	<i>PmiACE</i>	155
7.3	ITS-Sequenzen	156
7.4	Identifizierung der extrazellulären Siderophore.....	157
7.4.1	Identifizierung des putativen, extrazellulären Siderophors I aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	157
7.4.2	LC-MS/MS-Analyse zur Identifizierung putativer Siderophore.....	157
7.5	Detektion der intrazellulären Siderophore.....	159
7.6	Identifizierung von Esca-assozierten Siderophore in der Weinrebenpflanze	165
7.7	Identifizierung der an der Siderophore-Biosynthese beteiligten Gene in Esca- und Wurzelfäule-assozierten Pilzen	165

7.7.1	Homologievergleich der putativen Siderophor-Biosynthese-Gene aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> UCRPC4, <i>Phaeoacremonium minimum</i> UCRPA7 und <i>Roesleria subterranea</i> IB-Rüd01-16 mit bekannten, identifizierten Genen der Siderophor-Biosynthese aus verschiedenen Organismen.....	165
7.7.2	Southern Blot Analyse der generierten Geninaktivierungsmutanten	169
7.7.3	Nachweis der Komplementation der Geninaktivierungsmutanten über Kolonie-PCR	173
7.7.4	Siderophor-Produktion der generierten Mutanten von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i>	174
7.7.5	Phänotypische Charakterisierung der „ <i>loss-of-function</i> “-Mutanten der Siderophor-Biosynthese aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i> .	179
7.7.6	Infektionsuntersuchung zu den generierten Siderophor-Biosynthese-Mutanten von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i> an Weinrebenstecklingen	185
7.8	Sequenzen zur L-Ornithin- <i>N</i> ⁵ -Monooxygenase-Gene in <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i>	186
7.8.1	<i>PchOMOI</i> (JGI <i>Pch</i> UCRPC4 Protein ID: 22) aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> ..	186
7.8.2	<i>PmiOMO</i> (JGI <i>Pmi</i> UCRPA7 Protein ID: 6736) aus <i>Phaeoacremonium minimum</i> ..	188

I. Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten hat die Prävalenz der Holzkrankheiten an der Weinrebe, den sogenannten *Grapevine trunk diseases*, im Weinanbau weltweit erheblich zugenommen. Esca ist eine der verheerendsten Krankheiten unter diesen, für die es bis heute noch keine effektiven Kontrollstrategien gibt. Um eine frühzeitige Eindämmung von Esca zu ermöglichen, ist die Gewinnung von Erkenntnissen über den Krankheitskomplex, mit dem eine Vielzahl von Symptomen und assoziierten Pilzen einhergehen, unabdingbar. Da in vielen Pathogen-Wirt-Interaktionen die Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme im Hinblick auf die Virulenz der Pathogene eine große Rolle spielt, war das Ziel dieser Arbeit die Funktion der Siderophor-Biosynthese in den Esca-assoziierten Pilzen aufzuklären. Hierbei konnte gezeigt werden, dass *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) neben dem extrazellulären Siderophor Ferrichrysin ein bis dato in der Literatur unbeschriebenes Siderophor, welches im Zuge der Arbeit isoliert und als Trihydroxyfusarinin C identifiziert werden konnte, sekretiert und Ferricrocin als intrazelluläres Siderophor produziert. Für *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*) wurden die extrazellulären Siderophore Coprogen B und Triacetylfusarinin C und das intrazelluläre Siderophor Ferricrocin detektiert. Für *Fomitiporia mediterranea* und *Eutypa lata* wurden dagegen verschiedene sekretierte Coprogen-Derivate nachgewiesen. Über *in silico* Cluster- und BLAST-Analysen konnten für *Pch* und *Pmi* putative Gene identifiziert werden, deren Involvement in der Siderophor-Biosynthese dieser Pilze über gezielte Geninaktivierungsexperimente bestätigt wurden. Die Disruption der für die putativ L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase kodierenden Gene *PchOMOI* und *PmiOMO* resultierte in beiden Pilzen in einem vollständigen Siderophor-Produktionsverlust. Für *Pch* wurde des Weiteren die Beteiligung von *PchNRPSII*, welches für eine putative nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) kodiert, und *PchACEII*, welches für eine putative Acyltransferase kodiert, an der Synthese von Trihydroxyfusarinin C vorgefunden. Darüber hinaus wurde für *Pmi* festgestellt, dass *PmiACE*, welches ebenfalls für eine putative Acyltransferase kodiert, in der Produktion von Triacetylfusarinin C involviert ist. Anhand von phänotypischen Studien mit den generierten „*loss-of-function*“-Mutanten konnte kein signifikanter Einfluss der Siderophor-Produktion bezüglich der Vitalität, der Konidiogenese und der Sensitivität gegenüber oxidativem Stress von *Pch* oder *Pmi* beobachtet werden. Weder wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten im Wachstumsverhalten unter Eisenmangelbedingungen in Bezug auf die Interaktionen zwischen den Esca-assoziierten Pilzen in Konfrontationsstudien detektiert, noch konnte ein Einfluss der Siderophor-Produktion auf

die Entwicklung von Weinreben-Einaugenstecklingen nach Inokulation mit diesen festgestellt werden.

Darüber hinaus wurde in einem kleineren Teil der Arbeit die Siderophor-Produktion von dem Pilz *Roesleria subterranea* (*Rsub*), der mit der Weinrebenkrankheit Wurzelfäule assoziiert wird, analysiert. Hierbei konnte für diesen die Produktion von verschiedenen Coprogen-Derivaten nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden anhand von *in silico* Clusteranalysen mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig sequenzierten Genom von *Rsub* ein putatives Siderophor-Cluster detektiert und Fortschritte in der Etablierung eines Transformationssystems zur zielgerichteten Mutagenese von *Rsub* erlangt.

II. Summary

In the last few decades, the prevalence of grapevine trunk diseases (GTD) in viticulture has increased considerably worldwide. Esca is one of the most devastating GTD for which there are still no effective control strategies. In order to control this disease at an early stage, it is essential to gain knowledge about the disease complex, which is associated with a wide range of symptoms and fungi. Since in many pathogen-host interactions siderophore-mediated iron metabolism plays a major role in the virulence of pathogens, the aim of this work was to elucidate the function of siderophore biosynthesis in esca-associated fungi. This work demonstrated that *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) secretes ferrichrysin and a so far undescribed siderophore for iron uptake. As a part of the presented work this siderophore was isolated and identified as trihydroxyfusarinine C. Furthermore, ferricrocin was identified as an intracellular siderophore. For *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*), the extracellular siderophores coprogen B and triacetylfusarinine C and the intracellular siderophore ferricrocin were detected. For *Fomitiporia mediterranea* and *Eutypa lata* various secreted coprogen derivatives were found. *In silico* cluster and BLAST analyses were used to identify various putative genes for *Pch* and *Pmi*. For both, the involvement of detected genes in siderophore biosynthesis could be confirmed by targeted gene inactivation experiments. The disruption of the genes *PchOMOI* and *PmiOMO* encoding putative L-ornithine- N^5 -monooxygenases resulted in a complete loss of siderophore production in both fungi. For *Pch*, the involvement of *PchNRPSII* encoding a putative NRPS and *PchACEII* encoding a putative acyltransferase was found in synthesis of trihydroxyfusarinine C. Furthermore, from gene inactivation experiments, *PmiACE* encoding a putative acyltransferase was shown to be involved in triacetylfusarinine C production in *Pmi*. Phenotypic studies with the generated loss-of-function mutants did not show a significant impact of siderophore production on the vitality, conidiogenesis or sensitivity to oxidative stress of *Pch* or *Pmi*. No difference in growth behaviour under iron deficiency conditions between wild type and mutants concerning interactions between esca-associated fungi was observed in confrontation studies. In addition, the siderophore production for the root rot-associated fungus *Roesleria subterranea* (*Rsub*) was analysed in a smaller part of this work. The production of various coprogen derivatives could be shown for this fungus. Furthermore, *in silico* cluster analyses with the genome of *Rsub*, which was sequenced for the first time in this thesis, were used to detect a putative siderophore cluster and progress was made in the establishment of a transformation system for targeted mutagenesis of *Rsub*.

III. Abkürzungsverzeichnis

(Standard-Abkürzungen sind nicht gelistet)

Abb.	Abbildung	Kb (p)	Kilobase (paare)
ACE	Acyltransferase	KF	Kulturfiltrat
AIM	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Induktionsmedium	LB	<i>Lsogeny Broth</i>
AS	Aminosäure	mAU	<i>milli absorption unit</i>
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>mediated transformation</i>	MeOH	Methanol
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>	NRPS	nichtribosomale Peptid-Synthetase
bp	Basenpaare	OD	optische Dichte
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>	orf	<i>open reading frame</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	OMO	L-Ornithin- <i>N</i> ⁵ -Monooxygenase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	<i>p.a.</i>	<i>pro analysis</i>
<i>EFAI</i>	Elongationsfaktor 1 α	<i>Pch</i>	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ESI	<i>electrospray ionization</i>	<i>Pmi</i>	<i>Phaeoacremonium minimum</i>
<i>Ela</i>	<i>Eutypa lata</i>	r	<i>reverse</i>
EtOH	Ethanol	Rif	Rifampicin
<i>Fmed</i>	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
f	<i>forward</i>	RNase	Ribonuklease
Gen	Geneticin (G418)	rpm	<i>revolutions per minute</i>
<i>GTD</i>	<i>grapevine trunk diseases</i>	<i>Rsub</i>	<i>Roesleria subterranea</i>
H ₂ O _{deion}	deionisiertes Wasser	RT	Raumtemperatur
H ₂ O _{UF}	ultrafiltriertes Wasser	SIM	<i>single ion monitoring</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	Tab.	Tabelle
HPLC-MS	<i>high performance liquid chromatography-mass spectrometry</i>	T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur
<i>HPT</i>	Hygromycin B- Phosphotransferasegen	t _E	Elongationszeit
Hyg	Hygromycin B	Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>	UV	Ultraviolettbestrahlung
Kana	Kanamycin	v/v	<i>volume per volume</i>
		VIS	<i>visible</i> (sichtbarer Spektralbereich)
		w/v	<i>weight per volume</i>
		WT	Wildtyp

Anmerkung zur Nomenklatur

Im Nachfolgenden ist die im Zuge dieser vorliegenden Arbeit verwendete Nomenklatur für Gene, Proteine und Mutanten in Beispielen aufgezeigt.

<i>PchOMOI</i>	bezeichnet das Gen, welches für die L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase I in <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (<i>Pch</i>) kodiert.
Pchomolp	bezeichnet das korrespondierende Protein zu dem Gen <i>PchOMOI</i> .
$\Delta Pchomol$	bezeichnet die Mutante von <i>Pch</i> , in der das Gen <i>PchOMOI</i> inaktiviert wurde.
$\Delta Pchomol/OMOI$	bezeichnet die Komplementationsmutante von $\Delta Pchomol$, welche durch zufällige Integration der nativen Genkopie von <i>PchOMOI</i> , einschließlich des Promotors und der Terminatorregion, generiert wurde.

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Charakteristische Symptome der chronischen (1) und apoplektischen (2) Verlaufsform der Escar-Krankheit.	6
Abbildung 2: Repräsentative chemische Strukturen der vier Hydroxamatfamilien Rhodotorulasäure (A), Coprogene (B), Fusarinine (C) und Ferrichrome (D).	15
Abbildung 3: Postulierter Biosyntheseweg der pilzlichen Hydroxamat-Siderophore.	16
Abbildung 4: Durchführung der Infektionsuntersuchung von Weinrebenstecklingen.	44
Abbildung 5: Identifizierung sekretierter Siderophore der <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> -Isolate IBWF 1315 (A) und CBS 229.95 (B).	53
Abbildung 6: Massen- und UV-Vis-Spektrum des identifizierten Siderophors Ferrichrysin aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	54
Abbildung 7: Massen- und UV-Vis-Spektrum des identifizierten Siderophors Ferricrocin aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	54
Abbildung 8: Massen- und UV-Vis-Spektrum des detektierten, putativen Siderophors I aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	55
Abbildung 9: Identifizierung des unbekanntes, sekretierten, putativen Siderophors I aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> als Trihydroxyfusarinin C.	56
Abbildung 10: Identifizierung sekretierter Siderophore der <i>Phaeoacremonium minimum</i> -Isolate IBWF 1189 (A) und CBS 100.398 (B).	57
Abbildung 11: Massen- und UV-Vis-Spektrum des identifizierten Siderophors Coprogen B aus <i>Phaeoacremonium minimum</i>	58
Abbildung 12: Massen- und UV-Vis-Spektrum des identifizierten Siderophors Triacetylfusarinin C aus <i>Phaeoacremonium minimum</i>	58

Abbildung 13: Identifizierung sekretierter Siderophore des <i>Fomitiporia mediterranea</i> Isolats <i>Fmed IBWF</i>	59
Abbildung 14: Massen- und UV-Vis-Spektrum des identifizierten Siderophors Coprogen aus <i>Fomitiporia mediterranea</i>	60
Abbildung 15: Massen- und UV-Vis-Spektrum des putativen Siderophors Dimerumsäure aus <i>Fomitiporia mediterranea</i>	61
Abbildung 16: Massen- und UV-Vis-Spektrum des putativen Siderophors Hydroxyneocoprogen I bzw. Hydroxyisoneocoprogen I aus <i>Fomitiporia mediterranea</i>	61
Abbildung 17: Massen- und UV-Vis-Spektrum des putativen Siderophors Hydroxycoprogen aus <i>Fomitiporia mediterranea</i>	61
Abbildung 18: Massen- und UV-Vis-Spektrum des putativen Siderophors Neocoprogen I bzw. Isonecoprogen I aus <i>Fomitiporia mediterranea</i>	62
Abbildung 19: Identifizierung sekretierter Siderophore aus <i>Eutypa lata</i>	63
Abbildung 20: Massen- und UV-Vis-Spektren der identifizierten Siderophore Coprogen B, Methylcoprogen B und Hydroxydimethylcoprogen B sowie des putativen Siderophors Dimethylcoprogen B aus <i>Eutypa lata</i>	65
Abbildung 21: Massen- und UV-Vis-Spektren des identifizierten Siderophors Methylcoprogen und des putativen Siderophors Hydroxymethylcoprogen aus <i>Eutypa lata</i>	67
Abbildung 22: Chemische Struktur der detektierten Coprogen-Derivate aus <i>Eutypa lata</i>	67
Abbildung 23: Identifizierung sekretierter Siderophore aus <i>Roesleria subterranea</i>	69
Abbildung 24: Massen- und UV-Vis-Spektrum des detektierten, putativen Siderophors II aus <i>Roesleria subterranea</i>	70
Abbildung 25: Putativer Siderophor-Biosyntheseweg in <i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	72
Abbildung 26: Schematische Darstellung der putativen Gencluster der Siderophor-Biosynthese in <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> (<i>Pch</i>).....	73
Abbildung 27: Vergleich der Produktion von extrazellulären Siderophoren aus $\Delta PchomoI$, $\Delta PchomoII$, $\Delta PchomoII/\Delta PchomoI$ und <i>PchWT</i>	76
Abbildung 28: Vergleich der Produktion von extrazellulären Siderophoren aus $\Delta PchaceII$, $\Delta PchaceIII$ und <i>PchWT</i>	79
Abbildung 29: Vergleich der Produktion von extrazellulären Siderophoren aus $\Delta PchnrpsII$ und <i>PchWT</i>	83
Abbildung 30: Einfluss von oxidativem Stress auf das vegetative Wachstum der Siderophor-Biosynthese-Mutanten von <i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	86
Abbildung 31: Einfluss von Eisenmangel auf das vegetative Wachstum der generierten Mutanten zur Siderophor-Biosynthese in <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> bei RT.....	87
Abbildung 32: Einfluss von Eisenmangel auf das vegetative Wachstum der generierten Mutanten zur Siderophor-Biosynthese in <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> bei 30 °C.....	88
Abbildung 33: Putativer Siderophor-Biosyntheseweg in <i>Phaeoacremonium minimum</i>	89
Abbildung 34: Schematische Darstellung der putativen Gencluster der Siderophor-Biosynthese in <i>Phaeoacremonium minimum</i> (<i>Pmi</i>).....	90
Abbildung 35: Vergleich der Produktion von extrazellulären Siderophoren aus $\Delta Pmiomo$ und <i>PmiWT</i>	92
Abbildung 36: Vergleich der Produktion von extrazellulären Siderophoren aus $\Delta Pmiace$ und <i>PmiWT</i>	94

Abbildung 37: Einfluss von oxidativem Stress auf das Wachstumsverhalten der Siderophor-Biosynthese-Mutanten von <i>Phaeoacremonium minimum</i>	98
Abbildung 38: Einfluss von Eisenmangel auf das vegetative Wachstum der generierten Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ zur Siderophor-Biosynthese in <i>Phaeoacremonium minimum</i> bei RT.	99
Abbildung 39: Einfluss von Eisenmangel auf das vegetative Wachstum der generierten Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ zur Siderophor-Biosynthese in <i>Phaeoacremonium minimum</i> bei 30 °C.	100
Abbildung 40: Infektionsuntersuchung von Weinrebenstecklingen der generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i> im Hinblick auf die Entwicklung des Blattaustriebs.	102
Abbildung 41: Infektionsuntersuchung von Weinrebenstecklingen der generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i> im Hinblick auf die Wurzelbildung.	102
Abbildung 42: Chemische Struktur von <i>cis</i> -Fusarinin (A), Fusarinin A (B), Fusarinin B (C), Fusarinin C (D, R = H), Triacetylfusarinin C (D, R = COCH ₃) und Trihydroxyfusarinin C (E).	107
Abbildung 43: Chemische Struktur von verschiedenen Siderophore der Coprogen-Familie.	111
Abbildung 44: Vorgehensweise zur Erstellung einer 3D-Ionenintensitätskarte einer Pflanze.	115
Abbildung 45: Postulierter Siderophor-Biosyntheseweg in <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	119
Abbildung 46: Postulierter Siderophor-Biosyntheseweg in <i>Phaeoacremonium minimum</i>	123
Abbildung 47: Visualisierung des molekularen Netzwerks von spektralen Similaritäten der MS/MS-Fragmentationsspektren zu verschiedenen Coprogen-Derivaten aus <i>Eutypa lata</i>	158
Abbildung 48: MS/MS-Fragmentationsspektren der detektierten Desferri-Formen der extrazellulären Siderophoren aus <i>Eutypa lata</i>	159
Abbildung 49: Detektion der intrazellulären Siderophore im Konidienextrakt aus der Kultivierung mit <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	160
Abbildung 50: Detektion der intrazellulären Siderophore im Myzelextrakt aus der Kultivierung mit <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	161
Abbildung 51: Detektion der intrazellulären Siderophore im Konidienextrakt aus der Kultivierung mit <i>Phaeoacremonium minimum</i>	162
Abbildung 52: Detektion der intrazellulären Siderophore im Myzelextrakt aus der Kultivierung mit <i>Phaeoacremonium minimum</i>	163
Abbildung 53: Detektion der intrazellulären Siderophore im Myzelextrakt aus der Kultivierung mit <i>Eutypa lata</i>	164
Abbildung 54: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta PchomoI$	169
Abbildung 55: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta PchomoII$	169
Abbildung 56: Southern Blot Analyse zur Bestätigung der homologen Rekombinationsereignisse im Genom der Doppel-Geninaktivierungsmutante $\Delta PchomoIII/\Delta PchomoI$	170
Abbildung 57: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta PchaceII$	170

Abbildung 58: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta PchaceIII$	171
Abbildung 59: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta PchnrpsII$	171
Abbildung 60: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta Pmiomo$	172
Abbildung 61: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta Pmiace$	172
Abbildung 62: Nachweis der Komplementation von $PchOMOI$ in $\Delta PchomOI/OMOI$ über PCR.	173
Abbildung 63: Nachweis der Komplementation von $PchNRPSII$ in $\Delta PchnrpsII/NRPSII$ über PCR.	173
Abbildung 64: Detektion extrazellulärer Siderophore von $PchWT$, $\Delta PchomOI$ und $\Delta PchomOI/OMOI$	175
Abbildung 65: Detektion extrazellulärer Siderophore von $PchWT$, $\Delta PchnrpsII$ und $\Delta PchnrpsII/NRPSII$	176
Abbildung 66: Detektion intrazellulärer Siderophore der zur Siderophor-Biosynthese-Analyse generierten Mutanten aus <i>Phaeomonella chlamydospora</i>	178
Abbildung 67: Detektion intrazellulärer Siderophore der zur Siderophor-Biosynthese-Analyse generierten Mutanten aus <i>Phaeoacremonium minimum</i>	179
Abbildung 68: Vergleich des vegetativen Myzelwachstums der „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von <i>Phaeomonella chlamydospora</i> und dem Wildtyp auf HMG-Festmedium.	180
Abbildung 69: Vergleich des vegetativen Myzelwachstums der „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von <i>Phaeoacremonium minimum</i> und dem Wildtyp auf HMG-Festmedium.	180
Abbildung 70: Vergleich des vegetativen Myzelwachstums der „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von <i>Phaeomonella chlamydospora</i> und dem Wildtyp unter oxidativen Stress.	181
Abbildung 71: Vergleich des vegetativen Myzelwachstums der „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von <i>Phaeoacremonium minimum</i> und dem Wildtyp unter oxidativen Stress.....	181
Abbildung 72: Vergleich der Interaktionen von $PchWT$ und $\Delta PchomOI$ zu Pmi , Ela und $Fmed$ unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen bei RT.	182
Abbildung 73: Vergleich der Interaktionen von $PchWT$ und $\Delta PchomOI$ zu Pmi , Ela und $Fmed$ unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen bei 30 °C.	183
Abbildung 74: Vergleich der Interaktionen von $PmiWT$ und $\Delta Pmiomo$ zu Pch , Ela und $Fmed$ unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen bei RT.	184
Abbildung 75: Vergleich der Interaktionen von $PmiWT$ und $\Delta Pmiomo$ zu Pch , Ela und $Fmed$ unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen bei 30 °C.	185

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antibiotika-Stammlösungen.....	21
Tabelle 2:	Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme.....	28
Tabelle 3:	Auflistung der verwendeten Reaktionskits.....	28
Tabelle 4:	Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide.....	29
Tabelle 5:	Verwendete Software und Datenbanken.....	29
Tabelle 6:	PCR-Programm für Standard PCR-Reaktionsansatz mit der DreamTaq™ Polymerase.....	33
Tabelle 7:	PCR-Programm für Standard PCR-Reaktionsansatz mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.....	33
Tabelle 8:	PCR-Programm für Standard PCR-Reaktionsansatz mit der SapphireAmp® Polymerase.....	34
Tabelle 9:	Programm für PCR-Reaktionsansatz mit der DreamTaq™ Polymerase.....	35
Tabelle 10:	Standard-Gradientenparameter der analytischen HPLC.....	48
Tabelle 11:	Gradientenparameter der analytischen HPLC zur Vorbereitung einer chromatographischen Auftrennung eines Extrakts über die präparative HPLC.....	48
Tabelle 12:	Standard-Gradientenparameter (I) der analytischen HPLC-MS.....	48
Tabelle 13:	Gradientenparameter (II) der analytischen HPLC-MS.....	49
Tabelle 14:	Gradientenparameter der präparative HPLC zur chromatographischen Auftrennung eines Rohextrakts.....	50
Tabelle 15:	Vergleich der detektierten Siderophore aus den Kulturfiltrat (KF)-Extrakten der Isolate <i>Ela IBWF 16012</i> , <i>Ela IBWF 16121</i> , <i>Ela IBWF 16122</i> und <i>Ela IBWF 16123</i>	66
Tabelle 16:	Vergleich der detektierten Siderophore aus den Kulturfiltrat (KF)-Extrakten des Isolats <i>IB-Rüd01-16</i> und den Isolaten <i>CBS 201.25</i> , <i>CBS 407.51</i> , <i>CBS 271.82</i> , <i>CBS 272.82</i> und <i>CBS 339.96</i>	70
Tabelle 17:	Homologievergleich von den putativen L-Ornithin- <i>N</i> ⁵ -Monooxygenasen aus <i>Phaeomoniella chlamydospora UCRPC4</i> mit SidAp aus <i>Aspergillus fumigatus</i> und Omo1p aus <i>Magnaporthe oryzae</i>	74
Tabelle 18:	Homologievergleich zwischen putativen Acylasen (ACE) aus <i>Phaeomoniella chlamydospora UCRPC4</i> und den ACE SidLp, SidFp und SidGp der Siderophor-Biosynthese aus dem Organismus <i>Aspergillus fumigatus</i>	77
Tabelle 19:	Vergleich der Domänenstrukturen zwischen ausgewählten, bereits identifizierten NRPS der Siderophor-Biosynthese und de putativen NRPS aus <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	81
Tabelle 20:	Myzelflächenwachstum und Konidienanzahl der Mutanten $\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ im Vergleich zum Wildtypstamm.....	85
Tabelle 21:	Myzelflächenwachstum der Mutanten $\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ im Vergleich zum Wildtypstamm unter Eisenmangel.....	87
Tabelle 22:	Myzelflächenwachstum der Mutanten $\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ im Vergleich zum Wildtypstamm unter Eisenmangel.....	88
Tabelle 23:	Homologievergleich von der putativen L-Ornithin- <i>N</i> ⁵ -Monooxygenase aus <i>Phaeoacremonium minimum UCRPA7</i> mit SidAp aus <i>Aspergillus fumigatus</i> und Omo1p aus <i>Magnaporthe oryzae</i>	91

Tabelle 24:	Homologievergleich zwischen der Aminosäuresequenz des putativen ACE-Gens aus <i>Pmi UCRPA7</i> und verschiedenen ACE-Genen <i>SIDL</i> , <i>SIDF</i> und <i>SIDG</i> der Siderophor-Biosynthese aus dem Organismus <i>Aspergillus fumigatus</i>	93
Tabelle 25:	Myzelflächenwachstum und Konidienanzahl der Mutanten $\Delta Pmiomo$, $\Delta Pmiace$ im Vergleich zum Wildtypstamm.	97
Tabelle 26:	Myzelflächenwachstum der Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ im Vergleich zum Wildtyp unter Eisenmangel.	99
Tabelle 27:	Myzelflächenwachstum der Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ im Vergleich zum Wildtypstamm unter Eisenmangel.	100
Tabelle 28:	Oligonukleotid-Primer zur Generierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geninaktivierungsvektoren.	144
Tabelle 29:	Oligonukleotid-Primer zur Generierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Komplementationsvektoren.	146
Tabelle 30:	Oligonukleotid-Primer für das Screening potenzieller Geninaktivierungsmutanten.	146
Tabelle 31:	Oligonukleotid-Primer für das Screening potenzieller Komplementationsmutanten.	147
Tabelle 32:	Oligonukleotid-Primer zur Sonden-Generierung für die Southern Blot Analyse.	147
Tabelle 33:	Auswertung der NMR-Analyse des putativen Siderophors I aus <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> CBS 229.95.	157
Tabelle 34:	Auflistung der analysierten Weinrebenproben zur Detektion von Esca-assoziierten Siderophoren.	165
Tabelle 35:	Homologievergleich zwischen putativen NRPS aus <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> UCRPC4 und verschiedenen NRPS der Siderophor-Biosynthese aus den Organismen <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cochliobolus heterostrophus</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> und <i>Ustilago maydis</i>	166
Tabelle 36:	Homologievergleich zwischen putativen NRPS aus <i>Phaeoacremonium minimum</i> UCRPA7 und verschiedenen NRPS der Siderophor-Biosynthese aus den Organismen <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cochliobolus heterostrophus</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> und <i>Ustilago maydis</i>	167
Tabelle 37:	Homologievergleich von der putativen L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase aus <i>Roesleria subterranea</i> IB-Rüd01-16 mit SidAp aus <i>Aspergillus fumigatus</i> und Omo1p aus <i>Magnaporthe oryzae</i>	168
Tabelle 38:	Homologievergleich zwischen putativen NRPS aus <i>Roesleria subterranea</i> IB-Rüd01-16 und verschiedenen NRPS der Siderophor-Biosynthese aus den Organismen <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cochliobolus heterostrophus</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> und <i>Ustilago maydis</i>	168
Tabelle 39:	Auswertung der Infektionsuntersuchung von Weinrebenstecklingen mit generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i> im Hinblick auf die Entwicklung des Blattaustriebs.	185
Tabelle 40:	Auswertung der Infektionsuntersuchung von Weinrebenstecklingen mit generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> und <i>Phaeoacremonium minimum</i> im Hinblick auf die Wurzelbildung.	186

1 Einleitung

1.1 Wirtschaftliche Bedeutung von Krankheiten an der Weinrebe

Die Weinrebe ist eine weltweit verbreitete, mehrjährige Nutzpflanze, die wirtschaftlich von großer Bedeutung ist (Michele *et al.*, 2019). Mit einer Anbaufläche von etwa 7,4 Millionen Hektar auf der ganzen Welt werden jährlich über 270 Millionen Hektoliter Wein produziert (OIV, 2018). Der wirtschaftliche Umsatz der Trauben- und Weinindustrie wird beispielsweise in den USA auf etwa 162 Milliarden US\$ (Research, 2007) und in Australien auf etwa 45 Milliarden A\$ (Gillespie und Clarke, 2019) jährlich geschätzt. Der Weinanbau ist allerdings mit erheblichen finanziellen Ausgaben verbunden, welche sich unter anderem aus Investitionen in der anfänglichen Einrichtung einer Weinbergsanlage, den fortlaufenden Pflegemaßnahmen und dem Pflanzenschutz zusammensetzen. Ein Großteil der finanziellen Kosten werden hierbei durch intensive Bekämpfungsstrategien von diversen Krankheiten an der Weinrebe hervorgerufen (Cooper *et al.*, 2012). Diese werden vor allem durch Bakterien, Viren oder Pilze ausgelöst (Armijo *et al.*, 2016). Eine Vielzahl dieser Krankheiten, welche von ökonomisch großer Bedeutung sind, werden durch Pilze und Pilz-ähnlichen (Oomyzeten) Mikroorganismen verursacht (Kassemeyer, 2017). Hierbei sind insbesondere die Rebenkrankheiten Falscher Mehltau (A), Echter Mehltau (B) und die Grauschimmelfäule (C) zu nennen, welche durch den Oomyzeten *Plasmopara viticola* (A) bzw. durch die Ascomyzeten *Erysiphe necator* (B) und *Botrytis cinerea* (C) ausgelöst werden (Armijo *et al.*, 2016). Die wirtschaftlichen Auswirkungen der drei Krankheiten zusammen werden beispielsweise in Australien auf 191 Millionen A\$ pro Jahr geschätzt (Kiss *et al.*, 2016). In den letzten drei Jahrzehnten nahm des Weiteren die Relevanz der Holzkrankheiten an Weinreben, den sogenannten *Grapevine trunk diseases* (GTD), in vielen Weinanbaugebieten weltweit zu (Fontaine *et al.*, 2016b). Unter dem Begriff GTD werden Krankheiten zusammengefasst, die mit Pilzen eng assoziiert sind, welche das Xylem im Stamm der Weinrebe kolonisieren und Symptome insbesondere im Holzgewebe, aber auch an Blättern und Beeren hervorrufen können. Die drei wichtigsten Hauptkrankheiten der GTD sind Esca, *Eutypa dieback* und *Botryosphaeria dieback* (Bertsch *et al.*, 2013). Es wird angenommen, dass die wirtschaftlichen Verluste durch *Eutypa dieback* und *Botryosphaeria dieback* sich zusammen jährlich auf 260 Millionen US\$ in Kalifornien belaufen (Siebert, 2001). Die finanziellen Ausgaben allein für den Austausch von Weinrebenpflanzen in den Weinbergsanlagen, welche aufgrund den GTD abgestorben sind, werden weltweit jährlich auf etwa 1,5 Milliarden US\$ geschätzt (Hofstetter *et al.*, 2012).

1.2 Die *Grapevine trunk diseases*

Grapevine trunk diseases (GTD) zählen zu den destruktivsten Weinrebenkrankheiten weltweit, da derzeit noch keine effektiven Kontrollstrategien vorhanden sind (Fontaine *et al.*, 2016a). Bis zu 133 verschiedene Pilzspezies sind aktuell bekannt, welche mit GTD assoziiert werden (Gramaje *et al.*, 2018). Diese umfassen verschiedene Spezies, unter anderem aus den Familien der Botryosphaeriaceae, Diatrypaceae, Togniniaceae, Hymenochaetaceae sowie aus den Gattungen der *Cylindrocarpon*, *Campylocarpon* und *Phomopsis* (Fischer und Kassemeyer, 2003; Bertsch *et al.*, 2013; Úrbez-Torres *et al.*, 2013; Andolfi *et al.*, 2011). Zu den prävalentesten Krankheiten zählt neben Esca auch *Eutypa dieback* (Bertsch *et al.*, 2013), welche in den nachfolgenden Abschnitten näher erläutert wird. Krankheiten wie *Botryosphaeria dieback*, welche durch Spezies, unter anderem wie *Diplodia seriata*, *D. mutila* oder *Neofusicoccum parvum*, ausgelöst werden, *Phomopsis dieback*, die primär durch *Phomopsis viticola* hervorgerufen wird, oder *Black foot disease*, welche hauptsächlich mit den Pathogenen *Ilyonectria destructans*, *Cylindrocarpon macrodidymum*, *Campylocarpon fasciculare* und *Campylocarpon pseudofasciculare* assoziiert werden, sind allerdings hierbei auch zu nennen (Úrbez-Torres *et al.*, 2013; Gramaje *et al.*, 2018). Der Begriff GTD wurde global durch Dr. Luigi Chiarappa 1990 in der Wissenschaft etabliert. Erste Aufzeichnungen von GTD-Symptomen gehen allerdings bereits auf das 19. Jahrhundert zurück (Gramaje *et al.*, 2018).

Es wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass die GTD-assoziierten Pilze mit ihren Sporen die Weinrebe über offene Wunden, welche bereits bei Stecklingen in Rebschulen oder während des Rückschnitts an der Weinrebe in der Weinbergsanlage verursacht wurden, infizieren und das Xylem kolonisieren (Gramaje *et al.*, 2018; Bertsch *et al.*, 2013). Diese Phytopathogene können dabei verschiedene äußere und innere Symptome sowohl an jüngeren Weinstöcken (< 5 Jahre) als auch an älteren (> 5 Jahre) hervorrufen. Als äußere Symptome der Weinrebe wurden zum Beispiel verkümmertes Wachstum, verminderte Vitalität, verkürzte Internodien, Chlorosen und Nekrosen an Blättern, Fruchtfäule und das Absterben der gesamten Pflanze beobachtet. Innere Symptome umfassen vor allem Verfärbungen und Nekrosen im Holzgewebe (Mugnai *et al.*, 1999; Bertsch *et al.*, 2013; Pintos *et al.*, 2018). Daraus können geringere Ernteerträge, eine Reduktion der einhergehenden Weinqualität und eine verkürzte Gesamtnutzungsdauer der Weinbergsanlage resultieren (Guérin-Dubrana *et al.*, 2019).

Die Eindämmung der GTD wird aufgrund der Tatsache erschwert, dass auch mehrere dieser Krankheiten simultan an einer Weinrebe beobachtet werden können. Da es teilweise

symptomatische Überschneidungen zwischen den einzelnen *GTD* im Erscheinungsbild gibt und die Symptomausprägung der jeweiligen Krankheit zudem von Jahr zu Jahr aufgrund von abiotischen und biotischen Faktoren erheblich variieren kann, ist das Monitoring der jeweiligen *GTD* im Feld schwierig durchzuführen (Mugnai *et al.*, 1999; Bertsch *et al.*, 2013; Gramaje *et al.*, 2018). Des Weiteren zeichnen sich viele dieser Krankheiten, wie beispielsweise Esca, durch eine lange Latenzzeit von oft mehreren Jahren zwischen der Kolonisierung des Holzes durch die mit der Krankheit-assoziierten Pilze bis hin zu sichtbaren Blattsymptomen aus (Calzarano *et al.*, 2018). Es konnten sowohl in symptomatischen als auch in asymptomatischen Weinreben *GTD*-assoziierte Phytopathogene nachgewiesen werden (Hofstetter *et al.*, 2012; Bruez *et al.*, 2014), was eine präzise, schnelle Früherkennung der Krankheit zusätzlich erschwert. Es gibt derzeit keine resistente Weinrebensorte gegenüber *GTD* (Fontaine *et al.*, 2016a). Lediglich wurden über unterschiedliche Suszeptibilitäten von verschiedenen Weinrebensorten gegenüber Esca berichtet (Murolo und Romanazzi, 2014). Seit dem Verbot von Fungiziden mit Natriumarsenit, Methylbromid, Carbendazim und Benomyl aufgrund der schlechten Umweltverträglichkeit und der gesundheitsschädlichen Wirkung für den Menschen in einigen Ländern sind die am meist chemisch, effektiv-wirksamsten Produkte gegenüber *GTD*-assoziierten Pilze nicht mehr verfügbar (Gramaje *et al.*, 2018). Die aktuellen Kontrollstrategien beruhen hauptsächlich auf Präventivmaßnahmen, wie die Verwendung von gesundem Pflanzgut und dem Verhindern einer Infektion durch Schnittwunden an der Weinrebe (Bertsch *et al.*, 2013). Darüber hinaus wird über chemische Eindämmungsmaßnahmen diskutiert, wie beispielweise eine zielgerichtete Applikation von Fungiziden. Hierbei werden diese über Injektoren in den Stamm eingebracht oder als Pasten bzw. flüssige Formulierungen auf offenen Schnittwunden der Weinrebe appliziert. Die Applikation von Fungizid-beinhalteten Pasten bietet dabei sowohl einen chemischen als auch einen physikalischen Schutz, der das Eindringen des Pathogens in die Pflanze verhindern soll. Auch wurden sogenannte *Biological control agents* (*BCA*), unter anderem mit *Trichoderma*-Spezies, *Fusarium*-Spezies oder *Bacillus subtilis*, als Wundschutzmaßnahme untersucht, wobei Pilze der Gattung *Trichoderma* als das geeignetste *BCA* eingestuft worden sind. Des Weiteren wird empfohlen, infizierte Weinreben oder -abschnitte zu identifizieren, zu markieren und in der Folge das kontaminierte Holz oder auch die gesamte abgestorbene Pflanze in der anschließenden Wintersaison zu entfernen. (Bertsch *et al.*, 2013; Gramaje *et al.*, 2018; Mondello *et al.*, 2018)

Die bisher bekannten Kontrollstrategien sind allerdings arbeits- und kostenintensiv und nur eingeschränkt effektiv wirksam. Zudem sind derzeit keine kurativen Eindämmungsmaßnahmen auf dem Markt verfügbar (Gramaje *et al.*, 2018), weshalb weitere Forschung in diesen

Bereichen essenziell ist. Lediglich eine erste Studie, in der eine *Nanocarrier*-vermittelte Wirkstoff-Applikation eingesetzt worden ist, wurde als potenzielle kurative Behandlung gegenüber *GTD* diskutiert. Hierbei wurde mit Lignin-*Nanocarrier* umhülltes Pyraclostrobin über Stamminjektoren in die Weinrebe eingebracht, welches aufgrund von Ligninabbauenden Enzymen der Esca-assoziierten Pilze *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) und *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*) innerhalb der Pflanze freigesetzt und gegenüber diesen Pilzen wirksam werden soll. In Feldstudien mit einem Projektzeitrahmen von 5 Jahren konnten geringere Symptomausprägungen der Esca-Krankheit nach Injizieren des Wirkstoffs in den Stamm der Weinrebe beobachtet werden (Fischer *et al.*, 2019).

1.2.1 Esca

Esca ist neben *Eutypa dieback* und *Bortyosphaeria dieback* eine der verheerendsten *GTD* weltweit (Fontaine *et al.*, 2016a). In zahlreichen Ländern, wie den USA, Australien, Frankreich, Südafrika, Italien, Portugal, Spanien, Griechenland oder Neuseeland, wurde von dieser Krankheit berichtet. Seit etwa 30 Jahren ist diese auch zunehmend in Deutschland präsent (Murolo und Romanazzi, 2014; Fischer und Kassemeyer, 2003). Erste Hinweise von Esca-ähnlichen Symptomen gehen allerdings bereits auf altgriechische und lateinische Schriften aus der Antike zurück (Mugnai *et al.*, 1999). Die Rebenkrankheit Esca wird im Allgemeinen als Krankheitskomplex beschrieben, welcher eine Vielfalt von Syndromen an Holz- und Blattgewebe der Weinrebe umfasst (Mugnai *et al.*, 1999; Bertsch *et al.*, 2013). Aufgrund dessen wird diese häufig auch „Esca-Komplex“ genannt (Surico, 2009). Je nach Lebensalter der symptomatischen Weinrebe und unter Berücksichtigung der verschiedenen Pathogene wird nach neueren Deklarationen vor allem zwischen fünf verschiedenen Syndromen unterschieden: *Dark/brown wood streaking*, *Petri disease*, *Grapevine leaf stripe disease (GLSD)*, *Esca proper* und *White rot* (Weißfäule) (Surico, 2009; Mondello *et al.*, 2018). *Dark/brown wood streaking* und *Petri disease* werden häufig mit jüngeren Weinreben in einem Alter von 1 bis 7 Jahren assoziiert, wohingegen die Weißfäule und *Esca proper* überwiegend älteren Weinreben mit einem Alter ab 8 Jahren zuzuordnen sind (Mugnai *et al.*, 1999; Surico, 2009). *GLSD*, auch bekannt als *Young esca*, kann dagegen sowohl an jüngeren als auch an älteren Weinreben beobachtet werden (Bertsch *et al.*, 2013; Mondello *et al.*, 2018).

Mit dem Syndrom ***Dark/brown wood streaking*** werden ausschließlich innere Symptome der Weinrebe zusammengefasst, welche als schwarz-bräunliche, streifenähnliche, vaskuläre Verfärbungen, die häufig bewurzelte Stecklinge betreffen, festzustellen sind. Im Querschnitt

des Stecklings können schwarze Flecken beobachtet werden, die zumeist aus gummiartigem Exsudat bestehen (Mugnai *et al.*, 1999; Surico *et al.*, 2008; Surico, 2009).

Die **Petri disease**, ursprünglich *Black goo decline* oder *Young vine decline* genannt, wird mit einem verkümmerten Wachstum und Absterben von jungen Weinreben assoziiert, was mit einem Verlust von bis zu 50 % der Weinreben in neu angelegten Weinbergen einhergehen kann (Pascoe und Cottral, 2000; Mugnai *et al.*, 1999). Des Weiteren werden schwach ausgeprägte, interveniale Chlorosen der Blätter, verkürzte Internodien und dunkelbraune Verfärbungen der Xylemgefäße des Stammes beobachtet. Die Xylemgefäße können dabei durch Akkumulation von Polysacchariden und phenolischen Substanzen vollständig blockiert sein, was zu einer unzureichenden Wasser- und Nährstoffversorgung der Pflanze führen kann. Dies wird auch als *Gummosis* bezeichnet (Mugnai *et al.*, 1999; Mostert *et al.*, 2006; Surico *et al.*, 2008; Bertsch *et al.*, 2013).

Mit **GLSD** werden hauptsächlich externe Symptome des Blattgewebes der Weinrebe zusammengefasst, welche anfänglich durch Chlorosen entlang der Hauptader des Blattes und teilweise an den Blatträndern gekennzeichnet sind. Im weiteren Verlauf vergrößern sich die chlorotischen Gewebe vom basalen Bereich ausgehend bis hin zum distalen, bis diese sich zu dem charakteristischen „Tigerstreifen“-ähnlichen Muster entwickeln (Abb. 1, 1A), welches von zusätzlichen Nekrosen begleitet ist (Mugnai *et al.*, 1999; Calzarano *et al.*, 2017). Zusammen mit den Blattsymptomen können auch weitere Symptome an den Trauben beobachtet werden. Diese äußern sich in dunkelviolettschwarzen Flecken, sogenannte *Black measles*, welche auf der gesamten Traubenoberfläche verteilt sind. Des Weiteren kann das Vertrocknen des vollständigen Traubenbündels vorgefunden werden (Abb. 1, 1B) (Mugnai *et al.*, 1999; Goufo *et al.*, 2019). Die Symptome der **GLSD** können auch zeitgleich zusammen mit denen der Weißfäule an älteren Weinreben beobachtet werden. Beide Syndrome werden dabei als **Esca proper** zusammengefasst (Surico, 2009; Mondello *et al.*, 2018).

Das mit älteren Weinreben assoziierte Syndrom **Weißfäule** umfasst innere Symptome des Esca-Komplexes. Hierbei wird eine Fäulnis des Holzgewebes beobachtet, welche sich zumeist von einer großen Schnittwunde ausgehend im Stamm der Weinrebe sowohl akro- als auch basipetal entlang dessen ausbreitet. Bisher wurde diese noch nie im Wurzelbereich und auch nur selten unterhalb des Propfverbandes beobachtet. Die Weißfäule ist durch einen Zerfallsprozess des Holzgewebes gekennzeichnet, in welchem das harte Gewebe sich schrittweise in eine schwammartige, zerbrechliche Konsistenz entwickelt und eine gelbweißliche Verfärbung annimmt. Häufig ist im Querschnitt (Abb. 1, 2B) zusätzlich eine

schwarz-bräunliche Umrandung des verrotteten Gewebes zu beobachten, welche das nicht zerfallene Gewebe begrenzt (Mugnai *et al.*, 1999; Surico *et al.*, 2008).

Häufig wird der Esca-Komplex in zwei Krankheitsverlaufsformen unterteilt (Abb. 1). Hierbei wird zwischen einer milden, chronischen Verlaufsform (Abb. 1, 1), wobei das charakteristische „Tigerstreifen“-ähnliche Muster der Weinrebenblätter der zuvor beschriebenen *GLSD* (Abb. 1, 1A) über mehrere Jahre hinweg zu beobachten ist, und einer akuten, schwerwiegenden Verlaufsform (Abb. 1, 2), welche auch als Apoplexie bezeichnet wird, unterschieden. Bei dem apoplektischen Krankheitsverlauf wird eine „plötzliche“, vollständige Blattwelke der Weinrebe vorgefunden, die von dem Absterben der gesamten Pflanze innerhalb von sehr kurzer Zeit begleitet wird (Abb. 1, 2A). Häufig sind die Weintrauben hierbei vollständig vertrocknet. Die Apoplexie wird überwiegend bei älteren Weinreben beobachtet, von denen eine sehr intensive Fäulnis im Stamm bereits festgestellt werden konnte (Abb. 1, 2B) (Mugnai *et al.*, 1999; Surico *et al.*, 2008; Goufo *et al.*, 2019).

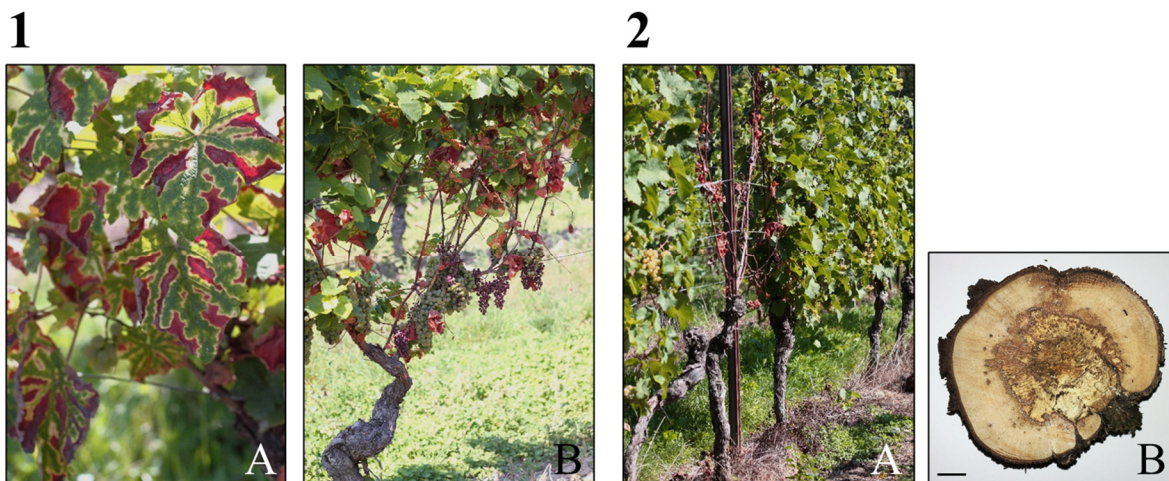


Abbildung 1: Charakteristische Symptome der chronischen (1) und apoplektischen (2) Verlaufsform der Esca-Krankheit. Während der chronischen Verlaufsform können *GLSD*-Symptome, wie Chlorosen und Nekrosen mit Tigerstreifen-ähnlichem Muster an Blättern (1A) und teilweise vertrocknete Traubenbündel (1B), beobachtet werden. Der apoplektische Krankheitsverlauf äußert sich durch eine „plötzliche“ Blattwelke, begleitet vom Absterben der gesamten Weinrebenpflanze innerhalb weniger Tage (2A). Im Querschnitt des Stammes kann eine intensive Fäulnis (2B) festgestellt werden (Maßstabsbalken: 1,5 cm).

Die Symptomausprägungen variieren allerdings von Jahr zu Jahr (Bertsch *et al.*, 2013), weshalb angenommen wird, dass die Krankheitsentwicklung abhängig von Wirt-Pathogen-Umwelt-Interaktionen ist (Fischer und Peighami Ashnaei, 2019). Faktoren wie Pflanzenalter, -sorte und klimatische Bedingungen können dabei auch einen Einfluss haben (Fontaine *et al.*, 2016a; Kraus *et al.*, 2019a, 2019b). Des Weiteren wird hypothetisiert, dass die Symptome der Weinrebe durch Toxine hervorgerufen werden, welche von den Esca-assoziierten Pilzen im Holzgewebe produziert und durch den Transpirationsstrom in die Blätter

transportiert werden (Mugnai *et al.*, 1999; Andolfi *et al.*, 2011). Eine weitere Hypothese ist, dass die Symptome aufgrund einer Dysfunktion des Wassertransportsystems der Pflanz entstehen, welche unter anderem auf einen Verschluss der Xylemgefäße durch die Pathogene selbst und/oder durch gebildete Tylosen und Gele der Pflanze zurückzuführen ist (Bortolami *et al.*, 2019). Die Symptome konnten allerdings bisher noch nicht in Gänze reproduziert und die Koch'sche-Postulate für diese vervollständigt werden (Calzarano *et al.*, 2017; Guérin-Dubrana *et al.*, 2019).

Sowohl *Dark/brown wood streaking*, *Petri disease* als auch *GLSD* werden vor allem mit den tracheomykotischen Ascomyzeten *Pch* und *Pmi* assoziiert (Mugnai *et al.*, 1999; Surico, 2009). Pilze wie *Pleurostoma richardisae* oder *Cadosphora* sp. wurden vereinzelt auch mit *Petri disease* in Verbindung gebracht (Gramaje *et al.*, 2018). Der Basidiomyzet *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) wird hingegen hauptsächlich als Verursacher der Weißfäule in Europa angesehen. Außerhalb von Europa wurden auch *Fomitiporia*-Arten wie *F. australiensis* in Australien oder *F. polymorpha* in Nordamerika aus Weinreben, von denen die Symptomatik der Weißfäule festgestellt wurde, isoliert (Fischer, 2006). Aufgrund der Betrachtung der Symptome von *GLSD* und Weißfäule wird *Esca proper* sowohl mit *Fmed* als auch mit den zuvor genannten Ascomyzeten eng assoziiert (Mugnai *et al.*, 1999; Surico, 2009). Da aus *Esca*-symptomatischen Weinreben auch Spezies wie *Ela*, *Phomopsis vitivola*, *Botryosphaeria obtusa* und *Cylindrocarpon destructans* isoliert werden konnten, wird des Weiteren davon ausgegangen, dass die mit diesen Pilzen assoziierten Krankheiten simultan oder auch sukzessive gegenüber *Esca* vorkommen können (Fischer und Kassemeyer, 2003; Péros *et al.*, 2008; Bruez *et al.*, 2014). Vereinzelt ist Berichten zu entnehmen, dass *Ela* neben *Pch*, *Pmi* und *Fmed* auch direkt mit *Esca* assoziiert wird (Larignon und Dubos, 1997; Armengol *et al.*, 2001).

1.2.1.1 *Phaeomoniella chlamydospora*

Phaeomoniella chlamydospora (*Pch*) (W. Gams, P. Crous, M. J. Wingf., and L. Mugnai) (Crous und Gams, 2000), ursprünglich auch als *Phaeacremonium chlamydospora* bezeichnet (Crous *et al.*, 1996), ist neben *Pmi* und *Fmed* einer von den am häufigsten in der Literatur zitierten Pilze, die mit *Esca* eng assoziiert werden (Mugnai *et al.*, 1999; Goufo *et al.*, 2019). Er ist ein haploider Ascomyzet, welcher zur Ordnung der Chaetothyriales und zur Familie der Herpotrichiellaceae gezählt wird (Crous und Gams, 2000; Bertsch *et al.*, 2013). Das Genom wurde 2014 von dem Isolat *RR-HGI* durch Antonielli *et al.* und 2015 von dem Isolat *UCRPC4*

von Morales-Cruz *et al.* sequenziert und veröffentlicht (Antonielli *et al.*, 2014; Morales-Cruz *et al.*, 2015). In phänotypischen Studien konnte ein Temperaturwachstumsbereich zwischen 10 °C bis 35 °C und ein Temperaturoptimum von 25 °C für *Pch* beobachtet werden (Dupont *et al.*, 1998; Whiting *et al.*, 2001; Tello *et al.*, 2010). Das Myzel enthält septierte Hyphen und ist überwiegend dunkelgrün pigmentiert (Crous und Gams, 2000). *Pch* zählt zu den Deuteromyzeten, da von diesem bisher keine sexuellen Fruchtkörper vorgefunden wurden (Crous und Gams, 2000; Borie *et al.*, 2002; Eskalen und Gubler, 2001). Die Annahme, dass die Reproduktion vorwiegend asexual verläuft, wird des Weiteren durch Studien zur genetischen Diversität gestützt, in welchen eine hohe genetische Homogenität zwischen verschiedenen *Pch*-Isolaten aus unterschiedlichen Ländern zueinander beschrieben wurde (Borie *et al.*, 2002; Cobos und Martin, 2008; Comont *et al.*, 2010). Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass *Pch* Konidien sowohl über Konidiophoren als auch über Pyknidien produzieren kann, die primär über die Luft innerhalb des Weinbergs verbreitet werden (Crous und Gams, 2000; Borie *et al.*, 2002; Eskalen und Gubler, 2001). Arthropoden sowie die Rebscheren, mit welchen der Rückschnitt der Weinrebe durchgeführt wird, können dabei zusätzlich Konidien übertragen (Moyo *et al.*, 2014; Agustí-Brisach *et al.*, 2015). *Pch* infiziert mit den Konidien vor allem über offene Wunden die Weinrebe und kolonisiert darüber das vaskuläre Gewebe im Stamm (Mugnai *et al.*, 1999; Serra *et al.*, 2008). Als mögliche ursprüngliche Inokulationsquelle des *Pch* wird bereits infiziertes Pflanzgut, welches in den Weinberg eingebracht wurde, angesehen (Mugnai *et al.*, 1999).

Es konnten verschiedene Sekundärmetabolite aus der axenischen Kulturvierung mit *Pch*, wie beispielweise 4-Hydroxybenzaldehyd, 4-Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyloxy)-benzoesäure, Isoscleron, Scytalon, Pullulan oder Tyrosol, identifiziert werden (Tabacchi *et al.*, 2000; Sparapano *et al.*, 2000). Von den Naphthalinon-Pentaketiden Scytalon und Isoscleron und von dem Exopolysaccharid Pullulan, welches aus Maltotrioseeinheiten besteht, konnte bereits eine phytotoxische Aktivität in Blattscheiben- und Kalluskulturentests nachgewiesen werden (Sparapano *et al.*, 2000; Abou-Mansour *et al.*, 2004; Bruno *et al.*, 2007; Cimmino *et al.*, 2016). Des Weiteren konnte für *Pch* festgestellt werden, dass dieser zwar fähig ist Pektin zu metabolisieren, jedoch lignifizierte, sekundäre Zellwände nur geringfügig abbauen kann (Marchi *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006; Valtaud *et al.*, 2009).

1.2.1.2 *Phaeoacremonium minimum*

Phaeoacremonium aleophilum (W. Gams, Crous, M. J. Wingf. & Mugnai) (Crous *et al.*, 1996), welcher in den letzten Jahren zu *Phaeoacremonium minimum* ((Tul. & C. Tul.) D. Gramaje,

L. Mostert & Crous, com. nov.) (*Pmi*) umbenannt wurde (Gramaje *et al.*, 2015), zählt zusammen mit *Pch* zu den Hyphomyceten und ist neben diesem und *Fmed* einer der prävalentesten Pilze, welche als Hauptursache für die Entstehung von Esca angesehen werden (Mugnai *et al.*, 1999; Mostert *et al.*, 2006; Bertsch *et al.*, 2013). Er wird zur Ordnung der Diaporthales gezählt und ist der Familie der Togniniaceae zuzuordnen (Gramaje *et al.*, 2015). Das Genom des Isolats *UCRPA7* wurde sequenziert und ist seit 2013 veröffentlicht (Blanco-Ulate *et al.*, 2013b). Derzeit wurden 46 verschiedene Spezies des Genus *Phaeoacremonium* beschrieben, von diesen 28 ausschließlich aus der Weinrebenpflanze isoliert worden sind (Kazemzadeh Chakusary *et al.*, 2017). Hierunter zählen beispielsweise *P. parasiticum*, *P. inflatipes*, *P. viticola* oder *P. nordesticola*, welche in Esca-symptomatischen Weinreben identifiziert werden konnten (Mugnai *et al.*, 1999; Aroca und Raposo, 2009; da Silva *et al.*, 2017). Das Wirtsspektrum von *Pmi* ist nicht nur auf die Weinrebe begrenzt. Dieser wurde auch aus Oliven-, Datteln-, Pfirsich-, Apfel- und Birnenbäumen isoliert (Gramaje *et al.*, 2015). In phänotypischen Studien wurde für *Pmi* ein Temperaturbereich des vegetativen Wachstums zwischen 10 °C und 35 °C beobachtet. Das Wachstumsoptimum lag dabei bei 25 °C (Whiting *et al.*, 2001). Das Myzel ist zumeist bräunlich, beige pigmentiert (Gramaje *et al.*, 2015). *In vitro* konnte des Weiteren *Togninia minima* ((Tul. & Tul.) Berl.) als dessen Teleomorphe bestätigt werden, welche sich heterothallisch reproduziert (Mostert *et al.*, 2003; Rooney-Latham *et al.*, 2005a). Diese wurde zusammen mit der anamorphen Form auf derselben Weinrebenpflanze beobachtet. Hierbei konnten Perithezien als Überwinterungsstrukturen auf gespaltetem Xylemgewebe älterer Schnittwunden und in Vertiefungen entlang des Stammes, des Kordons und der Ausläufer festgestellt werden (Rooney-Latham *et al.*, 2005b; Gramaje *et al.*, 2015). Weiterhin wird davon ausgegangen, dass sowohl Konidien, welche *Pmi* in Konidiophoren produziert, als auch Ascosporen aus Perithezien im Frühjahr über Wind, Wasser oder Insekten im Weinberg verbreitet werden und dabei die Weinrebe primär über Rückschnittwunden infizieren. Über diese dringt der Pilz ins vaskuläre System der Pflanze ein und kann dort Nekrosen hervorrufen (Mostert *et al.*, 2006; Moyo *et al.*, 2014; Gramaje *et al.*, 2015). In Pathogenitätsstudien konnten Symptome wie *Brown wood streaking*, reduziertes Wachstum und Chlorosen an Blättern nach Inokulation der Weinrebenpflanze mit *Pmi* und *Pch* demonstriert werden (Sparapano *et al.*, 2001b; Adalat *et al.*, 2000). Aus axenischer Kultivierung mit *Pmi* wurden unter anderem die gleichen phytotoxischen Substanzen, welche *in vitro* mit *Pch* nachgewiesen worden sind, identifiziert: das Exopolysaccharid Pullulan und die zwei Naphthalinon-Pentaketide Scytalon und Isoscleron (Sparapano *et al.*, 2000). Des Weiteren konnten *in vitro* für *Pmi* die Produktion von

verschiedenen extrazellulären Enzymen, wie Protease, Lipase, Amylase, Cellulase, Xylanase, Pektinase und Urease, bestätigt werden (Santos *et al.*, 2006). Auch wurde die Produktion von exo- und endo- β -1,4-Glukanasen und β -Glukosidasen nachgewiesen (Valtaud *et al.*, 2009).

1.2.1.3 *Fomitiporia mediterranea*

Der Basidiomycet *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) (M. Fisch.) ist neben *Pch* und *Pmi* einer von den in der Literatur zumeist zitierten Pilze, welche mit dem Esca-Komplex assoziiert werden, und gilt als Auslöser von der Weißfäule an der Weinrebe in Europa, insbesondere in Deutschland (Mugnai *et al.*, 1999; Fischer, 2002; Fischer, 2006; Goufo *et al.*, 2019). Er zählt zur Ordnung der Hymenochaetales und wird der Familie Hymenochaetaceae zugeordnet. Lange Zeit wurde dieser fälschlicherweise als *F. punctata* identifiziert, bis 2002 in Arbeiten von M. Fischer molekulargenetische Unterschiede aufgezeigt wurden, mit welchen *F. punctata* als eng verwandt zu *Fmed* neu eingestuft worden ist (Fischer, 2002). Das Genom von *Fmed* wurde 2012 sequenziert und veröffentlicht (Floudas *et al.*, 2012). Neben der Weinrebe ist *Fmed* auch in der Lage unter anderem Oliven-, Zitrusbäume, Haselnusssträucher sowie Kiwipflanzen zu kolonisieren und in diesen eine Holzfäulnis auszulösen (Elena *et al.*, 2006; Fischer, 2006; Markakis *et al.*, 2019). *In vitro* wurde für *Fmed* ein Temperaturbereich des vegetativen Wachstums zwischen 15 °C und 35 °C beobachtet. Das Wachstumsoptimum liegt bei 30 °C (Fischer, 2002; Surico *et al.*, 2008). Für das Myzel wurde eine „flaumige“, weiche Konsistenz von Lufthyphen, welche gelb bis bräunlich pigmentiert sind, beobachtet (Fischer, 2006; Surico *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte für die Reproduktion von *Fmed* ein homothallischer Verlauf festgestellt werden (Fischer, 2002). Es wird davon ausgegangen, dass dieser Pilz sich mit Basidiosporen über die Luft im Weinberg verbreitet, die Weinrebe hauptsächlich über Schnittwunden infiziert und letztlich im Stamm die sogenannte Weißfäule auslösen kann (Fischer, 2002; Fischer, 2019). Die Basidiosporen werden in resupinierten Fruchtkörpern produziert, die auf abgestorbenen Stämmen der Weinrebe beobachten werden können (Fischer und Kassemeyer, 2003). Aus der axenischen Kultivierung mit *F. punctata* konnten bereits die Sekundärmetabolite 4-Hydroxybenzaldehyd, Dihydroactinolid und 6-Formyl-2,2-methyl-4-chromanon isoliert werden, deren Produktion aufgrund der engen Verwandtschaft zu *Fmed* auch für diesen vermutet werden (Tabacchi *et al.*, 2000; Andolfi *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass *Fmed* extrazelluläre Liginin- und Tanninabbauende Enzyme, wie Peroxidase, Tannasen, Laccasen, produzieren und sekretieren kann (Bruno und Sparapano, 2006; Abou-Mansour *et al.*, 2009).

1.2.2 *Eutypa dieback*

Eutypa dieback, auch bekannt als Eutypiose oder *Dying arm disease*, zählt zu den wichtigsten *GTD* weltweit (Amborabé *et al.*, 2005; Fontaine *et al.*, 2016a). Die Krankheit wird hauptsächlich durch den Ascomyzeten *Eutypa lata* (*Ela*) Pers. Fr. Tul & C. Tul. (ursprünglich als *E. armeniaca* Hansf. & Carter bezeichnet, anamorph: *Libertella blepharis* A.L. Smith) hervorgerufen, der zur Familie der Diatrypaceae zugeordnet wird (Munkvold *et al.*, 1994; Trouillas *et al.*, 2010). Weitere Diatrypaceae-Spezies, wie *Diatrype stigma*, *Diatrype whitmanensis*, *Cryptosphaeria pullmanensis* und *Cryptovalsa ampelina*, wurden auch aus Weinrebenpflanzen isoliert, an denen *Eutypa dieback*-Symptome beobachtet werden konnten (Bertsch *et al.*, 2013). Da *Ela* ein breites Wirtsspektrum besitzt, konnte dieser nicht nur aus der Weinrebe, sondern auch aus über 80 verschiedenen Pflanzenarten, wie beispielsweise aus Äpfel-, Birnen- und Zitronenbäumen, isoliert werden (Chapuis *et al.*, 1998). Das optimale vegetative Wachstum wurde vor allem bei Temperaturen zwischen 20 °C und 25 °C unter Laborbedingungen beobachtet (Amborabé *et al.*, 2005). Auf Grundlage des Isolats *UCR-EL1* wurde das Genom von *Ela* sequenziert und liegt seit 2013 veröffentlicht vor (Blanco-Ulate *et al.*, 2013a). Des Öfteren wurde *Ela* auch mit Esca eng assoziiert, da dieser aus Holzläsionsbereichen der Weinrebenpflanze zusammen mit den Esca-assoziierten Pilzen *Pmi* und *Pch* isoliert werden konnte (Armengol *et al.*, 2001; Larignon und Dubos, 1997).

Es wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass *Ela* mit Ascosporen die Weinrebe primär über Schnittwunden infiziert, durch die er in das vaskuläre System des Stammes und der Triebe eindringt. Es konnten Perithezien sowie Ascosporen auf älterem Weinrebenholz vorgefunden werden (Chapuis *et al.*, 1998). Erst nach 3 bis 4 Jahren der Kolonisierung des Pilzes werden Symptome, wie vor allem marginale Blattnekrosen und verkümmerte oder abgestorbene Triebe, beobachtet. Weiterhin können braune, keilförmige Nekrosen im Stamm und letztlich das Absterben der gesamten Pflanze festgestellt werden (Munkvold *et al.*, 1994; Molyneux *et al.*, 2002; Amborabé *et al.*, 2005; Bertsch *et al.*, 2013). *Ela* produziert verschiedene Enzyme wie Xylanasen, Cellulasen, β -Glukanasen, Chitinasen, Proteasen, Oxidasen, Glukosidasen und Stärke-abbauende Enzyme, welche bei dem Zerfall des Holzes in der Weinrebe involviert sein sollen (Schmidt *et al.*, 1999; Rolshausen *et al.*, 2008). Weiterhin wird hypothetisiert, dass die Symptome an den Blättern durch phytotoxische Sekundärmetabolite ausgelöst werden, welche von *Ela* produziert und über das Xylem zu den Blattgeweben transportiert werden (Octave *et al.*, 2008). Es konnten bereits verschiedene Sekundärmetabolite, vor allem acetylierte und heterozyklische Verbindungen, aus der axenischen Kultivierung mit *Ela* isoliert und identifiziert werden (Andolfi *et al.*, 2011;

Masi *et al.*, 2018). Unter anderem wurden die Sekundärmetabolite wie Eutypin, Eutypinol, Eulatinol Eulatachromen, 2-isopropenyl-5-formylbenzofuran und Siccayn vorgefunden. Für Eulatachromen, Eulatinol, Eutypin und 2-Isopropenyl-5-formylbenzofuran wurde in Blattscheibentests bereits eine Phytotoxizität beobachtet (Renaud *et al.*, 1989; Tey-Rulh *et al.*, 1991; Molyneux *et al.*, 2002; Mahoney *et al.*, 2003). Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Eutypin über passive Diffusion in die pflanzliche Zelle gelangen kann, in der es enzymatisch zu Eutypinol reduziert wird und dadurch die phytotoxische Wirkung verliert (Amborabé *et al.*, 2001; Clorat *et al.*, 1999).

1.3 Die Wurzelfäule der Weinrebe

In den letzten Jahren nahm neben den *GTD* auch die Bedeutung von Krankheiten an der Weinrebe zu, welche durch bodenbürtige Phytopathogene hervorgerufen werden. Erkrankungen an den Wurzeln der Pflanze, die wie beispielsweise durch die Wurzelfäule ausgelöst werden, können zu einem erhöhten Absterben der gesamten Pflanze führen, was sich in Ernteverlusten und in einhergehenden, erhöhten finanziellen Kosten für Neuanpflanzungen im Weinberg äußert (Gubler *et al.*, 2004; Abou-Elaid *et al.*, 2014; Mundy, 2015). Da die Infektionsstelle der bodenbürtigen Phytopathogenen sich unterhalb der Erde an der Weinrebe befindet und die assoziierten, oberirdischen Symptome häufig erst zu detektieren sind, sobald schwerwiegende Verletzungen sichtbar sind oder sogar das Absterben der gesamten Pflanze vorzufinden ist, wird eine Früherkennung von solchen Krankheiten im Weinberg deutlich erschwert (Mundy, 2015). Die Wurzelfäule kann hierbei durch verschiedene Pilzgattungen sowie durch Oomyzeten hervorgerufen werden. Beispiele hierfür sind Krankheiten wie *Black foot rot*, welche durch den Ascomyzeten *Cylindrocarpon* spp. ausgelöst wird, *Phytophthora root rot*, die mit dem Oomyzeten *Phytophthora* spp. assoziiert wird, *Armillaria root rot*, die durch den Basidiomyzeten *Armillaria* ssp. verursacht wird, oder *Roesleria root rot*, welche durch den Ascomyzeten *Roesleria subterranea* hervorgerufen wird, (Gubler *et al.*, 2004; Hallenn *et al.*, 2006; Spies *et al.*, 2011; Mundy, 2015; Neuhauser *et al.*, 2011). Derzeit ist allerdings noch wenig über die verschiedenen Krankheitsverläufe sowie über das Ausmaß der ökonomischen Schäden, welche durch die Pathogene ausgelöst werden, bekannt (Huber *et al.*, 2009).

1.3.1 *Roesleria subterranea*

Der Ascomyzet *Roesleria subterranea* (*Rsub*) (Weinm.) Redhead, welcher ursprünglich unter dem Namen *Roesleria hypogaea* 1877 von Thümen eingeführt worden ist, (Thümen, 1878;

Redhead, 1984; Kirchmair *et al.*, 2008) wird als ein Hauptverursacher der Wurzelfäule an Weinreben und Obstbäumen angesehen, der massive, wirtschaftliche Verluste auslösen kann (Véghelyi, 1985; Beckwith, 1924; Neuhauser *et al.*, 2011). Dieser wird nach Kirchmair *et al.* (2008) zur Ordnung der Helotiales gezählt (Kirchmair *et al.*, 2008). *Rsub* wurde sowohl aus Weinrebenpflanzen der Gattung *Vitis* spp. als auch aus Obstbäumen wie *Cydonia* spp., *Malus* spp., *Prunus* spp., *Pyrus* spp. sowie aus weiteren Laubbäumen wie *Populus* spp., *Rosa* spp., *Salix* spp., oder *Tilia* spp. isoliert (Beckwith, 1924; Höfer, 1992). Lange Zeit wurde dieser als schwaches, minoritäres Pathogen eingestuft, bis eine Schädlingsrisikoanalyse nach den Richtlinien der EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*)-Standardserie PM 5 diesen als schwerwiegenden, primären Krankheitserreger für Weinreben und Obstbäume neu eingeordnet hat (Neuhauser *et al.*, 2011). In verschiedenen Ländern, wie unter anderem den USA (Miles und Schilder, 2009), Neuseeland (Neuhauser *et al.*, 2011), Frankreich (Delatour und Guillaumin, 1985), Ungarn (Véghelyi, 1985), Österreich (Kirchmair *et al.*, 2008), Luxemburg oder Deutschland (Huber *et al.*, 2006; Kirchmair *et al.*, 2008), wurde von signifikanten Schäden, welche durch *Rsub* ausgelöst wurden, berichtet. *Rsub* ist ein hypogäisch lebender Pilz, der im Allgemeinen als fakultativer Wurzelparasit angesehen wird. Er besiedelt in 1,5 m-Bodentiefe primär Wurzeln der Weinrebe, auf denen er vor allem zwischen Herbst und Frühling gestielte Apothezien zur Ascosporenproduktion bildet (Degawa *et al.*, 2015). Der Temperaturbereich des vegetativen Wachstums konnte *in vitro* zwischen 3 °C und 35 °C beobachtet werden. Die optimalen Wachstumstemperaturen im Boden liegen allerdings zwischen 15 °C und 20 °C (Höfer, 1992). Ein typisches äußerliches Merkmal von *Rsub* ist eine fast vollständige malachitgrüne Pigmentierung des Myzels (Beckwith, 1924; Bachmann *et al.*, 1986). Die Infektion des Pilzes beginnt mit der Kolonisierung der Wurzeloberfläche der Weinrebe, gefolgt von dem Durchwachsen des Kortex in das vaskuläre Gefäßsystem der Pflanze hinein (Neuhauser *et al.*, 2011). Da Aggregationen der Hyphen von *Rsub* im Xylemlumen beobachtet werden konnten, wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass diese den Wassertransport der Pflanze blockieren und dadurch massive Schäden an den Wurzeln hervorrufen, welche letztlich zum Absterben der gesamten Pflanze innerhalb von 2 bis 3 Jahren führen kann (Höfer, 1992). Als äußere Symptome werden dabei unter anderem eine verminderte Vitalität, ein verkümmertes Wachstum und ein signifikanter Ertragsverlust an der Weinrebe beobachtet. Des Weiteren können zumeist schwache Chlorosen an den Blättern und das Abstreben einzelner Triebe vorgefunden werden (Höfer, 1992; Neuhauser *et al.*, 2011). Eine frühzeitige Detektion der Krankheit wird allerdings aufgrund der hypogäischen Lebensweise des Pilzes sowie den

Varianzen in der oberirdischen Symptomausprägung stark erschwert. Da des Weiteren wenig über dessen Wirt-Pathogen-Interaktion bekannt ist und derzeit noch keine effizienten Kontrollmechanismen verfügbar sind, ist es schwierig die Krankheit einzudämmen (Neuhauser *et al.*, 2011).

1.4 Die Siderophor-Biosynthese in filamentösen Pilzen

Eisen ist ein essentielles Spurenelement für zahlreiche zelluläre Prozesse in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen (Coughlan, 1971). Für viele Enzyme ist es ein wichtiger Cofaktor und ist beispielsweise in prosthetischen Gruppen, wie Häm- oder Eisen-Schwefel-Cluster, zusammengelagert in vielen Metalloproteinen inkorporiert und kann dadurch als Biokatalysator oder als Elektronenträger fungieren. Des Weiteren ist Eisen in vielen Proteinen enthalten, welche unter anderem bei der DNA-Reparatur und -Replikation, dem Kohlenstoffmetabolismus, dem Sauerstofftransport und der Genexpressionsregulation beteiligt sind (Caza und Kronstad, 2013). Eine inkorrekte, zelluläre Eisenakkumulation kann allerdings die Produktion von zellschädigenden Sauerstoffspezies im Organismus katalysieren (Halliwell und Gutteridge, 1992; Johnson, 2008). Obwohl Eisen eines der am häufigsten vorkommenden Elemente auf der Erde ist, liegt es zumeist in der aeroben Umgebung nicht in der reduzierten (Fe^{2+}) sondern in der schwerlöslichen, oxidierten Form (Fe^{3+}) als Eisenhydroxid oder -oxyhydroxid-Komplex vor und ist dadurch für viele Organismen schwer zugänglich (Schwertmann und Fitzpatrick, 1992; Haas, 2003). Aufgrund dessen haben diese verschiedenen Strategien entwickelt, um die extrazelluläre Eisenaufnahme zu gewährleisten und intrazelluläre Eisenspeicherung sorgfältig zu regulieren. Viele Mikroorganismen produzieren hierfür sogenannte Siderophore (Crowley *et al.*, 1991).

1.4.1 Chemische Struktur der pilzlichen Siderophore

Siderophore sind niedermolekulare Eisenchelatoren (überwiegend <1500 Da), welche sich durch eine hohe Affinität zu Eisen auszeichnen (Neilands, 1995; Howard, 1999). Aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung können Siderophore in drei Gruppen eingeteilt werden: Catechole, Carboxylate und Hydroxamate. Mit Ausnahme der Zygomyceten, welche Siderophore der Carboxylate produzieren können, wurde die Mehrheit der bis heute vorgefundenen, pilzlichen Siderophore zur Gruppe der Hydroxamate zugeordnet (Thieken und Winkelmann, 1992; Haas, 2003). Die Hydroxamat-Siderophore wiederum können in vier strukturelle Familien klassifiziert werden: Rhodotorulasäure (A), Coprogene (B), Fusarinine (C) und Ferrichrome (D) (Abb. 2).

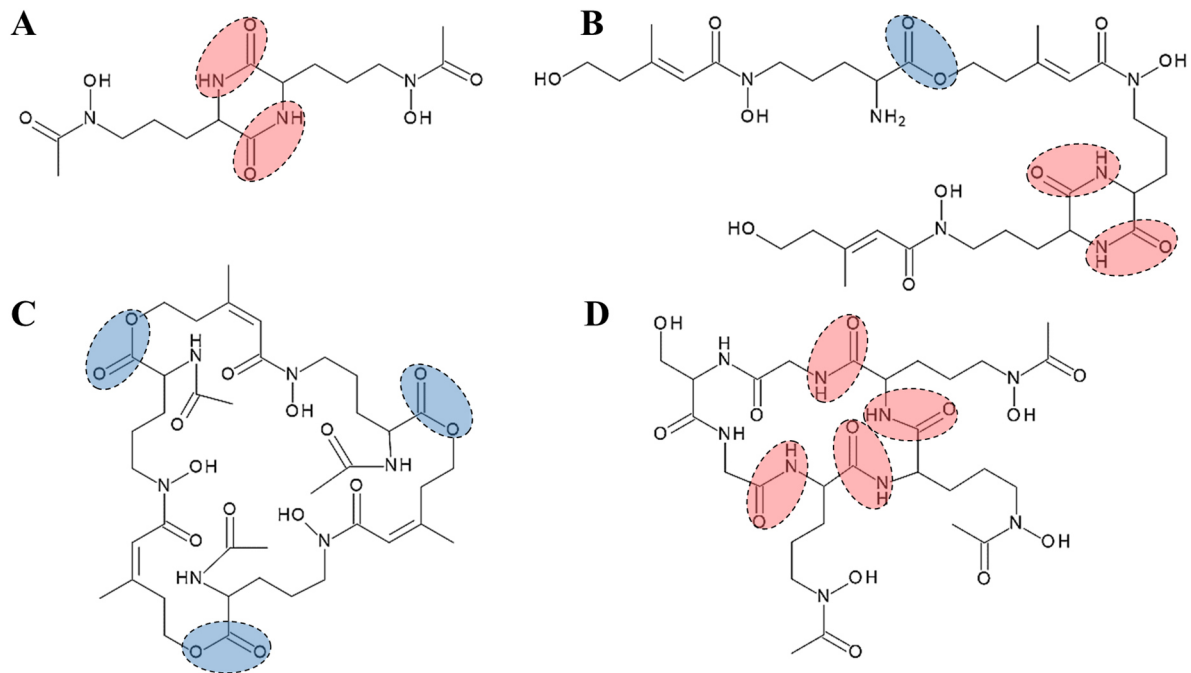


Abbildung 2: Repräsentative chemische Strukturen der vier Hydroxamatfamilien Rhodotorulasäure (A), Coprogene (B), Fusarinine (C) und Ferrichrome (D). Gezeigt sind exemplarisch die Desferri-Formen der Siderophore Rhodotorulasäure (A), Coprogen B (B), Triacetylfusarinin C (C) und Ferricrocin (D) mit markierten Peptid (rot)- und Ester (blau)-bindungen der verknüpften N^5 -Acyl- N^5 -Hydroxyornithin-Einheiten (modifiziert nach Haas *et al.*, 2008).

Die chemische Struktur aller Hydroxamate, mit Ausnahme des Neurosporins, welches von L-Ornithin abgeleitet wird, basiert auf der N^{δ} -Acyl- N^{δ} -Hydroxyornithin-Einheit (Renshaw *et al.*, 2002; Haas, 2003). Die Biosynthese (Abb. 3) hierfür beginnt im Allgemeinen mit der N^5 -Hydroxlierung des L-Ornithins zu N^5 -Hydroxy-L-Ornithin, welche durch die L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase katalysiert wird. Mit Hilfe der N^5 -Transacylase wird im zweiten Syntheseschritt eine Acylgruppe von Acyl-CoenzymA (CoA)-Derivaten auf N^5 -Hydroxy-L-Ornithin transferiert, wodurch N^5 -Acyl- N^5 -Hydroxy-L-Ornithin gebildet wird (Abb. 3). In Abhängigkeit des zu synthetisierenden Siderophors werden hierbei Acylgruppen unter anderem wie Acetyl, Anhydromevanly oder Methylglutaconyl verwendet. Im weiteren Verlauf werden die synthetisierten Hydroxamat-Einheiten anschließend über modular organisierte Multienzymkomplexe, den sogenannten nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), miteinander oder mit weiteren Aminosäuren über Peptid- und/oder Esterbindungen verknüpft (Haas, 2003; Philpott, 2006; Haas *et al.*, 2008). Weiterhin können Modifizierungen dieser über Acetylierung, Methylierung oder Hydroxylierung erfolgen (Haas *et al.*, 2008).

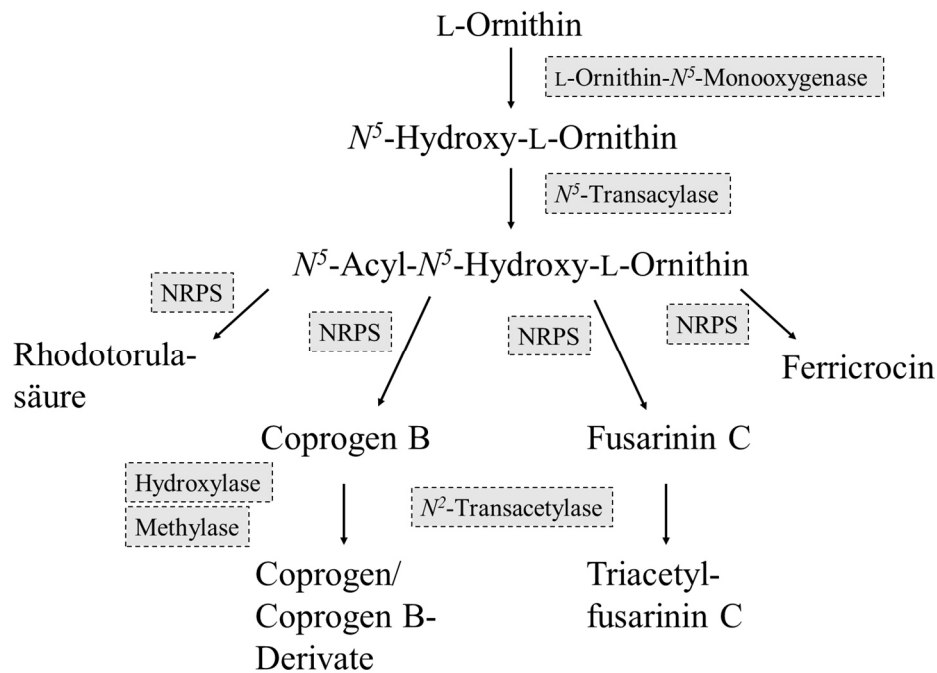


Abbildung 3: Postulierter Biosyntheseweg der pilzlichen Hydroxamat-Siderophore. Schematische Darstellung des Siderophor-Biosynthesewegs exemplarischer Siderophore (modifiziert nach Johnson, 2008 und Haas *et al.*, 2008).

Rhodotorulasäure (Abb. 2, A) besteht aus zwei N^5 -Acetyl- N^5 -Hydroxy-L-Ornithin-Einheiten, welche über einen Diketopiperazinring verbunden sind. Siderophore der Coprogen-Familie beinhalten dagegen zwei oder drei N^5 -*trans*-Anhydromevalonyl- N^5 -Hydroxy-L-Ornithin-Einheiten, von denen, im Falle von Coprogen B (Abb. 2, B), zwei Einheiten über ein Diketopiperazinring zur Dimerumsäure verbunden sind und eine weitere Einheit mit der OH-Gruppe der Dimerumsäure verestert ist (Haas, 2003; Haas, 2014). Fusarinine (Abb. 2, C) werden im Vergleich dazu aus drei N^5 -*cis*-Anhydromevalonyl- N^5 -Hydroxy-L-Ornithin-Einheiten gebildet, die über Esterbindungen linear oder zyklisch verknüpft sind. Ferrichrom-Siderophore (Abb. 2, D) bestehen im Allgemeinen aus drei N^5 -Acyl- N^5 -Hydroxy-L-Ornithin-Einheiten und drei weiteren Aminosäuren (Alanin, Serin und Glycin), welche zu einem zyklischen Hexapeptid synthetisiert sind (Haas, 2003). In der Biosynthese dieser Familie wurden bisher fünf verschiedene Acylgruppen, wie Acetyl für die Produktion von beispielsweise Ferrichrom, Ferricrocin (Abb. 2, D) oder Ferrichrysin, Malonyl für Malonichrom, *trans*- β -Ethylglutaconyl für Ferrichrom A, *trans*-Anhydromevalonyl für Ferrirubrin und *cis*-Anhydromevalonyl für Ferrirhodin, beschrieben (Renshaw *et al.*, 2002).

1.4.2 Gene der Siderophor-Biosynthese

Unter Zuhilfenahme von Methoden der reversen Genetik, welche unter anderem die Generierung und Charakterisierung von mutierten Stämmen mit zielgerichteten Defekten von

vermeintlichen Siderophor-Biosynthesegenen beinhalten, konnte beispielsweise in *Aspergillus fumigatus*, der die invasive Aspergillose in Menschen hervorrufen kann, der Biosyntheseweg der Siderophore nahezu vollständig aufgeklärt werden (Haas, 2014). Hierbei konnte für den ersten Syntheseschritt das Gen *SIDA*, das für die L-Ornithin- N^5 -Monoxygenase kodiert, identifiziert werden (Eisendle *et al.*, 2003). Auch in anderen Ascomyzeten wie *Fusarium graminearum*, der Auslöser für *Fusarium head blight* an Getreidepflanzen, *Magnaporthe oryzae*, der Reisbranderreger, oder in dem Basidiomyzeten *Ustilago maydis*, der Maisbranderreger, wurden SidAp-Orthologe detektiert, deren Involvierung in der Siderophor-Biosynthese des jeweiligen Organismus bereits bewiesen wurde (Greenshields *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2007; Mei *et al.*, 1993). Für den zweiten Syntheseschritt, der durch die N^5 -Transacylase katalysiert wird, wurde in *A. fumigatus*, der sowohl Siderophore der Ferrichrome (Ferricrocin, Hydroxyferricrocin) als auch der Fusarinine (Fusarinin C, Triacetylfusarinin C) produziert, hierfür zwei verschiedene Acylase-Gene, *SIDF* und *SIDL*, identifiziert (Haas, 2014). *SIDL* kodiert für eine N^5 -Hydroxyornithin:Acetyl-CoenzymA- N^5 -transacylase, die in der Synthese von Ferricrocin involviert ist (Blatzer *et al.*, 2011). *SIDF* kodiert hingegen für eine N^5 -Hydroxyornithin:Anhydromevalonyl-CoenzymA- N^5 -Transacylase, welche in der Siderophor-Biosynthese der Fusarinine beteiligt ist (Schrettl *et al.*, 2007). Für den nächsten Syntheseschritt, in dem die Hydroxamat-Einheiten über NRPS miteinander oder mit weiteren Aminosäuren über Peptid- oder Esterbindungen verknüpft werden, wurden in *A. fumigatus* zwei NRPS-Gene, *SIDD* und *SIDC*, identifiziert (Haas *et al.*, 2008). *SIDC* katalysiert hierbei die Synthese von Ferricrocin und *SIDD* die der Fusarinine. Für SidCp wurden Homologe vorgefunden, die essenziell für die Synthese von Siderophore der Ferrichrom-Familie sind (Schrettl *et al.*, 2007). Für Orthologe von SidDp wurden dagegen in anderen Spezies nicht nur die Involvierung in der Synthese von Fusarinine festgestellt, sondern auch die in der Siderophor-Biosynthese der Coprogen-Familie (Oide *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte das Gen einer Acetylase, *SIDG*, identifiziert werden, welches die N^2 -Acylierung von Fusarinin C zu Triacetylfusarinin C katalysiert (Schrettl *et al.*, 2007). In filamentösen Pilzen sind Gene, welche für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten benötigt werden, häufig geclustert im Genom lokalisiert (Keller und Hohn, 1997). Auch Siderophor-Biosynthesegene sind oftmals in Gencluster organisiert (Blatzer *et al.*, 2011). Beispielsweise sind in *U. maydis* *SID1* und *SID2*, welche beide in der Ferrichrom-Synthese involviert sind, geclustert vorzufinden (Yuan *et al.*, 2001). In *M. oryzae* sind *OMOI* und *SSMI*, die an der Synthese von Ferricrocin beteiligt sind, ebenfalls in einem Cluster organisiert (Hof *et al.*, 2007). Hingegen sind die Gene *SIDA* und *SIDC* in *A. fumigatus* auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert (Haas, 2003).

1.4.3 Funktion der Siderophore

Siderophore können im Hinblick auf die Funktion zwischen intra- und extrazellulären Siderophoren unterschieden werden (Charlang *et al.*, 1981; Winkelmann, 2007). Es wurde festgestellt, dass extrazelluläre Siderophore von vielen Pilz- und Bakterien-Spezies sowie von einigen Pflanzen synthetisiert werden können. Hingegen wurde die Produktion von intrazellulären Siderophoren bisher ausschließlich von Pilz-Spezies beobachtet (Haas *et al.*, 2008). Extrazelluläre Siderophore werden vor allem produziert und sekretiert, um extrazelluläres Eisen aufnehmen zu können, wenn eisenlimitierende Bedingungen in der unmittelbaren Umgebung des Organismus zu beobachten sind (Howard, 1999; Haas, 2003). Intrazelluläre Siderophore werden dagegen auch in Anwesenheit von adäquaten Eisenmengen der pilzlichen Ernährung synthetisiert und verbleiben innerhalb der Zelle (Charlang *et al.*, 1981). Es wird angenommen, dass diese zur intrazellulären Eisenspeicherung verwendet werden und dadurch den Pilz vor Eisentoxizität schützt, da eine zelluläre Akkumulation von freiem Eisen das Potenzial hat die Produktion von zytotoxisch reaktiven Sauerstoffspezies zu katalysieren (Halliwell und Gutteridge, 1992). Für *A. fumigatus* konnte beispielsweise neben den extrazellulären Siderophoren Fusarinin C und Triacetylfusarinin C die intrazellulären Siderophore Ferricrocin und Hydroxyferricrocin identifiziert werden, welche der konidialen und hyphalen Eisenspeicherung und der zellulären Eisenverteilung nützen (Schrettl *et al.*, 2007). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass in einigen Pilzen intrazelluläre Siderophore auch für die Konidiogenese- und Konidienkeimfähigkeit essenziell sind (Horowitz *et al.*, 1976; Haas, 2003). Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit des Eisens in der Umwelt, produzieren viele pathogene Pilze Siderophore, mit welchen sie dem Wirt Eisen entziehen können (Haas *et al.*, 2008). In diesem Kontext wurde die Siderophor-Produktion als essenzieller Virulenzfaktor einiger Mikroorganismen diskutiert, welche die Pathogenität von diesen signifikant beeinflussen (Comensoli *et al.*, 2017). In mehreren Studien konnte anhand einer Unterbrechung des Siderophor-Biosynthesewegs durch zielgerichtete Inaktivierungen kodierender Gene der beteiligten Synthesenzyme die Virulenz des Pathogens reduziert werden. Beispielsweise wurde in *F. graminearum* das Gen *NPS6*, welches für eine NRPS kodiert, inaktiviert. Durch dessen Deletion konnte eine Reduktion der Virulenz und eine Hypersensitivität gegenüber H₂O₂ in dem Pilz beobachtet werden (Oide *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde im Mausmodellsystem demonstriert, dass eine Inaktivierung des Gens *SIDA*, welche für eine L-Ornithin-N⁵-Monooxygenase kodiert, in *A. fumigatus* dazu führt, dass die die Siderophor-Produktion zum Erliegen kam und die Mutante avirulent wurde (Hissen *et al.*, 2005).

1.5 Ziele der Arbeit

Zwar wurde der Krankheitsverlauf des Esca-Komplexes in den letzten Jahren eingehend untersucht, jedoch sind bis dato die molekularen Mechanismen in den Wirt-Pathogen- und in den Pathogen-Pathogen-Interaktionen der Esca-assoziierten Pilzen insbesondere im Hinblick auf die Ätiologie dieser Krankheit nicht in Gänze verstanden worden. Weder die Hintergründe für die lange Latenzzeit der Krankheit von mehreren Jahren zwischen der Holzkolonisierung der Esca-assoziierten Pilze und den sichtbaren Symptomen an der Weinrebe, noch die Unstetigkeit der einzelnen Symptomausprägungen in darauffolgenden Jahren an der gleichen Weinrebe wurden vollständig aufgeklärt (Bertsch *et al.*, 2013; Calzarano *et al.*, 2018; Fischer und Peighami Ashnaei, 2019). Aufgrund dessen sollte im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Virulenzfaktor der Esca-assoziierten Pilze *Pch*, *Pmi*, *Fmed* und *Ela*, gefunden werden, der zur Erforschung der molekularen Grundlage zwischen den Pilz-Pilz- oder den Pilz-Pflanzen-Interaktionen eingesetzt werden könnte. Hierbei sollte der Einfluss der Siderophor-Produktion der aufgeführten Pilze im Hinblick auf deren Virulenz untersucht werden. Dazu war das Ziel im ersten Teil der Arbeit die Siderophor-Produktion der Esca-assoziierten Pilze zu analysieren und die synthetisierten Siderophore der einzelnen Pilze zu identifizieren. Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Siderophor-Biosyntheseweg näher untersucht werden. Dazu war das Ziel anhand von Homologievergleichen mit bekannten Genen anderer pathogener Pilze, deren Involvierung in der Siderophor-Biosynthese bereits nachgewiesen wurde, putativ beteiligte Gene der Esca-assoziierten Pilze zu identifizieren und über deren zielgerichteten Disruption und anschließenden Charakterisierung der generierten Mutanten die Beteiligung an der Siderophor-Biosynthese zu bestätigen. In anschließenden Untersuchungen sollte der Einfluss der disruptierten Siderophor-Biosynthese-Gene im Hinblick auf die Vitalität und die Konidiogenese der jeweiligen Pilze, die Interaktionen zwischen den Pilzen sowie die Virulenz analysiert werden. Hierzu sollte aufgrund der langen Latenzzeit der Esca-Krankheit ein geeignetes biologisches Testsystem mit Weinrebenstecklingen zunächst etabliert werden. In einem kleineren Teil der Arbeit sollte die Siderophor-Biosynthese auch für den Wurzelfäule-assoziierten Pilz *Rsub* analysiert werden, da bisher wenig über dessen Wirt-Pathogen-Interaktionen bekannt ist. Hierbei sollte zunächst die Produktion von möglichen Siderophoren für *Rsub* überprüft werden und synthetisierte Siderophore identifiziert werden, um eine Grundlage für zukünftige weiterführende Forschung gewährleisten zu können.

2 Material und Methode

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Medienbestandteile

Die im Nachfolgenden genannten Chemikalien und Medienbestandteile wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem GmbH, Bayer CropScience GmbH, Becton Dickinson GmbH, Biozym Scientific GmbH, Carl Roth GmbH & Co. KG, Fischer Chemical, Fresenius, InvivoGen, Leiber GmbH, Merck KGaA, New England Biolabs, Roche Diagnostics GmbH, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Thermo Fisher Scientific.

Wasser

Für die Herstellung der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Medien, Lösungen und Puffer wurde, wenn nicht anders angegeben, deionisiertes Wasser (H_2O_{deion}) (Aufbereitungsanlage: EMD Millipore RiOsTM 30; Merck KGaA) eingesetzt. Ultrafiltriertes Reinstwasser (H_2O_{UF}) (Aufbereitungsanlage: EMD Millipore, Milli-Q Plus 185, Merck KGaA) wurde dagegen für das Ansetzen von Puffer und Lösungen molekularbiologischer Reaktionen und analytischen Arbeiten verwendet.

Lösungsmittel

Acetonitril (*HPLC/MS grade*), Ethanol *p.a.*, Ethylacetat, Isopropanol *p.a.*, Methanol, DMSO *p.a.*

Säuren und Laugen

Ameisensäure *p.a.* (100 %), Essigsäure *p.a.* (100 %), HCl *p.a.* (37 %), NaOH, Trifluoressigsäure *p.a.* (100 %)

2.1.2 Lösungen und Puffer

Die nachfolgend aufgeführten pH-Werte der hergestellten Puffer und Lösungen wurden mit einer HCl- oder NaOH-Lösung eingestellt.

2.1.2.1 Antibiotika-Lösung

Die nachfolgend aufgelisteten Antibiotika wurden entsprechend den in Tabelle 1 aufgeführten Lösungsmittel resuspendiert, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antibiotika-Stammlösungen.

Antibiotika	Lösungsmittel	Konzentration [mg/ml]
Cefotaxim	H ₂ O _{UF}	100
Geneticin	H ₂ O _{UF}	100
Glufosinat-Ammonium (Basta®)	-*	200
Kanamycin	H ₂ O _{UF}	100
Hygromycin B	H ₂ O _{UF}	100
Kanamycin	H ₂ O _{UF}	100
Penicillin	H ₂ O _{UF}	100
Rifampicin	MeOH	10
Streptomycin	H ₂ O _{UF}	100

*wurde bereits gelöst vom Hersteller bezogen.

2.1.2.2 Lösungen und Puffer zur alkalischen Lyse

Alkalische Lyse-Lösung 1

50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM Na₂EDTA · H₂O (pH 8,0)

Alkalische Lyse-Lösung 2

200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

Alkalische Lyse-Lösung 3

3 M Kaliumacetat, 2 M CH₃COOH

TE-Puffer pH 8,0

10 mM Tris, 1 mM Na₂EDTA · H₂O

TE-Puffer + RNase

20 ml TE-Puffer, 40 µl RNase A (20 mg/ml)

2.1.2.3 Lösungen und Puffer für Southern Blot-Analyse

Antikörper-Lösung

1,5 µl Anti-Digoxigenin-AP, ad 20 ml Blocking-Puffer

Blockingpuffer

30 g/L Magermilchpulver, 100 ml Maleinsäure-Puffer

Denaturierungspuffer

46,8 g/L NaCl, 16 g/L NaOH

Depurinierungspuffer

20,8 ml HCl (37 %)

Detektierungspuffer pH 9,5

5,8 g/L NaCl, 12,1 g Tris

Hybridisierungspuffer

Roti®-Hybri-Quick (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Neutralisationspuffer pH 7,6

87,7 g/L NaCl, 60,6 g/L Tris

Maleinsäurepuffer pH 7,5

11,6 g/L Maleinsäure, 8,8 g/L NaCl

SSPE-Puffer (20x) pH 7,4

210 g/L NaCl, 8,2 g/L Na₂EDTA x H₂O, 27,6 g/L Na₂PO₂ x H₂O

SSPE-Puffer (2x) + 0,1 %SDS pH 7,4

10 ml/L SDS (10 %), 10 ml/L SSPE-Puffer (20 x)

SSPE-Puffer (0,2x) + 0,1 %SDS pH 7,4

10 ml/L SDS (10 %), 10 ml/L SSPE-Puffer (2 x)

Waschpuffer

5 ml/L Tween® 20, 1L Maleinsäurepuffer

2.1.2.4 Sonstige Lösungen und Puffer

Biotin-Lösung

0,01 % (w/v) Biotin

K-Puffer

1,15 M KH₂PO₄, 1,15 M K₂HPO₄

MN-Puffer

120 mM MgSO₄, 255 mM NaCl

MOPS-Glycerin Puffer

15 % Glycerin, 1 mM MOPS

Spurenelement-Lösung II (1000x)

0,1 g/L CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 g/L FeSO₄ x 7 H₂O, 0,1 g/L H₃BO₃, 0,1 g/L MnSO₄ x H₂O,
0,1 g/L ZnSO₄ x 7 H₂O

Thiamindichlorid-Lösung

1 % (w/v) Thiamindichlorid

TAE-Puffer (50x) pH 7,5

32,15 g/L EDTA, 242,2 g/L Tris

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

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.3.1 Verbrauchsmaterialien

Glukosemessstreifen (Medi-Test Glukose, Macherey-Nagel GmbH), Miracloth (EMD Millipore Corp), Nylonmembran Roti®-Nylon plus (Carl Roth GmbH & Co. KG), Parafilm™ M® (Carl Roth GmbH & Co. KG), Röntgenfilm CL-X Posure™ Film (Thermo Fisher Scientific).

2.1.3.2 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zentrifugationsschritte wurden mit den Tischzentrifugen 5415 R (Rotor FA-45-24-11) in 1,5 oder 2,0 ml Reaktionsgefäße und 5810 R (Festwinkelrotor FA-45-6-30, Ausschwingrotor Rotor A-4-81) in 15-, 50- oder 500 ml-Reaktionsgefäße jeweils der Firma Eppendorf AG, Hamburg durchgeführt.

Für die Fermentation von Submerskulturen in Erlenmeyerkolben (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 L, 2 L, 5 L) wurde der Orbitalschüttler Infors HAT RC-406 (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) verwendet.

Die Kultivierung von bakteriellen Kulturen wurde in 15 ml-Reaktionsgefäßen in dem Inkubationsschüttler (temperierbar) KS 4000 i control (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) durchgeführt.

2.1.4 Kulturmedien

Die in der Arbeit verwendeten Kulturmedien wurden vor Gebrauch für 20 min bei einer Temperatur von 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Die pH-Werte wurden vor dem Autoklavieren mit einer HCl- oder NaOH-Lösung eingestellt. Die nachfolgend genannten Medienbestandteile wurden, sofern nicht anders angegeben, in H₂O_{deion} gelöst. Zur Herstellung von Festmedien wurden diese vor dem Autoklavievorgang mit 2 % granuliertem Agar versetzt. Thermoinstabile Medienbestandteile (z.B. Antibiotika) wurden nach Abkühlen der autoklavierten Medien auf < 55 °C sterilfiltriert hinzugegeben.

M1 AI-Medium (*Agrobacterium tumefaciens* Induktionsmedium)

Die nachfolgenden Medienbestandteile wurden sterilfiltriert und zu sterilem H₂O_{deion} (ad 1 L) hinzugegeben. Das AI-Festmedium wurden zusätzlich mit 200 µM Acetosyringon versetzt.

1 ml/L Biotin-Lösung (0,01 %), 1 ml/L CaCl₂-Lösung (1 %), 10 ml/L FeSO₄-Lösung (0,01 %), 5 ml/L Glukose-Lösung (20 %), 5 ml/L Glycerin-Lösung (50 %), 0,8 ml/L K-Puffer, 40 ml/L MES-Lösung (1 M), 20 ml/L MN-Puffer, 2,5 ml/L NH₄NO₃-Lösung (20 %), 5 ml/L Spurenelement-Lösung II

M2 BAF-Medium (Singer, 1975) pH 5,5

20 g/L Maltose, 10 g/L Glukose, 2,0 g/L Pepton, 1,0 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L KH₂PO₄, 0,1 g MgSO₄·7 H₂O, 73,5 mg/L CaCl₂·2 H₂O, 16,6 mg/L FeCl₃·6 H₂O, 1,78 mg/L ZnSO₄·7 H₂O

M3 HMG-Medium pH 5,5

4 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Malzextrakt, 10 g/L Glukose

HMG_{Cefo,Strep,Hyg}: HMG-Medium supplementiert mit 300 µg/ml Cefotaxim, 200 µg/ml Streptomycin, 300 µg/ml (für *Pch* und *Pmi*) oder 50 µg/ml (für *Rsub*) Hygromycin

HMG_{Cefo,Strep,Gen}: HMG-Medium supplementiert mit 300 µg/ml Cefotaxim, 200 µg/ml Streptomycin, 300 µg/ml (für *Pch* und *Pmi*) Geneticin

M4 Kartoffelextrakt-Glukose-Bouillon (KGB)-Medium

26,5 g/L Kartoffelextrakt-Glukose-Bouillon (Carl Roth GmbH & Co. KG)

M5 Kartoffelextrakt-Glukose-Bouillon-Medium (KGB) (50 %)

13,25 g/L Kartoffelextrakt-Glukose-Bouillon (Carl Roth GmbH & Co. KG)

KGB (50 %)_{Pen, Strep}: KGB-Medium supplementiert mit 100 µg/ml Penicillin, 200 µg/ml Streptomycin

M6 Kryo-Medium

80 g/L DifcoTM Oatmeal, 40 g/L Glukose, 25 ml/L Glycerin

Das Oatmeal wurde in 800 ml H₂O_{deion} für 45 min bei 70 °C erhitzt und anschließend über ein Sieb filtriert. Das Filtrat wurde mit Glukose und Glycerin versetzt und auf ein Volumen von 1 L mit H₂O_{deion} aufgefüllt. Je 1 ml Nährlösung wurde zusammen mit etwa 0,2 g zerkleinertem Vermiculit in ein Kryo-Schraubdeckelgefäß überführt und autoklaviert.

M7 LB-Medium pH 7,4

10 g/L BactoTM Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl

LB_{Kana}: LB-Medium supplementiert mit 60 µg/ml Kanamycin

LB_{Kana, Rif}: LB-Medium supplementiert mit 60 µg/ml Kanamycin, 60 µg/ml Rifampicin

M8 2 % Biomalz-Medium pH 5,5

20 g Biomalz

M9 SOC-Medium

SOC (*Super Optimal Broth*) *Outgrowth medium* (New England Biolabs GmbH)

M10 Sundström-Medium (Sundström, 1964)

Für die Herstellung des Sundström-Mediums wurden zuvor alle benötigten Gefäße mit 0,1 M EDTA (pH 8,0) ausgewaschen und im Anschluss mit H₂O_{UF} ausgespült.

Lösung A und B wurden getrennt voneinander angesetzt, autoklaviert und in einem Verhältnis von 20:1 anschließend steril zusammengeführt. Für eisensupplementierte Kultivierungsbedingungen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 10 µM FeCl₃-Lösung (FeCl₃ gelöst in H₂O_{UF}, sterilfiltriert) hinzugefügt.

Lösung A: 20 g/L Glukose, 1,4 g/L L-Asparagin-Monohydrat, 0,35 g/L KH₂PO₄, 0,15 g/L K₂HPO₄, 0,22 g/L Na₂SO₄, 0,1 mg/L Thiamindichlorid

Lösung B: 2,64 g/L CaCl₂·2 H₂O, 8,2 g/L MgCl₂·6 H₂O, 123,2 mg/L Tri-Natriumcitrat·2 H₂O, 106,2 mg/L Zitronensäure, 80,56 mg/L MnSO₄·1 H₂O, 81 mg/L ZnSO₄·7 H₂O

2.1.5 Organismen

Im Nachfolgenden sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Organismen beschrieben.

2.1.5.1 *Escherichia coli*

Stamm NEB[®]-10-beta Competent *E. coli*

Genotyp *araD139 Δ(ara-leu)7697 fhuA lacX74 galK (f80 Δ(lacZ)M15) mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) Δ(mrr-hsΔRMS-mcrBC)*

2.1.5.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Stamm AGL1 (BAA-101) (ATCC, Manassas, USA)

Genotyp *AGL0 recA::bla pTIPo542deltaT Mop + CbR* (Lazo et al., 1991)

2.1.5.3 Esca-assoziierte Pilze

In der vorliegenden Arbeit wurden die Esca-assoziierten Pilze *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*), *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*), *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) und *Eutypa lata* (*Ela*), deren Wirtsorganismus *Vitis vinifera* ist, für die Untersuchung der Siderophor-Biosynthese verwendet. Die Standard-Kultivierung von *Pch*, *Pmi* und *Fmed* erfolgte bei RT auf HMG-Festmedium (M3). *Ela* wurde hingegen sowohl auf BAF (M2)- als auch HMG (M3)-Festmedium und ebenfalls bei RT kultiviert. Zur langfristigen Lagerung wurden diese in sterilen 1,5 ml Kryo-Schraubdeckelgefäßen, welche mit Kryomedium (M6) befüllt waren, bei -80 °C aufbewahrt. Des Weiteren wurden diese in Agarschräggkulturen bei 4 °C in der Stammsammlung des IBWF (Kaiserslautern) gelagert.

Phaeomoniella chlamydospora (Pch)

Stamm #1: *Pch IBWF 1315* (IBWF, Kaiserslautern)

Stamm #2: *CBS 229.95* (Fungal Collection, Utrecht, NL)

Phaeoacremonium minimum (Pmi)

Stamm #1: *Pmi IBWF 1189* (IBWF, Kaiserslautern)

Stamm #2: *CBS 100.398* (Fungal Collection, Utrecht, NL)

Fomitiporia mediterranea (Fmed)

Stamm #1: *Fmed IBWF* (IBWF, Kaiserslautern)

Stamm #2: *Fmed IB-Her01-16* (Isolat aus Weinreben des Weinguts Schäfer, Herrnsheim)

Der Stamm *Fmed IB-Her01-16* wurde im Zuge dieser Arbeit aus dem Stamm der Weinrebenpflanze (Unterlagssorte: SO4, Rebsorte: Portugieser) des Weinguts Schäfer (Herrnsheim) isoliert und identifiziert (2.2). Die sequenzierte ITS-Region zur molekularbiologischen Identifizierung des Pilzes ist dem Abschnitt 7.3 zu entnehmen.

Eutypa lata (Ela)

Stamm #1: *Ela IBWF 16012* (IBWF, Kaiserslautern)

Stamm #2: *Ela IBWF 16121* (IBWF, Kaiserslautern)

Stamm #3: *Ela IBWF 16122* (IBWF, Kaiserslautern)

Stamm #4: *Ela IBWF 16123* (IBWF, Kaiserslautern)

2.1.5.4 *Roesleria subterranea* (Rsub)

Die *Roesleria subterranea* (*Rsub*) Stämme wurden bei 20 °C auf HMG (M3)-Festmedium kultiviert. Diese wurden für die Untersuchungen zur Siderophoren-Produktion von *Rsub* in der vorliegenden Arbeit herangezogen. Zur langfristigen Lagerung wurden die Isolate in Agarschräggkulturen bei 4 °C in der Stammsammlung des IBWF (Kaiserslautern) aufbewahrt.

Stamm #1: *CBS 201.25* (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Niederlande)
Wirtsorganismus: *Vitis vinifera*

Stamm #2: *CBS 407.51* (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Niederlande)
Wirtsorganismus: *Vitis vinifera*

Stamm #3: *CBS 271.82* (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Niederlande)
Wirtsorganismus: *Populus* sp.

Stamm #4: *CBS 272.82* (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Niederlande)
Wirtsorganismus: *Pyrus communis*

Stamm #5: CBS 339.96 (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Niederlande)
Wirtsorganismus: Laubbaum (nicht näher bestimmt)

Stamm #6: IB-Rüd01-16 (Weingut Endlich, Rüdesheim)
Wirtsorganismus: *Vitis vinifera*

Der *Roesleria subterranea* Stamm IB-Rüd01-16 wurde im Zuge dieser Arbeit aus den Wurzeln einer Weinrebenpflanze (Unterlagssorte: 125 AA, Rebsorte: Blauer Spätburgunder) des Weinguts Endlich (Rüdesheim) isoliert und identifiziert (2.2). Die sequenzierte ITS-Region zur molekularbiologischen Identifizierung des Pilzes ist dem Abschnitt 7.3 zu entnehmen. Das Pflanzenmaterial zur Pilzisolierung wurde freundlicherweise [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Enzyme

Die nachfolgend aufgelisteten Enzyme wurden gemäß den Herstellergaben für molekularbiologische Arbeiten verwendet.

Tabelle 2: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme.

Enzyme	Hersteller
DreamTaq™ DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH
FastAP Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific GmbH
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Mix	New England BioLabs
Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific GmbH
RNase A	Thermo Fisher Scientific GmbH
Phusion® DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH
SapphireAmp Fast PCR Master Mix	TaKaRa Bio Europe S.A.

2.1.7 Reaktionskits

Im Nachfolgenden sind die Reaktionskits aufgeführt, welche für molekularbiologische Arbeiten verwendet worden sind.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Reaktionskits.

Enzyme	Hersteller
GeneJET™ Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH
GeneJET™ Plant Genomic DNA Purification Mini Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Mix	New England BioLabs®

2.1.8 Oligonukleotid-Primer

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotid-Primer (7.1) wurden von der Firma Eurofins Genomics stets in der Reinheitsqualität von *high purity salt free* bezogen. Die Oligonukleotid-Primer wurden für die Generierung von Vektoren zu Klonierungszwecken (2.3.2.2) mittels

Gibson Assembly (2.3.6), zum Screening von putativen Mutanten über Kolonie-PCR (2.3.2.3), zur Herstellung DIG-markierter Sonden (2.3.2.4) für die Southern Blot Analyse (2.3.10) und für Sequenzierungen (2.2) herangezogen. Diese wurden, mit Ausnahme für den Gibson Assembly, mit Hilfe des Primer Design Tools ebenfalls von der Firma Eurofins Genomics entworfen (2.1.10). Zu Klonierungszwecken wurden die Oligonukleotid-Primer mittels NEBuilder®_{v2.2.5} Assembly Tool der Firma New England BioLabs® designt (2.1.10). Die jeweilige *Annealing*-Temperatur des Oligonukleotid-Primers wurde über den Tm Calculator_{v1.12.0} der gleichen Firma ermittelt (2.1.10). Die jeweiligen Oligonukleotidsequenzen der in der Arbeit eingesetzten Oligonukleotid-Primer sind dem Anhang zu entnehmen (7.1).

2.1.9 Plasmide

Die im Nachfolgenden aufgeführten Plasmide wurden für die Generierung der in der Arbeit verwendeten Zielvektoren herangezogen. Sowohl die jeweilige Nukleotidsequenz als auch die entsprechende Beschreibung des Plasmids sind den in Tabelle 4 genannten Verweisen zu entnehmen.

Tabelle 4: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Verweis
<i>pCAMBIA0380</i>	CAMBIA, Canberra, Australien
<i>pSJBASIC</i>	(Bohnert <i>et al.</i> , 2019)
<i>pCB1636</i>	(Sweigard <i>et al.</i> , 1997)
<i>pSJ+GFP(G418)</i>	(Schunke, 2017)
<i>pSJ+GFP(G418_II)</i>	(Schunke, 2017)

2.1.10 Software und Datenbanken

Im Nachfolgenden sind die in der Arbeit eingesetzten, relevanten Softwares und Datenbanken tabellarisch dokumentiert.

Tabelle 5: Verwendete Software und Datenbanken.

Software/Datenbank	Verwendungszweck	Bezogen von
antiSMASH fungal version 5.0	Identifizierung und Analyse von Genclustern der Sekundärmetabolit-Biosynthese	https://fungismash.secondarymetabolites.org (Medema <i>et al.</i> , 2011; Blin <i>et al.</i> , 2019)
ApE V5	Visualisierung von Nukleotidsequenzen	http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/
BioEdit V5	Vergleich und Analyse von Aminosäure- und Nukleotidsequenzen miteinander	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
Cytoscape 3.7.1	Visualisierung von molekularen Netzwerken der spektralen Ähnlichkeiten von MS/MS-Fragmentationsspektren	https://cytoscape.org/ (Shannon <i>et al.</i> , 2003)

GNPS Version 1.3.11-GNPS	Vergleich und Analyse von LC-MS/MS-Spektren mit der Datenbank von GNPS	GNPS (<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>), California (USA) gnps.ucsd.edu (Wang <i>et al.</i> , 2016)
Image Lab™ _{6.0.1}	Dokumentation von Agarosegelen	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
JGI (Joint Genome Institute) Genome Portal	Vergleich und Analyse von pilzlichen Aminosäuren- und Nukleotid-Sequenzdaten	DOE Joint Genome Institute, California (USA) https://jgi.doe.gov (Nordberg <i>et al.</i> , 2014; Grigoriev <i>et al.</i> , 2014)
LabSolutions Version 5.92	Visualisierung von HPLC-Chromatogrammen und UV-Spektren	Shimadzu Deutschland GmbH
NCBI BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)	Vergleich und Analyse von Aminosäuren- und Nukleotidsequenzen mit der NCBI Datenbank	NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>), Bethesda (USA) https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (Altschul <i>et al.</i> , 1990; States und Gish, 1994)
NEBuilder® Assembly Tool v2.2.5	Design von spezifischen Primer zur Generierung von Vektoren	New England Biolabs® Inc. Beverly (USA) https://nebuilder.neb.com
pDRAW32 1.1.142	Visualisierung und Analyse von Vektorkarten und Sequenzabschnitten	http://www.acaclone.com
PCR Primer Design Tool	Design von spezifischen Primer zur Durchführung der Kolonie-PCR und Generierung von Sonden für Southern Blot Analyse	Eurofins Genomics Germany GmbH https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/
Tm Calculator v1.12.0	Ermittlung von <i>Annealing</i> -Temperaturen	New England Biolabs® Inc. Beverly (USA) https://tcalculator.neb.com
SnapGene® Viewer 5.0.5	Visualisierung und Analyse von Vektorkarten und Sequenzabschnitten	GSL Biotech, Chicago (USA)
SMART (<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>)	Identifizierung und Analyse von Proteindomänen innerhalb von Proteinsequenzen	http://smart.embl-heidelberg.de/ (Letunic und Bork, 2018; Letunic <i>et al.</i> , 2021)
Unipro UGENE v1.32.0	Visualisierung und Analyse von DNA-Sequenzen	Unipro, Novosibirsk (Russia)
Xcalibur™	Visualisierung und Analyse von MS/MS-Fragmentationsspektren	Thermo Fisher Scientific (USA) https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/OPTON-30965#/OPTON-30965

2.1.11 Mikroskopie und Dokumentation

Die mikroskopischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Binokular Stemi 2000-C von Zeiss und dem Lichtmikroskop Laborlux 11 von Leitz durchgeführt. Zur fotografischen Dokumentation wurde die Digitalkamera D3300 der Firma Nikon verwendet.

2.2 Isolierung phytopathogener Pilze

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pilze *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) *IB-Her01-16* (2.1.5.3) und *Roesleria subterranea* (*Rsub*) *IB-Rüd01-16* (2.1.5.4) wurden im Zuge der Promotionsarbeit aus Weinreben isoliert. Hierzu wurde für *Fmed* *IB-Her01-16* Pflanzenmaterial eines Weinrebenstammes und für *Rsub* *IB-Rüd01-16* Pflanzenmaterial von

Weinrebenwurzeln zur Pilzisolierung herangezogen. Die Isolierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Filip *et al.* (Filip *et al.*, 2003). Die entsprechende Pflanzenprobe, aus welcher der Pilz isoliert werden sollte, wurde zunächst unter fließendem Wasser oberflächlich vorgereinigt, um ggf. Erdpartikel zu entfernen. Es folgte eine Oberflächensterilisation, wobei die Pflanzenproben für 30 s in 70 % Ethanol, für 1 min in 5 % Natriumhypochlorid und für wiederum 30 s in 70 % Ethanol platziert wurden. Nach kurzer Lufttrocknung der Proben in der Sterilbank wurden diese auf 50 % KGB (M5)-Festmedium (mit 200 mg/L Streptomycin, 100 mg/L Penicillin) überführt und bei RT inkubiert. Die aus der Pflanzenprobe herausgewachsenen Pilze wurden separiert und bei RT auf HMG (M3)-Festmedium kultiviert. Im weiteren Verlauf wurde Pilzmyzel, wie in 2.3.1.1, 2.3.2.1 und 2.3.4 beschrieben, zur molekularbiologischen Identifizierung über die *internal transcribed spacer* (ITS)-Region (White *et al.*, 1990) aufbereitet. Die Sequenzierung des ITS-Sequenzbereichs der isolierten Pilze wurde über die Firma LGC Genomics GmbH, Berlin vorgenommen und anschließend die jeweilige Sequenz unter Zuhilfenahme des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) von *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), Bethesda (USA) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit der NCBI-Datenbank verglichen. Des Weiteren erfolgte eine makroskopische Identifizierung mit dem Binokular Stemi 2000-C von Zeiss.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von Nukleinsäure

2.3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Pilzen

Zur Isolierung der genomischen DNA der in dieser Arbeit verwendeten Pilze wurden 50 ml HMG (M3)-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit ca. 10 Myzelagarstücken (0,5 cm x 0,5 cm) der jeweiligen Pilzkultur inokuliert und für eine Woche bei 120 rpm und RT kultiviert. Anschließend wurde das Myzel von der Kulturbrühe getrennt, lyophilisiert und nachfolgend mit flüssigem Stickstoff überschichtet und gemörsert. Mit Hilfe des GeneJET™ Plant Genomic DNA Purification Mini Kit von Thermo Fisher Scientific wurde die jeweilige genomische DNA gemäß den Herstellerangaben isoliert und anschließend bei 4 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

2.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* wurden 5 ml-LB (M7)-Flüssigmedium, welches das jeweilige Selektionsantibiotikum (2.1.2.1) entsprechend dem zur Transformation

eingesetzten Zielvektor beinhaltetete, mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Für analytische Zwecke wurde die Plasmid-DNA über die alkalische Lyse nach Sambrook und Russel (2001) mit den unter Abschnitt 2.1.2.2 aufgeführten Lösungen isoliert (Sambrook und Russell, 2001). Hierbei ermöglicht die Methode eine schnelle und kostengünstige (mit geringer Reinheit) Isolierung der DNA. Für präparative Zwecke wurde die DNA mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits von Thermo Fisher Scientific gemäß den Herstellerangaben isoliert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.1.3 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäure

Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration der isolierten DNA wurde der NanoDrop Lite Spectrometer (Thermo Fisher Scientific) herangezogen und gemäß den Herstellerangaben verfahren. Hierbei wurde die Extinktion der Probe bei $\lambda = 260$ nm als Maß für die Konzentration der DNA photometrisch ermittelt. Über das Extinktionsverhältnis der Wellenlängen 260 nm/280 nm wurde die Reinheit der DNA bestimmt.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde für die Amplifikation von gewünschten Gensequenzen sowohl von genomischer DNA als auch von Plasmid-DNA eingesetzt. Hierfür wurde das Gerät S1000™ Thermal Cycler (Bio-RAD) verwendet.

2.3.2.1 PCR für molekulargenetische Identifizierung über *internal transcribed spacer* - Region

Der molekulargenetische Nachweis über die Amplifikation der *internal transcribed spacer* (ITS)- Region von isolierten Pilzen (2.2) erfolgte über einen Standard PCR-Reaktionsansatz mit den Oligonukleotid-Primersequenzen ITS-4 TCCTCCGCTTATTGATATGC, ITS-5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG und unter zu Hilfenahme der DreamTaq™ Polymerase.

PCR-Reaktionsansatz mit DreamTaq™ Polymerase

DreamTaq™ -Puffer mit MgCl ₂ (10x)	5,0 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl
Primer <i>forward</i> (5 pmol/µl)	2,5 µl
Primer <i>reverse</i> (5 pmol/µl)	2,5 µl
Template-DNA (ca. 100 ng/µl)	1,0 µl
DreamTaq™ Polymerase	1,0 µl
H ₂ O _{UF}	ad 50,0 µl

Tabelle 6: PCR-Programm für Standard PCR-Reaktionsansatz mit der DreamTaq™ Polymerase.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	1
Denaturierung	95	30	34
Primer- <i>Annealing</i>	T _A	30	
Elongation	72	60/kb	
Terminale Elongation	72	300	1

(T_A = *Annealing*-Temperatur)

2.3.2.2 PCR für Klonierungszwecke

Für Klonierungszwecke wurden die im Zuge des Gibson Assembly (2.3.6) benötigten DNA-Fragmente zur Generierung der Geninaktivierungs- und Komplementationsvektoren (7.2) mittels Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert. Die hierfür verwendeten Oligonukleotid-Primersequenzen können dem Abschnitt 7.1.1 entnommen werden.

PCR-Reaktionsansatz mit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase

HF-/GC-Puffer mit MgCl ₂ (5x)	10,0 µl
dNTPS-Mix (10 mM)	1,0 µl
Primer <i>forward</i> (5 pmol/µl)	2,5 µl
Primer <i>reverse</i> (5 pmol/µl)	2,5 µl
Template-DNA (ca. 100 ng/µl)	1,0 µl
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl
H ₂ O _{UF}	ad 50,0 µl

Tabelle 7: PCR-Programm für Standard PCR-Reaktionsansatz mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	180	1
Denaturierung	98	10	34
Primer- <i>Annealing</i>	T _A	15	
Elongation	72	30/kb	
Terminale Elongation	72	600	1

(T_A = *Annealing*-Temperatur)

2.3.2.3 Kolonie-PCR zur Voruntersuchung von Rekombinationsereignissen

Für den molekulargenetischen Nachweis über die Southern Blot Analyse (2.3.10) der in der vorliegenden Arbeit generierten Geninaktivierungsmutanten wurde zunächst eine Vorauswahl von potenziellen Transformaten vorgenommen. Hierbei wurde eine Kolonie-PCR unter Verwendung des SapphireAmp® Fast PCR Master Mix durchgeführt. Die dazu benötigte *Template*-DNA der zu untersuchenden Mutanten wurde wie in Arbeiten von Izumitsu *et al.* (Izumitsu *et al.*, 2012) beschrieben gewonnen. Hierfür wurde eine geringe Menge Luftmyzel der jeweiligen potenziellen Mutante mit Hilfe einer Impföse entnommen und in 100 µl TE-Puffer (2.1.2.2) aufgenommen. Die hierfür eingesetzten Oligonukleotid-Primersequenzen können dem Abschnitt 7.1.2 entnommen werden.

PCR-Reaktionsansatz mit SapphireAmp® Polymerase

SapphireAmp® Fas PCR Master Mix		6,25 µl
Primer <i>forward</i> (5 pmol/µl)		0,7 µl
Primer <i>reverse</i> (5 pmol/µl)		0,7 µl
Template-DNA (ca. 20 ng/µl)		2,0 µl
H ₂ O _{UF}	ad	12,5 µl

Tabelle 8: PCR-Programm für Standard PCR-Reaktionsansatz mit der SapphireAmp® Polymerase.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	60	1
Denaturierung	98	5	34
Primer- <i>Annealing</i>	T _A	5	
Elongation	72	10/kb	
Terminale Elongation	72	300	1

(T_A = *Annealing*-Temperatur)**2.3.2.4 PCR zur Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden**

Zur Untersuchung von Rekombinationsereignissen der in der vorliegenden Arbeit ausgewählten Pilze wurde eine Southern Blot Analyse (2.3.10) durchgeführt. Die hierfür benötigten DIG (Digoxigenin-11-dUTP)-markierten DNA Sonden wurden über den nachfolgenden PCR-Reaktionsansatz und unter zu Hilfenahme von der DreamTaq™ Polymerase generiert. Die Primersequenzen zur Überprüfung des jeweiligen Rekombinationsereignisses wurde entsprechend der gewünschten Amplifikatgröße der DIG-markierten DNA-Sonden von etwa 300 bis 400 bp gewählt und können dem Abschnitt 7.1.3 entnommen werden. Als *Template*-DNA wurde jeweils genomische DNA des zu untersuchenden Pilzes herangezogen.

PCR-Reaktionsansatz zur Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden

DreamTaq™-Puffer mit MgCl ₂ (10x)		5,0 µl
dNTPS-Mix (10 mM)		1,0 µl
DIG-11-dUTPS (1 nmol/µl)		1,5 µl
Primer <i>forward</i> (5 pmol/µl)		2,5 µl
Primer <i>reverse</i> (5 pmol/µl)		2,5 µl
Template-DNA (ca. 100 ng/µl)		1,0 µl
DreamTaq™ Polymerase		1,0 µl
H ₂ O _{UF}	ad	50,0 µl

Tabelle 9: Programm für PCR-Reaktionsansatz mit der DreamTaq™ Polymerase.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	1
Denaturierung	95	30	34
Primer-Annealing	T _A	30	
Elongation	72	60/kb	
Terminale Elongation	72	300	1

(T_A = Annealing-Temperatur)

2.3.3 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA im Zuge der Vektorgenerierung, der Analyse von bereits generierten Vektoren und von pilzlicher genomischer DNA für eine Southern Blot Analyse wurde, wie in Sambrook und Russell (2001) beschrieben, durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001). Die Reaktionsparameter des Restriktionsverdaus wurden gemäß den Herstellerangaben der eingesetzten Restriktionsendonukleasen gewählt. Im Allgemeinen wurden Restriktionsverdauansätze für analytische Zwecke für 1,5 h, für Klonierungszwecke für mindestens 3 h und für Southern Blot Analyse über Nacht inkubiert. Die jeweilige Reaktion wurde entweder durch eine Hitzeinaktivierung oder durch Zugabe des Gelladepuffers (2.3.4) beendet.

Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke

Plasmid-DNA	x µl (250-500 ng)
Enzypuffer (10x)	2,0 µl
Restriktionsendonuklease (10 U/µl)	1,0 µl
H ₂ O _{UF}	ad 20,0 µl

Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke

Plasmid-DNA	x µl (~1,5 µg)
Enzypuffer (10x)	10,0 µl
Restriktionsendonuklease (10 U/µl)	2,0 µl
H ₂ O _{UF}	ad 100,0 µl

Um eine mögliche Re-Ligation eines bereits durch Restriktionsenzymen geöffneten Plasmids zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung der freien 5'-Phosphatenden des linearisierten Plasmids durch die Thermo Scientific™ FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase gemäß der Herstellerangabe durchgeführt.

Restriktionsverdauansatz für Southern Blot Analyse

Genomische DNA	x µl (~4 µg)
Enzypuffer (10x)	20,0 µl
Restriktionsendonuklease (10 U/µl)	5,0 µl
H ₂ O _{UF}	ad 200,0 µl

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer molekularen Größe nach einem Restriktionsverdau (2.3.3) oder der Amplifikate nach einer PCR (2.3.2) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese bei konstanter Spannung von 80 bis 120 Volt nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001). Hierfür wurden 1 % [w/v]-Agarosegele in TAE-Puffer (2.1.2.4) angesetzt und eine Standard Gelkammer (Bio-Rad Laboratories, Inc.), befüllt mit TAE-Puffer, verwendet. Um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente determinieren zu können, wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) als Referenz eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Applizieren in die Agaroseladevertiefungen des Agarosegels mit 1 x Ladepuffer (6 x Orange Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) versetzt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Agarosegel für ca. 5 bis 10 s in eine Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) gefärbt und für etwa 1 h in H₂O_{deion} entfärbt. Zur Detektion und Dokumentation wurde das Geldokumentationssystem Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) unter zu Hilfenahme der Software Image Lab™_{6.0.1} (Bio-Rad Laboratories, Inc.) eingesetzt. Hierbei wurde eine UV-Bestrahlung von $\lambda = 365$ nm verwendet, um die Emission der mit Ethidiumbromid interkalierenden DNA-Fragmente detektieren zu können.

Zur Isolierung der aufgetrennten DNA-Fragmenten nach der Gelelektrophorese wurden diese aus dem Agarose-Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und mit Hilfe des GeneJET™ Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kits gemäß den Herstellerangaben aus den Gelstücken extrahiert.

2.3.5 Klonierungsstrategien

Zur Generierung der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Geninaktivierungsmutanten der Siderophor-Biosynthese wurden die DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Zielgenen entweder vollständig oder partiell mit der kodierenden DNA-Sequenz einer Resistenzkassette ersetzt. Somit sollte gewährleistet werden, dass die Biosynthese der Siderophore in den Zielorganismen *Pch* und *Pmi* durch disruptierte putative Gene verhindert wird. Für die Konstrukte wurden spezifische Gensequenzbereiche aus der jeweiligen Wildtyp-Sequenz von etwa 500 bp gewählt, welche die Resistenzkassette flankierten, um eine zielgerichtete Mutagenese im Genom des jeweiligen Zielorganismus zu ermöglichen. Eine ausführliche Beschreibung der Konstruktionsstrategien der jeweilig generierten Mutanten ist dem Anhang im Abschnitt 7.2 zu entnehmen.

2.3.6 Gibson Assembly

Die Generierung der in der Arbeit verwendeten Geninaktivierungs- oder Komplementationsvektoren (7.2) erfolgte unter Zuhilfenahme der Gibson Assembly® (Gibson *et al.*, 2009) Methode, welche eine simultane Ligation mehrerer DNA-Fragmenten ermöglicht. Hierfür wurde der NEBuilder® High-Fidelity DNA Master Mix von New England Biolabs® eingesetzt und gemäß den Herstellerangaben vorgegangen. Zur Planung der Oligonukleotid-Primer (7.1.1), welche für das Amplifizieren der für die Assemblierung benötigten DNA-Fragmente verwendet worden sind, wurde das NEBuilder® Assembly Tool (<http://nebuilder.neb.com>, New England Biolabs®) herangezogen. Die DNA-Fragmente wurden hierfür, wie in 2.3.2. und 2.3.4 beschrieben, amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt. Der für die Assemblierung benötigte Zielvektor wurde mit den entsprechenden Enzymen der jeweiligen Klonierungsstrategie (2.3.5), wie in 2.3.3 (Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) beschrieben, geöffnet und dephosphoryliert. Die Ligation erfolgte mit einem drei- oder fünffachen Überschuss des Insertfragments im Vergleich zum Vektorgerüst.

2.3.7 Transformation von *Escherichia coli*

2.3.7.1 Herstellung von elektrokompententen *Escherichia coli* Zellen

Zur Herstellung von elektrokompententen *Escherichia coli* Zellen wurde von einer Stammkultur der NEB®-10-beta Competent *E. coli*-Zellen von New England Biolabs® ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Streptomycin durchgeführt, welcher über Nacht (13 bis 16 h) bei 37 °C inkubiert wurde. Im Anschluss wurde mit einer Einzelkolonie eine 5 ml-LB (M7)-Vorkultur inokuliert, welche über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert wurde. Am darauffolgenden Tag wurde eine 500 ml LB-Hauptkultur in einem Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen mit der 5 ml-Vorkultur versetzt. Diese Hauptkultur wurde im Anschluss bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD₅₇₈) von 0,7 bis 1,0 angezogen. Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden steril und auf Eis durchgeführt. Die *E. coli*-Zellen wurden nach Erreichen der gewünschten OD₅₇₈ für 10 min bei 4 °C und 8000 rpm pelletiert und anschließend in 100 ml MOPS-Glycerin-Puffer (2.1.2.4) resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut für 10 min bei 4 °C und 8000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml MOPS-Glycerin-Puffer aufgenommen. Nach einem weiteren 10-minütigen Zentrifugationsschritt unter den gleichen Parametern wurde das Zellpellet in 2 ml MOPS-Glycerin-Puffer

resuspendiert, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße zu je 100 µl aliquotiert, mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.7.2 Transformation von elektrokompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Für die Generierung der in der Arbeit verwendeten Geninaktivierungs- und Komplementationsvektoren (7.2) wurden die *E. coli* Zellen NEB®-10-beta Competent *E. coli*-Zellen von New England Biolabs® verwendet. Die Transformation erfolgte nach der Elektroporationsmethode von Dower *et al.* (Dower *et al.*, 1988). Hierfür wurden elektrokompetente *E. coli*-Zellen (2.3.7.1) auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Gibson-Assembly-Ansatz (2.3.6) versetzt. Die Zellen wurden in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 1 mm) transferiert und einem elektrischen Impuls bei 25 µF, 1,7 kV und 200 Ω unter Zuhilfenahme des GenePulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) unterzogen. Im Anschluss wurden diese umgehend mit 300 µl SOC-Regenerationsmedium (M9) versetzt und in einem 15 ml-Reaktionsgefäß mit Belüftungsfunktion bei 37 °C und 220 rpm für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zur Selektion auf LB (M7)-Agarplatten (mit 60 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C herangezogen. Am darauffolgenden Tag wurden gewachsene einzelne *E. coli*-Kolonien in 5 ml LB-Medium transferiert und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte zur weiteren Analyse der Transformanten eine Isolierung des Plasmids (2.3.1.2) mit anschließender Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke).

2.3.8 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

2.3.8.1 Herstellung von chemisch-kompetenten *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung von chemisch-kompetenten *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen wurde von einer Stammkultur von *AGL1*-Zellen ein Verdünnungsausstrich auf LB (M7)-Agarplatten (mit 60g/ml Rifampicin) durchgeführt. Die Agarplatten wurden für 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurde mit mehreren *AGL1*-Kolonien eine 5 ml LB -Kultur inokuliert, welche bei 28 °C und 220 rpm über Nacht herangezogen wurde. Am darauffolgenden Tag wurden 500 ml LB-Medium in einem 1 L-Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen mit dieser Bakterienkultur inokuliert. Die Hauptkultur wurde bei 28 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Zelldichte (OD₆₀₀) von 0,5 bis 0,8 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurde die Kultur für 10 min auf Eis gelagert und die Zellen im Anschluss bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im weiteren Verlauf in 100 ml 20 mM CaCl₂-Lösung

resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 15 min unter den gleichen Parametern. Anschließend wurde das Zellpellet in 4 ml 20 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen, in 2,0 ml-Reaktionsgefäßen zu je 100 µl aliquotiert, mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.8.2 Transformation von chemisch-kompetenten *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Zur Generierung der in der vorliegenden Arbeit genannten Geninaktivierungs- und Komplementationsmutanten (7.2) wurden chemisch-kompetente *A. tumefaciens* Zellen des Stammes *AGL1* verwendet. Hierfür wurden kompetente *AGL1*-Zellen von einem Aliquot (2.3.8.1) auf Eis aufgetaut, welche im Anschluss mit etwa 500 ng des Zielvektors versetzt wurden. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 5 min inkubiert und anschließend auf Eis für weitere 5 min gelagert. Die Zellen wurden im weiteren Verlauf in 300 µl LB (M7)-Medium aufgenommen, in ein 15 ml-Reaktionsgefäß mit Belüftungsfunktion transferiert und bei 37 °C und 220 rpm für 4 bis 6 h regeneriert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf vorgewärmte LB (M7)-Agarplatten (mit 60 µg/ml Rifampicin und 60 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und bei 28 °C für 3 Tage im Dunkeln inkubiert.

2.3.9 Transformation von *Phaeoacremonium minimum* und *Phaeoconiella chlamydospora*

Für die Generierung der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Mutanten von *Pch* und *Pmi* wurde eine *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation (ATMT) geführt. Hierfür wurden von transformierten *AGL1*-Zellen (2.3.8.2), welche auf LB (M7)-Agarplatten (mit 60 µg/ml Rifampicin und 60 µg/ml Kanamycin) zuvor herangezogen wurden, mehrere Kolonien zur Inokulation einer 5 ml-Kultur aus LB (M7)-Flüssigmedium (mit 60 µg/ml Rifampicin und 60 µg/ml Kanamycin) eingesetzt. Diese wurde anschließend über Nacht bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 2 ml der Bakterienkultur bei 8000 rpm für 2 min zentrifugiert, das Zellpellet unter sterilen Bedingungen in 1 ml AIM (M1)-Flüssigmedium resuspendiert und zu 4 ml AIM (M1)-Flüssigmedium in einem 15 ml-Reaktionsgefäß mit Belüftungsfunktion überführt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen für 6 bis 8 h bei 28 °C und 220 rpm inkubiert und in einem 1:1-Verhältnis anschließend mit einer zuvor vorbereiteten Konidien suspension des zu transformierenden Pilzes versetzt. Die Konidien suspension wurde am Vortag abends unter Zuhilfenahme einer für ca. 11 Tage bei RT auf Agarplatte herangewachsen Pilzkultur von *Pch* bzw. *Pmi* hergestellt. Hierfür wurden unter sterilen Bedingungen Konidien des zu transformierenden Pilzes von der bewachsenen Agarplatte mit einem Wattestäbchen steril entnommen und eine ca. 5 ml HMG (M3)-Flüssigkultur in einem

50 ml-Reaktionsgefäß inokuliert. Die Konidien suspension wurde anschließend über einlagiges Miracloth filtriert, die Konidien dichte mittels Zählkammer (Neubauer improved, Carl Roth GmbH + Co. KG) ermittelt und auf eine Konzentration von 2×10^5 Konidien/ml eingestellt. Von der Bakterien-Pilz-Mischung wurde im weiteren Verlauf jeweils 500 µl auf sterile Nitrocellulosefilter (Ø 47 mm, 0,45 µm Porengröße, Sartorius Stedim Biotech) pipettiert, welche auf AIM (M1)-Agarplatten (mit 200 µM Acetosyringon) ausgelegt waren. Diese Platten wurden nach einer kurzen Trocknungszeit für 72 h bei 27 °C im Dunkeln gelagert und die Nitrocellulosefilter im Anschluss auf Selektionsagarplatten (HMG (M3)-Medium mit 300 µg/ml Hygromycin oder 300 µg/ml Geneticin und jeweils 200 µg/ml Streptomycin und 300 µg/ml Cefotaxim) transferiert und bei RT erneut gelagert. Nach ca. 14 Tagen konnten Transformanten unter sterilen Bedingungen auf Selektionsagarplatten (HMG (M3)-Medium mit 300 µg/ml Hygromycin oder 300 µg/ml Geneticin) überführt werden.

2.3.10 Southern Blot Analyse

Zur Überprüfung des Rekombinationsereignisses der in dieser Arbeit generierten Geninaktivierungsmutanten von *Pch* und *Pmi* wurde eine Southern Blot Analyse gemäß den Vorschriften von Sambrook und Russell (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt.

2.3.10.1 Präzipitation, Restriktionsverdau und gelelektrophoretische Auftrennung von genomischer DNA

Zunächst wurde genomische DNA des jeweiligen Wildtyp Pilzes und von den zu untersuchenden Transformanten wie in 2.3.1.1 beschrieben isoliert. Jeweils 4 µg der genomischen DNA wurde mit ausgewählten Restriktionsenzymen in einem 200 µl Restriktionsverdauansatz (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Southern Blot Analyse) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Ansatz mit 200 µl Isopropanol versetzt, invertiert und für 20 min bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 13.200 rpm für 20 min. Das DNA-Pellet wurde mit Hilfe eines Konzentrators getrocknet, in 25 µl H₂O_{UF} mit 1x Loading-Dye aufgenommen und über ein 1 %-iges Agarosegel in TAE-Puffer (2.1.2.4) bei konstanter Spannung von 90 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenzmarker diente der Digoxigeninmarkierte DNA Molecular Weight Marker III und VII der Firma Roche Diagnostics GmbH.

2.3.10.2 Transfer der Nukleinsäure

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel in eine 0,25 M HCl-Lösung zur Depurinierung der DNA bei 40 rpm für 15 min unter

Zuhilfenahme eines Orbitalschüttlers geschwenkt und im Anschluss mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gespült. Es folgte ein Denaturierungs- und ein Neutralisationsschritt, während dessen das Agarosegel zweimal für 10 min in dem Denaturierungspuffer (2.1.2.3) und zweimal für weitere 10 min im Neutralisationspuffer (2.1.2.3) bei 40 rpm geschwenkt wurde. Zwischen den jeweiligen Arbeitsschritten wurde das Agarosegel mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gespült und anschließend zum Äquilibrieren für ca. 10 min mit 20x SSPE-Puffer (2.1.2.3) versetzt. Im weiteren Verlauf wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roti®-Nylon Plus, Carl Roth GmbH + Co. KG) mittels Kapillarblot nach dem Standardverfahren von Darling und Brickell (1996) über Nacht transferiert (Darling und Brickell, 1996). Am darauffolgenden Tag wurden die DNA-Fragmente unter Zuhilfenahme eines UVP UV-Crosslinkers (Typ FLX-20M, Vilber Lourmat) bei einer UV-Licht Bestrahlung für 40 s und einem kontinuierlichen Energiedichtegradienten von 0,120 bis 0 J/cm^2 auf der Nylonmembran fixiert.

2.3.10.3 Hybridisierung

Nach dem Quervernetzen der DNA-Fragmente mit der Nylonmembran wurde diese in eine Hybridisierungsröhre transferiert und mit 20 ml Hybridisierungspuffer (Roti®-Hybrid-Quick, Carl Roth GmbH + Co. KG) bei 65 °C für 1,5 h unter Rotation mit Hilfe eines Hybridisierungsinkubators versetzt. Anschließend wurde der Puffer entfernt und 20 ml Hybridisierungspuffer hinzugegeben, welcher mit der zuvor generierten Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde (2.3.2.4, 2.3.4) versehen und für 10 min bei 99 °C erhitzt worden war. Die Hybridisierung erfolgte bei 6 °C über Nacht wiederum unter Rotation und unter Zuhilfenahme eines Hybridisierungsinkubators.

2.3.10.4 Detektion

Nach erfolgter Hybridisierung über Nacht wurde am darauffolgenden Tag die Nylonmembran zur Detektion der DIG-markierten DNA-Sonde mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) vorbereitet. Hierfür wurde der Puffer in der Hybridisierungsröhre verworfen und die Membran bei 65 °C für jeweils 15 min zweimal mit 25 ml SSPE(2x) + 0,1 % SDS-Puffer (2.1.2.3) und zweimal mit 25 ml SSPE(0,2x) + 0,1 % SDS-Puffer (2.1.2.3) gewaschen, um ungebundene DNA-Sonden-Anteile zu entfernen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei RT. Die Nylonmembran wurde anschließend für 1 min mit 50 ml Waschpuffer (2.1.2.3) versetzt und für weitere 60 min mit 100 ml Blockingpuffer (2.1.2.3) versehen, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Im Anschluss wurde 1,5 μl Antikörper zu 20 ml Blockingpuffer hinzugegeben,

worin die Nylonmembran für etwa 30 min gelagert wurde. Nach zweimaligem Waschen der Membran in 50 ml Waschpuffer (2.1.2.3) für jeweils 15 min und einer dreiminütigen Inkubation in 20 ml Detektionspuffer (2.1.2.3) wurde die Nylonmembran in eine Kunststofffolie platziert, mit 1 ml Detektionslösung (bestehend aus Detektionspuffer und CPD-Star® (ready-to-us, Roche) in einem Verhältnis von 1:1) bedeckt, die Folie durch Einschweißen verschlossen und für 8 min bei RT gelagert. Anschließend wurde an einer Ecke die Folie geöffnet und die Detektionslösung sorgfältig herausgestrichen. Die in der Folie eingeschlossene Nylonmembran wurde im weiteren Verlauf in eine Expositionskassette transferiert und unter Ausschluss von Tageslicht unter Zuhilfenahme von Rotlicht ein Röntgenfilm auf die eingeschlossene Nylonmembran für etwa 30 bis 45 min platziert. Durch die Dephosphorylierung der an den Antikörper gebundenen Alkalischen Phosphatase des CPD-Stars® entsteht ein Chemolumineszenz-Signal, welches nach der Entwicklung des Röntgenfilms mit Hilfe der Entwicklermaschine CP1000 der Firma Agfa HealthCare GmbH (Bonn) detektiert werden konnte.

2.4 Phänotypische Charakterisierung

Um die Vitalität, der in der vorliegenden Arbeit generierten „*loss-of-function*“ Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pch* und *Pmi* im Vergleich zum Wildtyp analysieren zu können, wurden verschiedene phänotypische Untersuchungen in Bezug auf die Konidiogenese, dem vegetativen Wachstum und der Morphologie der jeweiligen Testorganismen durchgeführt.

2.4.1 Analyse der Konidiogenese

Zur Überprüfung der Konidiogenese der „*loss-of-function*“ Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurden die Testorganismen auf HMG (M3)-Festmedium für 14 Tage bei RT kultiviert. Mit Hilfe eines Korklochbohrers mit einem Durchmesser von 0,7 cm wurden Myzelagarrondelle der jeweiligen Kultivierungsplatte der zu untersuchenden Organismen ausgestanzt. Von diesen Myzelagarrondellen wurde je ein Rondell mittig auf eine HMG (M3)-Festmedium-Platte transferiert, welche anschließend für 24 Tagen bei RT kultiviert worden war. Die Testplatten wurden im dreifachen Replikat angefertigt. Im Anschluss wurde jeweils der Wachstumsdurchmesser der gebildeten Myzelfläche der zu untersuchenden Organismen auf den Agarplatten ermittelt, morphologische Unterschiede dokumentiert und die Testplatten mit 10 ml H₂O_{deion} zur Herstellung einer Konidiensuspension versetzt. Die Suspension wurde über einlagiges Mira cloth™ filtriert und deren Konidiendichte anschließend mittels

Zählkammer (Neubauer improved, Carl Roth GmbH + Co. KG) jeweils bestimmt und dokumentiert.

2.4.2 Analyse des Wachstumsverhaltens unter Anwesenheit von oxidativem Stress

Um das Wachstumsverhalten der generierten „*loss-of-function*“ Mutanten von *Pch* und *Pmi* im Vergleich zum Wildtyp und unter Anwesenheit von reaktivem Sauerstoffspezies (*ROS*) zu untersuchen, wurden die Testorganismen zunächst auf HMG-Festmedium für 14 Tage bei RT kultiviert. Im Anschluss wurden mit einem Korklochbohrer mit einem Durchmesser von 0,7 cm jeweils Myzelagarrondelle von diesen ausgestant, je ein Myzelagarrondell auf HMG (M3)-Festmedium (versetzt mit 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,005 % und 0 % H₂O₂) mittig platziert und für 4 Wochen bei RT kultiviert. Die Testplatten wurden im dreifachen Replikat angefertigt. Im Anschluss wurde jeweils der Wachstumsdurchmesser der gebildeten Myzelfläche der Testorganismen ermittelt und morphologische Unterschiede dokumentiert.

2.4.3 Analyse des Wachstumsverhaltens unter Eisenmangelbedingungen

Um das Wachstumsverhalten der generierten „*loss-of-function*“ Mutanten von *Pch* und *Pmi* im Vergleich zum Wildtyp unter Eisenmangelbedingungen zu untersuchen, wurden die Testorganismen zunächst auf HMG (M3)-Festmedium für 14 Tage bei RT kultiviert. Im Anschluss wurden mit einem Korklochbohrer mit einem Durchmesser von 0,7 cm jeweils Myzelagarrondelle von diesen ausgestant, je ein Myzelagarrondell auf Sundström (M10)-Festmedium und als Kontrolle auf eisenhaltiges Sundström (M10 mit 10 µM FeCl₃)-Festmedium mittig platziert und für 4 Wochen bei RT kultiviert. Die Testplatten wurden im dreifachen Replikat angefertigt. Im Anschluss wurde jeweils der Wachstumsdurchmesser der vegetativ gebildeten Myzelfläche der Testorganismen ermittelt und morphologische Unterschiede dokumentiert.

2.4.4 Analyse des Wachstumsverhaltens unter Kokultivierungsbedingung

Um das Wachstumsverhalten der generierten Esca-assoziierten „*loss-of-function*“ Mutanten von *Pch* und *Pmi* während der Kokultivierung mit einem Esca-assoziierten Wildtyp (*Ela*, *Fmed*, *Pch* bzw. *Pmi*) unter Eisenmangelbedingungen zu untersuchen, wurden die Testorganismen zunächst auf HMG-Festmedium für 14 Tage bei RT kultiviert. Im Anschluss wurden mit einem Korklochbohrer von 0,7 cm-Durchmesser jeweils Myzelagarrondelle von den Kulturen ausgestant, je ein Myzelagarrondell auf Sundström (M10)-Festmedium und als Kontrolle auf eisenhaltigem Sundström (M10 mit 10 µM FeCl₃)-Festmedium in einem Abstand von 2,5 cm zu jeweils einem Wildtyp der Esca-assoziierten Pilze *Ela*, *Fmed*, *Pch* bzw. *Pmi* platziert und

für 4 Wochen bei RT und bei 30 °C kultiviert. Im Anschluss wurde das jeweilige Wachstumsverhalten in Anlehnung an Bertrand *et al.* (Bertrand *et al.*, 2013) dokumentiert.

2.4.5 Infektionsuntersuchung der generierten „*loss-of-function*“-Mutanten an Weinrebenstecklingen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der generierten „*loss-of-function*“-Mutanten der Esca-assoziierten Pilze *Pch* und *Pmi* im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp auf das Wachstumsverhalten von Weinrebenstecklingen unter Laborbedingungen untersucht. Die Studien wurden in Kooperation mit [REDACTED] durchgeführt (Abb. 4). Hierfür wurden Einaugenstecklinge der Weinrebensorte Müllerthurgau mit einer Länge von ca. 12 cm jeweils mit einem Bohrloch von 0,5 cm-Durchmesser in einem Abstand von ca. 3 cm unterhalb zur Axillarknospe versehen. In das Bohrloch eines Stecklings wurde ein Myzelagarrondell mit einem Durchmesser von 0,4 cm des zu untersuchenden Testorganismus, welcher zuvor auf 2 % Biomalz (M8)-Festmedium für ca. 12 Tage bei RT kultiviert worden war, platziert oder als Kontrolle ein Agarrondell (Durchmesser von 0,4 cm) mit 2 % Biomalz (M8)-Festmedium. Die Bohrlöcher wurden anschließend jeweils mit einem Parafilm®M-Streifen verschlossen. Von den inokulierten Stecklingen mit den Testorganismen und der Kontrolle wurden jeweils zehn biologische Replikate angefertigt. Im weiteren Verlauf wurden die inokulierten Stecklinge in Perlite gesteckt, in eine Anzuchtsbox mit feuchter Kammer überführt und im Gewächshaus des [REDACTED] unter optimalen klimatischen Bedingungen für 5 Wochen kultiviert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Wurzelbildung und der Blattaustrieb des jeweiligen Einaugenstecklings bonitiert und dokumentiert.

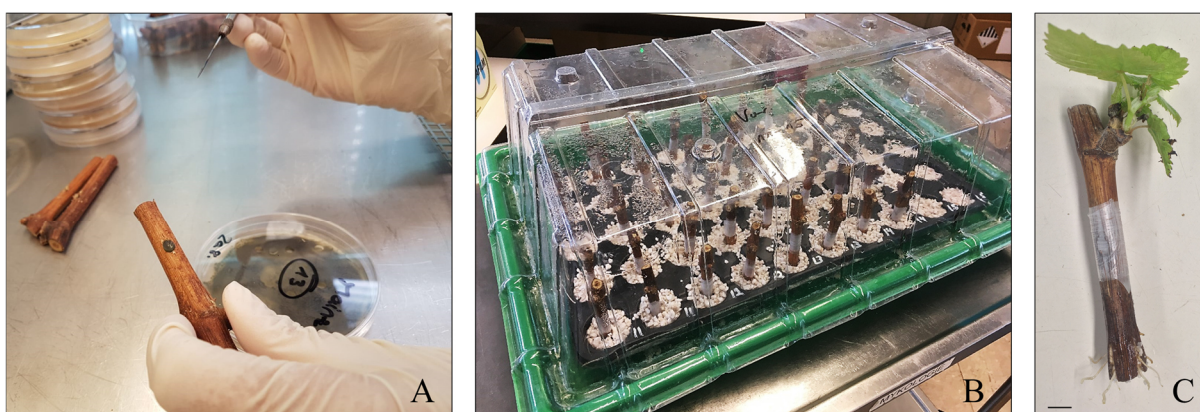


Abbildung 4: Durchführung der Infektionsuntersuchung von Weinrebenstecklingen. A: Inokulation des Weinreben-Einaugenstecklings. B: Überführung und Inkubation der inokulierten Stecklinge in einer Anzuchtsbox. C: Bonitur des Einaugenstecklings nach fünfwöchiger Inkubation unter Gewächshausbedingungen. (Maßstabsbalken: 1 cm)

2.5 Fermentation und analytische Methoden

Für die Analyse der Siderophor-Biosynthese der Esca-assoziierten Pilze und des Wurzelfäule-assoziierten Pilzes *Roesleria subterranea* (*Rsub*) wurden die zu untersuchenden Organismen in verschiedenen Kultivierungsmaßstäben von Sundström (M10)-Medium fermentiert. Die Fermentationen fanden stets bei RT und 120 rpm unter Zuhilfenahme des Orbitalschüttlers (Typ AG15, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) statt. Nach Beendigung der jeweiligen Fermentation wurde die Kulturbrühe im Falle der Kultivierung mit *Ela*, *Fmed* und *Rsub* über einen Büchner-Trichter und eine Vakuum-Saugflasche vom Myzel separiert. Hingegen wurde im Anschluss an die Fermentation mit *Pch* oder *Pmi* die Kulturbrühe mittels Zentrifugation bei RT und 4000 rpm (Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg) von dem jeweiligen Pilzmyzel getrennt. Sowohl die Kulturbrühe als auch das Myzel der zu untersuchenden Pilze wurde im weiteren Versuchsdurchlauf wie in (2.5.1 und 2.5.2) beschrieben aufbereitet und die resultierenden Rohextrakte mit Hilfe von HPLC- und HPLC-MS-Analysen (2.5.4) untersucht.

2.5.1 Fermentation in Submerskulturen zur Identifizierung von extrazellulären Siderophoren

Zur Identifizierung der extrazellulären Siderophore wurden die zu untersuchenden Organismen zunächst in HMG (M3)-Flüssigmedium in einem Maßstab von 50 ml, 125 ml, 250 ml oder 500 ml entsprechend dem jeweiligen Kulturvolumen in Erlenmeyerkolben mit einem Volumen, welches doppelt so groß im Vergleich zum Kultivierungsmedium war, bei RT und 120 rpm für fünf bis sieben Tagen kultiviert. Hierfür wurde die Vorkultur entsprechend dem Kultivierungsmaßstab mit 10, 20, 40 oder 80 Myzelagarstücken mit einer Größe von etwa 0,5 x 0,5 cm des zu analysierenden Pilzes inokuliert. Die Vorkultur wurde im Anschluss der Kultivierung jeweils für 5 min bei RT und 4000 rpm zentrifugiert und das Myzelpellet in 30 ml Sundström-Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und im Anschluss entsprechend des Vorkulturmaßstabs in 125 ml, 250 ml, 500 ml oder 1 L Sundström (M10)-Medium und als Kontrolle in Sundström-Medium mit 10 μ M FeCl₃ in Erlenmeyerkolben überführt. Wöchentlich wurden Proben entnommen, welche einem indirekten Nachweis der Anwesenheit extrazellulärer Siderophore im Kulturüberstand unterzogen wurden (Sujatha und Ammani, 2013). Hierfür wurden einem 200 μ l Kulturüberstand 10 μ l einer 100 mM FeCl₃-Lösung (FeCl₃ in H₂OUF) hinzugefügt. Bei Anwesenheit von Siderophoren im Kulturüberstand konnte ein Farbumschlag von gelb nach rot-braun beobachtet werden. Nach Beendigung der Fermentation wurde die Kulturbrühe vom Myzel separiert und mit 10 % w/v des Kulturfiltrat(KF)volumens entsprechend mit dem Polymerharz XAD-16 versetzt. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei RT und 120 rpm.

Anschließend wurde das Polymerharz von dem Kulturfiltrat getrennt und dreimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$, dessen Volumen 30 % des KF entsprach, gespült. Die Extraktion der Siderophore erfolgte mit Methanol, dessen Volumen mit 40 % des KF-Volumens korrespondierte. Das Lösungsmittel wurde im weiteren Verlauf unter Zuhilfenahme eines Rotationsverdampfers bei 45 °C bis zur Trockne eingengt, das resultierende Rohextrakt mit Methanol rückgelöst und in 4 ml-Probengefäße (Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) überführt. Nach erneuter Evaporation mittels Vakuumzentrifugation wurde das Extrakt bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das Myzel wurde hingegen wie in 2.5.2 aufbereitet und für Analysen von intrazellulären Siderophoren verwendet.

2.5.2 Fermentation in Submerskulturen zur Identifizierung von intrazellulären Siderophoren

Zur Identifizierung der intrazellulären Siderophore der zu untersuchenden Organismen wurden die Testorganismen wie in 2.5.1 beschrieben jeweils in Sundström-Medium mit 10 μM FeCl_3 kultiviert. Nach Beendigung der Fermentation wurde das Myzel von der Kulturbrühe separiert, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ gewaschen, erneut separiert, lyophilisiert, mit Hilfe von Mörser und Pistille mechanisch zerkleinert, mit Methanol überschichtet und mittels Magnets und Magnetrührers rührend für 1,5 h inkubiert. Zur Herstellung des Konidienextrakts wurde die Kulturbrühe über einlagige Miracloth filtriert, das Filtrat für 5 min bei RT und 4000 rpm zentrifugiert, das Konidienpellet mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ gewaschen, erneut für 5 min bei RT und 4000 rpm zentrifugiert, separiert, lyophilisiert und mit Hilfe von Mörser und Pistille mechanisch zerkleinert. Das Konidienpellet wurde anschließend mit Methanol überschichtet und mittels Magnets und Magnetrührers rührend für 1,5 h inkubiert. Das Methanol wurde im weiteren Verlauf jeweils filtriert, in einen Rundkolben überführt und unter Zuhilfenahme eines Rotationsverdampfers bei 45 °C bis zur Trockne eingengt. Das resultierende Rohextrakt wurde im weiteren Verlauf in Methanol rückgelöst, in ein 4 ml-Probengefäße transferiert, erneut mittels Vakuumzentrifugation evaporiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Identifizierung von pilzlichen Siderophoren in der Weinrebenpflanze

Zur möglichen Identifizierung von den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Siderophore, welche von den Esca-assoziierten Pilzen *Pch*, *Pmi*, *Fmed* und *Ela* unter Laborbedingungen produziert wurden, auch in Esca-assoziierten Weinreben zu detektieren, wurden Blattmaterial, Querschnitte von Weinrebenstämme und Wurzelmaterial, welche vom [REDACTED] und von [REDACTED] freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden sind, zunächst lyophilisiert und anschließend mit Hilfe von Mörser und Pistille

mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial mit Methanol überschichtet und mittels Magnets und Magnetrührers rührend für 1,5 h inkubiert. Im Anschluss wurde das Methanol filtriert, in einen Rundkolben überführt und unter Zuhilfenahme eines Rotationsverdampfers bei 45 °C bis zur Trockne eingengt. Das resultierende Rohextrakt wurde im weiteren Verlauf in Methanol rückgelöst, in ein 4 ml-Probengefäße transferiert, erneut mittels Vakuumzentrifugation evaporiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Analytische, präparative HPLC, HPLC-MS, LC-MS/MS

Die in der Arbeit durchgeführten analytischen Untersuchungen der extra- und intrazellulären Siderophore der gewonnenen Extrakte erfolgten unter Zuhilfenahme der *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (2.5.4.1) und der HPLC-Massenspektrometrie (MS) (2.5.4.2). Hierfür wurden die Proben stets auf eine Konzentration von 5 mg/ml mit Methanol eingestellt, mit FeCl₃ versetzt und der Überstand zur Messung nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm verwendet. Die chromatographische Auftrennung des zu untersuchenden Rohextrakts wurde mit Hilfe der präparativen HPLC (2.5.4.4) durchgeführt. Der Siderophoren-Standard Fusarinin C wurde freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Siderophoren-Standards wurden vom IBWF bezogen.

2.5.4.1 Analytische HPLC

Für die Analyse der zu untersuchenden Extrakten mit Hilfe der analytischen HPLC wurde ein modulares System von Shimadzu Deutschland GmbH mit den Modulen LC-20AD Prominence LIQUID CHROMATOGAPH, CTO-20AC Prominence COLUMN OVEN, DGU-20A₃ Prominence DEGASSER, SIL-20AC_{HT} Prominence AUTO SAMPLER und CBM-20A Prominence COMMUNICATIONS BUS MODULE in Verbindung mit einem Detektor (SPD-M20A Prominence DIODE ARRAY DETECTOR, Shimadzu Deutschland GmbH) verwendet. Die Chromatographie wurde als binärer Gradient mit den in den nachfolgenden Tabelle 10 und 11 aufgeführten Gradientenparameter und unter Verwendung einer *Reversed Phase* C18-Trennsäule (SunFire® C18, 4,6 x 250 mm, 5 µm, temperiert auf 20 °C) durchgeführt. Als Elutionsmittel wurden H₂O_{UF} + 0,1 % Trifluoressigsäure (Eluent A) und 100 % Acetonitril (Eluent B) eingesetzt. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Es wurden 20 µl des zu untersuchenden Extrakts pro Durchlauf aufgetragen. Zur Vorbereitung einer chromatographischen Auftrennung eines Rohextrakts mit Hilfe der präparative HPLC wurden die in Tabelle 11 aufgelisteten Gradientenparameter eingesetzt. Hierbei wurde eine Flussrate von 0,8 ml/min verwendet.

Tabelle 10: Standard-Gradientenparameter der analytischen HPLC. Eluent A: H₂O_{UF} + 0,1 % Trifluoressigsäure, Eluent B: 100% Acetonitril.

Flussrate [ml/min]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
1	0	99	1
	20	1	100
	24	1	100
	25	99	1
	30	99	1

Tabelle 11: Gradientenparameter der analytischen HPLC zur Vorbereitung einer chromatographischen Auftrennung eines Extrakts über die präparative HPLC. Eluent A: H₂O_{UF} + 0,1 % Trifluoressigsäure, Eluent B: 100 % Acetonitril.

Flussrate [ml/min]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,8	0	99	1
	20	50	50
	23	1	100
	25	1	100
	26	99	1
	30	99	1

2.5.4.2 Analytische HPLC-MS

Für die analytischen Untersuchungen der Extrakte unter Zuhilfenahme der HPLC-MS wurde das HP-LC/MSD-System Series 1100 der Firma Hewlett-Packard eingesetzt. Die chromatographische Auftrennung erfolgte mit der *Reversed Phase* C18-Trennsäule (Superspher 100, 125 x 4 mm, 4 µm, Merck), welche auf 40 °C temperiert wurde. Die Ionisierung wurde hierbei über *Electrospray Ionization* (ESI) im *full scan*- oder SIM (*Single Ion Monitoring*)-Mode bei einer Kapillarspannung von 4600 V (positiv) bis 5200 V (negativ) durchgeführt. Die Verdampfungstemperatur betrug 400 °C und die Fragmentorspannung 140 V. Als Elutionsmittel wurden H₂O_{UF} + 0,1 % Ameisensäure (Eluent A) und 100 % Acetonitril (Eluent B) eingesetzt und die in den nachfolgenden Tabellen 12 und 13 aufgeführten Gradientenparameter verwendet. Die UV-Vis- und MS-Spektren sowie die Retentionszeiten der chromatographisch aufgetrennten Metabolite der zu analysierenden Extrakte wurden mit den Einträgen der Datenbank des IBWF abgeglichen, um bereits bekannte Siderophore identifizieren zu können. Die einzelnen Messungen wurden von [REDACTED] durchgeführt.

Tabelle 12: Standard-Gradientenparameter (I) der analytischen HPLC-MS. Eluent A: H₂O_{UF} + 0,1 % Ameisensäure, Eluent B: 100 % Acetonitril.

Flussrate [ml/min]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,45	0	99	1
	20	0	100
	24	0	100
	25	99	1

Tabelle 13: Gradientenparameter (II) der analytischen HPLC-MS. Eluent A: H₂O_{UF} + 0,1 % Ameisensäure, Eluent B: 100 % Acetonitril.

Flussrate [ml/min]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,45	0	99	1
	20	50	50
	23	1	100
	25	1	100
	26	99	1
	30	99	1

2.5.4.3 Analytische LC-MS/MS

Des Weiteren wurden *Liquid Chromatography*-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Analysen von Kulturfiltratextrakten zur Identifizierung von Siderophoren

(UCSD, California) und eine anschließende Prozessierung der Daten von durchgeführt. Die Methoden-Beschreibung ist dem Preprint von Aron *et al.* (Aron *et al.*, 2019a) zu entnehmen. Die Daten wurden auf <ftp://massive.ucsd.edu/MSV000082999/> hinterlegt und mithilfe der MS/MS-Spektrum-Bibliothek und der spektralen Vernetzung über GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) auf gnps.ucsd.edu (Wang *et al.*, 2016; Aron *et al.*, 2019b) ausgewertet. GNPS verwendet ein MScuster-Algorithmus, um identische Spektren zu konsolidieren (Frank *et al.*, 2008). Die Konsensus-Spektren werden im weiteren Verlauf miteinander verglichen, gegeneinander bewertet und in Abhängigkeit zur spektralen Similarität in ein molekulares Spektral-Netzwerk organisiert (Floros *et al.*, 2017). Zur Visualisierung des molekularen Netzwerks wurde das Programm Cytoscape 3.7.1 (Shannon *et al.*, 2003) verwendet. Die Visualisierung der MS/MS-Fragmentationsspektren erfolgte über die XcaliburTM-Software von Thermo Fisher Scientific.

2.5.4.4 Präparative HPLC

Für die chromatographische Auftrennung des zu untersuchenden Rohextrakts mit Hilfe der präparativen HPLC wurde ein modulares System von Shimadzu Deutschland GmbH mit den Modulen LC-8A PREPARATIVE LIQUID CHROMATOGRAPH, SCL-10A_{VP} SYSTEM CONTROLLER, FRC-10A FRACTION COLECTOR in Verbindung mit einem Detektor (SPD-M10_{VP} DIODE ARRAY DETECTOR, Shimadzu Deutschland GmbH) verwendet. Die Chromatographie wurde als binärer Gradient mit den in der nachfolgenden Tabelle 14 aufgeführten Gradientenparameter und unter Verwendung einer *Reversed Phase* C18-Trennsäule (SunFire® C18 OBDTM, 19x250 mm, 5 µm, temperiert auf 20 °C) durchgeführt.

Als Elutionsmittel wurden $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}} + 0,1 \%$ Trifluoressigsäure (Eluent A) und 100 % Acetonitril (Eluent B) eingesetzt. Die Flussrate betrug 15 ml/min. Der Fraktionssammler wurde auf ein Volumen von 1 ml eingestellt. Die Messungen wurden von [REDACTED] durchgeföhrt.

Tabelle 14: Gradientenparameter der präparative HPLC zur chromatographischen Auftrennung eines Rohextrakts. Eluent A: $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}} + 0,1 \%$ Trifluoressigsäure, Eluent B: 100 % Acetonitril.

Flussrate [ml/min]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
15	0	99	1
	20	50	50
	23	1	100
	25	1	100
	26	99	1
	30	99	1

3 Ergebnisse

Siderophore sind niedermolekulare Verbindungen, welche sich durch eine hohe Affinität zu Eisen auszeichnen (Winkelmann, 1992). Die meisten Bakterien und Pilze synthetisieren diese, um aus der unmittelbaren extrazellulären Umgebung Eisen in die Zelle aufnehmen zu können. Des Weiteren werden von den meisten Pilzen Siderophore auch zur intrazellulären Eisenlagerung produziert, um sorgfältig die Eisenhomöostase regulieren zu können. (Matzanke *et al.*, 1987; Haas, 2003) In einigen Studien über Pilz-Wirt-Interaktionen wurden pilzliche Siderophore bereits als Virulenzfaktoren beschrieben (Weinberg, 1999; Hissen *et al.*, 2005; Oide *et al.*, 2006; Greenshields *et al.*, 2007). Da bisher weder die molekularen Mechanismen der Pilz-Pilz- noch der Pilz-Pflanzen-Interaktionen des Esca-Krankheitskomplexes im Hinblick auf die Ätiologie der Krankheit in Gänze verstanden worden sind (Fischer und Peighami Ashnaei, 2019), wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die Siderophor-Biosynthese in den Esca-assoziierten Pilzen *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*), *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*), *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) und *Eutypa lata* (*Ela*) gesetzt, um Siderophore als potenzieller Virulenzfaktor dieser Phytopathogenen diskutieren zu können. In einem kleineren Teil der Arbeit wurde des Weiteren die Siderophor-Biosynthese des Weinrebenpathogens *Roesleria subterranea* (*Rsub*), der mit der Wurzelfäule von Weinreben assoziiert wird (Höfer, 1992), untersucht, da auch wenig über dessen Wirt-Pathogen-Interaktion bekannt ist und darüber hinaus keine effizienten Kontrollmechanismen zur Eindämmung dieser Krankheit derzeit verfügbar sind (Neuhauser *et al.*, 2011). Dazu wurde im ersten Abschnitt der Arbeit die Identifizierung der Siderophore (3.1, 3.2) und im zweiten Abschnitt der Siderophor-Biosyntheseweg (3.3, 3.4) der aufgeführten Pilzen thematisiert.

3.1 Identifizierung der synthetisierten Siderophore von Esca- und Wurzelfäule-assoziierten Pilzen

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die Produktion der Siderophore in den Esca-assoziierten Pilzen *Pch*, *Pmi*, *Fmed*, *Ela* sowie in dem Wurzelfäule-assoziierten Pilz *Rsub* analysiert. Für *Rsub* war diese bis dato aus der Literatur nicht bekannt. Im Gegensatz dazu wurde die Produktion von eisenchelatierenden Verbindungen für die Esca-assoziierten Pilze *Pch*, *Pmi*, *Fomitiporia punctata*, welcher eng verwandt zu *Fmed* ist (Fischer, 2002), und *Libertella blepharis* (Trouillas *et al.*, 2010), die Anamorphe von *Ela*, anhand eines Chrome Azurol-Assays in Studien von Di Marco *et al.* bereits nachgewiesen (Di Marco *et al.*, 2001). Eine Identifizierung dieser Verbindungen wurde hierbei jedoch nicht vorgenommen. In einer

Studie von J. Fischer (2014) wurde des Weiteren die Produktion von Siderophoren aus der Ferrichrom-Familie für die Pilze *Pch* und *Pmi* detektiert (Fischer, 2014). Aufgrund dessen sollte in der vorliegenden Arbeit die Siderophor-Produktion der aufgeführten Pilze zunächst bestätigt werden und die synthetisierten Siderophore identifiziert werden. Hierfür wurden Kulturfiltrat- und Myzelextrakte, wie in 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben, aus der jeweiligen Submerskultivierung der zu untersuchenden Pilze in eisenfreiem sowie als Kontrolle in eisensupplementiertem Sundström-Medium hergestellt. Die Extrakte wurden anschließend unter Zuhilfenahme von HPLC- und HPLC-MS-Analysen (2.5.4) im Hinblick auf die Sekundärmetabolit-Komposition der Siderophore untersucht. Zur Identifizierung der Siderophore wurden von detektierten Signalen aus der HPLC-MS-Analyse der hergestellten Extrakte die Retentionszeit, die UV-Vis- und MS-Spektren mit denen von bereits bekannten Siderophor-Standards aus der Substanzdatenbank des IBWF sowie mit Literaturreferenzdaten (Konetschny-Rapp *et al.*, 1988; Jalal und van der Helm, 1989; Renshaw *et al.*, 2002; Pluháček *et al.*, 2016) abgeglichen. Darüber hinaus erfolgten LC-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Analysen (2.5.4.3) von Kulturfiltratextrakten zur Detektierung und Identifizierung von weiteren Siderophoren, welche freundlicherweise von [REDACTED] vollzogen wurden. Des Weiteren erfolgte eine Strukturaufklärung eines isolierten, bisher in der Literatur unbekanntes Siderophors, welche freundlicherweise vom Arbeitskreis von [REDACTED] durchgeführt worden ist.

3.1.1 Siderophore der Esca-assoziierten Pilze

Im Nachfolgenden sind die Ergebnisse zu den Untersuchungen der Siderophor-Produktion in den Esca-assoziierten Pilzen *Pch*, *Pmi*, *Fmed* und *Ela* näher beschrieben.

3.1.1.1 Extra- und intrazelluläre Siderophore aus *Phaeoconiella chlamydospora*

3.1.1.1.1 Extrazelluläre Siderophore aus *Phaeoconiella chlamydospora*

Zur Identifizierung von sekretierten, extrazellulären Siderophoren aus *Pch* wurden die Isolate *Pch IBWF 1315* und *Pch CBS229.95* (2.1.5.3) jeweils als Submerskultur in eisenfreiem sowie als Kontrolle in eisensupplementiertem Sundström-Medium für eine Woche kultiviert und die gewonnenen Kulturfiltratextrakte über HPLC- und HPLC-MS-Messungen (2.5.4) analysiert. Der nachfolgenden Abbildung 5 können die HPLC-Chromatogramme der Kulturfiltratextrakte aus der Kultivierung mit *Pch IBWF 1315* (A) und *Pch CBS 229.95* (B) entnommen werden.

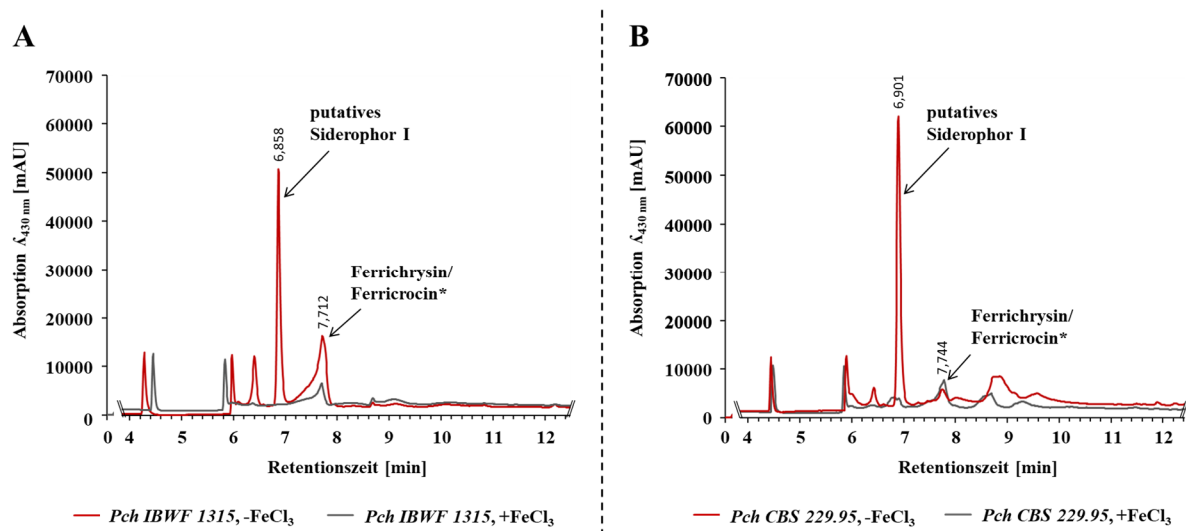


Abbildung 5: Identifizierung sekretierter Siderophore der *Phaeoconiella chlamydospora*-Isolate IBWF 1315 (A) und CBS 229.95 (B). Gezeigt sind jeweils die HPLC-Chromatogramme (Detektionswellenlänge $\lambda_{430\text{ nm}}$) der normalisierten Kulturfiltratextrakte (5 mg/ml) aus der siebentägigen Kultivierung mit den Isolaten *Pch IBWF 1315* und *Pch CBS 229.95* unter eisendefizienten (rot) und eisensupplementierten (dunkelgrau) Bedingungen. Detektiert wurden für beide Proben das Signal eines putativen, unbekanntes Siderophors (Siderophor I) (Retentionszeit $\sim 6,9$ min) und das für Ferrichrysin (Retentionszeit $\sim 7,7$ min). Ferricrocin* (Retentionszeit $\sim 7,7$ min) wurde in geringen Mengen detektiert. Für die HPLC-Analyse wurde jeweils der in Tabelle 10 (2.5.4.1) aufgeführte Gradient verwendet.

Unter eisendefizienten Kultivierungsbedingungen konnten für beide Pilz-Isolate zwei Siderophore mit jeweils einer Retentionszeit von $\sim 7,7$ min festgestellt werden. Diese wurden aufgrund einer weiteren Analyse der Extrakte unter Zuhilfenahme der HPLC-MS (2.5.4.2, Tab. 13) mittels Abgleich der Retentionszeit und der UV-Vis- und Massenspektren der detektierten Signale mit den Einträgen aus der Substanzdatenbank des IBWF als Ferrichrysin mit einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 801,3 (Abb. 6) und als Ferricrocin mit einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 771,3 (Abb. 7) identifiziert. Jedoch ist hierbei anzumerken, dass im Gegensatz zu Ferrichrysin Ferricrocin aufgrund der geringen detektierten Menge im Kulturfiltrat als primär intrazelluläres Siderophor eingeordnet worden ist (3.1.1.1.2).

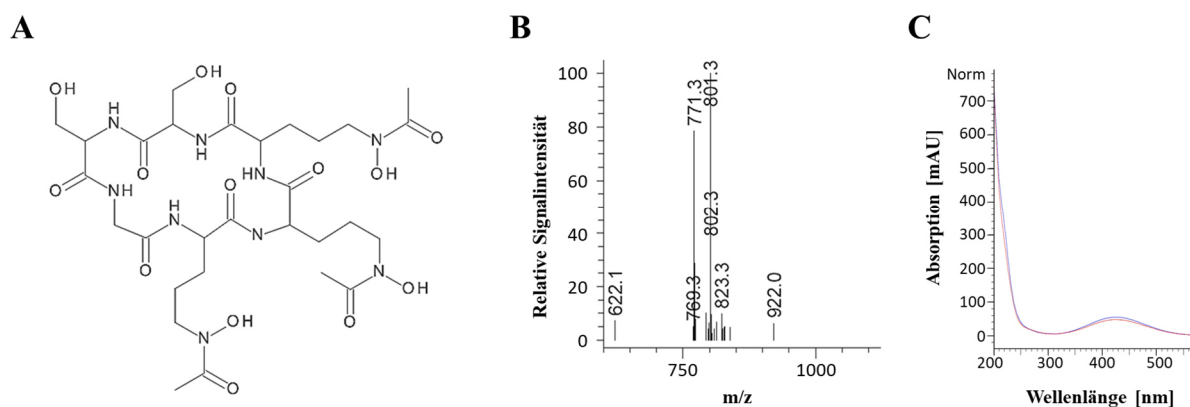


Abbildung 6: Massen- und UV-Vis-Spektrum des identifizierten Siderophors Ferrichrysin aus *Phaeoemoniella chlamydospora*. Gezeigt ist die chemische Struktur von Ferrichrysin (A), das dazugehörige Massenspektrum (positive Ionisierung) (B) sowie der Vergleich der UV-Vis-Spektren (C) zwischen dem Ferrichrysin-Standard (rot) und dem detektierten Signal (blau) des mittels HPLC-MS (2.5.4.2) analysierten Kulturfiltratextrakts aus der siebentägigen, eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Pch CBS 229.95*.

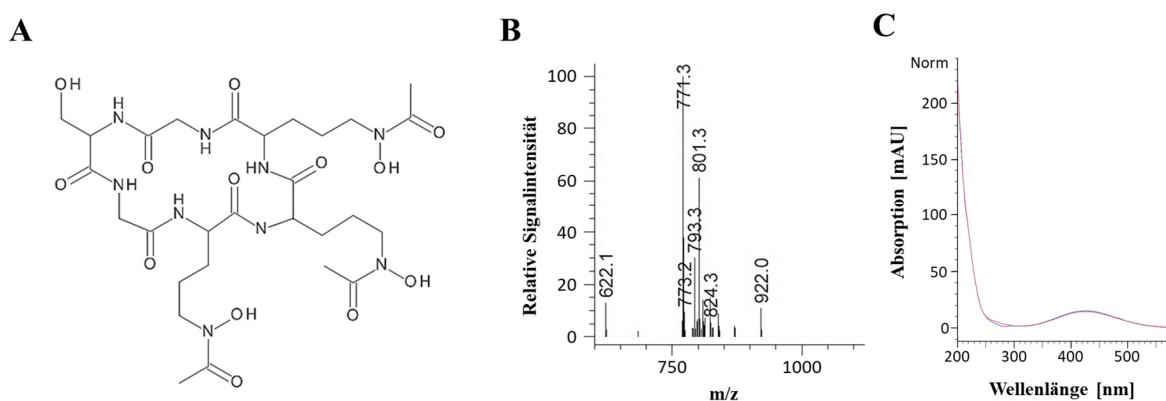


Abbildung 7: Massen- und UV-Vis-Spektrum des identifizierten Siderophors Ferricrocin aus *Phaeoemoniella chlamydospora*. Gezeigt ist die chemische Struktur von Ferricrocin (A) sowie das dazugehörige Massenspektrum (positive Ionisierung) (B) und der Vergleich der UV-Vis-Spektren (C) zwischen dem Ferricrocin-Standard (rot) und dem detektierten Signal (blau) des mittels HPLC-MS (2.5.4.2) analysierten Kulturfiltratextrakts aus der siebentägigen, eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Pch CBS 229.95*.

Des Weiteren wurde für beide Pilzisolat ein putatives Siderophor (Siderophor I) mit einer Retentionszeit von ~6,9 min detektiert (Abb. 5). Dieses wurde aufgrund des UV-Vis-Spektrums (Abb. 8, B), welches den Spektren von bereits bekannten Hydroxamat-Siderophoren aus der internen Substanzdatenbank des IBWF gleicht und sich durch ein signifikantes Maximum bei einer Wellenlänge von ~430 nm nach Eisenzugabe zum Extrakt auszeichnet (Neilands, 1981; Jalal und van der Helm, 1991) als Siderophor vermutet. Für das putative Siderophor I wurde eine Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 834,3 vorgefunden (Abb. 8, A).

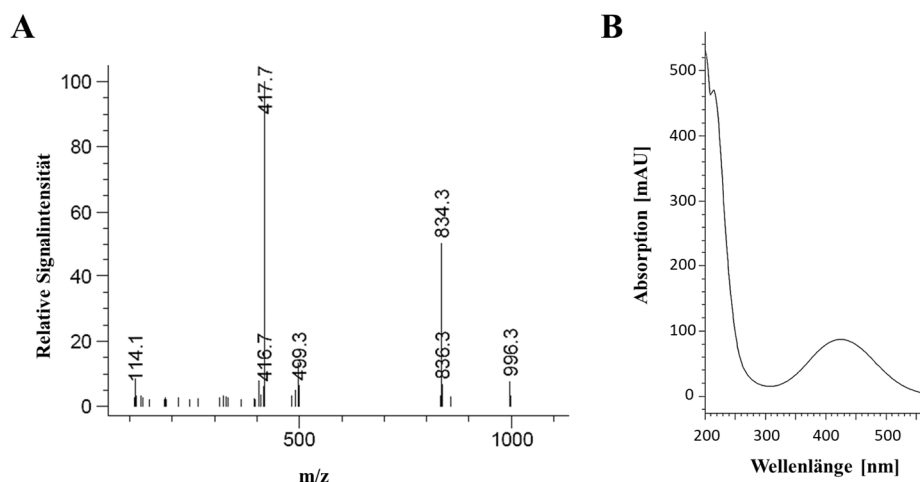


Abbildung 8: Massen- und UV-Vis-Spektrum des detektierten, putativen Siderophors I aus *Phaeomonieella chlamydospora*. Gezeigt ist das Massenspektrum (positive Ionisierung) (A) sowie das UV-Vis-Spektrum (B) des putativen Siderophors I aus der HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) des Kulturfiltratextrakts, welches aus der siebentägigen, eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Pch CBS 229.95* gewonnen wurde.

Zur eindeutigen Identifizierung des bis dato in der Literatur unbekanntes, putativen Siderophors I wurde von diesem eine Strukturaufklärung durchgeführt. Hierfür wurde das Kulturfiltratextrakt, welches aus einer neuntägigen Kultivierung mit *Pch CBS 229.95* von insgesamt 2 L eisenfreiem Sundström-Medium gewonnen wurde, über die präparative HPLC mit dem in Tabelle 14 (2.5.4.4) angegebenen Gradienten aufgetrennt. Von dem putativen Siderophor I, welches mit einer Reinheit von 76 % (Abb. 9, A) isoliert worden ist, wurde eine Strukturaufklärung über eine NMR-Analyse durchgeführt. Diese wurde freundlicherweise am [redacted] verrichtet.

Das putative Siderophor I konnte als ein an der jeweiligen Doppelbindung hydroxyliertes Fusarinin-Derivat, welches im Nachfolgendem als Trihydroxyfusarinin C bezeichnet wird, mit einer exakten Molekülmasse $[M+H]^+$ von 780,4177 identifiziert werden (Abb. 9, C). Die Auswertung der NMR-Analyse kann der Tabelle 33 (7.4) entnommen werden.

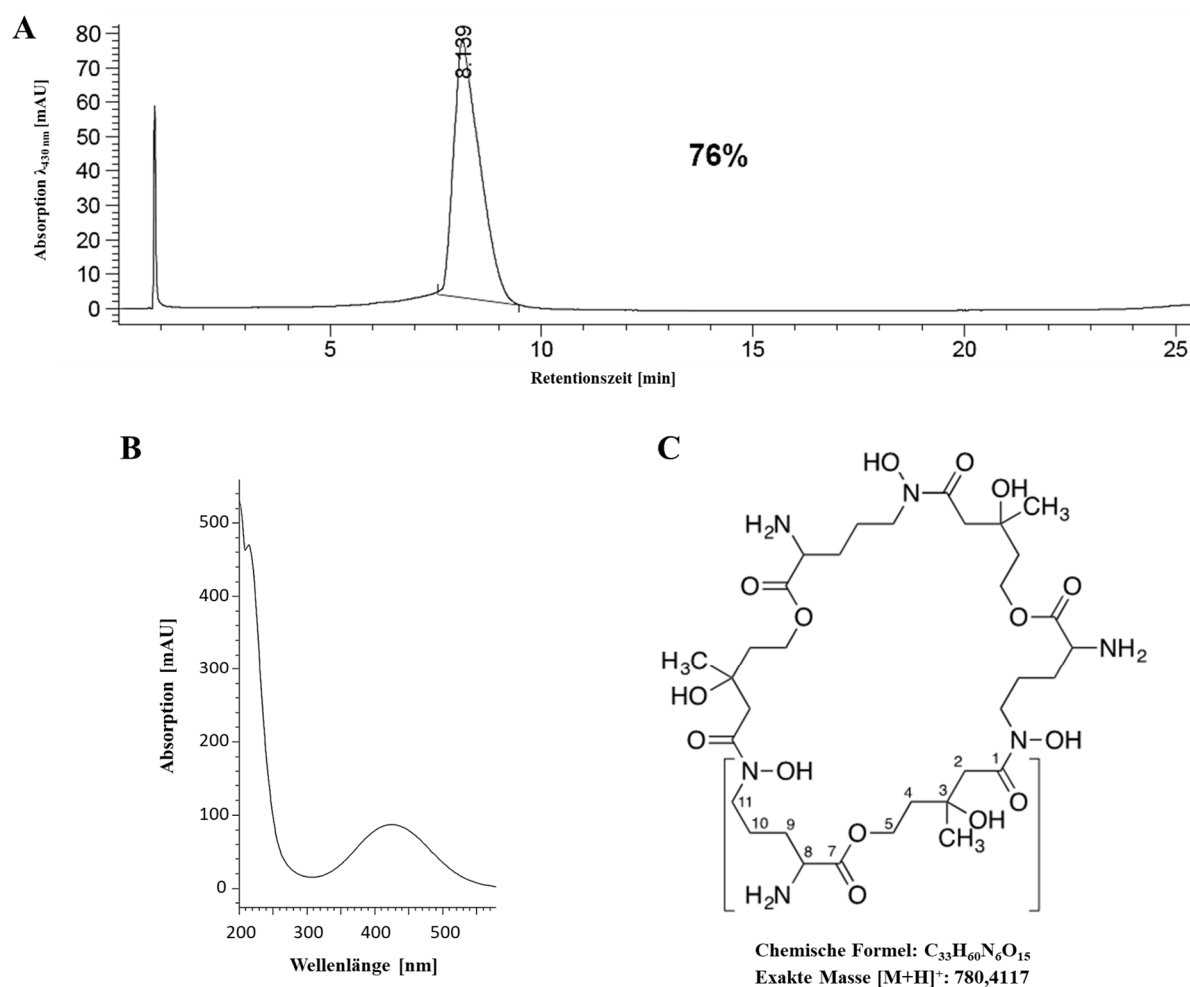


Abbildung 9: Identifizierung des unbekanntem, sekretierten, putativen Siderophors I aus *Phaeoaniella chlamydospora* als Trihydroxyfusarinin C. Gezeigt ist das HPLC-Chromatogramm aus der HPLC-MS-Analyse (Detektionswellenlänge $\lambda_{430\text{ nm}}$) mit Reinheitsgrad (A) und UV-Vis-Spektrum (B) des isolierten Siderophors I aus der neuntägigen Kultivierung des *Pch* Isolats *CBS 229.95* unter eisendefizienten Kultivierungsbedingungen. Für die HPLC-MS-Messung wurde der in Tabelle 12 (2.5.4.2) genannte Gradient verwendet. In C ist die chemische Struktur des Siderophors I zu entnehmen, welches über NMR-Analyse als Trihydroxyfusarinin C identifiziert worden ist.

3.1.1.1.2 Intrazelluläre Siderophore aus *Phaeoaniella chlamydospora*

Zur Identifizierung der intrazellulären Siderophore aus *Pch* wurden die gewonnenen Myzel- und Konidienextrakte aus der siebentägigen Kultivierung des Isolats *Pch IBWF 1315* in eisensupplementiertem Sundström-Medium (2.5.2) mittels HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) untersucht. Hierbei wurden die Messungen im SIM-Mode mit ESI durchgeführt und gezielt die Ionen der Massen ausgewählter, pilzlicher, intrazellulärer Siderophore (Konetschny-Rapp *et al.*, 1988; Haas *et al.*, 2008; Pluháček *et al.*, 2016) sowie der bereits detektierten Massen aus Abschnitt 3.1.1.1 fokussiert. Hierbei konnte sowohl für das Konidien- als auch das Myzelextrakt ein eindeutiges Signal für das Siderophor Ferricrocin mit einer Masse $[M-2H+Fe]^+$ von m/z 771 detektiert werden (7.5, Abb. 49 und 50). Für die Massen m/z 741 (Ferrichrom), m/z 755 (Ferrichrom C), m/z 801 (Ferrichrysin), m/z 834 (Trihydroxy-

fusarinin C), m/z 995 (Asperchrom A), m/z 1011 (Asperchrom E/ Ferrirhodin/ Ferrirubin) und m/z 1053 (Ferrichrom A/ Asperchrom C) konnte dagegen kein signifikantes Signal vorgefunden werden.

3.1.1.2 Extra- und intrazelluläre Siderophore aus *Phaeoacremonium minimum*

3.1.1.2.1 Extrazelluläre Siderophore aus *Phaeoacremonium minimum*

Zur Identifizierung der extrazellulären, sekretierten Siderophore aus *Pmi* wurden die Isolate *Pmi IBWF 1189* und *Pmi CBS 100.398* (2.1.5.3) in eisenfreiem und eisensupplementiertem Sundström-Medium für sieben Tage kultiviert und die gewonnenen Kulturfiltratextrakte über HPLC- und HPLC-MS-Messungen (2.5.4) analysiert. Der nachfolgenden Abbildung 10 können die HPLC-Chromatogramme der Extrakte aus der Kultivierung mit *Pmi IBWF 1189* (A) und *Pmi CBS 100.398* (B) entnommen werden.

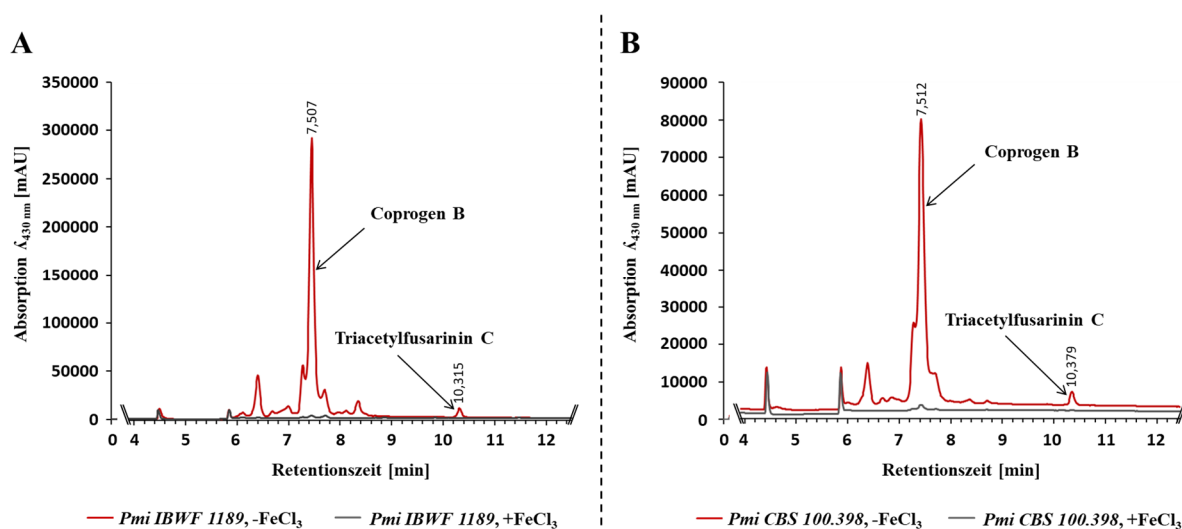


Abbildung 10: Identifizierung sekretierter Siderophore der *Phaeoacremonium minimum*-Isolate *IBWF 1189* (A) und *CBS 100.398* (B). Gezeigt sind jeweils die HPLC-Chromatogramme (Detektionswellenlänge $\lambda_{430\text{ nm}}$) der normalisierten Kulturfiltratextrakte (5 mg/ml) aus der siebentägigen Kultivierung mit den Isolaten *Pmi IBWF 1189* und *Pmi CBS 100.398* unter eisendefizienten (rot) und eisensupplementierten (dunkelgrau) Bedingungen. Detektiert wurden für beide die Signale für Coprogen B (Retentionszeit $\sim 7,5$ min) und Triacetylfusarinin C (Retentionszeit $\sim 10,3$ min). Für die Messungen wurde jeweils der in Tabelle 10 (2.5.4.1) aufgeführte Gradient verwendet.

Für beide Pilz-Isolate konnten anhand des Abgleichs von UV-Vis- und Massenspektrum sowie der Retentionszeit der detektierten Signale über die HPLC-MS mit der internen Substanzdatenbank des IBWF zwei bekannte Siderophore identifiziert werden. In beiden Extrakten wurde mit einer Retentionszeit von $\sim 7,5$ min (Abb. 10) und einer Masse von $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 780,3 das Siderophor Coprogen B (Abb. 11) und mit einer Retentionszeit von $\sim 10,3$ min (Abb. 10) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 906,3 das Siderophor Triacetylfusarinin C (Abb. 12) detektiert.

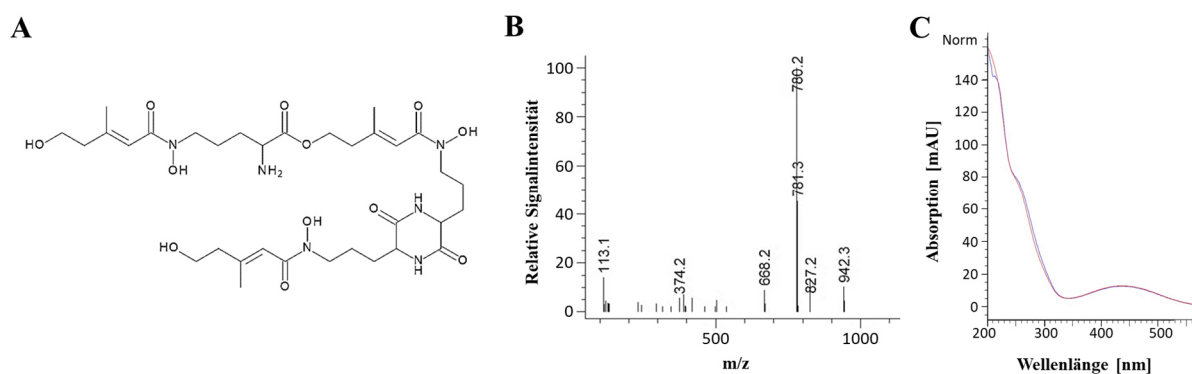


Abbildung 11: Massen- und UV-Vis-Spektrum des identifizierten Siderophors Coprogen B aus *Phaeoacremonium minimum*. Gezeigt ist die chemische Struktur von Coprogen B (A), das dazugehörige Massenspektrum (positive Ionisierung) (B) sowie der Vergleich der UV-Vis-Spektren (C) zwischen dem Coprogen B-Standard (rot) und dem detektierten Signal (blau) des mittels die HPLC-MS analysierten Kulturfiltratextrakts aus der siebentägigen, eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Pmi CBS 100.398*.

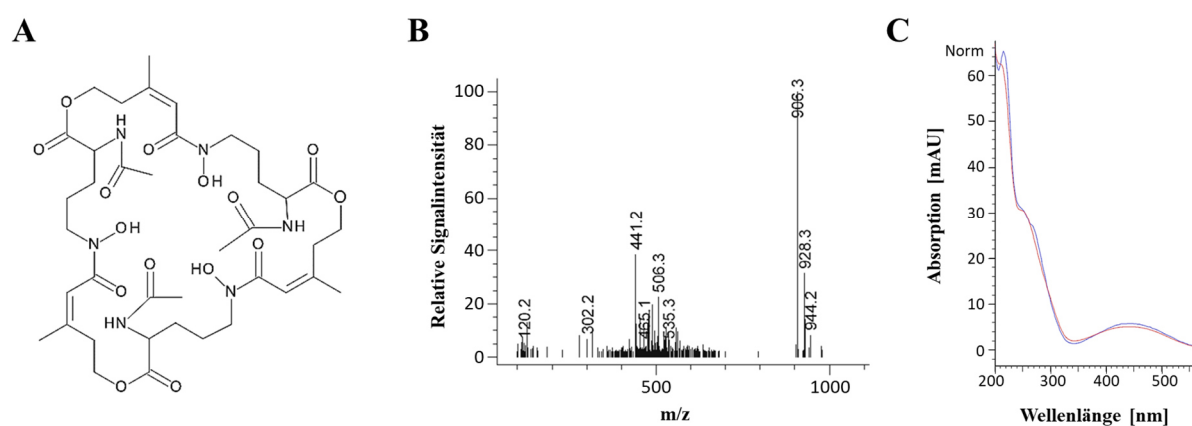


Abbildung 12: Massen- und UV-Vis-Spektrum des identifizierten Siderophors Triacetylfusarinin C aus *Phaeoacremonium minimum*. Gezeigt ist die chemische Struktur von Triacetylfusarinin C (A), das dazugehörige Massenspektrum (positive Ionisierung) (B) sowie der Vergleich der UV-Vis-Spektren (C) zwischen dem Triacetylfusarinin C-Standard (rot) und dem detektierten Signal (blau) des mittels die HPLC-MS analysierten Kulturfiltratextrakts aus der siebentägigen, eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Pmi CBS 100.398*.

3.1.1.2.2 Intrazelluläre Siderophore aus *Phaeoacremonium minimum*

Um die intrazelluläre Siderophore aus *Pmi* identifizieren zu können, wurden die gewonnenen Myzel- und Konidienextrakte aus der siebentägigen Kultivierung des Isolats *Pmi IBWF 1189* in eisensupplementiertem Sundström-Medium (2.5.2) über eine HPLC-MS-Analyse im SIM-Mode mit ESI (2.5.4.2) untersucht. Es konnten sowohl für das Konidien- als auch das Myzelextrakt ein signifikantes Signal für das Siderophor Ferricrocin mit einer Masse m/z 771 $[M - 2H + Fe]^+$ detektiert werden (7.5, Abb. 51 und 52). Für die Massen $[M - 2H + Fe]^+$ m/z 741 (Ferrichrom), m/z 755 (Ferrichrom C), m/z 801 (Ferrichrysin), m/z 906 (Triacetylfusarinin C),

m/z 995 (Asperchrom A), m/z 1011 (Asperchrom E/ Ferrirhodin/ Ferrirubin) und m/z 1053 (Ferrichrom A/ Asperchrom C) konnte dagegen kein spezifisches Signal vorgefunden werden.

3.1.1.3 Extra- und intrazelluläre Siderophore aus *Fomitiporia mediterranea*

Für die Analyse der Siderophor-Produktion in *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) wurden die Isolate *Fmed IBWF* und *Fmed IB-Her01-16* (2.1.5) herangezogen. Hierbei wurde im Zuge dieser Arbeit das Isolat *Fmed IB-Her01-16* aus dem Weinrebstamm, wie in 2.2 beschrieben, isoliert und identifiziert (7.3).

3.1.1.3.1 Extrazelluläre Siderophore aus *Fomitiporia mediterranea*

Um die extrazellulären Siderophore aus *Fmed* identifizieren zu können, wurden die Isolate *Fmed IBWF* und *Fmed IB-Her01-16* jeweils als Submerskultur in eisenfreiem und als Kontrolle in eisensupplementiertem Sundström-Medium in einem Zeitraum von bis zu 4 Wochen kultiviert und wöchentlich aus deren Kulturfiltrate, wie in 2.5.1 beschrieben, Extrakte gewonnen, welche anschließend über HPLC-MS-Messungen (2.5.4) analysiert worden sind. Im Zuge der betreuten Masterarbeit von A.-L. Hiller (Hiller, 2019) konnten für *Fmed IBWF* nach einer Kultivierung von 17 Tagen in eisenfreiem Sundström-Medium verschiedene Hydroxamat-Siderophore im Extrakt festgestellt werden (Abb. 13).

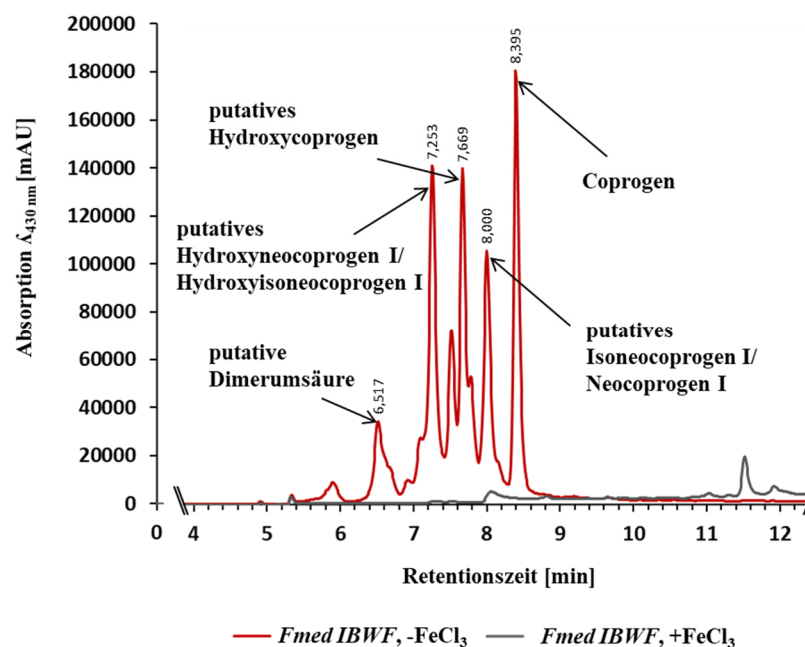


Abbildung 13: Identifizierung sekretierter Siderophore des *Fomitiporia mediterranea* Isolats *Fmed IBWF*. Gezeigt sind jeweils die HPLC-Chromatogramme (Detektionswellenlänge $\lambda_{430\text{ nm}}$) der normalisierten Kulturfiltratextrakte (5 mg/ml) aus der 17-tägigen Kultivierung mit dem Isolat *Fmed IBWF* unter eisendefizienten (rot) und eisensupplementierten (dunkelgrau) Bedingungen. Für die Messungen wurde jeweils der in Tabelle 10 (2.5.4.1) aufgeführte Gradient verwendet.

Hierbei wurde für *Fmed IBWF* mittels IBWF-Datenbank das Siderophor Coprogen mit einer Retentionszeit von $\sim 8,4$ min (Abb. 13) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 822,3 identifiziert (Abb. 14).

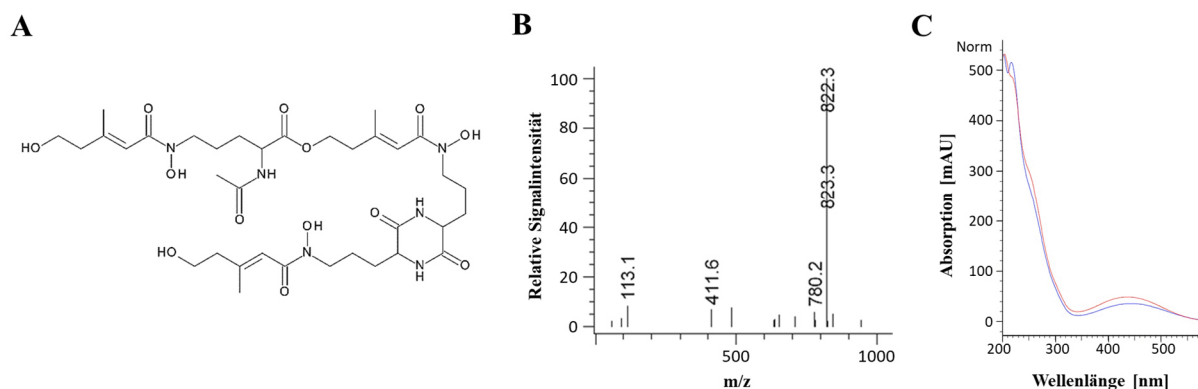


Abbildung 14: Massen- und UV-Vis-Spektrum des identifizierten Siderophors Coprogen aus *Fomitiporia mediterranea*. Gezeigt ist die chemische Struktur von Coprogen (A), das dazugehörige Massenspektrum (positive Ionisierung) (B) sowie der Vergleich der UV-Vis-Spektren (C) zwischen dem Coprogen-Standard (positive Ionisierung) und dem detektierten Signal (blau) des mittels die HPLC-MS (2.5.4.2) analysierten Kulturfiltratextrakts aus der 17-tägigen eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Fmed IBWF*.

Darüber hinaus wurden für diesen weitere putative Siderophore aufgrund von Vergleiche zu Literaturreferenzdaten (Konetschny-Rapp *et al.*, 1988; Jalal und van der Helm, 1989; Renshaw *et al.*, 2002; Pluháček *et al.*, 2016) angenommen. Die UV-Vis-Spektren der detektierten Signale glichen zudem den Spektren von bereits bekannten Hydroxamat-Siderophoren aus der internen Substanzdatenbank des IBWF und zeichneten sich jeweils durch ein signifikantes Maximum bei einer Wellenlänge von ~ 430 nm nach Eisenzugabe zum Extrakt aus (Neilands, 1981; Jalal und van der Helm, 1991). Aufgrund dessen und aufgrund der jeweiligen Massenspektren wurden folgende Siderophore vermutet: Dimerumsäure mit einer Retentionszeit von $\sim 6,5$ min (Abb. 13) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 538,2 (Abb. 15), Hydroxyneocoprogen I bzw. Hydroxyisoneocoprogen I mit einer Retentionszeit von $\sim 7,3$ min (Abb. 13) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 768,2 (Abb. 16), Hydroxycoprogen mit einer Retentionszeit von $\sim 7,7$ min (Abb. 13) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 838,3 (Abb. 17) und Neocoprogen I bzw. Isonocoprogen I mit einer Retentionszeit von $\sim 8,0$ min (Abb. 13) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 752,2 (Abb. 18).

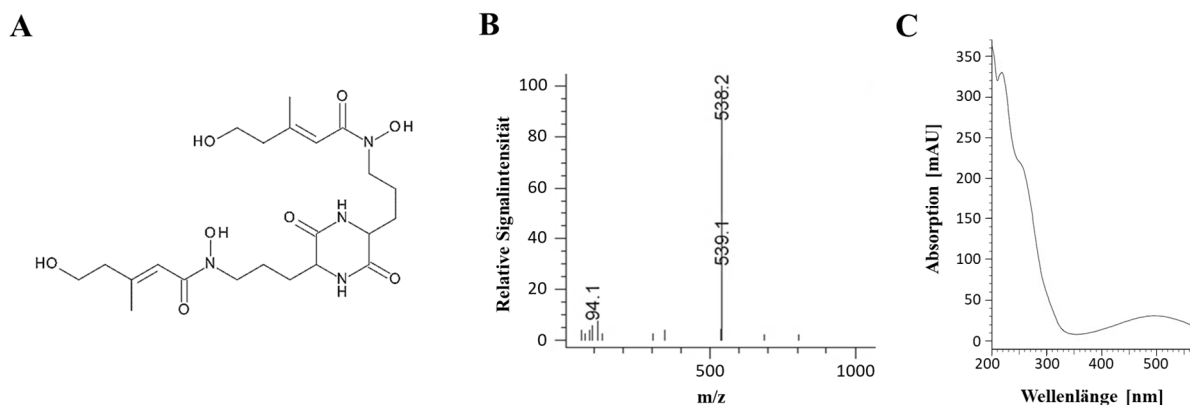


Abbildung 15: Massen- und UV-Vis-Spektrum des putativen Siderophors Dimerumsäure aus *Fomitiporia mediterranea*. Gezeigt ist die chemische Struktur von Dimerumsäure (A) sowie das Massen-(B) und UV-Vis (C)-spektrum (positive Ionisierung) des putativen Signals für Dimerumsäure aus der HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) des Kulturfiltratextrakts aus der 17-tägigen, eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Fmed IBWF*.

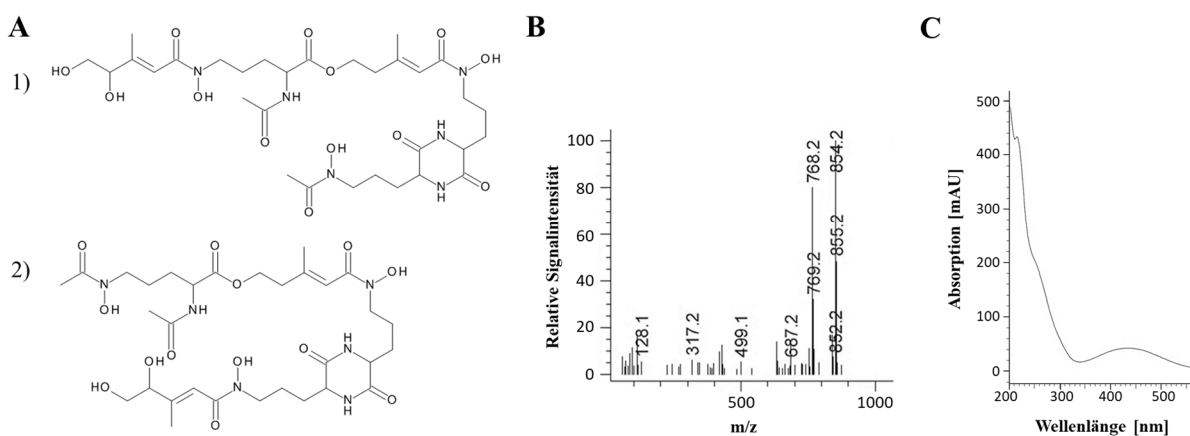


Abbildung 16: Massen- und UV-Vis-Spektrum des putativen Siderophors Hydroxyneocoprogen I bzw. Hydroxyisoneocoprogen I aus *Fomitiporia mediterranea*. Gezeigt ist die chemische Struktur von Hydroxyneocoprogen I (A, 1) bzw. Hydroxyisoneocoprogen I (A, 2) sowie das Massen-(B) und UV-Vis (C)-spektrum (positive Ionisierung) des putativen Signals für Hydroxyneocoprogen I bzw. Hydroxyisoneocoprogen I aus der HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) des Kulturfiltratextrakts aus der 17-tägigen, eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Fmed IBWF*.

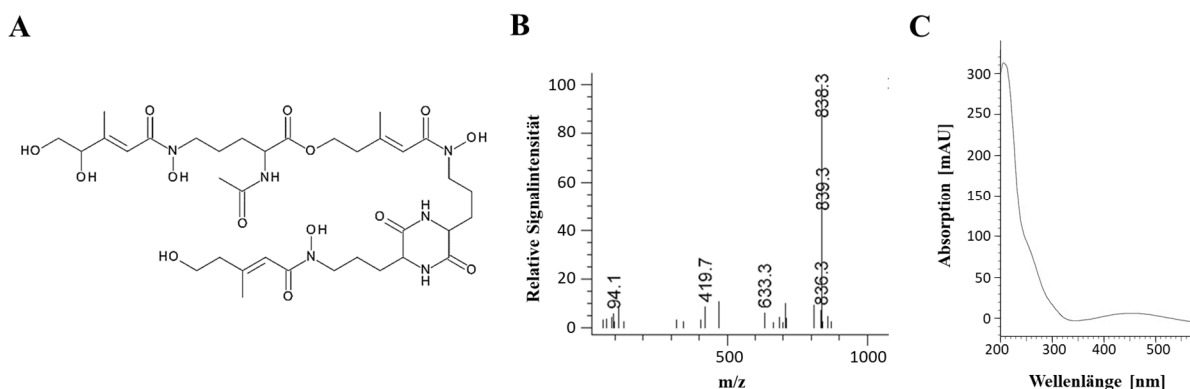


Abbildung 17: Massen- und UV-Vis-Spektrum des putativen Siderophors Hydroxycoprogen aus *Fomitiporia mediterranea*. Gezeigt ist die chemische Struktur von Hydroxycoprogen (A) sowie das Massen-(B) und UV-Vis (C)-spektrum (positive Ionisierung) des putativen Signals für Hydroxycoprogen aus der HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) des Kulturfiltratextrakts aus der 17-tägigen, eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Fmed IBWF*.

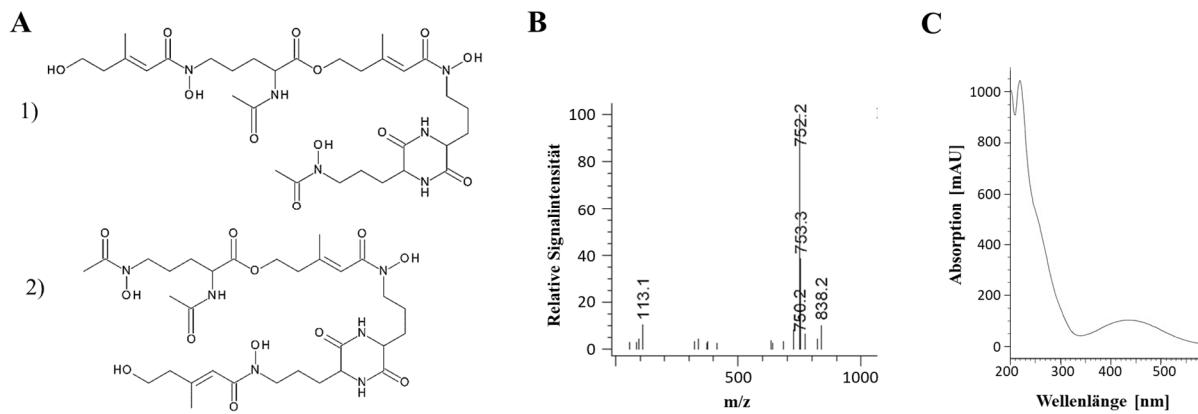


Abbildung 18: Massen- und UV-Vis-Spektrum des putativen Siderophors Neocoprogen I bzw. Isonecoprogen I aus *Fomitiporia mediterranea*. Gezeigt ist die chemische Struktur von Neocoprogen I (A, 1) bzw. Isonecoprogen I (A, 2) sowie das Massen-(B) und UV-Vis (C)-spektrum (positive Ionisierung) des putativen Signals für Neocoprogen I bzw. Isonecoprogen I aus der HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) des Kulturfiltratextrakts aus der 17-tägigen eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Fmed IBWF*.

Für *Fmed IB-Her01-16* konnten hingegen trotz mehrmaliger Versuchswiederholung und Veränderung der Versuchsparameter (Hiller, 2019) (wie beispielsweise die Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 30 °C, welches die optimale Wachstumstemperatur von *Fmed* (Fischer, 2002) ist, Erhöhung der Biomasse von *Fmed IB-Her01-16* zur Inokulation der Sundström-Hauptkultur, zweimalige Kultivierung von *Fmed* in Sundström-Medium zur Reduktion von möglichen Eisenrückständen) keine sekretierten Siderophore vorgefunden werden.

3.1.1.3.2 Intrazelluläre Siderophore aus *Fomitiporia mediterranea*

Auch von *Fmed* wurde die Produktion von intrazellulären Siderophore untersucht. Dazu wurde das generierte Myzelextrakt aus der jeweiligen siebentägigen Kultivierung der Isolate *Fmed IBWF* und *Fmed IB-Her01-16* in eisensupplementiertem Sundström-Medium gewonnen (2.5.2) und eine HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) durchgeführt. Die Messungen erfolgten im SIM-Mode mit ESI. Es wurden gezielt die Ionen der Massen ausgewählter, pilzlicher, intrazellulärer Siderophore (Konetschny-Rapp *et al.*, 1988; Haas *et al.*, 2008; Pluháček *et al.*, 2016) während der Messung fokussiert. Für keines der Massen $[M - 2H + Fe]^+$ m/z 741 (Ferrichrom), m/z 755 (Ferrichrom C), m/z 771 (Ferricrocin), m/z 801 (Ferrichrysin), m/z 995 (Asperchrom A), m/z 1011 (Asperchrom E/ Ferrirhodin/ Ferrirubin) und m/z 1053 (Ferrichrom A/ Asperchrom C) konnte ein signifikantes Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.1.4 Extra- und intrazelluläre Siderophore aus *Eutypa lata*

3.1.1.4.1 Extrazelluläre Siderophore aus *Eutypa lata*

Zur Identifizierung der extrazellulären, sekretierten Siderophore aus *Ela* wurden die Isolate *Ela IBWF 16012*, *Ela IBWF 16121*, *Ela IBWF 16122* und *Ela IBWF 16123* (2.1.5.3) in eisenfreiem und eisensupplementiertem Sundström-Medium in einen Zeitrahmen von 3 Wochen im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit von A. Mieland (Mieland, 2017) kultiviert und aus den jeweiligen Kulturfiltraten, wie in 2.5.1 beschrieben, Extrakte gewonnen, welche anschließend über HPLC-, HPLC-MS und LC-MS/MS-Messungen (2.5.4) analysiert worden sind. Die HPLC-MS-Analyse wurde freundlicherweise von [REDACTED] und die LC-MS/MS-Analyse von [REDACTED] durchgeführt. Hierbei konnten verschiedene Derivate der Siderophorfamilie der Coprogene detektiert werden. Der nachfolgenden Abbildung 19 ist exemplarisch das HPLC-Chromatogramm (2.5.4.1) des Rohextrakts aus der Kultivierung mit *Ela IBWF 16012* zu entnehmen.

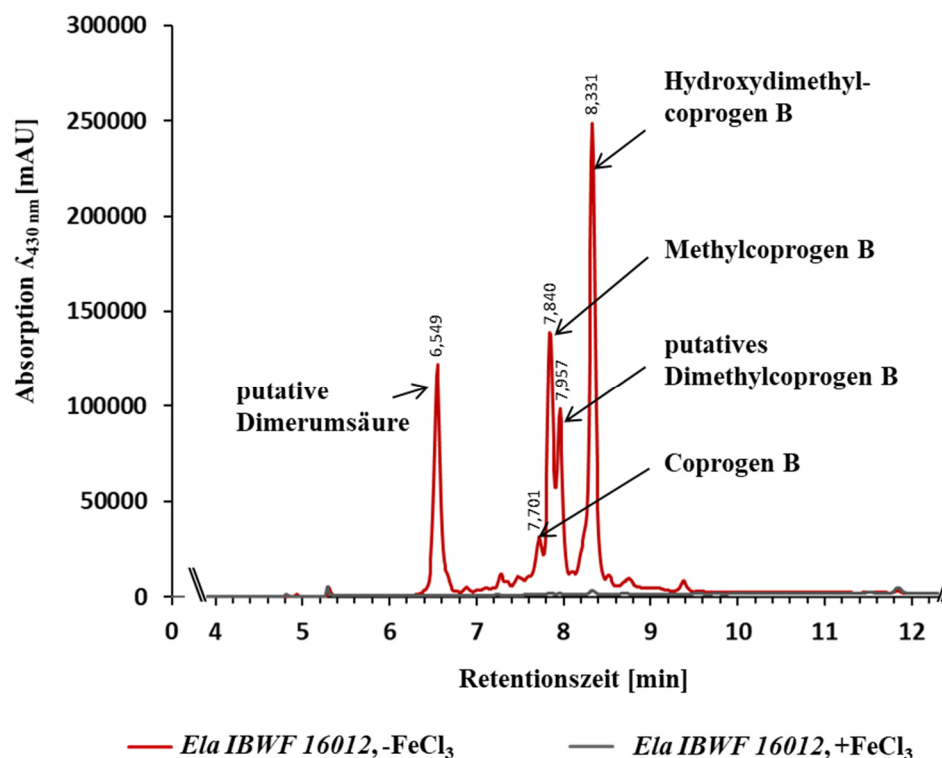


Abbildung 19: Identifizierung sekretierter Siderophore aus *Eutypa lata*. Gezeigt sind jeweils die HPLC-Chromatogramme (Detektionswellenlänge $\lambda_{430\text{ nm}}$) der normalisierten Kulturfiltratextrakte (5 mg/ml) aus der 14-tägigen Kultivierung mit dem Isolat *Ela IBWF 16012* unter eisendefizienten (rot) und eisensupplementierten (dunkelgrau) Bedingungen. Für die Messungen wurde jeweils der in Tabelle 10 (2.5.4.1) aufgeführte Gradient verwendet.

Für das Isolat *Ela IBWF 16012* konnten mittels HPLC-MS-Analyse anhand eines Abgleichs mit der Substanzdatenbank des IBWF zwei bekannte Siderophore identifiziert werden:

Coprogen B mit einer Retentionszeit von $\sim 7,7$ min (Abb. 19) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 780,3 (Abb. 20,1) und Methylcoprogen B mit einer Retentionszeit von $\sim 7,8$ min (Abb. 19) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 794,3 (Abb. 20, 2). Darüber hinaus wurden LC-MS/MS-Analysen mit dem Extrakt durchgeführt (2.5.4), anhand von diesen ein weiteres Siderophor, Hydroxydimethylcoprogen B, mit einer Retentionszeit von $\sim 8,3$ min (Abb. 19) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 824,3 (Abb. 20, 4) identifiziert werden konnte. Hierbei wurde das MS/MS-Fragmentationsspektrum (7.4.2, Abb. 48 E) mit Spektren der MS/MS-Spektrum-Bibliothek von GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) auf gnps.ucsd.edu (Wang *et al.*, 2016; Aron *et al.*, 2019b) verglichen. Des Weiteren konnten zwei putative Siderophore detektiert werden: Dimerumsäure mit einer Retentionszeit von $\sim 6,5$ min (Abb. 19) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 538,3 (nicht gezeigt; vergleichbar zu Abb. 15) und Dimethylcoprogen B mit einer Retentionszeit von $\sim 8,0$ min (Abb. 19) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 808,3 (Abb. 20, 3). Hierbei wurde die Annahme aufgrund des Abgleichs der Massen der detektierten Siderophore zu Literaturreferenzdaten (Konetschny-Rapp *et al.*, 1988; Jalal und van der Helm, 1989; Renshaw *et al.*, 2002; Pluháček *et al.*, 2016) und der spektralen Similarität der UV-Vis-Spektren zu bereits bekannten Hydroxamat-Siderophoren aus der internen Substanzdatenbank des IBWF aufgestellt. Diese wurde anhand der LC-MS/MS-Analyse bekräftigt (2.5.4), in der spektrale Similaritäten der MS/MS-Fragmentationsspektren (7.4.2, Abb. 48) zu bereits identifizierten Coprogen-Siderophore der MS/MS-Spektrum-Bibliothek von GNPS sowie eine spektrale molekulare Vernetzung der MS/MS-Spektren über GNPS aufgezeigt werden konnten (7.4.2, Abb. 47).

Die chemischen Strukturen der in der vorliegenden Arbeit detektierten Coprogen-Derivate sind der Abbildung 22 zu entnehmen. Auszüge der aufgeführten Ergebnisse zur Identifizierung der sekretierten Siderophore aus *Ela* können dem Preprint von Aron *et al.* (Aron *et al.*, 2019a) entnommen werden.

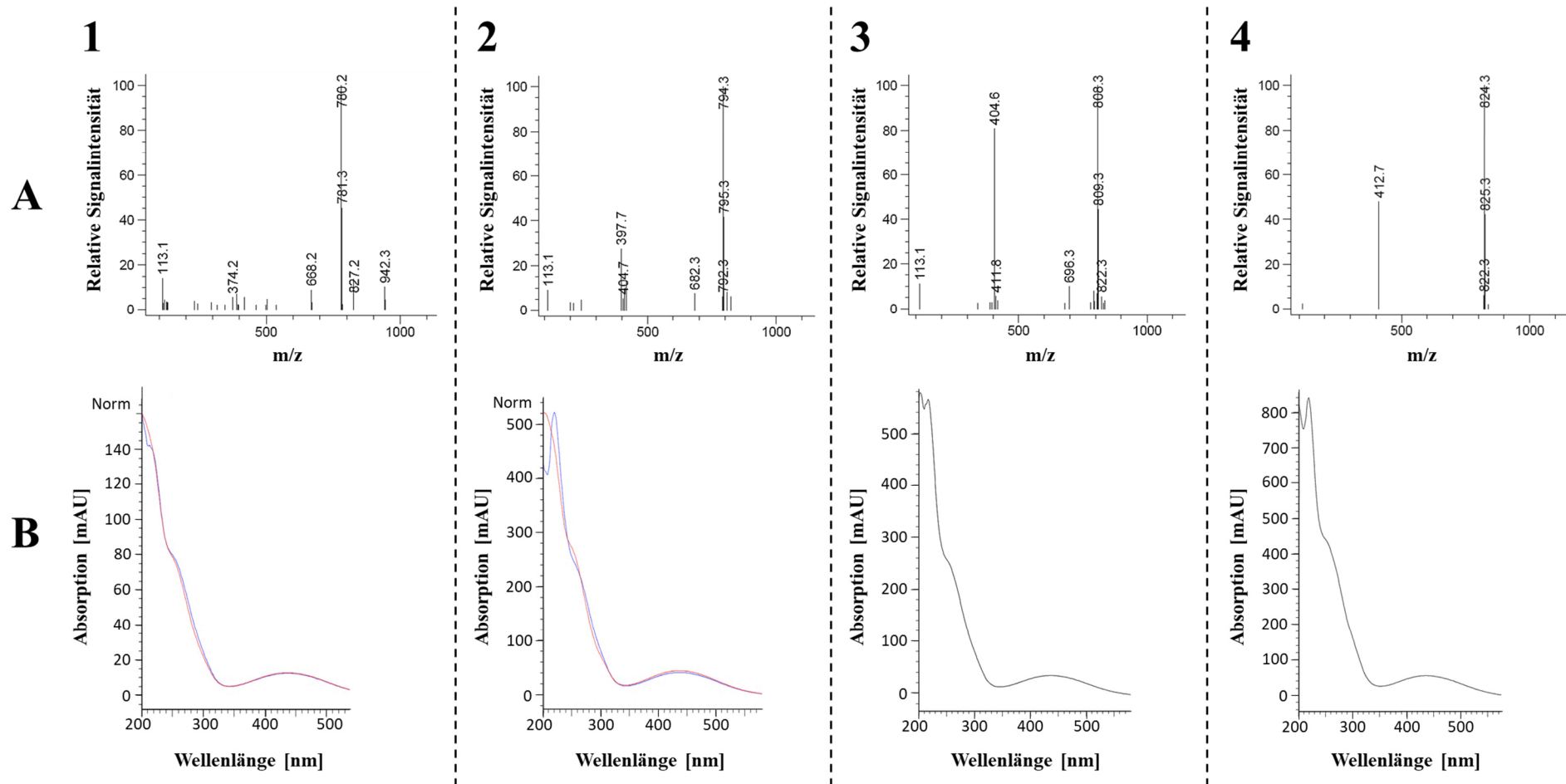


Abbildung 20: Massen- und UV-Vis-Spektren der identifizierten Siderophore Coprogen B, Methylcoprogen B und Hydroxydimethylcoprogen B sowie des putativen Siderophors Dimethylcoprogen B aus *Eutypa lata*. Gezeigt sind jeweils die Massen (A)- (positive Ionisierung) und UV-Vis (B)-Spektren der Signale für die identifizierten Siderophore Coprogen B (1), Methylcoprogen B (2) und Hydroxydimethylcoprogen B (4) sowie des putativen Signals für Dimethylcoprogen B (3) aus der HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) mit dem Kulturfiltratextrakt aus der 14-tägigen, eisdefizienten Kultivierung des Isolats *Ela IBWF 16012*. Von Coprogen B und Methylcoprogen B ist des Weiteren jeweils der Vergleich der UV-Vis-Spektren (1, B) zwischen dem Coprogen B bzw. Methylcoprogen B-Standard (rot) und dem jeweiligen detektierten Signal (blau) zu entnehmen.

Des Weiteren wurden die Kulturfiltratextrakte der Isolate *Ela IBWF 16121*, *Ela IBWF 16122* und *Ela IBWF 16123* im Hinblick auf sekretierte Siderophore untersucht und die Ergebnisse mit denen des Isolats *Ela IBWF 16012* verglichen (Tab. 15).

Tabelle 15: Vergleich der detektierten Siderophore aus den Kulturfiltrat (KF)-Extrakten der Isolate *Ela IBWF 16012*, *Ela IBWF 16121*, *Ela IBWF 16122* und *Ela IBWF 16123*. KF-Extrakte wurden aus der jeweiligen 14-tägigen Submerskultivierung der *Ela*-Isolate in Sundström-Medium gewonnen. *: putatives Siderophor aufgrund von Massen- und UV-Vis-Spektrum; √: detektiert; -: nicht detektiert.

Siderophor	Organismus	<i>Ela IBWF</i> <i>16012</i>	<i>Ela IBWF</i> <i>16121</i>	<i>Ela IBWF</i> <i>16122</i>	<i>Ela IBWF</i> <i>16123</i>
Dimerumsäure* [M -2H+Fe] ⁺ m/z 538		√	√	√	√
Coprogen B [M -2H+Fe] ⁺ m/z 780		√	√	-	√
Methylcoprogen B [M -2H+Fe] ⁺ m/z 794		√	√	-	√
Dimethylcoprogen B* [M -2H+Fe] ⁺ m/z 808		√	√	-	-
Hydroxydimethylcoprogen B* [M -2H+Fe] ⁺ m/z 824		√	√	-	√
Coprogen [M -2H+Fe] ⁺ m/z 822		-	-	-	-
Methylcoprogen [M -2H+Fe] ⁺ m/z 836		-	-	√	-
Hydroxymethylcoprogen [M -2H+Fe] ⁺ m/z 852		-	-	√	-

Hierbei konnte für alle Isolate das putative Siderophor Dimerumsäure vorgefunden werden. Größere Abweichungen der detektierten Siderophor-Komposition im Extrakt im Vergleich zu *Ela IBWF 16012* wurden dagegen nur für das Isolat *Ela IBWF 16122* festgestellt. In dessen Extrakt konnte anhand der Substanzdatenbank des IBWF Methylcoprogen (Abb. 21, 1) und das putative Siderophor Hydroxymethylcoprogen detektiert werden (Abb. 21, 2).

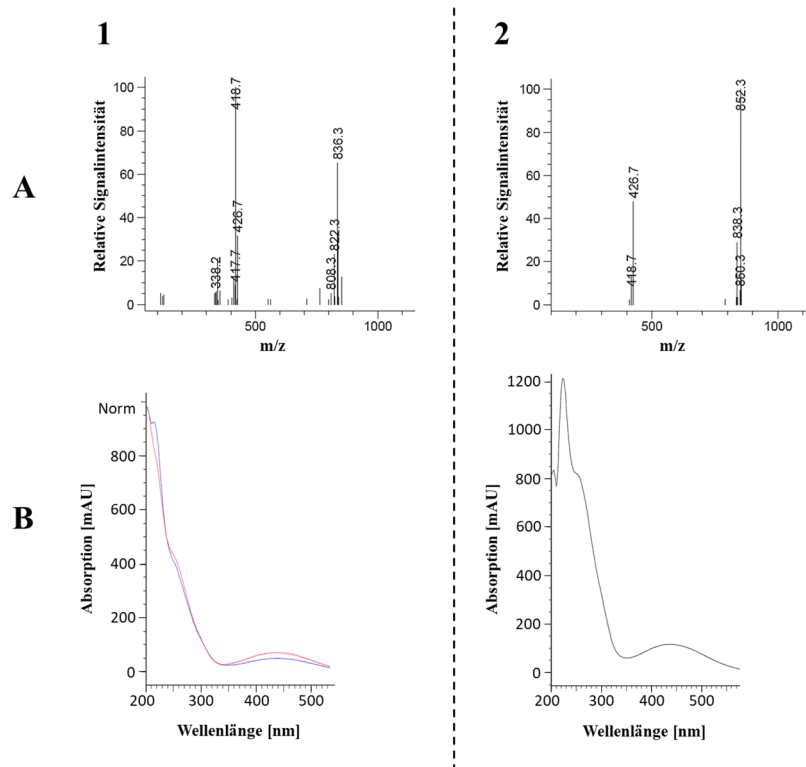
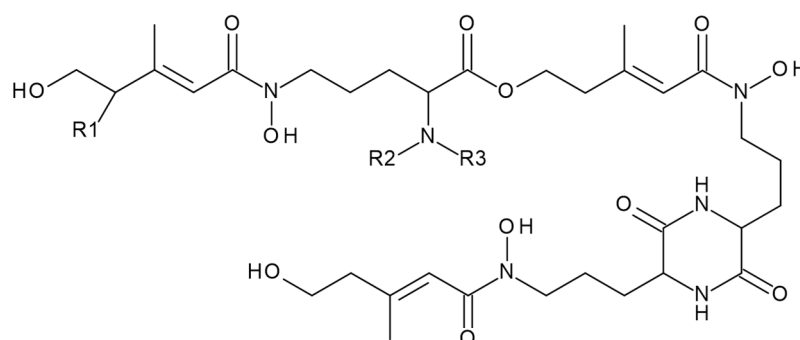


Abbildung 21: Massen- und UV-Vis-Spektren des identifizierten Siderophors Methylcoprogen und des putativen Siderophors Hydroxymethylcoprogen aus *Eutypa lata*. Gezeigt sind jeweils die Massen (A-) (positive Ionisierung) und UV-Vis (B)-spektren des Signals für das identifizierte Siderophor Methylcoprogen (1) sowie für das putative Siderophor Hydroxymethylcoprogen (2) aus der HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) mit dem Kulturfiltratextrakt aus der 14-tägigen, eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Ela* IBWF 16122. Von Methylcoprogen ist des Weiteren der Vergleich der UV-Vis-Spektren (1, B) zwischen dem Methylcoprogen-Standard (rot) und dem detektierten Signal (blau) zu entnehmen.



	R1	R2	R3
Coprogen B	H	H	H
Methylcoprogen B	H	H	CH ₃
Dimethylcoprogen B	H	CH ₃	CH ₃
Hydroxydimethylcoprogen B	OH	CH ₃	CH ₃
Coprogen*	H	CH ₃ CO	H
Methylcoprogen	H	CH ₃ CO	CH ₃
Hydroxymethylcoprogen	OH	CH ₃ CO	CH ₃

Abbildung 22: Chemische Struktur der detektierten Coprogen-Derivate aus *Eutypa lata*. Gezeigt sind jeweils die chemischen Strukturen der detektierten Coprogen-Derivate in den Extrakten aus der Kultivierung mit *Ela* unter Eisenmangelbedingungen sowie ergänzend die chemische Struktur von Coprogen*, welches nicht in den Extrakten detektiert worden ist.

3.1.1.4.2 Intrazelluläre Siderophore aus *Eutypa lata*

Zur Identifizierung der intrazellulären Siderophore aus *Ela* wurde das gewonnene Myzelextrakt aus der siebentägigen Kultivierung des Isolats *Ela IBWF 16012* in eisensupplementiertem Sundström-Medium (2.5.2) über eine HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) untersucht. Hierbei konnte für das Myzelextrakt ein signifikantes Signal für das Siderophor Ferricrocin mit einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 771 detektiert werden (7.5, Abb. 53). Für die Massen $[M - 2H + Fe]^+$ m/z 741 (Ferrichrom), m/z 755 (Ferrichrom C), m/z 801 (Ferrichrysin), m/z 906 (Triacetylfusarinin C), m/z 995 (Asperchrom A), m/z 1011 (Asperchrom E/ Ferrirhodin/ Ferrirubin) und m/z 1053 (Ferrichrom A/ Asperchrom C) konnte dagegen kein spezifisches Signal gefunden werden.

3.1.2 Siderophore des Wurzelfäule-assoziierten Pilzes *Roesleria subterranea*

Im Nachfolgenden sind die Untersuchungen zur Siderophor-Produktion in dem Wurzelfäule-assoziierten Pilz *Rsub* näher beschrieben. Hierbei wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit das Isolat *IB-Rüd01-16* (2.1.5.4) aus Weinrebenwurzeln des Weinguts Endlich aus Rüdesheim, wie in 2.2 beschrieben, isoliert und identifiziert (7.3). Des Weiteren wurden die Isolate *CBS 201.25*, *CBS 407.51*, *CBS 271.82*, *CBS 272.82* und *CBS 339.96* (2.1.5.4) zur Analyse der sekretierten Siderophore verwendet. Diese wurden jeweils als Submerskultur in eisenfreiem und eisensupplementiertem Sundström-Medium in einem Zeitrahmen von 3 Wochen kultiviert und aus den jeweiligen Kulturfiltraten, wie in 2.5.1 beschrieben, Extrakte gewonnen, welche anschließend über HPLC- und HPLC-MS-Messungen (2.5.4) analysiert worden sind. Im Rahmen der betreuten Bachelorarbeiten von P. Schönberger (Schönberger, 2017) und A.-L. Hiller (Hiller, 2017) konnten hierbei verschiedene Derivate der Siderophorfamilie der Coprogene detektiert und identifiziert werden.

In der nachfolgenden Abbildung 23 ist exemplarisch das HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltratextrakts des Isolats *IB-Rüd01-16* gezeigt.

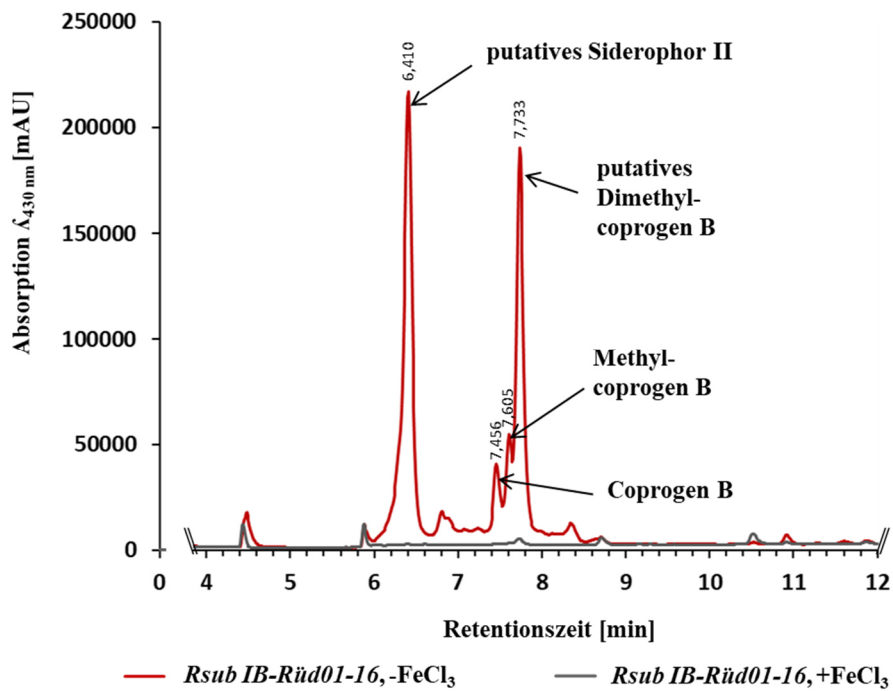


Abbildung 23: Identifizierung sekretierter Siderophore aus *Roesleria subterranea*. Gezeigt sind jeweils die HPLC-Chromatogramme (Detektionswellenlänge $\lambda_{430 \text{ nm}}$) der normalisierten Kulturfiltratextrakte (5 mg/ml) aus der 14-tägigen Kultivierung mit dem Isolat *Rsub IB-Rüd01-16* unter eisendefizienten (rot) und eisen-supplementierten (dunkelgrau) Bedingungen. Für die Messungen wurde jeweils der in Tabelle 10 (2.5.4.1) aufgeführte Gradient verwendet.

Hierbei konnten die Siderophore Coprogen B mit einer Retentionszeit von $\sim 7,5$ min (Abb. 23) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 780,3 (nicht gezeigt; vergleichbar zu Abb. 20, 1) und Methylcoprogen B mit einer Retentionszeit von $\sim 7,6$ min (Abb. 23) und einer Masse von m/z 794,3 identifiziert werden (nicht gezeigt; vergleichbar zu Abb. 20, 2). Des Weiteren wurde aufgrund der UV-Vis- und Massenspektren das putative Siderophor Dimethylcoprogen B mit einer Retentionszeit von $\sim 7,7$ min (Abb. 23) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 808,3 (nicht gezeigt; vergleichbar zu Abb. 20, 3) vermutet. Mit einer Retentionszeit von $\sim 6,4$ min (Abb. 23) und einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 1075,3 (Abb. 24, A) wurde darüber hinaus noch ein weiteres, putatives Siderophor (Siderophor II) aufgrund des UV-Vis-Spektrums (Abb. 24, B), welches den Spektren von bereits bekannten Hydroxamat-Siderophoren aus der internen Substanzdatenbank des IBWF glich und sich zusätzlich jeweils durch ein signifikantes Maximum bei einer Wellenlänge von ~ 430 nm nach Eisenzugabe zum Extrakt auszeichnete (Neilands, 1981; Jalal und van der Helm, 1991), detektiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings für dieses keine Strukturaufklärung durchgeführt werden.

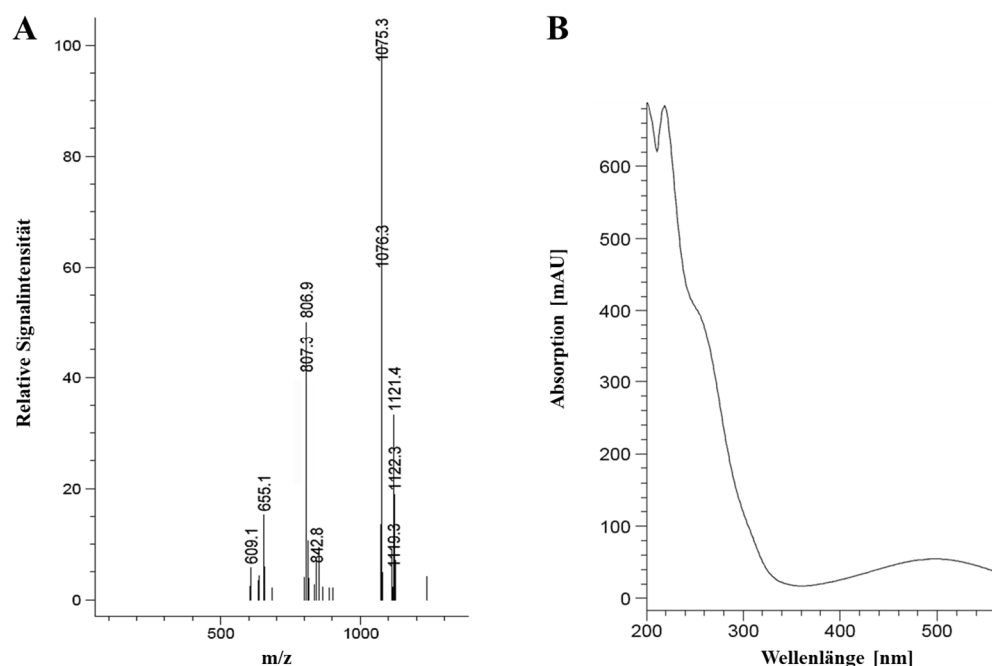


Abbildung 24: Massen- und UV-Vis-Spektrum des detektierten, putativen Siderophors II aus *Roesleria subterranea*. Gezeigt ist das Massenspektrum (positive Ionisierung) (A) sowie das UV-Vis-Spektrum (B) des putativen Siderophors II aus der HPLC-MS-Analyse (2.5.4.2) des Kulturfiltratextrakts, welches aus der 14-tägigen, eisendefizienten Kultivierung des Isolats *Rsub IB-Rüd01-16* gewonnen wurde.

Der Vergleich zwischen den detektierten Siderophoren des Isolats *IB-Rüd01-16* und den Isolaten *CBS 201.25*, *CBS 407.51*, *CBS 271.82*, *CBS 272.82* und *CBS 339.96* ist der Tabelle 16 zu entnehmen. Nur für das Isolat *CBS 339.96* konnte die exakt gleiche Siderophor-Komposition der Coprogen-Derivate im Extrakt festgestellt werden.

Tabelle 16: Vergleich der detektierten Siderophore aus den Kulturfiltrat (KF)-Extrakten des Isolats *IB-Rüd01-16* und den Isolaten *CBS 201.25*, *CBS 407.51*, *CBS 271.82*, *CBS 272.82* und *CBS 339.96*. KF-Extrakte wurden aus der jeweiligen 14-tägigen Submerskultivierung der *Rsub*-Isolate in Sundström-Medium gewonnen. *: putatives Siderophor aufgrund von Massen- und UV-Vis-Spektrum; √: detektiert; -: nicht detektiert.

Siderophor	Organismus	<i>IB-Rüd01-16</i>	<i>CBS 201.25</i>	<i>CBS 407.51</i>	<i>CBS 271.82</i>	<i>CBS 272.82</i>	<i>CBS 339.96</i>
Coprogen B [M -2H+Fe] ⁺ m/z 780		√	-	-	√	-	√
Methylcoprogen B [M -2H+Fe] ⁺ m/z 794		√	√	-	√	√	√
Dimethylcoprogen B* [M -2H+Fe] ⁺ m/z 808		√	√	√	-	-	√
Hydroxydimethylcoprogen B* [M -2H+Fe] ⁺ m/z 824		-	-	√	-	-	-

3.2 Identifizierung der Esca-assoziierten Siderophore aus Weinrebenpflanzen

Um zu klären, inwiefern Siderophore im Krankheitsverlauf von Esca an der Weinrebe involviert sind, wurde zunächst versucht gezielt sekretierte Siderophore der Esca-assoziierten Pilze in verschiedenen Weinrebenproben, welche von dem Weingut Schäfer aus Herrnsheim und von [REDACTED] zur Verfügung gestellt wurden, zu detektieren. Hierbei wurden Proben bestehend aus Blattmaterial, verschiedenen Querschnitten des Stammes und Wurzelmaterial aus drei verschiedenen Jahren (2016, 2018 und 2019) zusammengetragen, welche im Hinblick auf die Esca-Krankheit sowohl von symptomatischen als auch asymptomatischen Weinreben entnommen wurden. Die Zusammenstellung der untersuchten Weinrebenproben ist der Tabelle 34 (7.6) zu entnehmen. Aus den Proben wurden, wie in 2.5.3 beschrieben, jeweils Rohextrakte generiert, welche unter Zuhilfenahme der HPLC-MS analysiert (2.5.4.2) worden sind. Hierbei wurden die Messungen im SIM-Mode mit ESI durchgeführt und gezielt die Ionen mit einem bestimmten m/z-Verhältnis der Molekülmassen von den bereits in Abschnitt 3.1 identifizierten Siderophoren aus den Esca-assoziierten Pilzen fokussiert.

Für die generierten Pflanzenextraktproben konnten mit der aufgeführten Analysemethode keine signifikanten Signale vorgefunden werden, welche auf das Vorhandensein der bereits identifizierten Siderophore aus den Esca-assoziierten Pilzen in den Proben schließen lassen würden.

3.3 Identifizierung der in der Siderophor-Biosynthese involvierten Genen in Esca-assoziierten Pilzen

Um den Siderophor-Biosyntheseweg der Esca-assoziierten Pilzen näher analysieren zu können, wurden zunächst putative Gene und Gencluster der zu untersuchenden Pilzen identifiziert, welche in der Biosynthese involviert sein könnten. Im weiteren Verlauf wurde deren Funktionalität in der Siderophor-Biosynthese des jeweiligen Pilzes überprüft, indem von ausgewählten Genen zielgerichtete Geninaktivierungsmutanten generiert worden sind, welche anschließend phänotypisch charakterisiert wurden. Hierbei wurde der Fokus der Untersuchungen auf *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) IBWF 1315 und *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*) IBWF 1189 gelegt, deren Ergebnisse im Nachfolgendem näher beschrieben wurden.

3.3.1 Identifizierung der an der Siderophor-Biosynthese beteiligten Genen und Gencluster in *Phaeoconiella chlamyospora*

Zur Identifizierung der Gene und Gencluster, welche in der Siderophore-Biosynthese in *Pch* involviert sind (Abb. 25), wurden die Sequenzdaten von *Pch UCRPC4* verwendet.

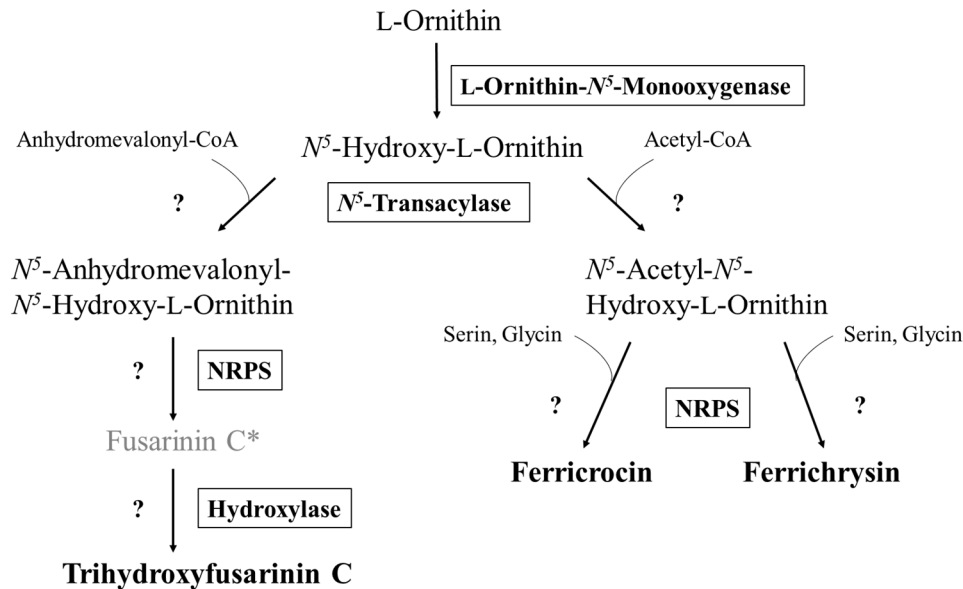


Abbildung 25: Putativer Siderophor-Biosyntheseweg in *Phaeoconiella chlamyospora*. Der putative Siderophor-Biosyntheseweg von *Pch* wurde anhand der Ergebnisse aus 3.1.1.1 in Anlehnung an Haas *et al.* (2008) erstellt. Enzyme, welche putativ an der Siderophor-Biosynthese beteiligt sind, wurden schwarz umrandet markiert. *: mögliche Vorstufe von Trihydroxyfusarinin C, bisher nicht in *Pch* detektiert.

Hierbei wurde sowohl eine antiSMASH (fungal version)-Analyse (Medema *et al.*, 2011; Blin *et al.*, 2019) (2.1.10; Tab. 5) von dessen Genom als auch ein Homologievergleich mittels gezielter BLAST-Analyse über die NCBI- (Altschul *et al.*, 1990; States und Gish, 1994) und JGI MycoCosm BLAST-Analyse (Nordberg *et al.*, 2014; Grigoriev *et al.*, 2014) (2.1.10; Tab. 5) anhand der Aminosäuresequenz von annotierten Genen aus *Pch UCRPC4* und der Aminosäuresequenz von bereits identifizierten, kodierenden Genen der Siderophor-Biosynthese aus den Organismen *Aspergillus fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007), *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium graminearum*, *Ustilago maydis* (Yuan *et al.*, 2001; Oide *et al.*, 2007). und *Magnaporthe oryzae* (Hof *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2009) durchgeführt. Es konnten hierbei drei putative Gencluster der Siderophor-Biosynthese (Abb. 26) für *Pch* detektiert werden.

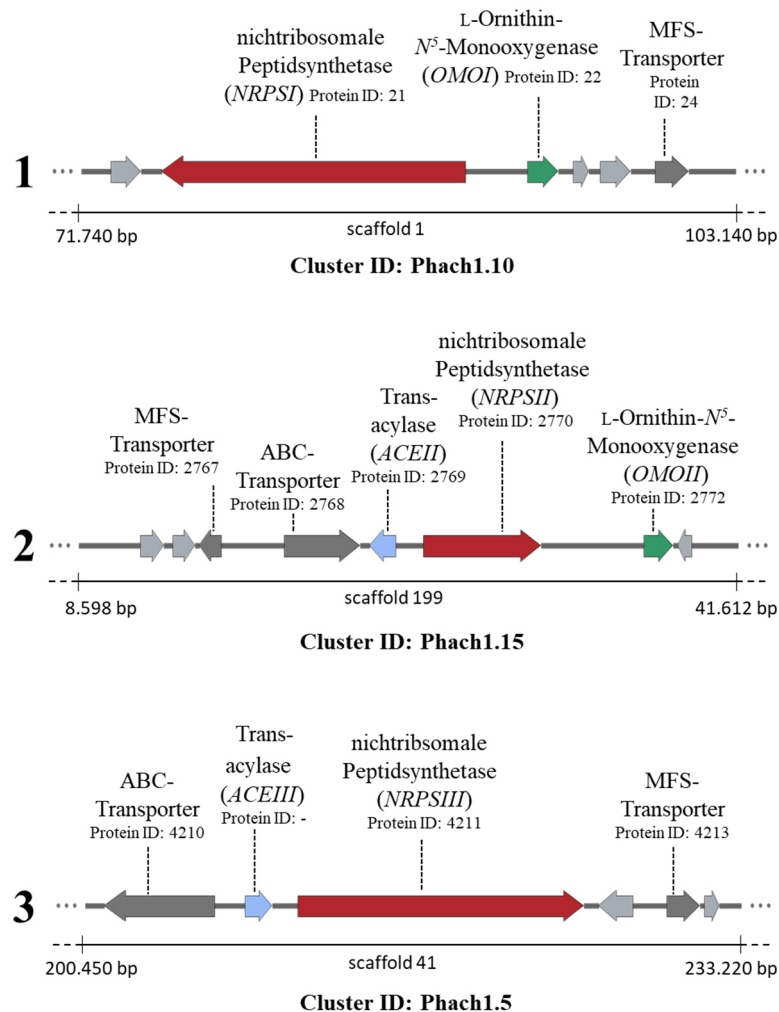


Abbildung 26: Schematische Darstellung der putativen Gencluster der Siderophor-Biosynthese in *Phaeomonieella chlamydospora* (*Pch*). Gezeigt sind Gencluster 1 (Cluster ID: Phach1.10) mit nichtribosomale Peptidsynthetase(*NRPSI*)-, L-Ornithin-*N*⁵-Monooxygenase(*OMOI*)- und MFS (*Major Facilitator Superfamily*)-Transporter-Gen, Gencluster 2 (Cluster ID: Phach1.15) mit MFS-Transporter-, ABC-Transporter-, Transacylase(*ACEII*)-, *NRPSII*- und *OMOII*-Gen, Gencluster 3 (Cluster: ID Phach1.5) mit ABC-Transporter-, *ACEIII*-, *NRPSIII* und MFS-Transporter-Gen in *Pch*. Die Graphik wurde mittels SnapGene Viewer V5 erstellt.

3.3.1.1 Die L-Ornithin-*N*⁵-Monooxygenase-Gene

Anhand der antiSMASH-Analyse von *Pch UCRPC4* und des Homologievergleichs mit der Aminosäuresequenz zu bereits bekannten L-Ornithin-*N*⁵-Monooxygenase (*OMO*)-Genen, *OMOI* (MGG_04212) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007) und *SIDA* (Afu2g07680) aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2004; Baltussen *et al.*, 2018), konnten über die BLAST-Analyse von NCBI in *Pch UCRPC4* zwei annotierte Gene *PchOMOI* (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 22, scaffold_1:93185-94654) und *PchOMOII* (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 2772, scaffold_199:36922-38274) detektiert werden, welche beide putativ für die L-Ornithin-*N*⁵-Monooxygenase kodieren. Die Homologievergleichswerte können der nachfolgenden Tabelle (Tab. 17) entnommen werden.

Tabelle 17: Homologievergleich von den putativen L-Ornithin- N^5 -Monooxygenasen aus *Phaeoemoniella chlamydospora* UCRPC4 mit SidAp aus *Aspergillus fumigatus* und Omo1p aus *Magnaporthe oryzae*. Aufgeführt sind die ermittelten Sequenzidentität (I) und -similarität (S) in Prozent aus der BLAST-Analyse (Substitutionsmatrix BLOSUM62) von NCBI mit der Aminosäuresequenz (AS) von *OMO1* und *SIDA*, welche in der Siderophor-Biosynthese der genannten Pilze involviert sind, gegenüber der putativen AS von *PchOMO1* und *PchOMOII* aus *Pch* UCRPC4.

	Omo1p (MGG_04212)		SidAp (Afu2g07680)	
	I [%]	S [%]	I [%]	S [%]
PchomoIp (ID 22)	44	61	54	70
PchomoIIp (ID 2772)	30	48	30	51

Das Gen *PchOMO1*, welches dem Gencluster 1 (Abb. 26, 1, Cluster ID: Phach.1.10) zuzuordnen ist, hat eine Gesamtlänge von 1470 bp und ist von zwei Introns an den Positionen 1 bis 845 bp und 893 bis 1470 bp unterbrochen. Das Gen *PchOMOII*, welches im Gencluster 2 (Abb. 26, 2, Cluster ID: Phach.1.15) lokalisiert ist, hat eine Gesamtlänge von 1353 bp und beinhaltet kein Intron.

3.3.1.1.1 Inaktivierung der L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Gene *PchOMO1* und *PchOMOII*

Um die Funktionalität der beiden L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Gene *PchOMO1* und *PchOMOII* in der Siderophor-Biosynthese von *Pch* zu überprüfen, wurden zunächst Geninaktivierungsmutanten von dem jeweiligen Gen sowie eine Doppelgeninaktivierungsmutante beider Gene mit dem Stamm *Pch IBWF 1315* zielgerichtet generiert. Hierzu wurden, wie in 2.3.5, 7.2.1, 7.2.2 beschrieben, die Geninaktivierungsvektoren *pCAMB-PchOMO1-HPT* und *pCAMB-PchOMOII-G418* hergestellt und für eine *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (ATMT) (2.3.9) von *Pch IBWF 1315* eingesetzt. Unter Zuhilfenahme der Kolonie-PCR (2.3.2.3), den Primerpaaren aus Tabelle 30 (7.1.2) und der DNA der generierten Transformanten wurden potenzielle Geninaktivierungsmutanten ermittelt, welche über eine Southern Blot-Analyse (2.3.10) final verifiziert worden sind. Hierbei konnten für *PchOMO1* zwei Mutanten $\Delta PchomoI\#16$ und $\#26$ (7.7.2, Abb. 54) und für *PchOMOII* eine Mutante $\Delta PchomoII\#24$ (7.7.2, Abb. 55) bestätigt werden. Zur Generierung der Doppelgeninaktivierungsmutante $\Delta PchomoII/\Delta PchomoI$ wurde für die ATMT die Mutante $\Delta PchomoII\#24$ und der Vektor *pCAMB-PchOMO1-HPT* verwendet. Die erfolgreiche Verifizierung der generierten Geninaktivierungsmutante $\Delta PchomoII\#24/\Delta PchomoI\#3$ über die Southern Blot-Analyse ist der Abbildung 56 (7.7.2) zu entnehmen. Des Weiteren wurde eine Komplementation unter Zuhilfenahme des im Zuge dieser Arbeit generierten Komplementationsvektors *pSJ-komp PchOMO1-G418* (7.2.1) von $\Delta PchomoI\#16$ durchgeführt. Hierbei konnte eine erfolgreiche Komplementation anhand der

Kolonie-PCR mit der DNA der generierten Transformante $\Delta PchomI\#16/OMOI$ (7.7.3, Abb. 62) und der anschließenden Untersuchung des Kulturfiltratextrakts aus der Kultivierung in eisemfreiem Sundström-Medium (3.3.1.1.2) bestätigt werden.

3.3.1.1.2 Die Produktion der Siderophore in $\Delta PchomI$, $\Delta PchomI/OMOI$, $\Delta PchomII$ und $\Delta PchomII/\Delta PchomI$

Um den Einfluss der detektierten putativen Gene der L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase auf die Biosynthese von extra- und intrazellulären Siderophoren in *Pch* zu analysieren, wurde die Siderophor-Produktion der generierten Geninaktivierungsmutanten im Vergleich zum Wildtyp *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) näher untersucht. Dazu wurden die Mutanten $\Delta PchomI\#16$, $\Delta PchomI\#16/OMOI$, $\Delta PchomII\#24$, $\Delta PchomII\#24/\Delta PchomI\#3$ (nachfolgend als $\Delta PchomI$, $\Delta PchomI/OMOI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$ bezeichnet) und *PchWT* als Kontrolle, wie in 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben, in eisemfreiem Sundström-Medium kultiviert und aus dem jeweiligen Kulturfiltrat und Myzel Extrakte hergestellt, welche unter Zuhilfenahme der HPLC und HPLC-MS (2.5.4) analysiert worden sind.

Extrazelluläre Siderophore:

Der Abbildung 27 ist die HPLC-Analyse zur Detektion der sekretierten Siderophore des Wildtyps *PchWT* (A) im Vergleich zu den Mutanten $\Delta PchomI$ (B), $\Delta PchomII$ (C) und $\Delta PchomII/\Delta PchomI$ (D) zu entnehmen. Im Kulturfiltratextrakt von $\Delta PchomI$ wurden keine Siderophore detektiert. Hingegen konnten für $\Delta PchomII$ und *PchWT* die Siderophore Ferrichrysin, Trihydroxyfusarinin C sowie geringe Mengen des intrazellulären Siderophors Ferricrocin festgestellt werden. Allerdings wurde für $\Delta PchomII$ im Vergleich zum Wildtyp eine geringer Signalintensität der einzelnen Siderophore detektiert. Im Falle der Doppelgeninaktivierung beider putativen L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Gene ($\Delta PchomII/\Delta PchomI$) wurden, vergleichbar zu $\Delta PchomI$, keine Siderophore im Extrakt vorgefunden. Für die Komplementationsmutante $\Delta PchomI/OMOI$ konnten hingegen die Siderophore Ferrichrysin, Ferricrocin und Trihydroxyfusarinin C dokumentiert werden (7.7.4.1, Abb. 64).

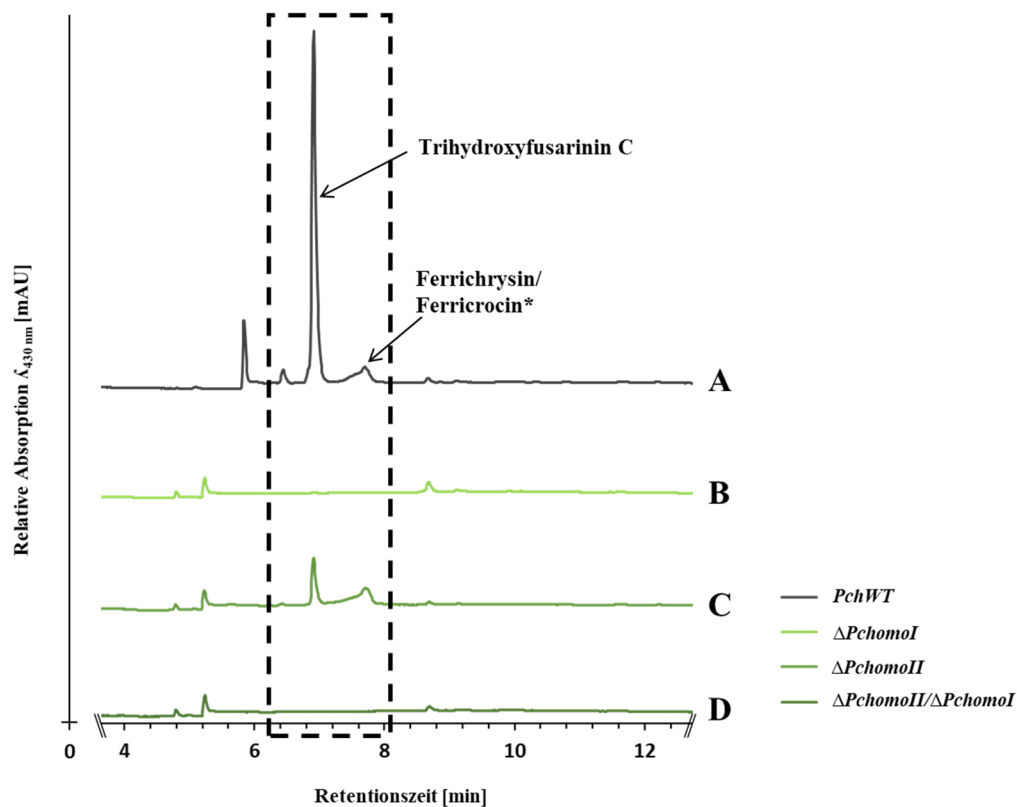


Abbildung 27: Vergleich der Produktion von extrazellulären Siderophoren aus $\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$ und *PchWT*. Gezeigt sind jeweils die HPLC-Chromatogramme (Detektionswellenlänge $\lambda_{430\text{ nm}}$) der normalisierten Kulturfiltratrohextrakte (5 mg/ml) aus der siebentägigen Kultivierung in eisendefizientem Sundström-Medium mit dem Wildtyp *Pch IBWF 1315 PchWT* (A) und den Mutanten $\Delta PchomI$ (B), $\Delta PchomII$ (C) und $\Delta PchomII/\Delta PchomI$ (D). Für die Messungen wurde jeweils der in Tabelle 11 (2.5.4.1) aufgeführte Gradient verwendet. Für $\Delta PchomI$ und $\Delta PchomII/\Delta PchomI$ wurden im Gegensatz zu *PchWT* und $\Delta PchomII$ keine Siderophore detektiert.

Intrazelluläre Siderophore:

Zur Analyse der synthetisierten, intrazellulären Siderophore der generierten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurden die Myzelextrakte jeweils unter Zuhilfenahme der HPLC-MS mit ESI im SIM-Mode untersucht. Hierbei wurde von dem bereits identifizierten Siderophor Ferricrocin (3.1.1.1.2) die Ionen im Verhältnis m/z der Molekülmasse $[M - 2H + Fe]^+$ m/z 771 fokussiert. Die Analyse ist der Abbildung 66 (7.7.4.2) zu entnehmen. Für $\Delta PchomI$ und auch für die Doppelgeninaktivierungsmutante $\Delta PchomII/\Delta PchomI$ konnte im Gegensatz zum Wildtyp kein signifikantes Signal detektiert werden. Für $\Delta PchomII$ wurde hingegen ein spezifisches Signal für Ferricrocin festgestellt. Für die Komplementationsmutante $\Delta PchomI/OMOI$ wurde dagegen erneut Ferricrocin im Myzelextrakt nachgewiesen.

3.3.1.2 Die Acyltransferase-Gene

Für die Identifizierung von potenziellen Acyltransferase (ACE)-Genen, welche in der Siderophor-Biosynthese in *Pch* involviert sind (Abb. 25), wurde sowohl eine antiSMASH-Analyse von *Pch UCRPC4* als auch ein Homologievergleich mit putativen ACE-Genen und der

jeweiligen Aminosäuresequenz zu den bereits bekannten ACE-Genen *SIDL* (AFUA_1G04450), *SIDF* (AFUA_3G03400) und *SIDG* (AFUA_3G03650) der Siderophor-Biosynthese aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2018) über die BLAST-Analyse von NCBI (Substitutionsmatrix BLOSUM62) durchgeführt. Hierbei konnten für *Pch UCRPC4* ein annotiertes Gen *PchACEII* (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 2769, scaffold_199:23180-24472) und ein bisher nicht annotiertes Gen *PchACEIII* (JGI *Pch UCRPC4* scaffold_41: 208377-209819) detektiert werden. Für *PchACEIII* wurde anhand einer anschließenden *orf*-Analyse des Nukleotidsequenzbereichs über UGENE die Aminosäuresequenz ermittelt. Die Homologievergleichswerte können der nachfolgenden Tabelle (Tab. 18) entnommen werden.

Tabelle 18: Homologievergleich zwischen putativen Acylasen (ACE) aus *Phaeoemoniella chlamydospora UCRPC4* und den ACE SidLp, SidFp und SidGp der Siderophor-Biosynthese aus dem Organismus *Aspergillus fumigatus*. Aufgeführt sind die ermittelten Identitäts (I)- und Similaritäts (S)-werte in Prozent aus der BLAST-Analyse von NCBI (Substitutionsmatrix BLOSUM62) mit der Aminosäuresequenz von *SIDL*, *SIDF* und *SIDG*, welche in der Siderophor-Biosynthese von *A. fumigatus* involviert sind, gegenüber der putativen von *PchACEII* und *PchACEIII* aus *Pch UCRPC4*.

	SidLp (AFUA_1G04450)		SidFp (AFUA_3G03400)		SidGp (AFUA_3G03650)	
	I [%]	S [%]	I [%]	S [%]	I [%]	S [%]
PchaceIIp (ID 2769)	36	47	48	65	43	56
PchaceIIIp (ID -)	26	39	38	55	39	56

Das Gen *PchACEII*, welches dem Gencluster 2 (Abb. 26, 2, Cluster ID: Phach.1.15) zuzuordnen ist, hat eine Gesamtlänge von 1293 bp und wird von keinem Intron unterbrochen. Das Gen *PchACEIII*, welches im Gencluster 3 (Abb. 26, 3, Cluster ID: Phach.1.5) lokalisiert ist, hat eine Gesamtlänge von 1442 bp.

3.3.1.2.1 Inaktivierung der Acyltransferase-Gene *PchACEII* und *PchACEIII*

Von den zwei detektierten putativen Acyltransferase-Genen (*PchACEII* und *PchACEIII*) wurden die Geninaktivierungsvektoren *pCAMB-PchACEII-HPT* und *pCAMB-PchACEIII*, wie in 2.3.5, 7.2.7 und 7.2.8 beschrieben, generiert und für die ATMT (2.3.8, 2.3.9) von *Pch IBWF 1315* eingesetzt. Von den generierten Transformanten wurde unter Zuhilfenahme der Kolonie-PCR (2.3.2.3) und den in Tabelle 30 (7.1.2) aufgeführten Oligonukleotidprimer potenzielle Geninaktivierungsmutanten ermittelt, welche über die Southern Blot-Analyse (2.3.10) final verifiziert worden sind. Für die Geninaktivierung von *PchACEII* wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR aus 32 generierten Transformanten drei potenzielle Geninaktivierungsmutanten $\Delta PchaceII\#7$, $\Delta PchaceII\#8$ und $\Delta PchaceII\#20$ detektiert, welche über die Southern Blot-Analyse erfolgreich verifiziert worden sind (7.7.2, Abb. 57). Für die

Geninaktivierung von *PchACEIII* wurde mit Hilfe der Kolonie-PCR aus 76 generierten Transformanten eine potenzielle Geninaktivierungsmutante $\Delta PchaceIII\#51$ vorgefunden, welche auch über die Southern Blot-Analyse erfolgreich verifiziert werden konnte (7.7.2, Abb. 58). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es jedoch nicht möglich eine Komplementation erfolgreich durchzuführen.

3.3.1.2.2 Die Produktion der Siderophore in $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$

Um den Einfluss der detektierten putativen Acyltransferase-Gene *PchACEII* und *PchACEIII* auf die Biosynthese von extra- und intrazellulären Siderophoren in *Pch* zu klären, wurden Myzel- und Kulturfiltratextrakte, wie in 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben, aus der jeweiligen siebentägigen Kultivierung der Mutanten $\Delta PchaceII\#7$ und $\Delta PchaceIII\#51$ (nachfolgend als $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ bezeichnet) und dem Wildtyp *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) generiert und mittels HPLC- und HPLC-MS-Analysen (2.5.4) im Hinblick auf das Vorhandensein der bereits detektierten Siderophore (3.1.1.1) analysiert.

Extrazelluläre Siderophore:

Das Ergebnis der HPLC-Analyse zur Detektion sekretierter Siderophore aus $\Delta PchaceII$ (B) und $\Delta PchaceIII$ (C) im Vergleich zum Wildtyp (A) ist der Abbildung 28 zu entnehmen. Im Gegensatz zum Wildtyp und der Mutante $\Delta PchaceIII$ konnte für $\Delta PchaceII$ kein Trihydroxyfusarinin C im Kulturfiltratextrakt nachgewiesen werden. Ferrichrysin und Ferricrocin konnten dagegen in allen Extrakten detektiert werden.

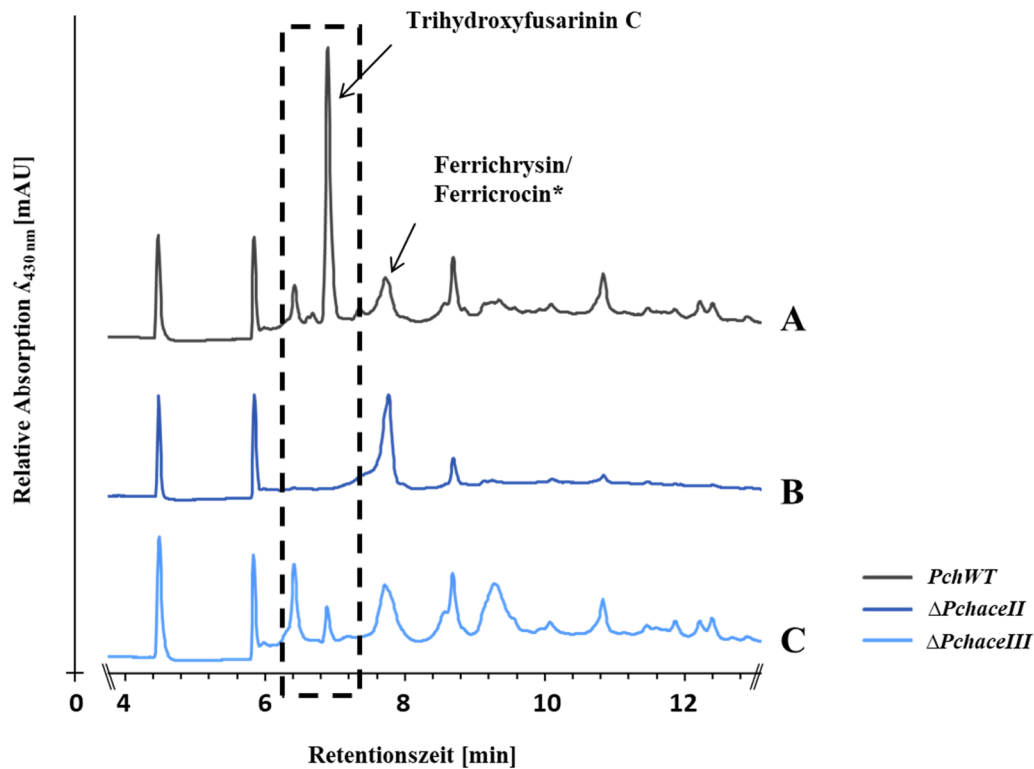


Abbildung 28: Vergleich der Produktion von extrazellulären Siderophoren aus $\Delta PchaceII$, $\Delta PchaceIII$ und $PchWT$. Gezeigt sind jeweils die HPLC-Chromatogramme (Detektionswellenlänge $\lambda_{430\text{ nm}}$) der normalisierten Kulturfiltratrohextrakte (5 mg/ml) aus der siebentägigen Kultivierung mit dem Wildtyp *Pch IBWF 1315* ($PchWT$) (A) und den Mutanten $\Delta PchaceII$ (B) und $\Delta PchaceIII$ (C) in eisendefizientem Sundström-Medium. Für die Messungen wurde jeweils der in Tabelle 11 (2.5.4.1) aufgeführte Gradient verwendet. Für $\Delta PchaceII$ wurde im Gegensatz zu $\Delta PchaceIII$ und $PchWT$ Trihydroxyfusarinin C nicht detektiert. Ferrichrysin und Ferricrocin konnte in allen Extrakten nachgewiesen werden.

Intrazelluläre Siderophore:

In den Myzelextrakten wurde anhand der HPLC-MS-Analyse für den Wildtyp und die Mutanten $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ jeweils das Signal des Siderophors Ferricrocin nachgewiesen (7.7.4.2, Abb. 66).

3.3.1.3 Die nichtribosomalen Peptidsynthetase-Gene

Zur Identifizierung von putativen nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS)-Genen, welche in der Siderophor-Biosynthese in *Pch* involviert sein könnten (Abb. 25), wurde zunächst eine antiSMASH-Analyse (2.1.10; Tab. 5) mit dem Genom von *Pch UCRPC4* sowie Homologievergleiche zwischen Aminosäuresequenzen von annotierten NRPS-Genen aus *Pch UCRPC4* und bereits bekannten NRPS-Genen der Siderophor-Biosynthese aus verschiedenen Organismen über die BLAST-Analyse von JGI MycoCosm und NCBI (2.1.10; Tab. 5) durchgeführt: *SIDC* (AFUA_1G17200) und *SIDD* (AFUA_3G03420) aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007; Fedorova *et al.*, 2008), *NPS2* (AY884187) und *NPS6* (AY884191) aus *C. heterostrophus* (Lee *et al.*, 2005; Turgeon *et al.*, 2008) und *NPS2* (EYB30114.1) und *NPS6*

(EYB32861.1) aus *F. graminearum* (Oide *et al.*, 2006; Tobiasen *et al.*, 2007), *SSM1* (MGG_04211) und *SSM2* (MGG_14767T0) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2009), *SID2* (AAB93493) aus *U. maydis* (Yuan *et al.*, 2001; Oide *et al.*, 2007).

Hierbei konnten drei putative NRPS-Gene *PchNRPSI* (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 21, scaffold_1:75606-90203), *PchNRPSII* (JGI Protein *Pch UCRPC4* ID: 2770, scaffold_199:25887-31772) und *PchNRPSIII* (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 4211, scaffold_41:211084-225412) in *Pch UCRPC4* detektiert werden, deren Homologievergleichswerte der Tabelle 35 (7.7.1.1) entnommen werden können. Das Gen *PchNRPSI*, welches dem Gencluster 1 (Abb. 26, 1, Cluster ID: Phach.1.10) zuzuordnen ist, hat eine Gesamtlänge von 14.598 bp und ist von zwei Introns an den Positionen 7.915 bis 8.079 bp und 14.598 bis 14358 bp unterbrochen. Das Gen *PchNRPSII*, welches im Gencluster 2 (Abb. 26, 2, Cluster ID: Phach.1.15) detektiert wurde, hat eine Länge von 5886 bp und kein Intron vorzuweisen. Das Gen *PchNRPSIII*, welches auf Gencluster 3 (Abb. 26, 3, Cluster ID: Phach.1.5) vorzufinden ist, hingegen hat eine Gesamtlänge von 14.329 bp und zeichnet sich durch zwei Introns an Position 454 bis 505 bp und 11.000 bis 11.149 bp aus.

Des Weiteren wurde die modulare Organisation der jeweiligen putativen NRPS aus *Pch UCRPC4* anhand deren Aminosäuresequenzen unter Zuhilfenahme der SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*)-Analyse (Letunic und Bork, 2018; Letunic *et al.*, 2021) (2.1.10, Tab. 5) untersucht und in der nachfolgenden Tabelle 19 den Domänenstrukturen der identifizierten NRPS der Siderophor-Biosynthese aus den zuvor genannten Organismen gegenübergestellt. Die modulare Domänenstruktur von *PchnrpsIp* entspricht der Struktur der beiden NRPS, *Nps2p* aus *F. graminearum* und *Ssm1p* aus *M. oryzae*, welche beide bereits als Ferricrocin-Synthetase identifiziert worden sind (Tobiasen *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2007). Weiterhin wurden signifikante Übereinstimmungen zwischen der putativen Domänenstruktur von *PchnrpsIIp* und den beiden NRPS, *SidDp* aus *A. fumigatus* und *Nps6p* aus *F. graminearum* vorgefunden, welche beide in der Synthese von Triacetylfusarinin C und Fusarinin C involviert sind (Schrettl *et al.*, 2007; Oide *et al.*, 2006). Für *PchnrpsIIIp* wurde dagegen keine vollständige Übereinstimmung der putativen Domänenstruktur zu den in Tab. 19 aufgeführten festgestellt.

Tabelle 19: Vergleich der Domänenstrukturen zwischen ausgewählten, bereits identifizierten NRPS der Siderophor-Biosynthese und de putativen NRPS aus *Phaeomonilla chlamydospora*. Tabellarisch aufgelistet ist schematisch die modulare Organisation einzelner NRPS der Siderophor-Biosynthese aus verschiedenen Organismen im Vergleich zur putativen Domänenstruktur von PchnrpsI_p, PchnrpsII_p und PchnrpsIII_p aus *Pch UCRPC4*. Die Daten der putativen NRPS aus *Pch* wurden über die SMART-Analyse (2.1.10; Tab. 5) erhoben. A: Adenylierungsdomäne, T: Thiolierungsdomäne, C: Kondensationsdomäne, d: degenerierte Domäne, *: inaktive Domäne, nd: nicht bestimmt.

NRPS Typ	Protein	Modulare Organisation	Referenz
nd	PchnrpsI_p (JGI ID: 21)	A T C A T C T C A T C T C T C	SMART-Analyse (2.1.10, Tab. 5)
nd	PchnrpsII_p (JGI ID: 2270)	A T C A T C	SMART-Analyse (2.1.10, Tab. 5)
nd	PchnrpsIII_p (JGI ID: 4211)	A T C A T C A T C C T C	SMART-Analyse (2.1.10, Tab. 5)
Ferri- chrom NRPS	SidCp (Afu1g17200, <i>A. fumigatus</i>)	A T C A T C A T C T C T C	Schrettl <i>et al.</i> , 2007; Haas <i>et al.</i> , 2008
	Nps2p (AY884187, <i>C. heterostrophus</i>)	A T C A T C A T C A T C T C T C	Turgeon <i>et al.</i> , 2008; Haas <i>et al.</i> , 2008
	Nps2p (EYB30114.1, <i>F. graminearum</i>)	A T C A T C T C A T C T C T C	Tobiasen <i>et al.</i> , 2007; Haas <i>et al.</i> , 2008
	Ssm1p (MGG_04211, <i>M. oryzae</i>)	A T C A T C T C A T C T C T C	Hof <i>et al.</i> , 2007; Haas <i>et al.</i> , 2008
	Sid2p (AAB93493, <i>U. maydis</i>)	A T C A T C A T C T C*	Yuan <i>et al.</i> , 2001; Haas <i>et al.</i> , 2008
Coprogen NRPS	Nps6p (AY884191, <i>C. heterostrophus</i>)	A T C A* T T C	Turgeon <i>et al.</i> , 2008; Haas <i>et al.</i> , 2008
	Ssm2p (MGG_14767T0, <i>M. oryzae</i>)	A T C T C	Hof <i>et al.</i> , 2009
Fusarinin NRPS	SidDp (Afu3g03420, <i>A. fumigatus</i>)	A T C A* T C	Schrettl <i>et al.</i> , 2007; Haas <i>et al.</i> , 2008
	Nps6p (XM_383923, <i>F. graminearum</i>)	A T C dA* T C	Tobiasen <i>et al.</i> , 2007; Haas <i>et al.</i> , 2008

3.3.1.3.1 Inaktivierung der nichtribosomalen Peptidsynthetase-Gene *PchNRPSI*, *PchNRPSII* und *PchNRPSIII*

Von den drei detektierten, putativen NRPS-Genen *PchNRPSI*, *PchNRPSII* und *PchNRPSIII* wurden die Geninaktivierungsvektoren *pCAMB-PchNRPSI-HPT*, *pCAMB-PchNRPSII-HPT* und *pCAMB-PchNRPSIII-HPT*, wie in 2.3.5 und 7.2.4 - 7.2.6 beschrieben, generiert. Hierbei ist zu erwähnen, dass der Vektor *pCAMB-PchNRPSIII-HPT* im Zuge der Masterarbeit von

A.-L. Hiller (Hiller, 2019) hergestellt worden ist. Die Genaktivierungsvektoren wurden für die ATMT (2.3.8, 2.3.9) von dem Stamm *Pch IBWF 1315* eingesetzt. Von den generierten Transformanten wurden unter Zuhilfenahme der Kolonie-PCR (2.3.2.3) und den in Tabelle 30 (7.1.2) genannten Oligonukleotidprimer potenzielle Geninaktivierungsmutanten ermittelt, welche über die Southern Blot-Analyse (2.3.10) final verifiziert worden sind.

Im Zuge der Masterarbeit von A.-L. Hiller (Hiller, 2019) wurden für die Geninaktivierung von *PchNRPSI* insgesamt 235 Transformanten über die Kolonie-PCR-Analyse im Hinblick auf eine potenziell zielgerichtete Gen-Disruption von *PchNRPSI* mittels Hygromycin-Resistenzkassette in *Pch IBWF 1315* überprüft. Von keiner der untersuchten Transformanten konnte eine zielgerichtete Geninaktivierung bestätigt werden. Für die Geninaktivierung von *PchNRPSII* wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR aus 87 generierten Transformanten drei potenzielle Geninaktivierungsmutanten $\Delta PchnrpsII\#41$, $\Delta PchnrpsII\#62$ und $\Delta PchnrpsII\#77$ detektiert, welche über die Southern Blot-Analyse erfolgreich verifiziert worden sind (7.7.2, Abb. 59). Des Weiteren erfolgte eine Komplementation von $\Delta PchnrpsII\#41$ unter Zuhilfenahme des im Zuge dieser Arbeit generierten Komplementationsvektors *pSJ-komp PchNRPSII-G418* (7.2.5), welche anhand der Kolonie-PCR mit der DNA der generierten Transformante $\Delta PchnrpsII\#41/NRPSII$ (7.7.3, Abb. 63) und der anschließenden Untersuchung des Kulturfiltratextrakts aus der Kultivierung in eisemfreiem Sundström-Medium (3.3.1.3.2) bestätigt werden konnte. Für die Geninaktivierung von *PchNRPSIII* wurden insgesamt 237 generierte Transformanten, von denen 100 Transformanten im Zuge der Masterarbeit von A.-L. Hiller (Hiller, 2019) und 137 Transformanten im Zuge der vorliegenden Dissertation hergestellt worden sind, unter Zuhilfenahme der Kolonie-PCR-Analyse im Hinblick auf eine potenzielle Gen-Disruption von *PchNRPSIII* mittels Hygromycin-Resistenzkassette in *Pch IBWF 1315* untersucht. Von keinen der 237 Transformanten konnte eine zielgerichtete Geninaktivierung bestätigt werden.

3.3.1.3.2 Die Produktion der Siderophore in $\Delta PchnrpsII$ und $\Delta PchnrpsII/NRPSII$

Um die Funktion des detektierten nichtribosomale Peptidsynthetase-Gens *PchNRPSII* in der Biosynthese von extra- und intrazellulären Siderophoren in *Pch* zu klären, wurde die Siderophor-Produktion der generierten Geninaktivierungsmutante $\Delta PchnrpsII\#41$ (nachfolgend als $\Delta PchnrpsII$ bezeichnet) sowie die Komplementationsmutante $\Delta PchnrpsII/NRPSII$ im Vergleich zum Wildtyp *PchWT* analysiert. Hierfür wurden Myzel- und Kulturfiltratohextrakte aus der jeweiligen siebentägigen Kultivierung in eisemfreiem Sundström-Medium, wie in 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben, hergestellt und mittels HPLC- und

HPLC-MS-Analysen (2.5.4) im Hinblick auf das Vorhandensein der bereits detektierten Siderophore (3.1.1.1) untersucht.

Extrazelluläre Siderophore:

In der nachfolgenden Abbildung 29 ist die HPLC-Analyse zur Detektion von sekretierten Siderophoren aus $\Delta PchnrpsII$ (B) im Vergleich zum Wildtyp *PchWT* (A) gezeigt. Hierbei wurde im Kulturfiltratextrakt von $\Delta PchnrpsII$ kein Trihydroxyfusarinin C im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Ferrichrysin und auch geringe Mengen von Ferricrocin wurden dagegen in beiden Kulturfiltratextrakte detektiert. Für die Komplementationsmutante $\Delta PchnrpsII/NRPSII$ wurde die Anwesenheit der Siderophore Ferrichrysin, Ferricrocin und das putative Trihydroxyfusarinin C im Extrakt bestätigt (7.7.4.1, Abb. 65).

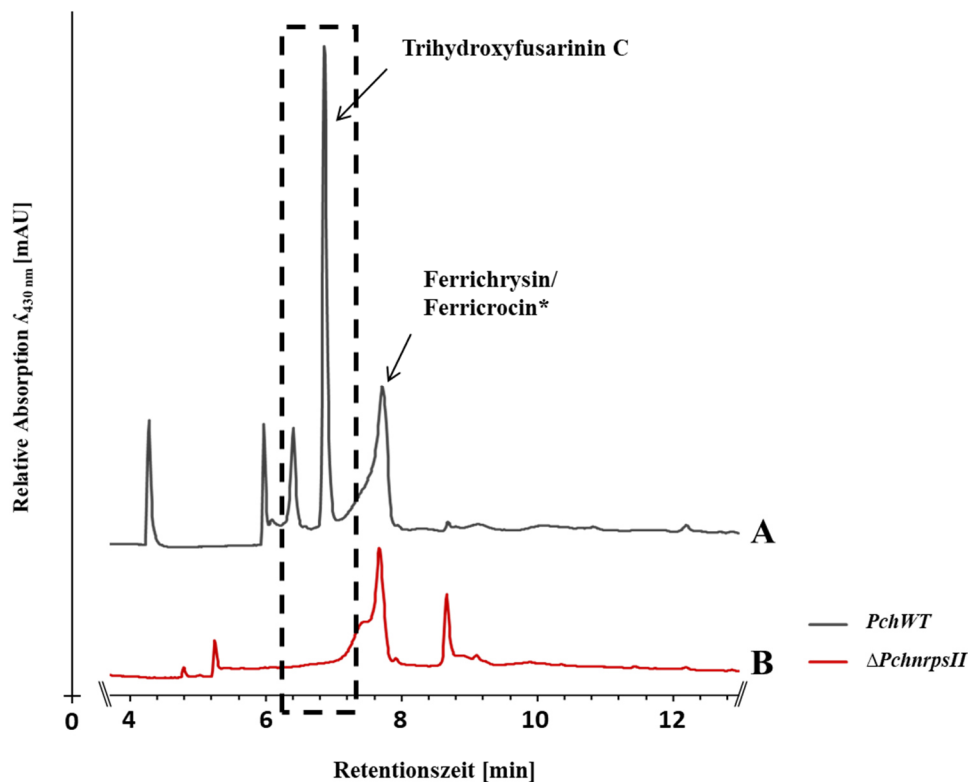


Abbildung 29: Vergleich der Produktion von extrazellulären Siderophoren aus $\Delta PchnrpsII$ und *PchWT*. Gezeigt sind jeweils die HPLC-Chromatogramme (Detektionswellenlänge $\lambda_{430\text{ nm}}$) der normalisierten Kulturfiltratrohextrakte (5 mg/ml) aus der siebentägigen Kultivierung mit dem Wildtyp *Pch IBWF 1315 PchWT* (A, dunkelgrau) und der Mutante $\Delta PchnrpsII$ (B, rot) in eisendefizientem Sundström-Medium. Für die Messungen wurde jeweils der in Tabelle 11 (2.5.4.1) aufgeführte Gradient verwendet. Für $\Delta PchnrpsII$ wurde im Gegensatz zu *PchWT* Trihydroxyfusarinin C nicht detektiert. Ferrichrysin und Ferricrocin wurden dagegen in beiden Extrakten vorgefunden.

Intrazelluläre Siderophore:

Unter Zuhilfenahme der HPLC-MS-Analyse konnte im Myzelextrakt für beide, Wildtyp und $\Delta PchnrpsII$, das Signal für das intrazelluläre Siderophor Ferricrocin detektiert werden (7.7.4.2,

Abb. 66). Darüber hinaus konnte auch für der Komplementationsmutante $\Delta PchnrpsII/NRPSII$ ein signifikantes Signal für Ferricrocin im Myzelextrakt nachgewiesen werden.

3.3.1.4 Phänotypische Charakterisierung der „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese aus *Phaeoconiella chlamydospora*

Um die Vitalität, der in der vorliegenden Arbeit generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pch* im Vergleich zum Wildtyp analysieren zu können, wurden verschiedene phänotypische Untersuchungen in Bezug auf die Konidiogenese, dem vegetativen Wachstum und der Morphologie der jeweiligen Mutanten durchgeführt.

3.3.1.4.1 Analyse der Konidiogenese

Zur Untersuchung der Konidiogenese der generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pch* wurden $\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$, $\Delta PchaceIII$ und der Referenzstamm *Pch IBWF 1315 (PchWT)*, wie in 2.4.1 beschrieben, jeweils auf HMG(M3)-Festmedium für 24 Tagen kultiviert und anschließend das jeweils ermittelte Myzelflächenwachstum und die Konidienanzahl der Mutanten mit der des Referenzstamms *PchWT* verglichen (Tab. 20).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp *PchWT* im Hinblick auf das jeweilige Myzelflächenwachstum beobachtet werden (7.7.5.1, Abb. 68). Das jeweils ermittelte Myzelflächenwachstum der Mutanten waren in etwa vergleichbar zu der des Wildtyps (Tab. 20). Hingegen konnten Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp bezüglich der jeweiligen Konidienanzahl beobachtet werden (Tab. 20). Hierfür wurde die Konidienanzahl pro Flächeneinheit des vegetativ, gebildeten Myzels von den jeweiligen Testorganismen nach 24-tägiger Kultivierung ermittelt und miteinander verglichen. Die Konidienanzahl war im Vergleich zu *PchWT* für die Mutanten $\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ um etwa 40 bis 50 % reduziert. Für $\Delta PchnrpsII$ wurde kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu *PchWT* in Bezug auf die jeweils ermittelte Konidienanzahl festgestellt.

Tabelle 20: Myzelflächenwachstum und Konidienanzahl der Mutanten $\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ im Vergleich zum Wildtypstamm. Aufgelistet sind von den zu untersuchenden Mutanten und dem Wildtypstamm *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) die ermittelte Myzelflächenwachstum und Konidienanzahl aus jeweils drei biologischen Replikaten nach 24-tägiger Kultivierung auf HMG-Festmedium. Angegeben sind die Werte relativ zu *PchWT* [100 %], sowie die jeweilige Standardabweichung. Die Konidienanzahl bezieht sich jeweils auf die Anzahl der gebildeten Konidien pro Myzel-Flächeneinheit.

	<i>PchWT</i>	$\Delta PchomI$	$\Delta PchomII$	$\Delta PchomII/\Delta PchomI$	$\Delta PchnrpsII$	$\Delta PchaceII$	$\Delta PchaceIII$
Myzelflächenwachstum	100,0 ±1,2	96,5 ±3,2	100,0 ±4,2	94,8 ±4,2	99,1 ±3,2	100,0 ±2,1	103,5 ±3,3
Konidienanzahl	100,0 ±4,9	47,8 ±3,3	66,8 ±9,7	49,1 ±14,5	110,0 ±6,6	55,8 ±3,3	57,1 ±2,6

3.3.1.4.2 Analyse des Wachstumsverhaltens unter oxidativem Stress

Da eine zelluläre Akkumulation von freiem Eisen das Potenzial hat durch die Haber-Weiss/Fenton-Reaktion die Produktion von zytotoxischen reaktiven Sauerstoffspezies zu katalysieren (Halliwell und Gutteridge, 1992), wird in vielen Mikroorganismen die Eisenhomöostase sorgfältig reguliert (Johnson, 2008). Einige Pilze synthetisieren hierfür Siderophore, um intrazellulär Eisen einlagern zu können (Haas *et al.*, 2008). Beispielsweise konnte in Studien von Eisendle *et al.* demonstriert werden, dass das intrazelluläre Siderophore Ferricrocin in der Resistenz gegenüber oxidativem Stress in *Aspergillus nidulans* involviert ist (Eisendle *et al.*, 2006). Um den Einfluss von oxidativem Stress auf das vegetative Wachstum der generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pch* zu analysieren, wurden $\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$, $\Delta PchaceIII$ und der Wildtyp *Pch IBWF 1315* (*PchWT*), wie in 2.4.2 beschrieben, jeweils auf HMG (M3)-Festmedium, welches mit verschiedenen Konzentrationen von H_2O_2 (0 %, 0,005 % und 0,05 %) supplementiert war, für 4 Wochen kultiviert. Anschließend wurde der jeweils ermittelte Kolonie-Durchmesser des vegetativ, gebildeten Myzels der Mutanten mit dem von *PchWT* verglichen (Abb. 30; 7.7.5.2, Abb. 70). Es konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten und *PchWT* in Bezug auf das jeweilige Myzelflächenwachstum beobachtet werden. Die ermittelten Kolonie-Durchmesserwerte der gewachsenen Mutanten (mit und ohne H_2O_2 supplementiert) waren in etwa vergleichbar zu dem des Wildtyps (Abb. 30). Ab einer Konzentration von 0,05 % H_2O_2 konnte eine Sensitivität von allen Testorganismen gegenüber H_2O_2 festgestellt werden, welche sich jeweils in eine Reduzierung des Kolonie-Durchmessers von etwa 1,5 cm äußerte.

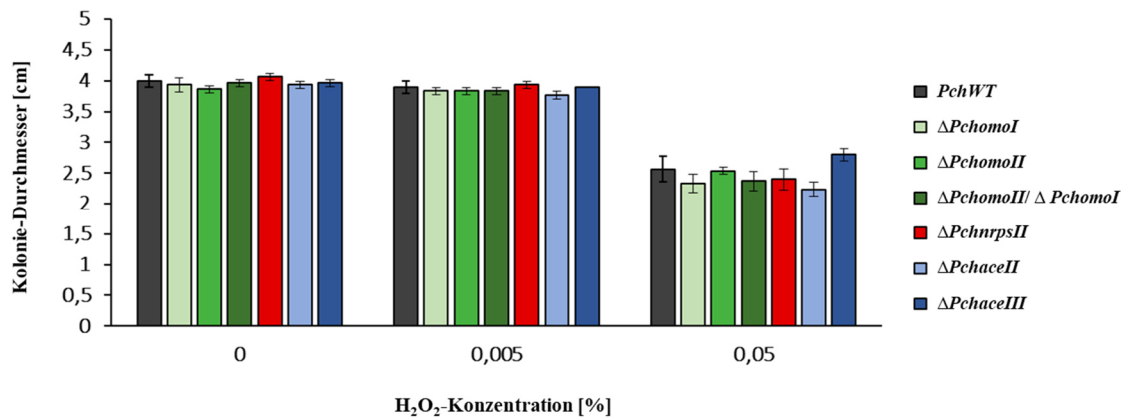


Abbildung 30: Einfluss von oxidativem Stress auf das vegetative Wachstum der Siderophor-Biosynthesemutanten von *Phaeoconiella chlamydospora*. Gezeigt sind jeweils die Kolonie-Durchmesser sowie die dazugehörige Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten der Mutanten $\Delta PchomOI$, $\Delta PchomOII$, $\Delta PchomOII/\Delta PchomOI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$, $\Delta PchaceIII$ und des Wildtyps *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) nach einer vierwöchigen Kultivierung auf HMG-Festmedium mit 0 %, 0,005 % und 0,05 % H₂O₂.

3.3.1.4.3 Analyse des Wachstumsverhaltens unter Eisenmangelbedingungen

Es wurde bereits von verschiedenen Disruptionsmutanten der Siderophor-Biosynthese in Pilzen eine erhöhte Sensitivität gegenüber einem Eisenmangel beschrieben. Beispielsweise führte die Disruption von *SIDA* zu einem vollständigen Verlust der Siderophor-Produktion in *A. nidulans* und resultierte unter eisenverminderten Kultivierungsbedingungen in einen nahezu nicht lebensfähigen Organismus (Eisendle *et al.*, 2003). Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Kultivierung unter Eisenmangelbedingungen auf das vegetative Wachstum der generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pch* untersucht. Dazu wurden $\Delta PchomOI$, $\Delta PchomOII$, $\Delta PchomOII/\Delta PchomOI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$, $\Delta PchaceIII$ und der Referenzstamm *Pch IBWF 1315* (*PchWT*), wie in 2.4.3 beschrieben, jeweils auf Sundström-Festmedium und als Kontrolle auf eisensupplementiertem Sundström-Festmedium für 25 Tagen bei RT (Abb. 31) und 30 °C (Abb. 32) kultiviert und anschließend das jeweils ermittelte Myzelflächenwachstum der Mutanten mit der des Referenzstamms verglichen.

Kultivierung bei RT:

Hierbei konnte im Vergleich zum Wildtyp eine Reduzierung des Myzelflächenwachstums der Mutanten $\Delta PchomOI$ und $\Delta PchomOII/\Delta PchomOI$ von jeweils ~40 % unter Eisenmangelbedingungen (Kultivierung auf Sundström-Festmedium ohne FeCl₃-Zugabe) beobachtet werden (Tab. 21). Auch auf eisenhaltigem Medium war von diesen das Myzelflächenwachstum im Vergleich zu *PchWT* ebenfalls vermindert, allerdings nur um ~27 %. Für die Mutante $\Delta PchaceII$ wurde unter eisenlimitierten Kultivierungsbedingungen ein um ~22 % geringeres Myzelflächenwachstum im Verhältnis zu *PchWT* dokumentiert. Unter

eisensupplementierten Kultivierungsbedingungen war diese im Gegensatz dazu nur noch um ~9 % reduziert (Tab. 21). Für die Mutanten $\Delta PchomoII$, $\Delta PchnrpsII$ und $\Delta PchaceIII$ wurde kein signifikanter Unterschied zwischen diesen und $PchWT$ bezüglich des ermittelten Myzelflächenwachstums unter eisenlimitierten bzw. -supplementierten Kultivierungsbedingungen festgestellt (Tab. 21).

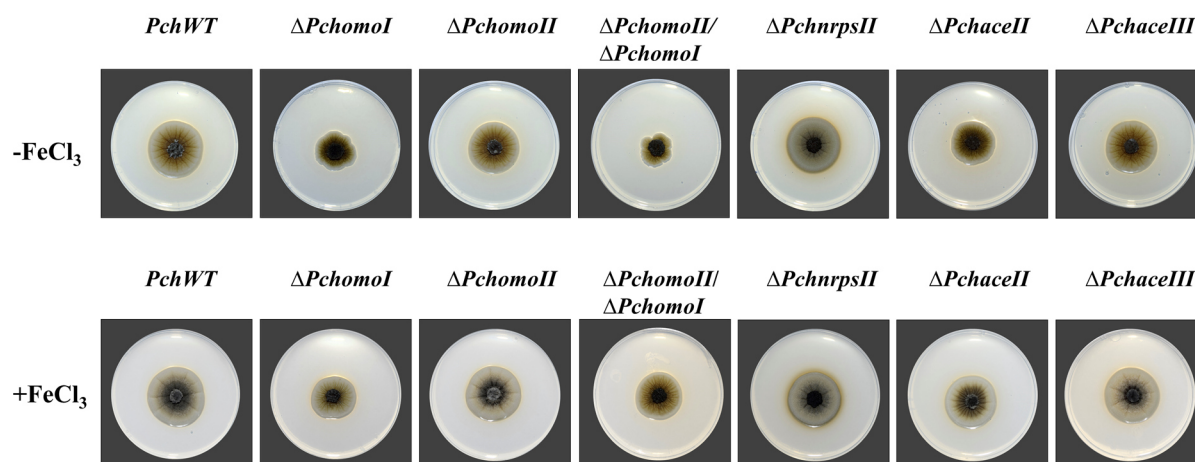


Abbildung 31: Einfluss von Eisenmangel auf das vegetative Wachstum der generierten Mutanten zur Siderophor-Biosynthese in *Phaeomonilla chlamydospora* bei RT. Gezeigt sind die Mutanten $\Delta Pchomol$, $\Delta PchomoII$, $\Delta PchomoII/\Delta Pchomol$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ und der Referenzstamm *Pch IBWF 1315* ($PchWT$) exemplarisch jeweils nach 25-tägiger Kultivierung auf Sundström-Festmedium und als Kontrolle auf eisensupplementiertem Sundström-Festmedium bei RT.

Tabelle 21: Myzelflächenwachstum der Mutanten $\Delta Pchomol$, $\Delta PchomoII$, $\Delta PchomoII/\Delta Pchomol$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ im Vergleich zum Wildtypstamm unter Eisenmangel. Aufgelistet sind von den zu untersuchenden Mutanten und dem Wildtypstamm *Pch IBWF 1315* ($PchWT$) das ermittelte Myzelflächenwachstum aus jeweils drei biologischen Replikaten nach 25-tägiger Kultivierung auf Sundström-Festmedium und als Kontrolle auf eisensupplementiertem Sundström-Festmedium bei RT. Angegeben sind die Werte relativ zu $PchWT$ [100 %], sowie die jeweilige Standardabweichung.

RT	<i>PchWT</i>	$\Delta Pchomol$	$\Delta PchomoII$	$\Delta PchomoII/\Delta Pchomol$	$\Delta PchnrpsII$	$\Delta PchaceII$	$\Delta PchaceIII$
Sundström	100,0 ±3,8	62,0 ±5,7	89,8 ±1,3	59,3 ±3,5	99,1 ±2,6	77,8 ±2,3	91,7 ±2,3
Sundström + 10 μM $FeCl_3$	100,0 ±1,3	72,7 ±1,3	95,5 ±2,2	73,6 ±2,1	97,3 ±1,3	90,9 ±2,6	98,2 ±2,2

Kultivierung bei 30 °C:

Das ermittelte Myzelflächenwachstum der jeweiligen Mutanten, welche sowohl unter Eisenmangel als auch auf eisensupplementiertem Medium bei einer Temperatur von 30 °C kultiviert wurden (Tab. 22), ist im Wesentlichen vergleichbar zu dem der Mutanten, welche unter Eisenmangel allerdings bei RT gewachsen sind (Tab. 21). Es konnte jeweils eine ähnliche Reduzierung des Myzelflächenwachstums der Mutanten $\Delta Pchomol$, $\Delta PchomoII/\Delta Pchomol$ und $\Delta PchaceII$ im Vergleich zu $PchWT$ dokumentiert (Tab. 21, Tab. 22) und ein vergleichbares Wachstumsverhalten der Mutanten $\Delta PchomoII$, $\Delta PchnrpsII$ und $\Delta PchaceIII$ zum Wildtyp

festgestellt werden (Abb. 31, Abb. 32). Bei allen konnte eine starke dunkelgrüne Pigmentierung beobachtet werden, welche bei einer Kultivierung unter Eisenmangel etwas deutlicher im Vergleich zu einer Kultivierung auf eisensupplementiertem Medium war.

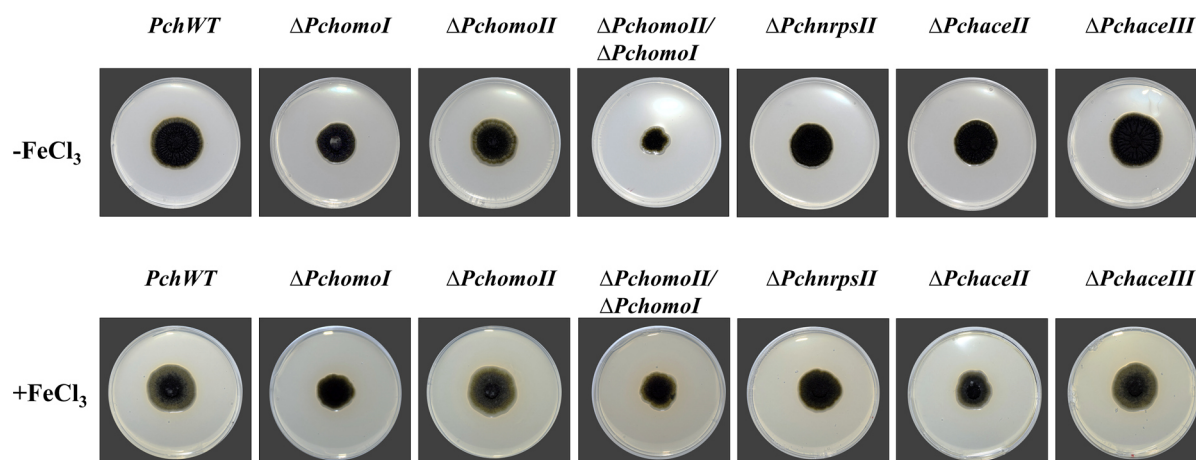


Abbildung 32: Einfluss von Eisenmangel auf das vegetative Wachstum der generierten Mutanten zur Siderophor-Biosynthese in *Phaeoemoniella chlamydospora* bei 30 °C. Gezeigt sind die Mutanten $\Delta Pchomol$, $\Delta PchomolII$, $\Delta PchomolII/\Delta PchomolI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ und der Referenzstamm *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) exemplarisch jeweils nach 25-tägiger Kultivierung auf Sundström-Festmedium und als Kontrolle auf eisensupplementiertem Sundström-Festmedium bei 30 °C.

Tabelle 22: Myzelflächenwachstum der Mutanten $\Delta Pchomol$, $\Delta PchomolII$, $\Delta PchomolII/\Delta PchomolI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ im Vergleich zum Wildtypstamm unter Eisenmangel. Aufgelistet sind von den zu untersuchenden Mutanten und dem Wildtypstamm *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) jeweils das ermittelte Myzelflächenwachstum aus jeweils drei biologischen Replikaten nach 25-tägiger Kultivierung auf Sundström-Festmedium und als Kontrolle auf eisensupplementiertem Sundström-Festmedium bei 30 °C. Angegeben sind die Werte relativ zu *PchWT* [100 %], sowie die jeweilige Standardabweichung.

30 °C	<i>PchWT</i>	$\Delta Pchomol$	$\Delta PchomolII$	$\Delta PchomolII/\Delta PchomolI$	$\Delta PchnrpsII$	$\Delta PchaceII$	$\Delta PchaceIII$
Sundström	100,0 ±3,7	71,2 ±3,6	92,6 ±1,7	56,3 ±1,4	95,8 ±2,4	82,5 ±1,4	106,8 ±1,4
Sundström + 10 µM FeCl ₃	100,0 ±3,0	77,2 ±3,9	98,9 ±1,5	71,6 ±5,4	94,7 ±2,6	87,4 ±6,5	101,1 ±2,6

3.3.1.4.4 Analyse des Wachstumsverhaltens unter Kokultivierungsbedingungen

Esca ist ein Krankheitskomplex, mit dem verschiedene Pilze, wie *Pch*, *Pmi*, *Fmed* oder auch *Ela*, assoziiert werden, welche das Holzgewebe der Weinrebe kolonisieren (Mugnai *et al.*, 1999). Allerdings ist noch wenig über deren Interaktionen und Wechselwirkungen zueinander bekannt. Aufgrund dessen sollte das Wachstumsverhalten im Hinblick auf die Interaktionen der generierten „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pch* zu den Esca-assoziierten Pilzen *Pmi*, *Fmed* und *Ela* im Vergleich zum Wildtyp *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) untersucht werden. Hierzu wurden die Mutanten $\Delta Pchomol$, $\Delta PchomolII$, $\Delta PchomolII/\Delta PchomolI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$, $\Delta PchaceIII$ und *PchWT* jeweils

zusammen mit *Pmi*, *Fmed* oder *Ela* unter Eisenmangelbedingungen auf Sundström (M10)-Festmedium und als Kontrolle auf eisenhaltigem Sundström (M10 mit 10 μM FeCl_3)-Festmedium für 4 Wochen kultiviert und das Wachstumsverhalten beobachtet (2.4.4). Die Interaktionen zwischen den Pilzen wurden, wie in Bertrand *et al.* (2013) beschrieben, in die vier Kategorien Distanzinhibition, Zonen-Linie, Kontaktinhibition und Überwachsen eingeordnet (Bertrand *et al.*, 2013). Die Versuche wurden bei RT und auch bei 30 °C durchgeführt.

Sowohl unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen als auch bei Kultivierung auf eisenhaltigem Festmedium konnten bei RT (7.7.5.3.1, Abb. 72) aber auch bei 30 °C (7.7.5.3.1, Abb. 73) keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen dem Wildtyp und den verschiedenen Mutanten bezüglich der Interaktionen zu *Pmi*, *Fmed* oder *Ela* beobachtet werden. Eine detaillierte Beschreibung der Interaktionen zwischen den Pilzen ist dem Abschnitt 7.7.5.3.1 zu entnehmen.

3.3.2 Identifizierung der an der Siderophor-Biosynthese beteiligten Genen und Gencluster in *Phaeoacremonium minimum*

Für die Identifizierung der Gene und Gencluster, welche an der Siderophore-Biosynthese in *Pmi* beteiligt sind (Abb. 33), wurden die Sequenzdaten von *Pmi* UCRPA7 verwendet.

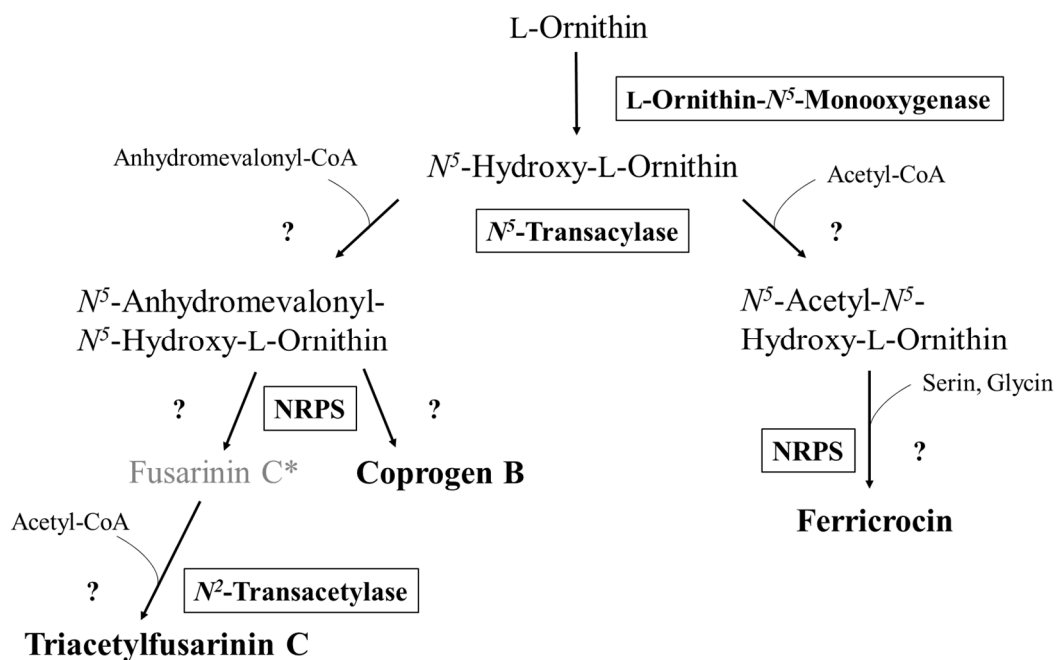


Abbildung 33: Putativer Siderophor-Biosyntheseweg in *Phaeoacremonium minimum*. Der putative Siderophor-Biosyntheseweg von *Pmi* wurde anhand der Ergebnisse aus 3.1.1.2 in Anlehnung an Haas *et al.* (2008) erstellt. Enzyme, welche putativ an der Siderophor-Biosynthese beteiligt sind, wurden schwarz umrandet markiert. *: mögliche Vorstufe von Triacetylfusarinin C, bisher nicht in *Pmi* detektiert.

Hierbei wurde sowohl eine antiSMASH (fungale Version)-Analyse (Medema *et al.*, 2011; Blin *et al.*, 2019) (2.1.10; Tab. 5) von dessen Genom als auch ein Homologievergleich mittels gezielter BLAST-Analyse von NCBI (Altschul *et al.*, 1990; States und Gish, 1994) und JGI MycoCosm (Nordberg *et al.*, 2014; Grigoriev *et al.*, 2014) (2.1.10; Tab. 5) anhand der Aminosäuresequenz (AS) von annotierten Genen aus *Pmi UCRPA7* und der AS von bereits identifizierten Genen der Siderophor-Biosynthese aus den Organismen *Aspergillus fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007), *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium graminearum*, *Ustilago maydis* (Yuan *et al.*, 2001; Oide *et al.*, 2007). und *Magnaporthe oryzae* (Hof *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2009) durchgeführt. Es konnten hierbei zwei putative Gencluster der Siderophor-Biosynthese (Abb. 33) für *Pmi UCRPA7* detektiert werden.

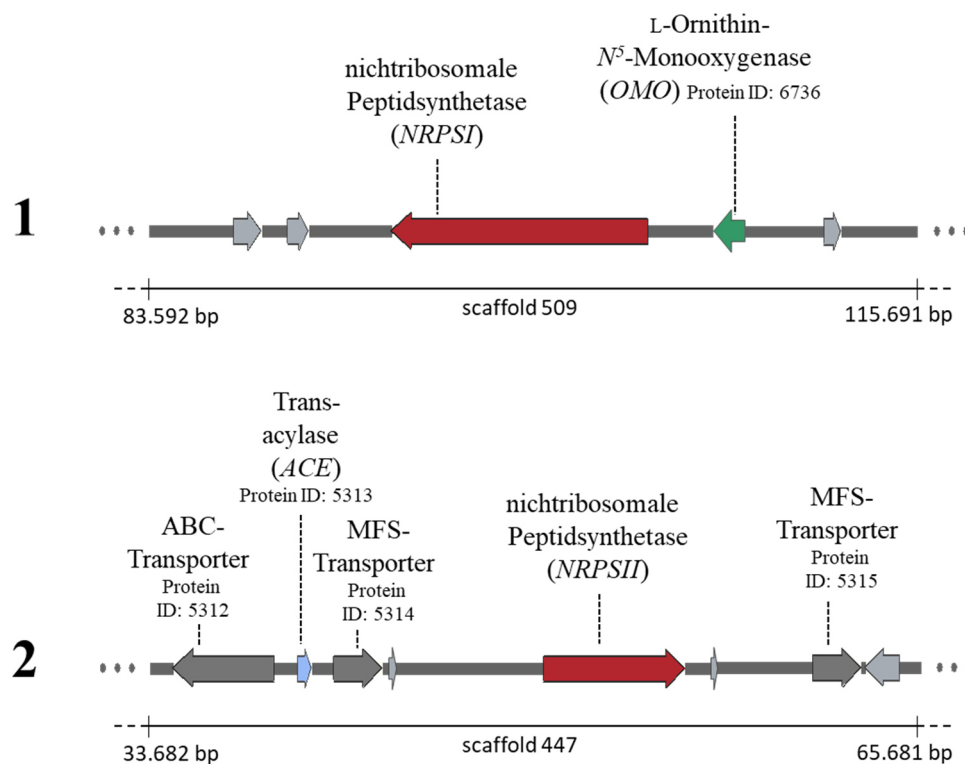


Abbildung 34: Schematische Darstellung der putativen Gencluster der Siderophor-Biosynthese in *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*). Gezeigt ist Gencluster 1 (scaffold 509: 83.592 – 115.691 bp) mit nichtribosomale Peptidsynthetase (*NRPS I*)- und L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase (*OMO*)-Gen und Gencluster 2 (scaffold 447: 33.682 – 65.681 bp) mit ABC-Transporter-Gen, zwei MFS (*Major Facilitator Superfamily*)-Transporter-Genen, ein Transacylase (*ACE*)-Gen und ein *NRPS II*-Gen in *Pmi*. Die Graphik wurde mittels SnapGene Viewer V5 erstellt.

3.3.2.1 Das L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Gen

Mit Hilfe der antiSMASH-Analyse (2.1.10; Tab. 5) von *Pmi UCRPA7* sowie des Homologievergleichs (Tab. 23) mit der Aminosäuresequenz zu bereits bekannten L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Genen *OMO I* (MGG_04212) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007) und *SIDA*

(Afu2g07680) aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2004; Baltussen *et al.*, 2018) konnte über die BLAST-Analyse von NCBI in *Pmi UCRPA7* ein annotiertes Gen *PmiOMO* (JGI *Pmi UCRPA* Protein ID: 6736, scaffold_509:107131-108534), welches putativ für die L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase kodiert (Abb. 33), detektiert werden.

Tabelle 23: Homologievergleich von der putativen L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase aus *Phaeoacremonium minimum UCRPA7* mit SidAp aus *Aspergillus fumigatus* und Omo1p aus *Magnaporthe oryzae*. Aufgeführt sind die ermittelten Identitäts (I)- und Similaritäts (S)-werte in Prozent aus der BLAST-Analyse von NCBI (Substitutionsmatrix BLOSUM62) mit der Aminosäuresequenz von *OMO1* und *SIDA*, welche in der Siderophor-Biosynthese der genannten Pilze involviert sind, gegenüber der von *PmiOMO* aus *Pmi UCRPA7*.

	Omo1p (MGG_04212)		SidAp (Afu2g07680)	
	I [%]	S [%]	I [%]	S [%]
Pmiomop (ID 6736)	62	74	51	64

Das Gen *PmiOMO*, welches dem Gencluster 1 zuzuordnen ist (Abb. 34, 1), hat eine Gesamtlänge von 1404 bp und ist von zwei Introns an den Positionen 570 bis 618 bp und 1244 bis 1302 bp unterbrochen.

3.3.2.1.1 Inaktivierung des L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Gens *PmiOMO*

Um die Funktionalität des putativen L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Gens *PmiOMO* in der Siderophor-Biosynthese von *Pmi* zu analysieren (Abb. 33), wurden zunächst *PmiOMO*-Geninaktivierungsmutanten mit dem Stamm *Pmi IBWF 1189* zielgerichtet erzeugt. Hierzu wurden, wie in 2.3.5 und 7.2.9 beschrieben, der Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PmiOMO-HPT* generiert und für eine ATMT (2.3.8, 2.3.9) von *Pmi IBWF 1189* eingesetzt. Unter Zuhilfenahme der Kolonie-PCR (2.3.2.3), den Oligonukleotidprimer aus Tabelle 30 (7.1.2) und der DNA der generierten Transformanten wurden potenzielle Geninaktivierungsmutanten ermittelt, welche über die Southern Blot-Analyse (2.3.10) final verifiziert worden sind. Hierbei konnten für *PmiOMO* aus 65 generierten Transformanten fünf Geninaktivierungsmutanten $\Delta Pmiomo\#14$, $\#20$, $\#45$, $\#47$, $\#62$ bestätigt werden (7.7.2, Abb. 60). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es jedoch nicht möglich eine Komplementation erfolgreich durchzuführen.

3.3.2.1.2 Die Produktion der Siderophore in $\Delta Pmiomo$

Um zu klären, in wie fern das detektierte putative L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Gen *PmiOMO* in der Biosynthese von extra- und intrazellulären Siderophoren in *Pmi* involviert ist, wurden die Myzel- und Kulturfiltratextrakte, wie in 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben, aus der jeweiligen siebentägigen Kultivierung des Wildtyps *Pmi IBWF 1189* und der

Geninaktivierungsmutante $\Delta Pmiomo\#14$ (nachfolgend als $\Delta Pmiomo$ bezeichnet) in eisenfreiem Sundström-Medium (M10) hergestellt und unter Zuhilfenahme von HPLC- und HPLC-MS-Analysen (2.5.4) im Hinblick auf das Vorhandensein der bereits detektierten Siderophore in *Pmi IBWF 1189* (3.1.1.2) untersucht.

Extrazelluläre Siderophore:

Das Ergebnis der HPLC-Analyse zur Detektion sekretierter Siderophore von $\Delta Pmiomo$ (B) im Vergleich zum Wildtyp (*PmiWT*) (A) ist in der nachfolgenden Abbildung 35 gezeigt. Hierbei konnte im Gegensatz zu *PmiWT* im Kulturfiltratextrakt von $\Delta Pmiomo$ weder Triacetylfusarinin C noch Coprogen B festgestellt werden.

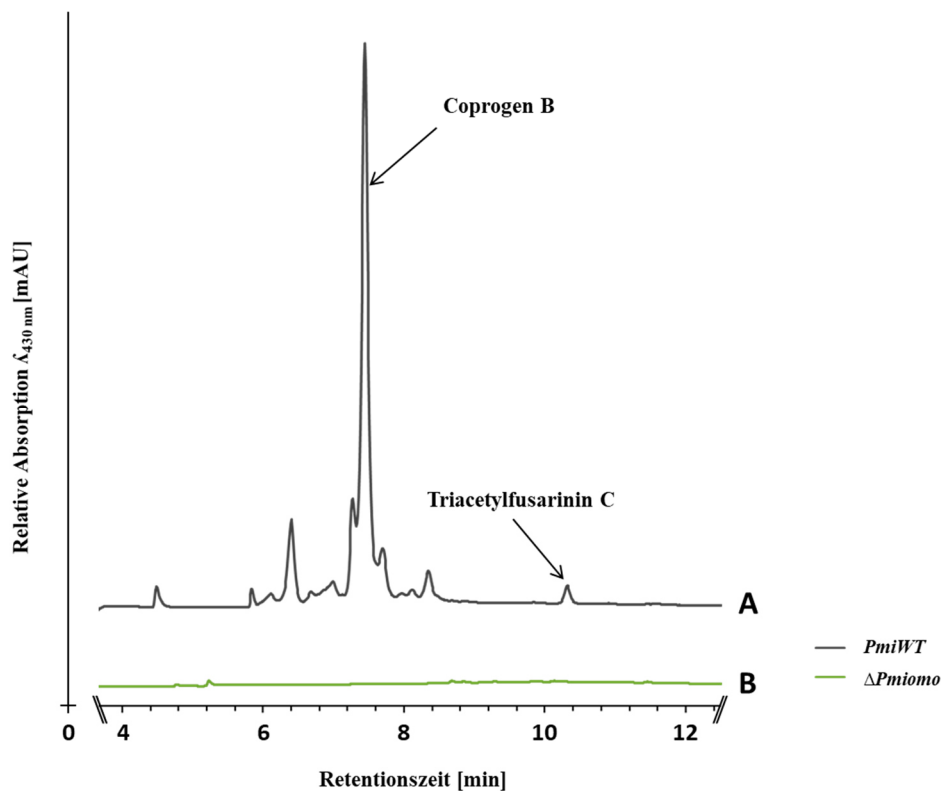


Abbildung 35: Vergleich der Produktion von extrazellulären Siderophoren aus $\Delta Pmiomo$ und *PmiWT*. Gezeigt sind jeweils die HPLC-Chromatogramme (Detektionswellenlänge $\lambda_{430\text{ nm}}$) der normalisierten Kulturfiltratrohextrakte (5 mg/ml) aus der siebentägigen Kultivierung mit dem Wildtyp *Pmi IBWF 1189* (A) und der Mutante $\Delta Pmiomo$ (B) in eisendefizientem Sundström-Medium. Für die Messungen wurde jeweils der in Tabelle 10 (2.5.4.1) aufgeführte Gradient verwendet. Es konnten keine Siderophore im Gegensatz zu *PmiWT* für $\Delta Pmiomo$ detektiert werden.

Intrazelluläre Siderophore:

Im Myzelextrakt wurde mittels HPLC-MS-Analyse (ESI, SIM-Mode) im Gegensatz zu *PmiWT* für die Mutante $\Delta Pmiomo$ kein signifikantes Signal für das bereits detektierte Siderophor Ferricrocin (3.1.1.2.2) mit der Masse von $[M - 2H + Fe]^+$ m/z 771 detektiert (7.7.4.2, Abb. 67).

3.3.2.2 Das Acyltransferase-Gen

Anhand der antiSMASH-Analyse von *Pmi UCRPA7* und der BLAST-Analyse von JGI MycoCosm und NCBI konnten im Gencluster 2 (Abb. 34, 2) auf dem scaffold_447 ein Gen *PmiACE* (Protein ID: 5313, scaffold_447: 39769-40347) detektiert werden. Ein Homologievergleich wurde zwischen *Pmiacep* und der Aminosäuresequenz der ACE-Genen *SIDL* (AFUA_1G04450), *SIDF* (AFUA_3G03400) und *SIDG* (AFUA_3G03650) der Siderophor-Biosynthese aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2018) durchgeführt. Dieser kann der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 24: Homologievergleich zwischen der Aminosäuresequenz des putativen ACE-Gens aus *Pmi UCRPA7* und verschiedenen ACE-Genen *SIDL*, *SIDF* und *SIDG* der Siderophor-Biosynthese aus dem Organismus *Aspergillus fumigatus*. Aufgeführt sind die ermittelten Identitäts (I)- und Similaritäts (S)-werte in Prozent aus der BLAST-Analyse von NCBI (Substitutionsmatrix BLOSUM62) mit der Aminosäuresequenz von *SIDL*, *SIDF* und *SIDG*, welche in der Siderophor-Biosynthese von *A. fumigatus* involviert sind, gegenüber der putativen von *PmiACE* aus *Pmi UCRPA7*.

	SidLp (AFUA_1G04450)		SidFp (AFUA_3G03400)		SidGp (AFUA_3G03650)	
	I [%]	S [%]	I [%]	S [%]	I [%]	S [%]
<i>Pmiacep</i> (ID 5313)	28	42	26	40	58	70

3.3.2.2.1 Inaktivierung des Acyltransferase-Gens *PmiACE*

Von dem detektierten putativen Acyltransferase-Gen *PmiACE* wurde der Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PmiACE-HPT*, wie in 2.3.5 und 7.2.12 beschrieben, generiert und für die ATMT (2.3.8, 2.3.9) von *Pmi IBWF 1189* eingesetzt. Unter Zuhilfenahme der Kolonie-PCR (2.3.2.3), den Primerpaaren aus Tabelle 30 (7.1.2) und der DNA der generierten Transformanten wurden potenzielle Geninaktivierungsmutanten ermittelt, welche über die Southern Blot-Analyse final verifiziert worden sind. Hierbei konnten für *PmiACE* aus 48 generierte Transformanten drei Geninaktivierungsmutanten $\Delta Pmiace\#12$, $\#42$ und $\#46$ bestätigt werden (7.7.2, Abb. 61). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es jedoch nicht möglich eine Komplementation erfolgreich durchzuführen

3.3.2.2.2 Die Produktion der Siderophore in $\Delta Pmiace$

Zur Überprüfung der Funktionalität des detektierten putativen Acyltransferase-Gens *PmiACE* wurde die Produktion der extra- und intrazellulären Siderophore von $\Delta Pmiace\#12$ (nachfolgend als $\Delta Pmiace$ bezeichnet) im Vergleich zum Wildtyp *Pmi IBWF 1189* untersucht. Hierzu wurden Myzel- und Kulturfiltratextrakte, wie in 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben, aus der jeweiligen siebentägigen Kultivierung von $\Delta Pmiace$ und dem Wildtyp in eisenfreiem Sundström-

Medium (M10) hergestellt und im Hinblick auf das Vorhandensein der bereits detektierten Siderophore aus *Pmi* (3.1.1.2) analysiert.

Extrazelluläre Siderophore:

In der Abbildung 36 ist die HPLC-Analyse von $\Delta Pmiace$ (B) und der des Wildtyps (*PmiWT*) (A) zur Detektion der sekretierten Siderophore gegenübergestellt. Im Kulturfiltratextrakt konnte für $\Delta Pmiace$ im Gegensatz zum Wildtyp das Signal für Triacetylfusarinin C nicht nachgewiesen werden. Ein Signal für Coprogen B konnte dagegen jeweils in beiden Extrakten detektiert werden.

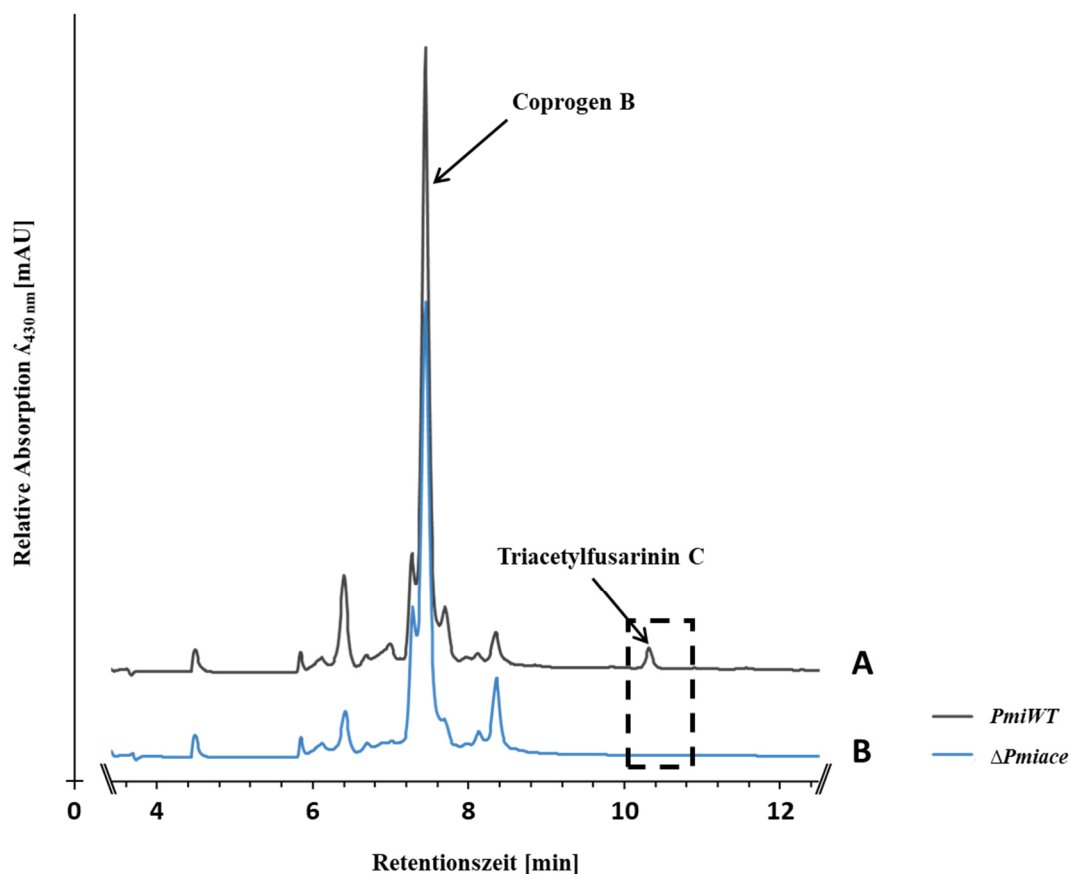


Abbildung 36: Vergleich der Produktion von extrazellulären Siderophoren aus $\Delta Pmiace$ und *PmiWT*. Gezeigt sind jeweils die HPLC-Chromatogramme (Detektionswellenlänge $\lambda_{430\text{ nm}}$) der normalisierten Kulturfiltratextrakte (5 mg/ml) aus der siebentägigen Kultivierung mit dem Wildtyp *Pmi IBWF 1189* (A) und der Mutante $\Delta Pmiace$ (B) in eisendefizientem Sundström-Medium. Für die Messungen wurde jeweils der in Tabelle 10 (2.5.4.1) aufgeführte Gradient verwendet. Für $\Delta Pmiace$ konnte im Gegensatz zu *PmiWT* kein Signal für Triacetylfusarinin C detektiert werden. Für beide wurde das Signal für Coprogen B festgestellt.

Intrazelluläre Siderophore:

Im Myzelextrakt wurde mittels HPLC-MS-Analyse (ESI, SIM-Mode) im Gegensatz zu *PmiWT* für die Mutante $\Delta Pmiace$ ein signifikantes Signal für das bereits detektierte Siderophore (3.1.1.2.2) Ferricrocin mit der Masse von $[M - 2H + Fe]^+$ m/z 771 festgestellt (7.7.4.2, Abb. 67).

3.3.2.3 Die nichtribosomalen Peptidsynthetase-Gene

Zur Identifizierung von putativen nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS)-Genen, welche in der Siderophor-Biosynthese in *Pmi* involviert sind (Abb. 33), wurde zunächst eine antiSMASH-Analyse mit dem Genom von *Pmi UCRPA7* sowie Homologievergleiche zwischen der Aminosäuresequenzen der detektierten putativen NRPS-Gene von *Pmi UCRPA7* mit bereits bekannten NRPS-Genen der Siderophor-Biosynthese aus verschiedenen Organismen über die BLAST-Analyse von NCBI (2.1.10; Tab. 5) durchgeführt: *SIDC* (EDP56937.1) und *SIDD* (EDP53310.1) aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007; Fedorova *et al.*, 2008), *NPS2* (AAX09984.1) aus *C. heterostrophus* (Lee *et al.*, 2005; Turgeon *et al.*, 2008) und *NPS2* (EYB30114.1) und *NPS6* (EYB32861.1) aus *F. graminearum* (Oide *et al.*, 2006; Tobiasen *et al.*, 2007), *SSM1* (XP_003719607.1) und *SSM2* (ABY26907.1) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2009), *SID2* (AAB93493.1) aus *U. maydis* (Yuan *et al.*, 2001; Oide *et al.*, 2007). Die Werte der BLAST-Analyse können der Tabelle 36 (7.7.1.2) entnommen werden. Hierbei konnten zwei putative NRPS-Gene *PmiNRPSI* und *PmiNRPSII* detektiert werden. *PmiNRPSI* (scaffold_509: 90516-105363 bp) ist dem Gencluster 1 (3.3.2, Abb. 34, 1) zuzuordnen und hat eine Gesamtlänge von 14.848 bp. *PmiNRPSII* (scaffold_447: 50038-55947 bp) hat eine Gesamtlänge von 6.325 bp und ist im Gencluster 2 lokalisiert (3.3.2, Abb. 34, 2).

Des Weiteren wurde eine SMART-Analyse (Letunic und Bork, 2018; Letunic *et al.*, 2021) (2.1.10; Tab. 5) mit der jeweiligen Aminosäuresequenz von den *orf* der beiden Gene, welcher jeweils über UGENE ermittelt worden ist, durchgeführt. Für *PmiNRPSI* wurde der revers-komplementär translatierte Nukleotidsequenzbereich von 90516 - 98930 bp in *frame -1* und von 99082 - 105363 bp in *frame -2* verwendet. Für *PmiNRPSII* wurde der translatierte Nukleotidsequenzbereich von 50038 - 55947 bp in *frame +1* eingesetzt. Hierbei konnte für *PminrpsIp* die putative Domänenstruktur ATC-ATC-TCA-TC-TC-TC festgestellt werden, welche mit der von *Nps2p* (ATC-ATC-TCA-TC-TC-TC) aus *F. graminearum* und *Ssm1p* (ATC-ATC-TCA-TC-TC-TC) aus *M. oryzae* vollständig übereinstimmt (3.3.1.3, Tab. 19). Sowohl *Nps2p* als auch *Ssm1p* wurden beide bereits als Ferricrocin-Synthetase beschrieben (Tobiasen *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2007). Für die putative Domänenstruktur ATC-TC von *PminrpsIIp* wurde hingegen eine Übereinstimmung mit der von *Ssm2p* (ATC-TC) aus *M. oryzae* festgestellt (3.3.1.3, Tab. 19), welche als Coprogensynthetase bereits identifiziert worden ist (Hof *et al.*, 2009).

3.3.2.3.1 Inaktivierung der nichtribosomalen Peptidsynthetase-Gene *PmiNRPSI* und *PmiNRPSII*

Von den zwei detektierten putativen NRPS-Genen *PmiNRPSI* und *PmiNRPSII* wurden die Geninaktivierungsvektoren *pCAMB-PmiNRPSI-HPT* und *pCAMB-PmiNRPSII-HPT*, wie in 2.3.5, 7.2.10 und 7.2.11 beschrieben, generiert und für die ATMT (2.3.8, 2.3.9) von *Pmi IBWF 1189* eingesetzt. Von den generierten Transformanten sollten unter Zuhilfenahme der Kolonie-PCR (2.3.2.3) und den in Tabelle 30 (7.1.2) genannten Oligonukleotidprimer potenzielle Geninaktivierungsmutanten ermittelt werden, welche über die Southern Blot-Analyse (2.3.10) final verifiziert werden sollten. Hierbei wurden für die Geninaktivierung von *PmiNRPSI* insgesamt 210 Transformanten und für *PmiNRPSII* insgesamt 203 über die Kolonie-PCR-Analyse im Hinblick auf eine potenzielle Gen-Disruption von *PmiNRPSI* bzw. *PmiNRPSII* mittels Hygromycin-Resistenzkassette überprüft. Von keiner der untersuchten Transformanten konnte eine zielgerichtete Geninaktivierung bestätigt werden.

3.3.2.4 Phänotypische Charakterisierung der „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese aus *Phaeoacremonium minimum*

Um die Vitalität, der in der vorliegenden Arbeit generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pmi* im Vergleich zum Wildtyp analysieren zu können, wurden verschiedene phänotypische Untersuchungen in Bezug auf die Konidiogenese, dem vegetativen Wachstum und der Morphologie der jeweiligen Mutanten durchgeführt.

3.3.2.4.1 Analyse der Konidiogenese

Zur Analyse der Konidiogenese der generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pmi* wurden $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ und der Referenzstamm *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*), wie in 2.4.1 beschrieben, jeweils auf HMG (M3)-Festmedium für 24 Tagen kultiviert. Anschließend wurde das jeweils ermittelte Myzelflächenwachstum sowie die Konidienanzahl der Mutanten mit der des Referenzstamms verglichen.

Es konnten keine signifikanten Differenzen zwischen den Mutanten und *PmiWT* bezüglich des jeweiligen Myzelflächenwachstums festgestellt werden (Tab. 25; 7.7.5.1, Abb. 69). Die ermittelten Myzelflächen der Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ waren lediglich um etwa 10 bis 15 % im Vergleich zu *PmiWT* reduziert. Hingegen konnten Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp in Bezug auf die Konidienanzahl beobachtet werden (Tab. 25). Hierfür wurde die Konidienanzahl pro Flächeneinheit des vegetativ, gebildeten Myzels von den

jeweiligen Testorganismen nach 24-tägiger Kultivierung ermittelt und miteinander verglichen. Die ermittelte Konidienanzahl war im Vergleich zu *PmiWT* für die Mutante $\Delta Pmiomo$ um etwa 30 % reduziert. Für $\Delta Pmiace$ konnte hingegen ein Anstieg um etwa 14 % beobachtet werden.

Tabelle 25: Myzelflächenwachstum und Konidienanzahl der Mutanten $\Delta Pmiomo$, $\Delta Pmiace$ im Vergleich zum Wildtypstamm. Aufgelistet sind jeweils von den zu untersuchenden Mutanten und dem Wildtypstamm *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*) das ermittelte Myzelflächenwachstum und die Konidienanzahl aus jeweils drei biologischen Replikaten nach 24-tägiger Kultivierung auf HMG-Festmedium. Angegeben sind die Werte relativ zu *PmiWT* [100 %] sowie die jeweilige Standardabweichung. Die Konidienanzahl bezieht sich jeweils auf die Anzahl der gebildeten Konidien pro Myzel-Flächeneinheit.

	<i>PmiWT</i>	$\Delta Pmiomo$	$\Delta Pmiace$
Myzelflächenwachstum	100,0 ±1,5	92,9 ±1,4	83,3 ±2,0
Konidienanzahl	100,0 ±4,5	69,3 ±1,2	114,5 ±3,5

3.3.2.4.2 Analyse des Wachstumsverhaltens unter oxidativem Stress

Zur Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf das vegetative Wachstum der generierten „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pmi* wurden $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ und der Wildtyp *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*), wie in 2.4.2 beschrieben, jeweils auf HMG (M3)-Festmedium, welches mit verschiedenen Konzentrationen von H_2O_2 (0 %, 0,01 % und 0,1 %) supplementiert wurde, für 4 Wochen kultiviert. Anschließend wurde der jeweils ermittelte Koloniedurchmesser des vegetativ gewachsenen Myzels der Mutanten mit dem des Wildtyps verglichen (Abb. 37; 7.7.5.2, Abb. 71). Hierbei konnte im Vergleich zu *PmiWT* nur ein geringer Unterschied von etwa 1,2 cm bezüglich der ermittelten Kolonien-Durchmesser von den Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ auf HMG-Festmedium mit 0,1% H_2O_2 beobachtet werden (Abb. 37). Auf dem Kontrollmedium (Festmedium ohne H_2O_2) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten und *PmiWT* dokumentiert werden.

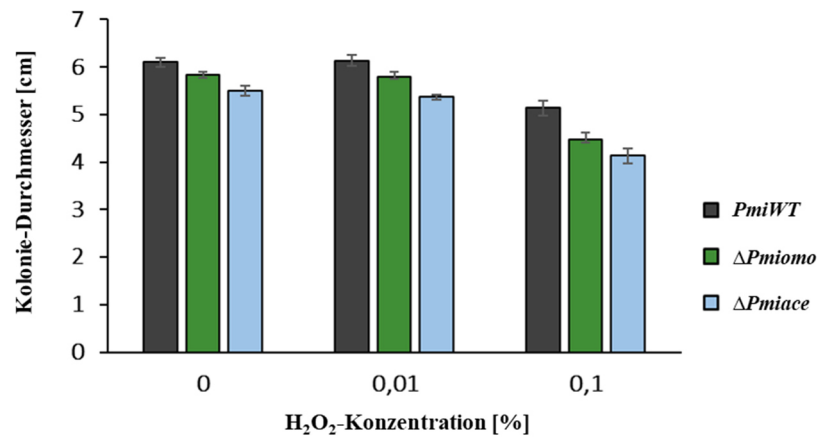


Abbildung 37: Einfluss von oxidativem Stress auf das Wachstumsverhalten der Siderophor-Biosynthesemutanten von *Phaeoacremonium minimum*. Gezeigt sind jeweils der Kolonie-Durchmesser und die dazugehörige Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten der Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ sowie des Referenzstamms *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*) nach einer vierwöchigen Kultivierung auf HMG-Festmedium mit 0 %, 0,01 % und 0,1 % H₂O₂.

3.3.2.4.3 Analyse des Wachstumsverhaltens unter Eisenmangelbedingungen

Zur Untersuchung des Einflusses von Eisenmangel auf das vegetative Wachstum der generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pmi* wurden $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ und der Referenzstamm *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*), wie in 2.4.3 beschrieben, jeweils auf Sundström-Festmedium und als Kontrolle auf eisensupplementiertem Sundström-Festmedium für 25 Tagen sowohl bei RT als auch bei 30 °C kultiviert und anschließend das jeweils ermittelte Myzelflächenwachstum der Mutanten mit der der Referenzstämme verglichen.

Kultivierung bei RT:

Es konnte unter eisenlimitierten Kultivierungsbedingungen bei Raumtemperatur im Vergleich zum Wildtyp eine Reduzierung des Myzelflächenwachstums der Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ um jeweils ~60 % festgestellt werden (Abb. 38, Tab. 26). Für $\Delta Pmiomo$ wurde zudem im Gegensatz zu $\Delta Pmiace$ ein deutlich diffuses Myzelwachstum beobachtet. Mit Kultivierung auf eisenhaltigem Festmedium war das Myzelflächenwachstum im Vergleich zu *PmiWT* für $\Delta Pmiomo$ nur um ~20 % und für $\Delta Pmiace$ um ~14 % vermindert.

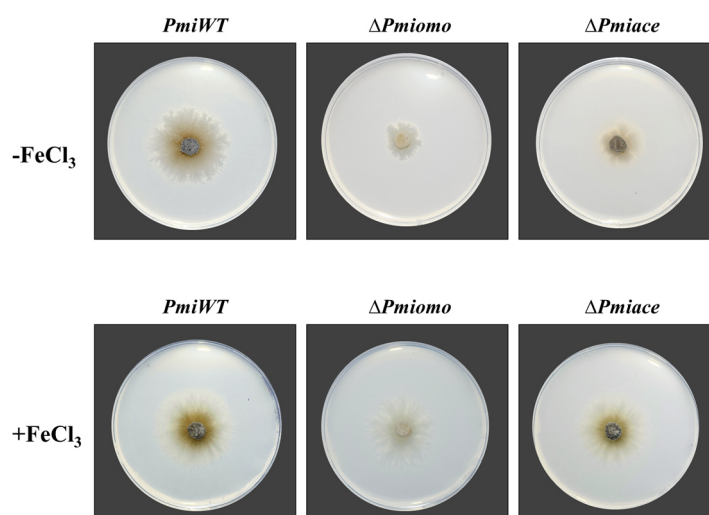


Abbildung 38: Einfluss von Eisenmangel auf das vegetative Wachstum der generierten Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ zur Siderophor-Biosynthese in *Phaeoacremonium minimum* bei RT. Gezeigt sind die Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ und der Referenzstamm *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*) exemplarisch jeweils nach 25-tägiger Kultivierung auf Sundström-Festmedium und als Kontrolle auf eisensupplementiertem Sundström-Festmedium bei RT.

Tabelle 26: Myzelflächenwachstum der Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ im Vergleich zum Wildtyp unter Eisenmangel. Aufgelistet ist von den zu untersuchenden Mutanten und dem Wildtyp *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*) das jeweils ermittelte Myzelflächenwachstum aus jeweils drei biologischen Replikaten nach 25-tägiger Kultivierung auf Sundström-Festmedium und als Kontrolle auf eisensupplementiertem Sundström-Festmedium bei RT. Angegeben sind die Werte relativ zu *PmiWT* [100 %] sowie die jeweilige Standardabweichung.

RT	<i>PmiWT</i>	$\Delta Pmiomo$	$\Delta Pmiace$
Sundström	100,0 \pm 2,8	39,3 \pm 2,7	40,7 \pm 3,5
Sundström + 10 μ M FeCl ₃	100,0 \pm 5,4	79,2 \pm 3,9	86,4 \pm 6,4

Kultivierung bei 30 °C:

Unter eisenlimitierten Kultivierungsbedingungen wurde im Vergleich zum Wildtyp auch bei 30 °C eine Reduzierung des Myzelflächenwachstums der Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ von ~ 60 % beobachtet (Abb. 39, Tab. 27). Mit der Kultivierung auf eisenhaltigem Sundström-Festmedium wurde für $\Delta Pmiomo$ keine signifikante Änderung festgestellt. Dagegen wurde für $\Delta Pmiace$ eine nur noch um ~11 % im Vergleich zu *PmiWT* vermindertes Myzelflächenwachstum dokumentiert.

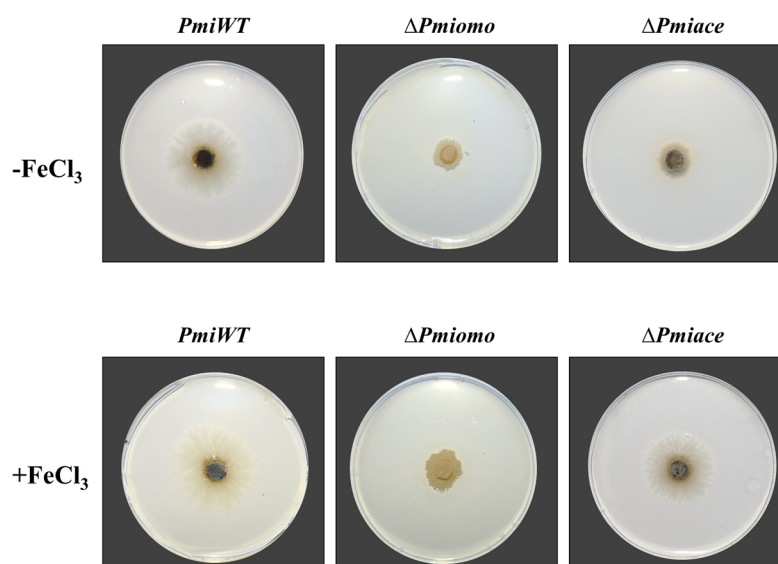


Abbildung 39: Einfluss von Eisenmangel auf das vegetative Wachstum der generierten Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ zur Siderophor-Biosynthese in *Phaeoacremonium minimum* bei 30 °C. Gezeigt sind die Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ und der Referenzstamm *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*) exemplarisch jeweils nach 25-tägiger Kultivierung auf Sundström-Festmedium und als Kontrolle auf eisensupplementiertem Sundström-Festmedium bei 30 °C.

Tabelle 27: Myzelflächenwachstum der Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ im Vergleich zum Wildtypstamm unter Eisenmangel. Aufgelistet ist von den zu untersuchenden Mutanten und dem Wildtypstamm *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*) jeweils das ermittelte Myzelflächenwachstum aus jeweils drei biologischen Replikaten nach 25-tägiger Kultivierung auf Sundström-Festmedium und als Kontrolle auf eisensupplementiertem Sundström-Festmedium bei 30 °C. Angegeben sind die Werte relativ zu *PmiWT* [100 %] sowie die jeweilige Standardabweichung.

30 °C	<i>PmiWT</i>	$\Delta Pmiomo$	$\Delta Pmiace$
Sundström	100,0 ±4,4	38,4 ±1,4	41,4 ±3,8
Sundström + 10 μM FeCl ₃	100,0 ±3,4	45,3 ±2,3	88,7 ±3,5

3.3.2.4.4 Analyse des Wachstumsverhaltens unter Kokultivierungsbedingungen

Um die Interaktionen der generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pmi* zu den Esca-assoziierten Pilzen *Pch*, *Fmed* und *Ela* im Vergleich zum Wildtyp *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*) zu untersuchen, wurden $\Delta Pmiomo$, $\Delta PmiaceI$ bzw. *PmiWT* jeweils zusammen mit *Pch*, *Fmed* oder *Ela* auf Sundström (M10)-Festmedium und als Kontrolle auf eisenhaltigem Sundström (M10 mit 10 μM FeCl₃)-Festmedium für 4 Wochen kultiviert und das jeweilige Wachstumsverhalten beobachtet (2.4.4). Die Interaktionen zwischen den Pilzen wurden, wie in Bertrand *et al.* (2013) beschrieben, in die vier Kategorien Distanzinhibition, Zonen-Linie, Kontaktinhibition oder Überwachsen eingeordnet. Die Versuche wurden sowohl bei RT als auch bei 30 °C durchgeführt.

Sowohl unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen als auch bei der Kultivierung auf eisenhaltigen Festmedium konnten bei RT (7.7.5.3.2, Abb. 74) aber auch bei 30 °C (7.7.5.3.2, Abb. 75) nur geringfügige, nicht signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen dem Wildtyp und den verschiedenen Mutanten bezüglich der Interaktionen zu *Pch*, *Fmed* oder *Ela* beobachtet werden. Eine detaillierte Beschreibung der Interaktionen zwischen den Pilzen ist dem Abschnitt 7.7.5.3.2 zu entnehmen.

3.3.3 Infektionsuntersuchung der generierten Siderophor-Biosynthese-Mutanten von *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum* an Weinrebenstecklingen

Esca ist eine komplexe Krankheit, welche eine Vielfalt von Symptomen am Stamm und an den Blättern der Weinrebe beinhaltet (Surico *et al.*, 2006; Elena *et al.*, 2015). Da diese in ihrer Intensität und Ausprägung von Jahr zu Jahr fluktuieren können (Mugnai *et al.*, 1999; Surico *et al.*, 2000) und zudem sich die Krankheit durch eine lange Latenzzeit von oft mehreren Jahren zwischen der Kolonisierung des Holzes durch die Esca-assoziierten Pilze bis hin zu den charakteristischen, sichtbaren Blattsymptomen auszeichnet (Calzarano *et al.*, 2018), war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich die generierten „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pch* und *Pmi* (3.3.2) innerhalb von langfristigen Feldstudien zu analysieren. Aufgrund dessen wurde zur Entwicklung eines biologischen Testsystems der Einfluss der hergestellten Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp auf das Wachstumsverhalten von Einaugenstecklingen der Weinrebe unter Laborbedingungen, wie in 2.4.5 beschrieben, untersucht. Die Studien wurden in Kooperation [REDACTED] durchgeführt. Den nachfolgenden Abbildungen ist die jeweilige Auswertung der Infektionsuntersuchung an den Einaugenstecklingen der Weinrebe im Hinblick auf die Entwicklung des Blattaustriebs (Abb. 40) und der Wurzelbildung (Abb. 41) zu entnehmen. Die Diagramme wurden anhand der in Tabelle 39 und 40 (7.7.6) aufgelisteten Mittelwerten der Boniturdaten der einzelnen Ansätze, bestehend aus jeweils zehn biologischen Replikaten, generiert.

Hieraus geht hervor, dass sowohl der Blattaustrieb als auch die Wurzelbildung der mit den „*loss-of-function*“-Mutanten inokulierten Stecklingen vergleichbar zu den Stecklingen, welche mit dem jeweiligen Wildtyppilz inokuliert wurde, war. Auch konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollstecklingen, welche mit 2 %-Malzagar inokuliert worden waren, beobachtet werden.

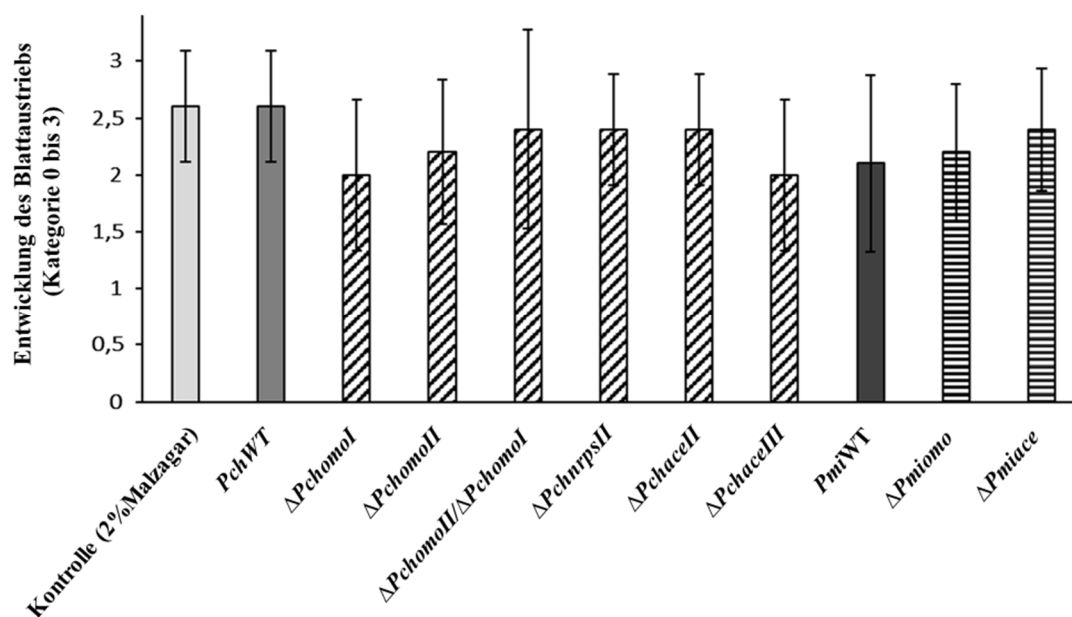


Abbildung 40: Infektionsuntersuchung von Weinrebenstecklingen der generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeomonium minimum* im Hinblick auf die Entwicklung des Blattaustriebs. Die Bonitur der Einaugenstecklinge der Weinrebensorte Müllerthurgau erfolgte fünf Wochen nach der jeweiligen Inokulation. Pro Ansatz wurden zehn biologische Replikate angefertigt. Hierbei wurde die Wachstumsentwicklung der ausgetriebenen Blätter jedes Ansatzes einer der vier Kategorien (K) zugeordnet (K3: mind. 5 Blätter sichtbar, Blattspreite \geq 4 cm; K2: mind. 3 Blätter sichtbar, Blattspreite \geq 2 cm; K1: mind. 1 Blatt sichtbar, Blattspreite \geq 1 cm; K0: keine Blätter sichtbar) und die resultierende Durchschnittskategorie aus den zehn Wiederholungen pro Inokulationsansatz mit Standardabweichung im Diagramm angegeben.

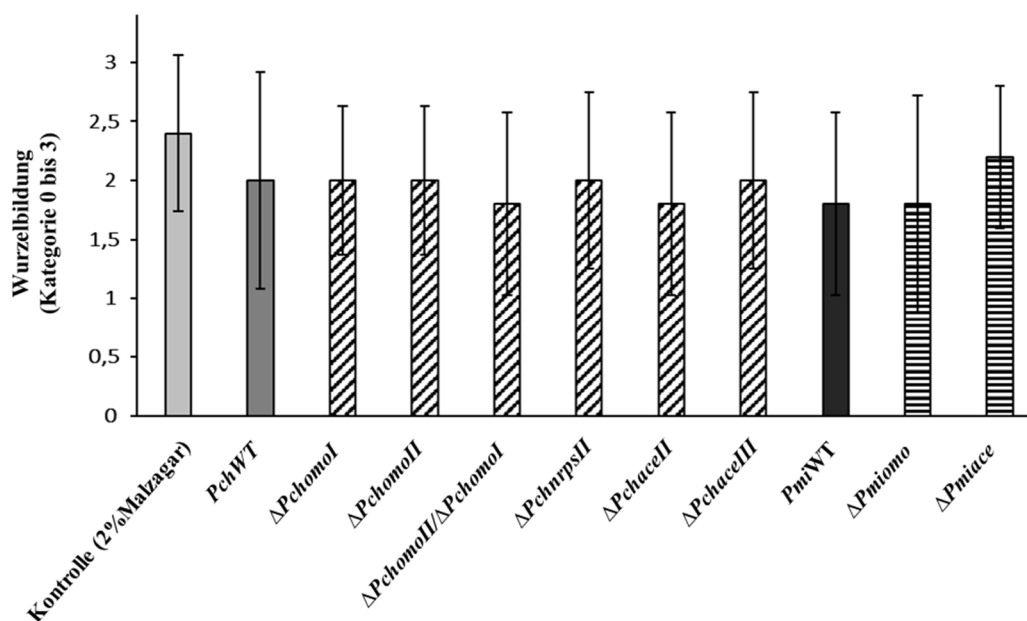


Abbildung 41: Infektionsuntersuchung von Weinrebenstecklingen der generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeomonium minimum* im Hinblick auf die Wurzelbildung. Die Bonitur der Einaugenstecklinge der Weinrebensorte Müllerthurgau erfolgte fünf Wochen nach der jeweiligen Inokulation. Pro Ansatz wurden zehn biologische Replikate angefertigt. Hierbei wurde die Wachstumsentwicklung der ausgetriebenen Wurzeln jedes Ansatzes einer der vier Kategorien (K) zugeordnet (K3: mind. 5 Wurzeln sichtbar, K2: mind. 3 Wurzeln sichtbar, K1: mind. eine Wurzel sichtbar, K0: keine Wurzelbildung sichtbar) und die resultierende Durchschnittskategorie aus den zehn Wiederholungen pro Inokulationsansatz mit Standardabweichung im Diagramm angegeben.

3.4 Identifizierung der an der Siderophor-Biosynthese beteiligten Gene und Gencluster in *Roesleria subterranea*

Zur Identifizierung der an der Siderophor-Biosynthese beteiligten Gene und Gencluster in *Roesleria subterranea* (*Rsub*) sind molekulargenetische Methoden unabdingbar. Hierfür wurde das Genom von dem Isolat *IB-Rüd01-16* im Rahmen der Arbeit von der Firma BGI Genomics sequenziert und freundlicherweise durch [REDACTED] mit dem Programm Spades assembliert, da bis dato kein Genom von *Rsub* veröffentlicht worden ist. Mittels antiSMASH (fungal version)- (Medema *et al.*, 2011; Blin *et al.*, 2019) und anschließenden NCBI BLAST- (Altschul *et al.*, 1990; States und Gish, 1994) Analysen (2.1.10; Tab. 5) konnte ein putatives Siderophor-Biosynthesecluster für *Rsub* identifiziert werden, welches auf dem NODE 443 im Nukleotidsequenzbereich zwischen 1 und 33.002 bp lokalisiert ist. Auf diesem wurden zwei Gene *RsubNRPS* und *RsubOMO* detektiert. *RsubNRPS* mit einer Gesamtgröße von 14.538 bp kodiert putativ für eine NRPS (NODE 443: 10.060-24.497 bp) und *RsubOMO* mit einer Gesamtgröße von 909 bp für eine putative L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase (NODE 443: 30.814-31.722 bp). Die Homologievergleichswerte sind aus der Tabelle 37 und Tabelle 38 des Anhangs (7.7.1.3) zu entnehmen.

Um spezifische Untersuchungen auf molekulargenetischer Ebene durchführen zu können, sollten über Methoden der reversen Genetik putative Gene, welche in der Siderophor-Biosynthese von *Rsub* involviert sind, identifiziert und charakterisiert werden. Dazu wurde zunächst versucht ein geeignetes Transformationssystem für *Rsub* zu entwickeln. Im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit von P. Schönberger (Schönberger, 2017) und Masterarbeit von K. Hackmer (Hackmer, 2017) wurden diverse Transformationsmethoden, welche auf der Grundlage der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation (Bundock *et al.*, 1995; Groot *et al.*, 1998), Polyethylen Glycol-vermittelten Transformation (Brust, 2005) und Elektroporation von Protoplasten (Bowyer, 2001) basierten, durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Induktion der Apothezienbildung zur Ascosporenproduktion von *Rsub* unter Laborbedingungen analysiert, um eine permanente Sporenquelle der Transformationsversuche gewährleisten zu können. Hierbei konnte erfolgreich eine Methode etabliert werden, welche der betreuten Masterarbeit von K. Hackmer zu entnehmen ist (Hackmer, 2017). Für die Transformationsversuche wurden verschiedene Vektoren (*psJ-GFP-HPT*, *psJ-GFB-BAR*) mit unterschiedlichen Resistenzkassetten, die eine Glufosinatammonium- bzw. Hygromycin B-Resistenz bei erfolgreicher Transformation vermitteln sollten, verwendet. Des Weiteren wurden diverse Modifikationen der einzelnen Protokolle durchgeführt, die unter anderem das Einsetzen von Myzel, Protoplasten und Sporen von *Rsub* sowie verschiedene Konzentrationen dieser, der

verwendeten Vektoren oder der transformierten *A. tumefaciens*-Zellen, das Vorkeimen der Sporen, eine Vorkultivierung des Myzels und unterschiedliche Kokultivierungszeiten und -temperaturen von *Rsub* und *A. tumefaciens* während des Transformationsprozesses beinhalteten. Trotz diverser Transformationsansätze mit variierenden Parametern konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine erfolgreiche, stabile Transformation von *Rsub* dokumentiert werden. Lediglich wurde das zunächst Heranwachsen von vermeintlichen Transformanten im Vergleich zum Wildtyp auf Hygromycin B-haltigen Agarplatten nach Durchführung der ATMT festgestellt (Schönberger, 2017). Allerdings starben diese nach längerer Kultivierung und anschließendem Transferieren auf weiteren Hygromycin B-haltigen Agarplatten nach wenigen Tagen, weshalb angenommen wurde, dass die Fremd-DNA nicht stabil integriert worden war.

4 Diskussion

Die finanziellen Schäden, welche durch Holzkrankheiten an Weinreben, den sogenannten *Grapevine trunk diseases* (GTD), verursacht werden, sind weltweit enorm. Allein die Gesamtkosten für das Ersetzen von abgestorbenen Weinreben werden auf jährlich 1,132 Milliarden € geschätzt (Hofstetter *et al.*, 2012). Eine der verheerendsten unter diesen Weinrebenkrankheiten ist Esca, welche global in vielen Weinanbaugebieten verbreitet ist und für die es bis heute keine effektiven Kontrollstrategien gibt (Murolo und Romanazzi, 2014; Gramaje *et al.*, 2018). Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Ascomyzeten *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) und *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*) sowie der Basidiomyzet *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*), welche das Holzgewebe der Weinrebe kolonisieren, die Esca-Krankheit auslösen (Mugnai *et al.*, 1999; Surico *et al.*, 2008). Pilze, wie *Eutypa lata* (*Ela*) und *Botryosphaeria*-Spezies, wurden jedoch auch häufig aus Esca-symptomatischen Weinrebenpflanzen isoliert, weshalb angenommen wird, dass diese als eigenständige Krankheit oder auch direkt in der Esca-Krankheit involviert sein können (Graniti *et al.*, 2000; Fischer und Kassemeyer, 2003; Péros *et al.*, 2008; Bruez *et al.*, 2014). Aufgrund dessen wurden die Pilze *Pch*, *Pmi*, *Fmed* und *Ela* in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien verwendet. Neben den GTD nahm in den letzten Jahren auch die Bedeutung von Weinrebenkrankheiten zu, welche durch bodenbürtige Pilze verursacht werden. Beispielsweise kann die Wurzelfäule, welche unter anderem von *Roesleria subterranea* (*Rsub*) ausgelöst wird, zu einem Absterben der gesamten Weinrebe führen, wodurch Ernteverluste und enorme finanzielle Kosten für Neuanpflanzungen im Weinberg entstehen können (Beckwith, 1924; Gubler *et al.*, 2004; Mundy, 2015). Bis dato sind die molekularen Mechanismen in den Wirt-Pathogen- und in den Pathogen-Pathogen-Interaktionen von Esca und auch von der Wurzelfäule insbesondere im Hinblick auf die Ätiologie der beiden Krankheiten nicht in Gänze verstanden (Graniti *et al.*, 2000; Fischer und Peighami Ashnaei, 2019; Neuhauser *et al.*, 2011). In einigen Untersuchungen zu mikrobiell-verursachten Infektionen wurde die Siderophor-Produktion als Virulenzfaktor von verschiedenen Pathogenen diskutiert (Weinberg, 1999; Howard, 1999; Hissen *et al.*, 2005; Johnson, 2008). Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Siderophor-Biosynthese als ein potenzieller Virulenzfaktor untersucht, der als Grundlage zur Erforschung der molekularen Mechanismen der Pilz-Pilz- und Pilz-Pflanzen-Interaktionen in Esca oder in der Wurzelfäule dienen könnte.

4.1 Siderophor-Produktion in Esca- und Wurzelfäule-assozierten Pilzen

Eisen ist für fast alle Organismen ein essenzielles Spurenelement, da es in zahlreichen zellulären Prozessen benötigt wird (Coughlan, 1971). Beispielsweise wird Eisen in vielen Enzymen als Cofaktor und in Elektronentransportsystemen als Katalysator verwendet (Eisendle *et al.*, 2006). Allerdings kann eine exzessive zelluläre Akkumulation von nicht gebundenem Eisen die Produktion von zellschädigenden, reaktiven Sauerstoffspezies verursachen (Halliwell und Gutteridge, 1992; Johnson, 2008). Die Bioverfügbarkeit von Eisen ist hinsichtlich der Tatsache, dass es zumeist in der schwerlöslichen, oxidierten Form in der Umwelt vorliegt, stark limitiert (Schwertmann und Fitzpatrick, 1992; Haas, 2003). Aufgrund dessen haben viele Organismen spezifische Strategien entwickelt, um extrazelluläres Eisen zu solubilisieren, in die Zelle aufzunehmen und intrazellulär eine sorgfältig regulierte Eisenhomöostase gewährleisten zu können. Eine Vielzahl der Mikroorganismen produziert hierfür sogenannte Siderophore. Das sind niedermolekulare, chelatierende Verbindungen, die sich durch eine hohe Affinität zu Eisen auszeichnen. (Crowley *et al.*, 1991; Haas, 2003) Diese lassen sich in die drei Klassen Carboxylate, Catechole und Hydroxamate einteilen. Die Mehrheit der bis heute vorgefundenen, pilzlichen Siderophore zählen zur Gruppe der Hydroxamate (Thieken und Winkelmann, 1992; Haas, 2003).

In Studien von Di Marco *et al.* konnten 2001 bereits anhand eines Chrome Azurol-Assays gezeigt werden, dass die Esca-assozierten Pilze *Pch*, *Pmi*, *Fomitiporia punctata*, welcher eng verwandt zu *Fmed* ist (Fischer, 2002), und *Libertella blepharis* (Trouillas *et al.*, 2010), die Anamorphe von *Ela*, eisenchelatierende Verbindungen produzieren können. Hierbei wurde angenommen, dass es sich bei diesen um Siderophore handelt (Di Marco *et al.*, 2001). In Studien von J. Fischer (2014) wurde die Detektion der Hydroxamat-Siderophore Ferricrocin und Ferrichrom A, welche der Familie der Ferrichrome zugeordnet werden, in Extrakten aus der jeweiligen Submerskultivierung mit *Pch* und *Pmi* beschrieben (Fischer, 2014). Für *Ela* und *Fmed* wurden hingegen keine Siderophore festgestellt. Diese Ergebnisse, konnten in der vorliegenden Arbeit allerdings nur teilweise bestätigt werden, was im Nachfolgenden näher erläutert wird. Für *Rsub* ist dagegen die Siderophor-Produktion, welche im Zuge der Arbeit nachgewiesen werden konnte, aus der Literatur bis dato noch nicht bekannt.

4.1.1 Siderophore aus *Phaeoconiella chlamydospora*

Für *Pch* konnte im Rahmen dieser Arbeit ein bisher unbekanntes Siderophor isoliert werden, welches als Trihydroxyfusarinin C (Abb. 42, E) mittels Strukturaufklärung identifiziert worden

ist (3.1.1.1.1). Es sind derzeit unterschiedliche Siderophore der Fusarinin-Familie aus verschiedenen Pilzspezies beschrieben, welche, mit Ausnahme des Neurosporins, mit *cis*-Fusarinin-Einheiten zu Dimeren oder Trimeren verknüpft sind (Abb. 42): Fusarinin A (linearer Dimer), Fusarinin B (linearer Trimer), Fusarinin C (zyklischer Trimer) und Triacetylfusarinin C (acetylierter, zyklischer Trimer) (Renshaw *et al.*, 2002; Holinsworth und Martin, 2009). Ein hydroxyliertes Fusarinin (Trihydroxyfusarinin C), das als zyklisches Trimer sich durch je eine Hydroxylgruppe an der jeweiligen Doppelbindung auszeichnet (Abb. 42, E), wurde bis dato in der Literatur nicht aufgeführt.

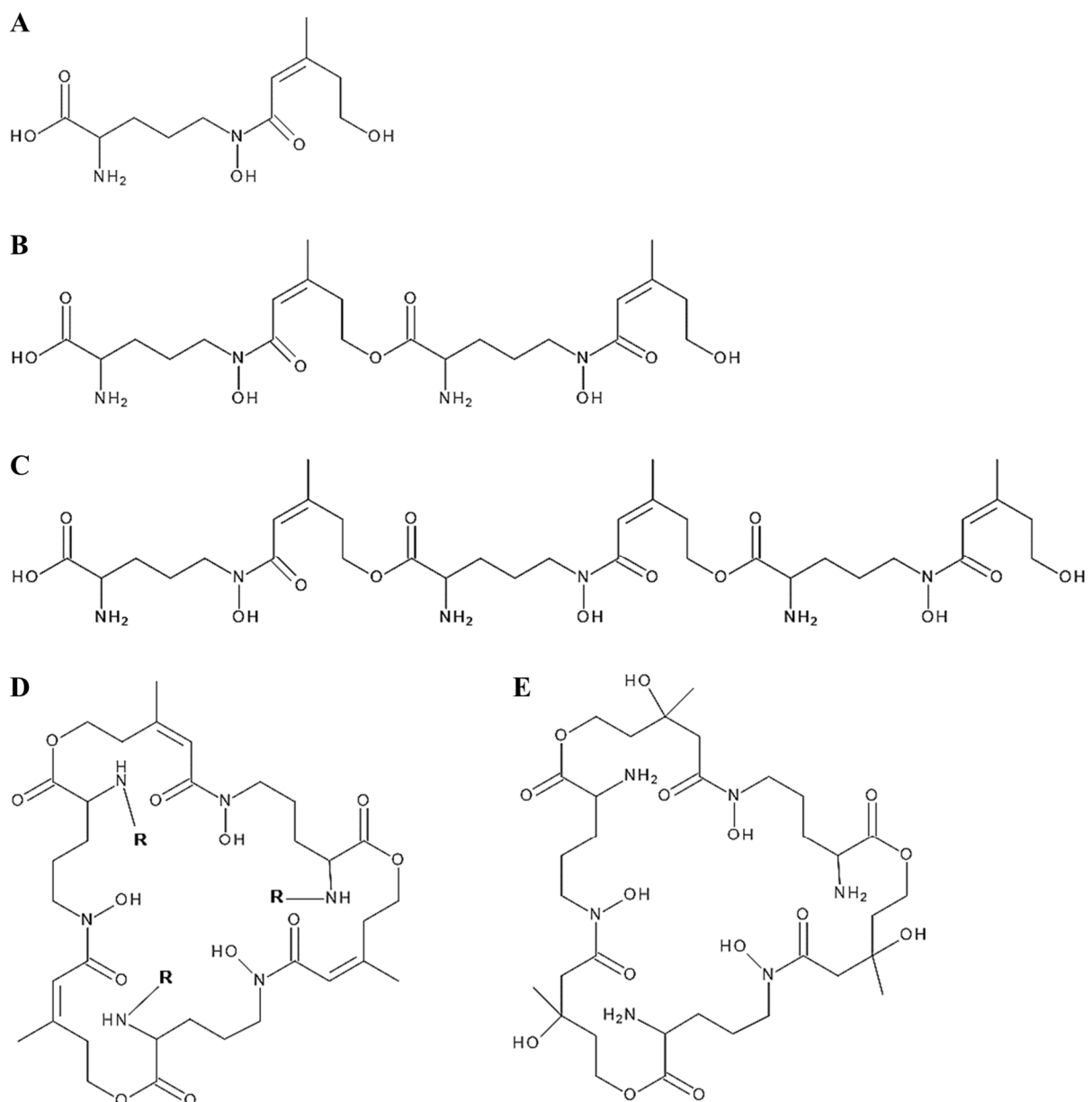


Abbildung 42: Chemische Struktur von *cis*-Fusarinin (A), Fusarinin A (B), Fusarinin B (C), Fusarinin C (D, R = H), Triacetylfusarinin C (D, R = COCH₃) und Trihydroxyfusarinin C (E). (modifiziert nach Holinsworth und Martin, 2009)

Allerdings wurden bereits hydroxylierte Siderophor-Varianten, wie beispielweise Hydroxyferricrocin aus *Aspergillus fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007) oder Hydroxycoprogen und Hydroxynecoprogen I aus *Alternaria longipes* (Jalal und van der Helm, 1989), beschrieben. In *A. fumigatus* wurde neben dem Hydroxyferricrocin die nicht-hydroxylierte Variante Ferricrocin vorgefunden. Hierbei wurde dem Hydroxyferricrocin die Funktion der hyphalen, intrazellulären Eisenspeicherung und dem Ferricrocin die der konidialen Eisenspeicherung zugeschrieben (Schrettl *et al.*, 2007). In *Pch* konnte hingegen nur die hydroxylierte Variante von Fusarinin C detektiert werden. Da in der vorliegenden Arbeit das Trihydroxyfusarinin C ausschließlich in Kulturfiltratextrakten aus der Kultivierung von *Pch* in eisenlimitierten Medien detektiert wurde und weder in Myzel- noch in Konidienextrakten nachgewiesen werden konnte, ist es anzunehmen, dass dieses als ausschließlich extrazelluläres Siderophor von dem Pilz sekretiert wird, um die zelluläre Eisenaufnahme bei eisenlimitierten Umweltbedingungen zu unterstützen (Howard, 1999; Haas, 2003).

Des Weiteren wurden die Siderophore Ferrichrysin und Ferricrocin, welche der Familie der Ferrichrome zugeordnet werden (Renshaw *et al.*, 2002), in Extrakten von *Pch* identifiziert. Die Produktion von Ferrichrysin wurde im Gegensatz zu Ferricrocin (Fischer, 2014) erstmals für *Pch* festgestellt. Da Ferrichrysin vor allem in Extrakten aus der *Pch*-Kultivierung in eisenlimitiertem Medium nachgewiesen werden konnte und zudem nicht im Myzelextrakt detektiert wurde, ist die Vermutung naheliegend, dass Ferrichrysin neben dem Trihydroxyfusarinin C von *Pch* sekretiert wird, um zusätzlich die extrazelluläre Eisenaufnahme des Pilzes zu begünstigen. Für *Aspergillus ochraceous* wurde bereits nachgewiesen, dass Ferrichrysin neben weiteren Siderophoren, wie Ferrirubin und verschiedenen Asperchromen, zur zellulären Aufnahme von extrazellulärem Eisen sekretiert wird (Jalal *et al.*, 1984) und auch für *Fusarium graminearum* wurden extrazelluläre Siderophore von zwei verschiedenen Familien neben dem intrazellulären Siderophor Ferricrocin festgestellt: Malonichrom aus der Ferrichrom-Familie und Triacetylfusarinin C aus der Fusarinin-Familie (Oide *et al.*, 2014).

Ferricrocin wurde in der vorliegenden Arbeit vor allem in Myzel- und Konidienextrakten aus der Kultivierung von *Pch* in eisenhaltigem Medium nachgewiesen (3.1.1.1.2). In zahlreichen Pilzen wurde dieses bereits als intrazelluläres Siderophor identifiziert. Als Beispiele hierfür sind die Ascomyzeten *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2004), *Aspergillus nidulans* (Charlang *et al.*, 1981), *Cochliobolus heterostrophus* (Oide *et al.*, 2006), *Fusarium graminearum* (Tobiasen *et al.*, 2007), *Magnaporthe oryzae* (Antelo *et al.*, 2006) und *Neurospora crassa* (Matzanke *et al.*, 1987) zu nennen. In *N. crassa* konnte beispielsweise

nachgewiesen werden, dass Ferricrocin intrazellulär Eisen sowohl in den Hyphen als auch in den Konidien einlagert und für dessen Konidiogenese essenziell ist (Matzanke *et al.*, 1987, 1988). In *A. fumigatus* wird es intrazellulär zur hyphalen Eisenverteilung und -speicherung verwendet. Hydroxyferricrocin, welches ebenfalls in *A. fumigatus* vorgefunden wurde, ist neben der bereits erwähnten konidialen Eisenspeicherung des Weiteren auch in der Konidienkeimung und Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress involviert (Schrettl *et al.*, 2007; Wallner *et al.*, 2009). Da die Ferricrocin-Produktion in *Pch* unabhängig von der eisenlimitierten oder -supplementierten Kultivierungsbedingung sowohl im Myzel- als auch im Konidienextrakt beobachtet werden konnte, ist es anzunehmen, dass dieses Siderophor zur intrazellulären Eisenspeicherung synthetisiert wird und dadurch dem Pilz fortdauernd die Eisenverfügbarkeit und den Schutz vor Eisentoxizität gewährleisten kann.

Die Produktion von Ferrichrysin, Ferricrocin sowie dem Fusarinin-Derivat konnte in mehrfach, biologisch unabhängigen Versuchen mit zwei verschiedenen *Pch*-Isolaten bestätigt werden. Ferrichrom A (Fischer, 2014) wurde dagegen weder in Myzel- noch in Kulturfiltratextrakten von *Pch* detektiert.

4.1.2 Siderophore aus *Phaeoacremonium minimum*

Für *Pmi* konnte in der vorliegenden Arbeit die Produktion der Siderophore aus der Familie der Fusarinine (Triacetylfusarinin C), der Coprogene (Coprogen B) und der Ferrichrome (Ferricrocin) nachgewiesen werden (3.1.1.2). Sowohl Triacetylfusarinin C als auch Coprogen B wurden ausschließlich unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen von *Pmi* produziert. In Extrakten aus der Kultivierung in eisenhaltigem Medium konnte keines der beiden Siderophore detektiert werden, weshalb anzunehmen ist, dass beide Siderophore von *Pmi* zur extrazellulären Eisenaufnahme sekretiert werden. Die Produktion von Siderophoren sowohl der Fusarinin- als auch der Coprogen-Familie ist typisch für Pilze der Pezizomycotina (Haas *et al.*, 2008), zu denen auch *Pmi* gezählt wird. Zum Beispiel wurde für *A. fumigatus* nachgewiesen, dass dieser neben Fusarinin C Triacetylfusarinin C sekretiert, um extrazelluläres Eisen in die Zelle aufzunehmen zu können (Schrettl *et al.*, 2007). Auch für *F. graminearum* wurde Triacetylfusarinin C als extrazelluläres Siderophor beschrieben (Oide *et al.*, 2006). *Alternaria alternata* sekretiert dagegen Coprogen und Coprogen B zur Eisenaufnahme in die Zelle (Voß *et al.*, 2020). Für *A. niger* wurde festgestellt, dass die hauptsächlich sekretierten Siderophore Coprogen B und Ferrichrom sind, wobei letzteres auch als vorherrschendes intrazelluläres Siderophor nachgewiesen wurde (Franken *et al.*, 2014). Die meisten Pilze produzieren eine Vielzahl von verschiedenen Siderophoren, um ein weitreichendes Spektrum

an physikalisch-chemischen Eigenschaften der Siderophore für eine begünstigte Eisenaufnahme gegenüber konkurrierenden Organismen zu gewähren (Winkelmann, 2007).

Ferricrocin wurde demgegenüber nur in Myzel- und Konidienextrakten von *Pmi* nachgewiesen, weshalb davon auszugehen ist, dass dieses Siderophor intrazellulär sowohl in der konidialen als auch in der hyphalen Eisenspeicherung, vergleichbar zu den in 4.1.1 aufgeführten Beispielen von *A. nidulans* und *N. crassa* (Matzanke *et al.*, 1988; Schrettl *et al.*, 2007), involviert ist.

4.1.3 Siderophore aus *Fomitiporia mediterranea*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten für *Fmed* ausschließlich Siderophore der Coprogen-Familie im Kulturfiltratextrakt detektiert werden (3.1.1.3). Dabei wurde das Siderophor Coprogen identifiziert und des Weiteren aufgrund der jeweiligen Massen- und UV-Vis-Spektren sowie der Polaritätseigenschaften die Siderophore Hydroxycoprogen, Isonocoprogen I bzw. Neocoprogen I, Hydroxyisonocoprogen I bzw. Hydroxyneocoprogen I und Dimerumsäure vermutet (Abb. 43). Im Zuge der Arbeit war es jedoch nicht möglich die putativen Siderophore zu isolieren und eine Strukturaufklärung von diesen zur finalen Bestätigung durchzuführen. Aufgrund der Tatsache, dass die genannten Siderophore lediglich unter eisenlimitierten und nicht unter eisensupplementierten Kultivierungsbedingungen detektiert wurden, ist auch in diesem Zusammenhang davon auszugehen, dass *Fmed* die Coprogen-Siderophore zur Aufnahme von extrazellulärem Eisen sekretiert. Im Gegensatz zur Siderophor-Produktion von Ascomyzeten ist die Synthese der Siderophore von Basidiomyzeten bislang nicht sehr umfangreich in der Literatur beschrieben worden. Unter anderem wurde die Produktion von Ferrichrom und Ferrichrom A in *U. maydis* (Budde und Leong, 1989), Basidiochrom in *Ceratobasidium* ssp. und *Rhizoctonia* ssp. (Haselwandter *et al.*, 2006) sowie verschiedene Siderophore der Fusarinin-, Ferrichrom- und Coprogen-Familie in den Ektomykorrhiza-Pilzen *Laccaria laccata* (Haselwandter *et al.*, 2013), *S. luteus* und *S. granulatus* (Haselwandter *et al.*, 2011) dokumentiert. Die Detektion von mehreren diversen Coprogen-Derivaten, wie es für *Fmed* vorgefunden wurde, ist für einen Basidiomyzeten bislang aus der Literatur noch nicht bekannt. Für den Ascomyzeten *A. longipes* konnten dagegen ebenfalls verschiedene Siderophore der Coprogen-Familie bestätigt werden (Jalal und van der Helm, 1989). Für diesen wurden zehn unterschiedliche Siderophore, wie beispielsweise Coprogen, Hydroxycoprogen, Neocoprogen I oder Hydroxyneocoprogen I (Abb. 43, B, C), nachgewiesen (Jalal und van der Helm, 1989). Für die Ascomyzeten *Histoplasma capsulatum* und *Paracoccidioides* spp. wurden dagegen ausschließlich die extrazellulären Siderophore

Coprogen B und Dimerumsäure festgestellt. In den entsprechenden Studien von Burt (1982) und Silva-Bailão *et al.* (2014) wurde angenommen, dass Dimerumsäure dabei nicht als Haupt-, sondern als Neben- oder sogar als Abbauprodukt detektiert worden ist (Burt, 1982; Silva-Bailão *et al.*, 2014). Aufgrund dessen und aufgrund der Tatsache, dass die Trihydroxamate der Coprogen-Familie aus drei N^5 -Acyl- N^5 -Hydroxy-L-Ornithineinheiten bestehen, von denen zwei der Einheiten über einen Diketopiperazinring zur Dimerumsäure verknüpft sind (Abb. 43) (Haas *et al.*, 2008), wäre es denkbar, dass auch die detektierte, putative Dimerumsäure als ein Abbau- oder Nebenprodukt in den Extrakten von *Fmed* vorgefunden wurde.

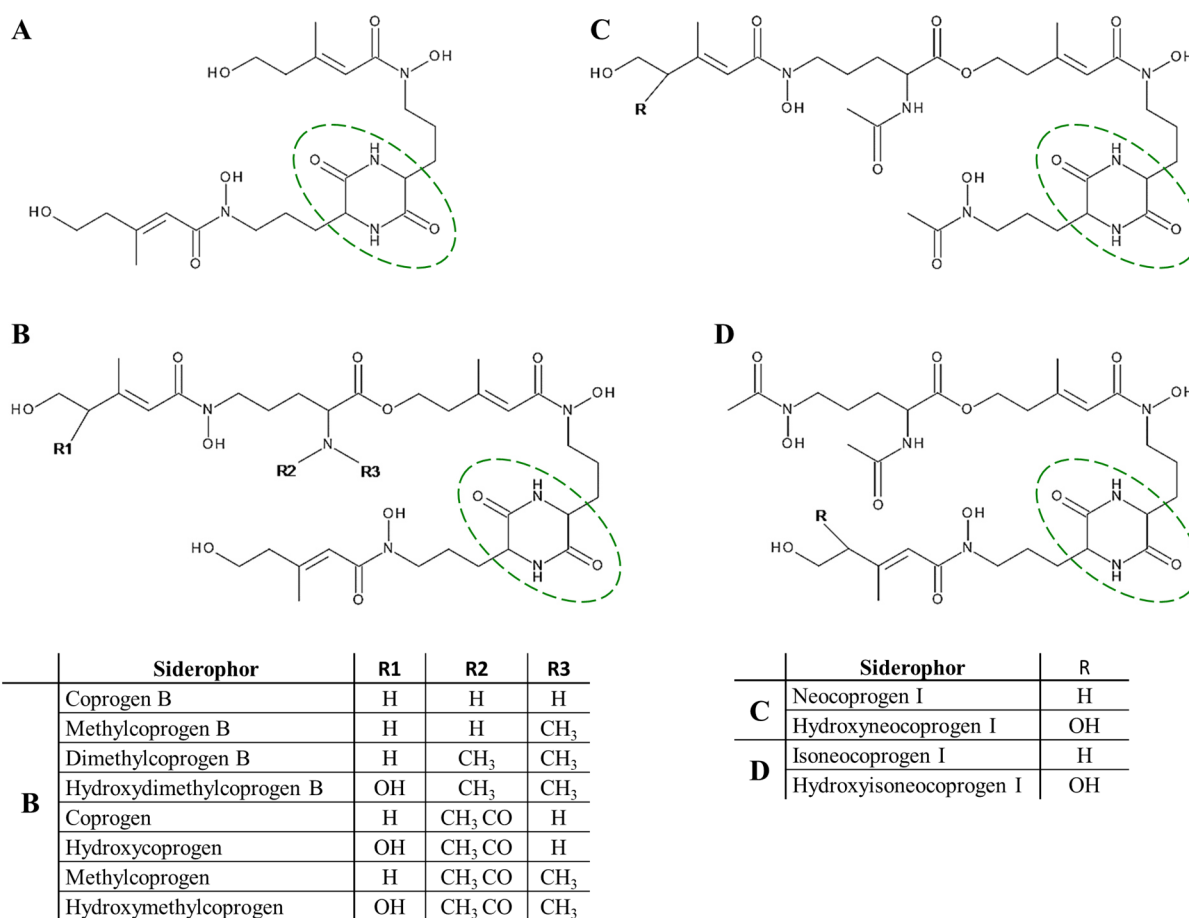


Abbildung 43: Chemische Struktur von verschiedenen Siderophoren der Coprogen-Familie. Gezeigt sind die chemischen Strukturen von Dimerumsäure (A), Coprogen- und Coprogen B- (B), Neocoprogen I- und Isonocoprogen I (C, D) -Derivate. Der für die Siderophore der Coprogen-Familie charakteristische Diketopiperazinring wurde jeweils grün umrandet hervorgehoben. (modifiziert nach Renshaw *et al.*, 2002)

4.1.4 Siderophore aus *Eutypa lata*

Für *Ela* konnten ebenfalls, wie für *Fmed* bereits beschrieben wurde (4.1.3), verschiedene, sekretierte Siderophore der Coprogen-Familie in den Kulturfiltratextrakten der Isolate festgestellt werden, welche ausschließlich aus der Kultivierung mit *Ela* in eisenlimitiertem Medium generiert worden sind (3.1.1.4.1). Daher ist auch hierbei anzunehmen, dass die

detektierten Siderophore von *Ela* zur Aufnahme von extrazellulärem Eisen unter limitierten Bedingungen in der Umwelt sekretiert werden. In Untersuchungen von Antelo *et al.* (2006) wurden ebenfalls verschiedene Coprogene (Coprogen, Methylcoprogen, Coprogen B und Methylcoprogen B) für *M. oryzae* nachgewiesen (Antelo *et al.*, 2006) und auch für verschiedene *Trichoderma*-Spezies konnte die Produktion von Coprogen und Coprogen B festgestellt werden (Anke *et al.*, 1991). Für *Alternaria brassicicola* wurden in Studien von Pedras und Park (2015) in Ausnahme von Dimethylneocoprogen I die gleichen Siderophore wie für *Ela* vorgefunden wurden: Dimerumsäure, Coprogen B, Methylcoprogen B, Dimethylcoprogen B und ein bisher unbekanntes Coprogen-Siderophor mit einer Masse $[M - 2H + Fe]^+$ von m/z 824 (Pedras und Park, 2015), welches dem identifizierten Siderophor Hydroxydimethylcoprogen B ($[M - 2H + Fe]^+$ m/z 824) aus *Ela* entsprechen könnte. Die verschiedenen Methylierungen und Hydroxylierungen der detektierten Coprogene ermöglichen die Diversität innerhalb der Coprogen-Siderophorfamilie (Haas, 2014). Da die Bioverfügbarkeit von Eisen in der Umwelt sehr limitiert ist, gibt es zwischen Pilzen, Bakterien und dem Wirt einen steten Wettbewerb um dieses Element (Barton und Hemming, 1993). Es ist daher denkbar, dass *Ela* bzw. *Fmed* aufgrund der Vielfalt der Siderophore, welche von diesen sekretiert werden, einen Vorteil bezüglich der Eisenakquirierung gegenüber konkurrierenden Organismen innerhalb der Pflanze unter Eisenmangelbedingungen in der Umwelt ermöglicht wird. Durch die hier aufgeführte LC-MS/MS-Analyse und der anschließenden spektralen, molekularen Vernetzung der MS/MS-Spektren (Aron *et al.*, 2019a) (3.1.1.4.1) war es möglich strukturell ähnliche Derivate der identifizierten Coprogen-Siderophore in dem *Ela*-Extrakt zu detektieren (7.4.2, Abb. 47). Auf Grundlage dieser Analyse-Methode könnten zukünftig noch weitere putative Siderophore identifiziert werden.

Als intrazelluläres Siderophor wurde Ferricrocin für *Ela* vorgefunden. Dies konnte ausschließlich in dessen Myzelextrakten detektiert werden, weshalb auch in diesem Zusammenhang davon auszugehen ist, dass Ferricrocin in *Ela* zur hyphalen Eisenspeicherung synthetisiert wird.

4.1.5 Siderophore aus *Roesleria subterranea*

Da bisher für *Rsub*, welcher mit der Krankheit der Wurzelfäule an Weinreben assoziiert wird (Höfer, 1992), die Siderophor-Produktion nicht beschrieben worden ist, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit diese näher analysiert werden. Hierbei konnten in den Kulturfiltratextrakten in allen untersuchten Isolaten verschiedene, sekretierte Siderophore der Coprogen-Familie detektiert werden (3.1.2). Diese wurden ausschließlich in

Kulturfiltratextrakten aus der Kultivierung mit *Rsub* in eisenlimitiertem Medium vorgefunden. Daher ist anzunehmen, dass vergleichbar zu *Ela* (4.1.4), die detektierten Siderophore von *Rsub* zur Aufnahme von extrazellulärem Eisen bei eisenlimitierenden Bedingungen in der Umwelt sekretiert werden. Darüber hinaus kann vermutet werden, dass *Rsub* aufgrund der Diversität der Coprogene, die von diesem synthetisiert werden, über einen Wettbewerbsvorteil gegenüber konkurrierenden Organismen bei der Eisenakquirierung verfügt. In anderen Wurzelfäule-assoziierten Pilzen konnte bereits die Siderophor-Produktion nachgewiesen werden. Beispielweise wurde für *Ilyonectria mors-panacis*, der Auslöser der Wurzelfäule in der Ginseng-Pflanze, die Produktion von Triacetylfusarinin C bestätigt (Walsh *et al.*, 2019). In dieser Studie wurde das Siderophor als Schlüssel-Metabolit für die Virulenz in der Wurzelfäule diskutiert. Und auch für *Fusarium oxysporum*, der als bodenbürtiges Phytopathogen angesehen wird, wurde die Siderophor-Produktion unter eisenlimitierenden Bedingungen nachgewiesen (Wijesundera *et al.*, 1995). Dieser produziert drei verschiedene Ferrichrom-Siderophore, Ferricrocin, Ferrichrom C und Malonichrom, welche unter anderem in der Konkurrenzfähigkeit von *F. oxysporum* um Eisen innerhalb der Rhizosphäre von Tomaten involviert sind (López-Berges *et al.*, 2012). Weiterhin ist anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit neben den Isolaten *IB-Rüd01-16*, *CBS 201.25*, *CBS 407.51*, deren Wirtsorganismus die Weinrebenpflanze ist, auch Isolate untersucht wurden, welche aus Laub- (*CBS 271.82*, *CBS 339.96*) und Birnenbäumen (*CBS 272.82*) stammen. In allen Isolaten konnten Siderophore der Coprogen-Familie detektiert werden, weshalb anzunehmen ist, dass die Siderophor-Produktion von *Rsub* Wirtsunabhängig ist.

Aufgrund des erbrachten Nachweises, dass *Rsub* fähig ist Siderophore zu produzieren, kann nun in weiterführenden Untersuchungen der Einfluss der Siderophor-Produktion auf die Virulenz von *Rsub* analysiert werden, da bisher noch wenig über die Wirt-Pathogen-Interaktion während der Wurzelfäule an der Weinrebe bekannt ist.

4.1.6 Detektion der von Esca-assoziierten Pilzen produzierten Siderophore in Weinreben

Da die Weinrebenkrankheit Esca sich durch eine lange Latenzzeit von oft mehreren Jahren zwischen der Holz-Kolonisierung der Esca-assoziierten Pilze bis hin zu den sichtbaren, charakteristischen, äußeren Symptomen an der Pflanze auszeichnet und zudem die Symptome am Stamm und an den Blättern von Jahr zu Jahr in der Intensität und Ausprägung fluktuieren können (Mugnai *et al.*, 1999; Surico *et al.*, 2000; Calzarano *et al.*, 2018), ist eine Früherkennung dieser Krankheit sehr schwierig. Neben der visuellen Beobachtung der

Blattsymptome und anschließender Entnahme von Pflanzenmaterial, welches zur mikroskopischen Identifizierung der herauswachsenden Pilze verwendet wird (Fleurat-Lessaed *et al.*, 2010), gibt es derzeit mehrere Möglichkeiten die Pilze innerhalb der Pflanze über PCR-basierte Methoden molekulargenetisch nachzuweisen (Bester *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2012). Jedoch geben diese Methoden nur Auskunft auf die Anwesenheit des Pilzes innerhalb der Pflanze und nicht über das Stadium der Krankheit. Daher wäre eine Früherkennungsmethode, die Hinweise auf den Beginn der Krankheit gibt, zur schnellstmöglichen Eindämmung von Vorteil. Aufgrund der Hypothese, dass Siderophore in der Virulenz der Esca-assoziierten Pilze involviert sein könnten, erfolgten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste Studien, um das Potenzial der Siderophore als möglichen Biomarker zur Früherkennung der Krankheit innerhalb der Weinrebe zu untersuchen. Derzeit wurden mehr als 500 verschiedene Siderophore identifiziert (Ahmed und Holmström, 2014). Aufgrund dieser Vielfalt wäre es denkbar, dass eine Spezies-spezifische Diagnostik ermöglicht werden könnte, da auch für die Esca-assoziierten Pilze im Zuge dieser Arbeit verschiedene Siderophore detektiert wurden (3.1). Zur Identifizierung der Siderophore innerhalb der Weinrebe wurden Extrakte aus Esca-symptomatischem und -asymptomatischem Pflanzenmaterial unter Zuhilfenahme der HPLC-MS analysiert (3.2). Es konnten jedoch keine Siderophore innerhalb des gesammelten Pflanzenmaterials, welches aus Proben von Blattmaterial, verschiedenen Querschnitten des Stammes und Wurzelmaterial aus drei verschiedenen Jahren bestand, mit der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Analyse-Methode nachgewiesen werden. In Studien von Carroll *et al.* wurde das Potenzial des Siderophors Triacetylfusarinin C als Biomarker zur Diagnose der durch *A. fumigatus* verursachten invasiven Aspergillose bei Menschen untersucht (Carroll *et al.*, 2016), da für die Biosynthese von Triacetylfusarinin C in einem Mausmodell die Involvierung in dessen Virulenz bereits demonstriert worden ist (Schrettl *et al.*, 2004; Hissen *et al.*, 2005). Hierbei konnte durch eine UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)-MS/MS-Methode der Nachweis von Triacetylfusarinin C in Serumproben von Patienten erbracht werden. In Studien von Hoenigl *et al.* (2019) wurde darüber hinaus das Potenzial des Siderophors Triacetylfusarinin C als Urin-Biomarker zur Diagnose der invasiven Aspergillose bei Menschen diskutiert (Hoenigl *et al.*, 2019). Hierbei war es möglich Triacetylfusarinin C über eine CE (*Capillary Electrophoresis*)-ESI-MS-Analyse im menschlichen Urin nachzuweisen. Die Nachweisgrenze von Triacetylfusarinin C lag dabei bei 0,1 ng/ml. Möglicherweise war die Sensitivität des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Testsystems nicht ausreichend zur Erkennung der im Pflanzenextrakt anwesenden Siderophore. Daher sollten in weiterführenden Studien zunächst die minimale Nachweisgrenze der HPLC-

MS-Analysemethode von Siderophoren in Pflanzenextrakten ermittelt werden. Hierzu könnten anhand von Gewächshausexperimenten eine Quantifizierung von Siderophoren in Extrakten von Pflanzenmaterial, welches von Weinrebenstecklingen mit zuvor injizierten Siderophoren entnommen wird, vorgenommen werden. Darüber hinaus sollten zukünftig sensitivere Messmethoden, wie beispielsweise LC-MS/MS mit einem Triple-Quadrupole-Analysator im MRM (*multiple reaction monitoring*)-Modus, verwendet werden, welche eine höhere Selektivität und Sensitivität bieten. Im Nahrungsmittel- und Umweltanalytikbereich wird diese Methode häufig für die gezielte Analyse von Toxin- und Pestizid-Rückständen verwendet und gilt hierbei als Goldstandard (Stachniuk und Fornal, 2016). In Verbindung mit *Mass Spectrometry Imaging* (MSI)-Methoden könnte zudem ein molekulares Profil über die räumliche Verteilung von zu untersuchenden Analyt-Ionen in einer Probe, wie es in Studien von Floros *et al.* (2017) demonstriert wurde (Abb. 44), erstellt werden (Floros *et al.*, 2017; Petras *et al.*, 2017).

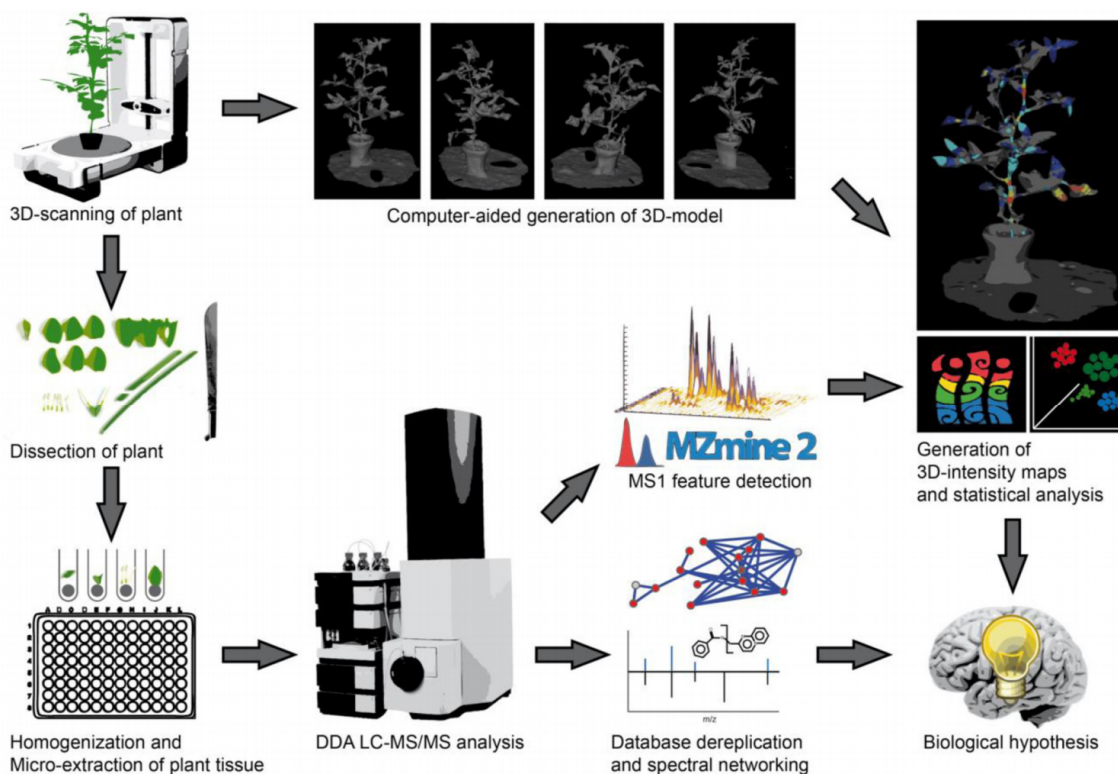


Abbildung 44: Vorgehensweise zur Erstellung einer 3D-Ionenintensitätskarte einer Pflanze. Entnommen aus Floros *et al.* (Floros *et al.*, 2017).

Darüber hinaus wären auch MSI-Methoden, wie beispielsweise MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) *Imaging*, zukünftig in Erwägung zu ziehen, mit welcher die Detektion und Abbildung von Analyt-Ionen auf einer Oberfläche pflanzlicher Sektionsschnitte

ermöglicht wird (Dong *et al.*, 2016). In Studien von Mullen *et al.* (2005) konnte bereits anhand der MALDI-Methode im Gewebe eines Sojapflanzen-Stiels das Fungizid Azoxystrobin zwei Tage nach Behandlung mit einer supplementierten Nährlösung nachgewiesen werden (Mullen *et al.*, 2005). In Studien von beispielsweise Lunsford *et al.* (2011) konnten im intakten Gewebe eines Holzstamm einer dreijährigen *Populus* sp.-Pflanze Cellulose und Hemicellulose über MALDI *Imaging* nachgewiesen werden (Lunsford *et al.*, 2011). Derzeit sind verschiedene Anwendungsbeispiele für den Nachweis von Analyten auf Gewebe von Samen, Blätter, Früchte, Stiel und Wurzeln in unterschiedlichen Pflanzen bekannt (Bjarnholt *et al.*, 2014), weshalb es denkbar wäre, durch die Weiterentwicklung und Innovation in diesen Analysemethoden ein besseres Verständnis von molekularen Mechanismen von Weinrebenkrankheiten zu erlangen, um eine Identifizierung von Biomarker zukünftig ermöglichen zu können.

4.2 Siderophor-Biosyntheseweg in Esca- und Wurzelfäule-assoziierten Pilzen

Zur Untersuchung des Siderophor-Biosynthesewegs in den Esca-assoziierten Pilzen wurde der Fokus in der vorliegenden Arbeit auf die Ascomyzeten *Pch* und *Pmi* gelegt (3.3), von denen die Möglichkeit zur zielgerichtete Mutagenese bereits dokumentiert worden ist (Landi *et al.*, 2012; Fischer, 2014). Für Analysen zur Aufklärung des Siderophor-Biosynthesewegs auf molekulargenetischer Ebene in *Rsub* sollte dagegen zunächst in einem kleineren Abschnitt der Arbeit eine Etablierung eines Transformationssystems vorgenommen werden, da bisher für diesen keine Methode in der Literatur beschrieben worden ist (3.4).

4.2.1 Siderophor-Biosyntheseweg in *Phaeoconiella chlamydospora*

Der erste Schritt in der Biosynthese von Hydroxamat-Siderophoren ist, in Ausnahme von Neurosporin, die N^5 -Hydroxylierung des L-Ornithins durch die L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase (Renshaw *et al.*, 2002; Haas, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnten für *Pch* zwei putative L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase (*OMO*)-Gene, *PchOMOI* und *PchOMOII*, identifiziert werden (3.3.1.1). Für beide wurden signifikante Sequenz-Homologien bezüglich der Aminosäuresequenz-Similarität zu den bereits beschriebenen Enzymen der L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase *Omo1p* aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007) und *SidAp* aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2004; Baltussen *et al.*, 2018) ermittelt (3.3.1.1, Tab. 17). Hierbei war allerdings die Similarität (S) von *Pchomolp* gegenüber beispielsweise *SidAp* (S: 70 %) deutlich höher im

Vergleich zu der von PchomIIp (S: 51 %). Aufgrund der jeweiligen Disruption des *PchOMOI*- und *PchOMOII*-Gens und der anschließenden Analyse der verifizierten Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass *PchOMOI* im Gegensatz zu *PchOMOII* essenziell für die Produktion sowohl der detektierten intra- als auch der extrazellulären Siderophore in *Pch* ist (3.3.1.1.2). Die Siderophor-Produktion kam im Gegensatz zu der in $\Delta PchomII$ in $\Delta PchomI$ vollständig zum Erliegen. Dies konnte auch anhand von den Analysen mit der generierten Doppelgeninaktivierungsmutante $\Delta PchomII/\Delta PchomI$ sowie der Komplementationsmutante $\Delta PchomI/OMOI$ bestätigt werden (3.3.1.1.2). Des Weiteren wurde für PchomIp drei putative Bindedomänen festgestellt (7.8.1), welche charakteristisch für ω -Aminosäure-Hydroxylasen sind: Flavinadenindinukleotid (FAD)-, Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP)- und Substratbindedomäne (Stehr *et al.*, 1998). Die putative FAD-Bindedomäne mit dem Motiv GXGXXG (Stehr *et al.*, 1998) ist an Position 43 - 48 lokalisiert, wobei das erste Glycin durch ein Cystein und das letzte Glycin durch ein Prolin ersetzt wurde. Ein vergleichbares Motiv wurde in dieser Form bereits auch für SidAp in *A. nidulans*, *A. oryzae* und *A. pullulans* (Eisendle *et al.*, 2003) sowie für Omo1p in *M. oryzae* (Hof, 2008) detektiert. Der zuletzt genannte Glycin-Austausch ist hierbei ein typisches Merkmal von Hydroxylasen, welche an der Biosynthese von Siderophoren beteiligt sind (Eisendle *et al.*, 2003). An Position 244 - 249 wurde die putative NADP-Bindedomäne mit dem Motiv GXGXX(G/A) (Stehr *et al.*, 1998) festgestellt. Die putative Substrat-Bindedomäne mit dem Motiv D(X)₃(L/F)ATGY(X)₄(H/P) (Stehr *et al.*, 1998) wurde an Position 384 - 397 detektiert. Die letzte Aminosäureposition ist von der NADP-Bindedomäne nicht konserviert und häufig ist das Prolin durch ein Histidin ersetzt (Hissen *et al.*, 2005). Dies konnte auch für *Pch* vorgefunden werden. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass *PchOMOI* für die L-Ornithin-*N*⁵-Monooxygenase kodiert, welche den ersten Syntheseschritt der Siderophore in *Pch* katalysiert (Abb. 45).

Im nächsten Syntheseschritt erfolgt die Acylierung von *N*⁵-Hydroxy-L-Ornithin zu *N*⁵-Acyl-*N*⁵-Hydroxy-L-Ornithin durch eine *N*⁵-Acylase (Renshaw *et al.*, 2002; Haas, 2003). Im Rahmen der Arbeit konnten zwei putative Acylase-Gene, *PchACEII* und *PchACEIII*, für *Pch* identifiziert werden. Jedoch wurde nur für *PchACEII* anhand der zielgerichteten Disruption und anschließenden Analyse der generierten Mutante eine Beteiligung an der Siderophor-Biosynthese in *Pch* festgestellt (3.3.1.2.2). Hierbei wurde im Vergleich zum Wildtyp für $\Delta PchaceII$ keine Produktion des Trihydroxyfusarinin C detektiert. Die Produktion von Ferrichrysin und Ferricrocin wurde dagegen nicht beeinflusst. Für PchaceIIp wurden signifikante Sequenz-Homologien zu den bereits bekannten Acylasen SidFp, SidGp und SidLp aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007; Blatzer *et al.*, 2011) festgestellt (3.3.1.2, Tab. 18). Im

Vergleich zu SidLp (S: 47 %) war die ermittelte Similarität für SidFp (S: 65 %) allerdings deutlich höher. Das Gen *SIDF* kodiert für eine N^5 -Hydroxyornithin:Anhydromevalonyl-CoenzymA- N^5 -Transacylase, welche den zweiten Schritt in der Siderophor-Biosynthese der Fusarinine in *A. fumigatus* katalysiert (Schrettl *et al.*, 2007). *SIDL* kodiert hingegen für eine N^5 -Hydroxyornithin:Acetyl-CoenzymA- N^5 -transacylase, die den zweiten Syntheseschritt von Ferricrocin in *A. fumigatus* katalysiert (Blatzer *et al.*, 2011). Gezielte Sequenzanalysen zur Identifizierung von weiteren Homologen von SidLp in *Pch* führten allerdings zu keinem Ergebnis. *SIDG* kodiert dagegen für die Acetyl-CoenzymA- N^2 -Transacetylase, welche die Katalyse von Fusarinin C zu Triacetylfusarinin C in *A. fumigatus* umsetzt (Schrettl *et al.*, 2007). Da bisher keine Produktion von Triacetylfusarinin C in *Pch* festgestellt werden konnte, aber eine etwas höhere Similarität von PchaceIIp zu SidFp (S: 65 %) im Vergleich zu SidGp (S: 56 %) dokumentiert wurde und zudem die Produktion des Trihydroxyfusarinin C in $\Delta PchaceII$ zum Erliegen kam, ist es naheliegend, dass *PchACEII* für eine N^5 -Transacylase kodiert, die im zweiten Syntheseschritt von Trihydroxyfusarinin C involviert ist (Abb. 45).

Im weiteren Verlauf der Siderophor-Biosynthese werden die synthetisierten Hydroxamat-Einheiten über nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) miteinander oder mit weiteren Aminosäuren über Peptid- und/ oder Esterbindungen verknüpft (Haas, 2003; Philpott, 2006; Haas *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden zwar drei für NRPS putativ kodierende Gene, *PchNRPSI*, *PchNRPSII* und *PchNRPSIII*, in *Pch* identifiziert, allerdings konnte lediglich für *PchNRPSII* eine zielgerichtete Disruption durchgeführt werden (3.3.1.3.1). Anhand der Analyse der verifizierten Mutante konnte nachgewiesen werden, dass *PchNRPSII* in der Produktion von Trihydroxyfusarinin C in *Pch* involviert ist (3.3.1.3.2). Trihydroxyfusarinin C konnte im Gegensatz zu Ferrichrysin und Ferricrocin nicht in Extrakten aus der Kultivierung mit $\Delta PchnrpsII$ detektiert werden. Darüber hinaus wurden für PchnrpsIIp signifikante Homologien zu den bereits beschriebenen NRPS SidDp (S: 66 %) aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007; Blatzer *et al.*, 2011) und Nps6p (S: 66 %) aus *F. graminearum* (Oide *et al.*, 2006), welche für die Synthese der Fusarinin-Siderophoren in beiden Pilzen essenziell sind, festgestellt (7.7.1.1, Tab. 35). Auch die modulare Organisation für SidDp (ATCA*TC) und Nps6p (ATCaA*TC) (Haas *et al.*, 2008) entspricht der ermittelten, putativen Domänenstruktur für PchnrpsIIp (ATCATC) (3.3.1.3, Tab. 19). Eine erfolgreiche Disruption von *PchNRPSI* und *PchNRPSIII* und eine anschließende Analyse der Mutanten könnten zukünftig in weiteren Untersuchungen Aufschluss auf eine Involvierung in der Siderophor-

Biosynthese von Ferrichrysin und Ferricrocin geben. Für beide konnten Homologien zu den bekannten NRPS, wie beispielsweise zu Ssm1p (PchnrpsIp: S: 53 %; PchnrpsIIIp S: 43 %) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007), welches an der Synthese von Ferricrocin beteiligt ist, aufgezeigt werden (7.7.1.1, Tab. 35). Allerdings wurde nur für die modulare Organisationsvorhersage von PchnrpsIp (ATC-ATC-TCA-TC-TC-TC) im Gegensatz zu der von PchnrpsIIIp (ATC-ATC-ATC-CTC) eine vollständige Übereinstimmung zu Ssm1p (ATC-ATC-TCA-TC-TC-TC) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007) festgestellt (3.3.1.3, Tab. 19). Darüber hinaus konnte im Genom von *Pch* downstream von *PchNRPSI* (5'→3') *PchOMOI* (3.3.1, Abb. 26, 1), welches putativ für die L-Ornithin-*N*⁵-Monooxygenase in *Pch* kodiert, geclustert detektiert werden. Häufig sind Gene, welche an der Siderophor-Biosynthese in Pilzen beteiligt sind, geclustert im Genom lokalisiert (Blatzer *et al.*, 2011). Aufgrund der aufgeführten Punkte könnte eine Involvierung von PchnrpsIp in der Synthese von eines der beiden Ferrichrom-Siderophore als wahrscheinlich angesehen werden (Abb. 45).

Anhand der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Studien wurde ein Siderophor-Biosyntheseweg für *Pch* erstellt, welcher der nachfolgenden Abbildung 45 zu entnehmen ist.

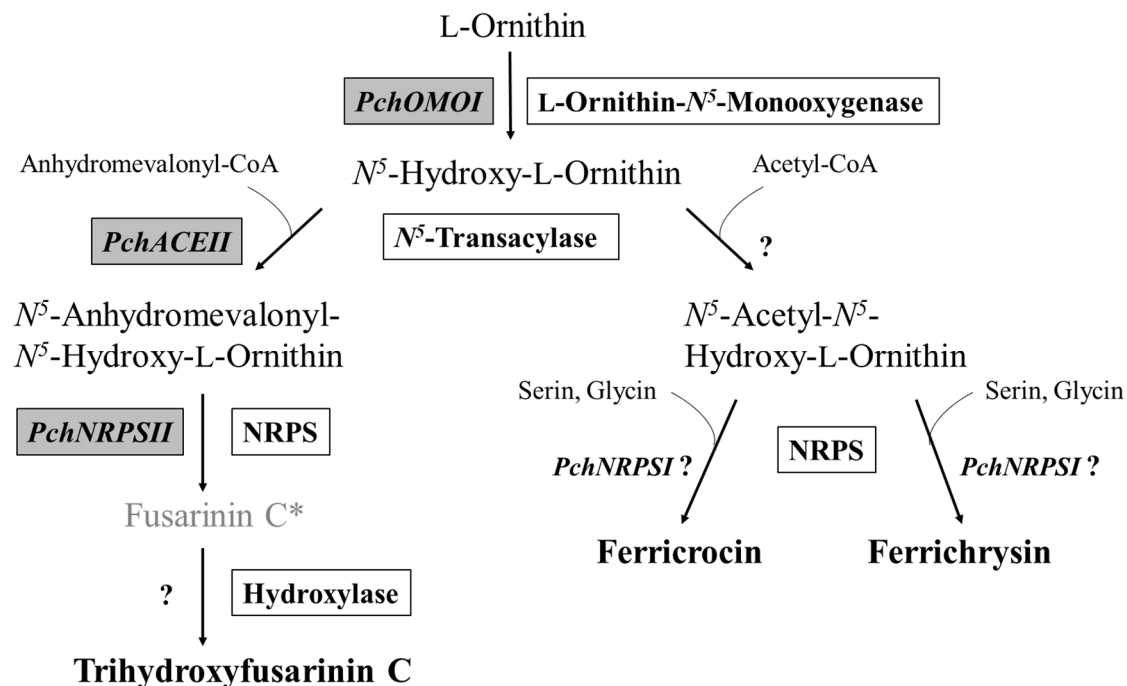


Abbildung 45: Postulierter Siderophor-Biosyntheseweg in *Phaeomonella chlamydospora*. Identifizierte Gene, welche in der Siderophor-Biosynthese von *Pch* involviert sind, wurden schematisch schwarz umrandet in grauem Hintergrund farblich hervorgehoben. Enzyme, die an der Siderophor-Biosynthese beteiligt sind, wurden dagegen ausschließlich schwarz umrandet markiert (Modifiziert nach Blatzer *et al.*, 2011 und Haas *et al.*, 2008). *: bisher nicht in *Pch* detektiert.

4.2.2 Siderophor-Biosyntheseweg in *Phaeoacremonium minimum*

Im Gegensatz zu *Pch* wurde für *Pmi* nur ein Gen (*PmiOMO*), welches putativ für eine L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase kodiert, detektiert (3.3.2.1). Für *Pmiomop* wurde eine signifikante Homologie zu dem bereits beschriebenen Enzym *Omo1p* (S: 74 %) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007) festgestellt (3.3.2.1, Tab. 23). Dieses kodiert für die L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase, welche den ersten Schritt der Siderophor-Biosynthese in *M. oryzae* katalysiert (Hof *et al.*, 2007; Schrettl *et al.*, 2004; Baltussen *et al.*, 2018). Anhand der erfolgreichen Disruption von *PmiOMO* sowie der anschließenden Analyse der generierten Mutante konnte die Involvierung von *PmiOMO* in der Synthese der detektierten extra- und intrazellulären Siderophore von *Pmi* nachgewiesen werden (3.3.2.1.2). Die Siderophor-Produktion kam im Vergleich zum Wildtyp in $\Delta Pmiomo$ vollständig zum Erliegen. Darüber hinaus wurden auch für *Pmiomop* drei putative charakteristische Bindedomänen (FAD-, NADP- und Substratbindedomäne) festgestellt (7.8.2), welche für ω -Aminosäure-Hydroxylasen spezifisch sind (Stehr *et al.*, 1998). Die putative FAD-Bindedomäne mit dem Motiv GXGXXG ist an Position 107 - 112 lokalisiert, wobei das erste Glycin durch ein Alanin und das letzte durch ein Prolin ausgetauscht ist. Der zuletzt genannte Glycin-Austausch ist, wie bereits für *Pchomolp* beschrieben (4.2.1), ein charakteristisches Merkmal der Hydroxylasen, welche an der Biosynthese von Siderophoren beteiligt sind (Eisendle *et al.*, 2003). Die putative NADP-Bindedomäne GXGXX(G/A) ist an Position 152 - 157 lokalisiert und die putative Substratbindedomäne D(X)₃(L/F)ATGY(X)₄(H/P) wurde an Position 316 - 329 detektiert. Auch hierbei konnte an der letzten Aminosäureposition ein Austausch von Prolin durch ein Histidin festgestellt werden, welcher häufig bei der Aminosäuresequenz für L-Ornithin- N^5 -Monooxygenasen wie beispielsweise für *SidAp* aus *A. fumigatus*, *Sid1p* aus *U. maydis* oder *PvdAp* aus *Burkholderia cepacia* vorzufinden ist (Hissen *et al.*, 2005). Anhand dieser Ergebnisse kann daraus geschlossen werden, dass *PmiOMO* für die L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase kodiert, die den ersten Biosyntheseschritt der Siderophore in *Pmi* katalysiert (Abb. 46).

Im weiteren Verlauf der Siderophor-Biosynthese in Pilzen wird N^5 -Hydroxy-L-Ornithin zu N^5 -Acyl- N^5 -Hydroxy-L-Ornithin durch eine N^5 -Acylase acyliert (Renshaw *et al.*, 2002; Haas, 2003). Für *Pmi* konnte mittels Homologievergleich ein Gen (*PmiACE*), welches putativ für eine Acyltransferase kodiert, identifiziert werden (3.3.2.2). Anhand der zielgerichteten Disruption und anschließenden Analyse der generierten Mutante konnte eine Involvierung von *PmiACE* in der Siderophor-Biosynthese von Triacetylfulvarin C festgestellt werden (3.3.2.2.2). Im Gegensatz zum Wildtyp wurde für $\Delta Pmiace$ keine Produktion von

Triacetylfusarinin C detektiert. Die Produktion des extrazellulären Siderophors Coprogen B und des intrazellulären Siderophors Ferricrocin wurde dagegen weiterhin vorgefunden. Für *Pmiacep* wurde eine signifikante Homologie zu SidGp (S: 70 %) aus *A. fumigatus* (Blatzer *et al.*, 2011) festgestellt (3.3.2.2, Tab. 24). *SIDG* kodiert für eine Fusarinin C-Acetyl-CoenzymA- N^2 -Transacetylase, welche in *A. fumigatus* die dreifache N^2 -Acetylierung von Fusarinin C zu Triacetylfusarinin C katalysiert (Schrettl *et al.*, 2007). Orthologe wurden bisher nur in Spezies wie *Aspergillus*, *Fusarium* und *Nectria* gefunden, die jeweils fähig sind Triacetylfusarinin C zu produzieren (Haas, 2014). Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass *Pmiacep* nicht den zweiten Syntheseschritt der Siderophore in *Pmi* katalysiert, sondern als N^2 -Transacetylase in der dreifachen N^2 -Acetylierung von Fusarinin C zu Triacetylfusarinin C involviert ist (Abb. 46). Allerdings konnte bisher die Vorstufe von Triacetylfusarinin C, Fusarinin C, nicht in Extrakten von *Pmi* detektiert werden. Anhand von weiteren Analysen zur Identifizierung von Homologen der N^5 -Acylase in *Pmi* wurden zwei zusätzliche Gene *PmiACEI* (ID 8311, scaffold 610:469451-470995 bp) und *PmiACEII* (ID 149, scaffold 149:315188-316513 bp), welche putativ jeweils für eine Acylase kodieren, festgestellt. Jedoch sind diese nicht auf den beschriebenen Gencluster von *Pmi* lokalisiert. Für beide wurden Homologien zu SidFp (*PmiaceIp* S: 44 %; *PmiaceIip* S: 63 %) und SidLp (*PmiaceIp* S: 61 %; *PmiaceIip* S: 46 %) aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007; Blatzer *et al.*, 2011) ermittelt. *SIDF* kodiert für eine N^5 -Hydroxyornithin:Anhydromevalonyl-CoenzymA- N^5 -Transacylase, welche den zweiten Schritt in der Siderophor-Biosynthese des Fusarinin C in *A. fumigatus* katalysiert (Schrettl *et al.*, 2007). Für *SIDL*, welches für eine N^5 -Hydroxyornithin:Acetyl-CoenzymA- N^5 -transacylase kodiert, wurde hingegen die Involvierung des zweiten Syntheseschritts von Ferricrocin beschrieben (Blatzer *et al.*, 2011). Anhand der hohen Similaritätswerte zu SidLp könnte eine Involvierung von *PmiaceIp* in der Ferricrocin-Synthese in *Pmi* in Betracht gezogen werden (Abb. 46). Da sowohl Triacetylfusarinin C als auch Coprogen B, deren Produktion für *Pmi* festgestellt wurde (3.1.1.2.1), in ihrer chemischen Struktur Anhydromevalonyl enthalten (Haas *et al.*, 2008) und zudem eine signifikante Similarität von *PmiaceIip* zur Acylase SidFp (N^5 -Hydroxyornithin:Anhydromevalonyl-CoenzymA- N^5 -Transacylase) festgestellt wurde, ist des Weiteren eine Involvierung von *PmiaceIip* in der Siderophor-Biosynthese der beiden extrazellulären Siderophore in *Pmi* denkbar (Abb. 46). Um letztlich Aufschluss darüber zu erlangen, sollten allerdings zukünftig in weiteren Untersuchungen zielgerichtete Geninaktivierungen von *PmiACEI* und *PmiACEII* durchgeführt und die generierten „*loss-of-function*“-Mutanten im Hinblick darüber analysiert werden.

Die Verknüpfung von synthetisierten Hydroxamat-Einheiten miteinander oder mit weiteren Aminosäuren über Peptid- und/ oder Esterbindungen zu vollständigen Siderophoren erfolgt in Pilzen über nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) (Haas, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden zwar zwei putative NRPS-Gene (*PmiNRPSI* und *PmiNRPSII*) für *Pmi* identifiziert, allerdings konnte die zielgerichtete Disruption von diesen nicht durchgeführt werden (3.3.2.3). Für *PminrpsIp* wurden signifikante Homologien zu bereits bekannten NRPS, wie beispielsweise *Ssm1p* (S: 64 %) aus *M. oryzae*, die an der Synthese von Ferricrocin beteiligt sind (Oide *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2007), festgestellt (7.7.1.2, Tab. 36). Auch wurde *PmiOMO downstream* von *PmiNRPSI* geclustert im Genom von *Pmi* detektiert (3.3.2, Abb. 34, 1), weshalb eine Involvierung von *PmiNRPSI* in der Siderophor-Biosynthese des detektierten Ferricrocins in *Pmi* nicht auszuschließen ist (Abb. 46), da häufig Siderophor-Biosynthesegene in Gencluster organisiert sind (Blatzer *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurde eine vollständige Übereinstimmung der modularen Organisationsvorhersage für *PminrpsIp* (ATC-ATC-TCA-TC-TC-TC) gegenüber der Domänenstruktur von *Ssm1p* (ATC-ATC-TCA-TC-TC-TC) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007) und *Nps2p* (ATC-ATC-TCA-TC-TC-TC) aus *F. graminearum* (Tobiasen *et al.*, 2007) festgestellt (3.3.2.3). Für *PminrpsIIp* wurden dagegen signifikante Homologien zu *SidDp* (S: 62%) aus *A. fumigatus* und *Nps6p* (S: 80%) aus *F. graminearum* vorgefunden (7.7.1.2, Tab. 36), welche beide an der Synthese von Fusarinin-Siderophore beteiligt sind (Oide *et al.*, 2006; Schrettl *et al.*, 2007). Des Weiteren wurden Homologien zu *Ssm2p* (S: 60%) aus *M. oryzae*, welches als Coprogensynthetase bereits identifiziert worden ist (Hof *et al.*, 2009), ermittelt (7.7.1.2, Tab. 36). Die modulare Organisation von *Ssm2p* (ATC-TC) stimmt im Gegensatz zu der von *SidDp* (ATC-ATC) und *Nps6p* (ATC-ATC) (Haas *et al.*, 2008) mit der ermittelten, putativen Domänenstruktur von *PminrpsIIp* (ATC-TC) vollständig überein (3.3.2.3). Denkbar wäre, dass *PminrpsIIp* die Synthese von Coprogen B katalysieren könnte (Abb. 46). Gezielte Sequenzanalysen zur Identifizierung von weiteren Homologen zu putativen NRPS in *Pmi*, welche in der Synthese von Triacetylfusarinin C involviert sein könnten, führten allerdings zu keinem Ergebnis. Eine zielgerichtete Disruption von *PmiNRPSI* und *PmiNRPSII* in *Pmi* oder eine heterologe Expression dieser in beispielsweise einer $\Delta ssm1$ - bzw. $\Delta ssm2$ -Mutante von *M. oryzae*, in denen die Ferricrocin- bzw. die Coprogen-Synthese zuvor unterbrochen wurde (Hof *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2009), könnten zukünftig zur Klärung der Funktion der beiden Gene in der Siderophor-Biosynthese beitragen.

Anhand den in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Untersuchungen wurde ein Siderophor-Biosyntheseweg für *Pmi* erstellt, welcher der nachfolgenden Abbildung 46 zu entnehmen ist.

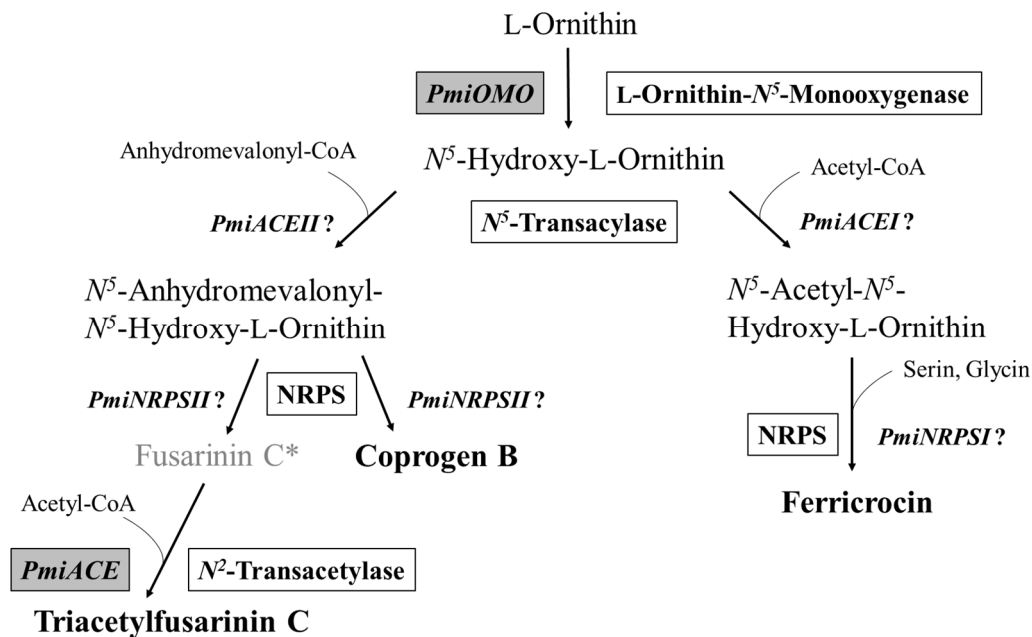


Abbildung 46: Postulierter Siderophor-Biosyntheseweg in *Phaeoacremonium minimum*. Identifizierte Gene, welche in der Siderophor-Biosynthese von *Pmi* involviert sind, wurden schematisch schwarz umrandet in grauem Hintergrund farblich hervorgehoben. Enzyme, die an der Siderophor-Biosynthese beteiligt sind, wurden dagegen ausschließlich schwarz umrandet markiert (Modifiziert nach Blatzer *et al.*, 2011 und Haas *et al.*, 2008). *: bisher nicht in *Pmi* detektiert.

4.2.3 Molekulargenetische Manipulation von *Roesleria subterranea*

Zur Identifizierung der an der Siderophor-Biosynthese beteiligten Gene und Gencluster in *Rsub* wurde das Genom von dem Isolat *IB-Rüd01-16* im Zuge der Arbeit sequenziert (3.4), da bis dato kein Genom von *Rsub* veröffentlicht worden ist. Mit einer Gesamtgröße von 86,8 Mbp ist das Genom von *Rsub* im Vergleich zu Pilzen, welche in die gleiche Klasse der Leotiomyceten wie *Rsub* eingruppiert sind (Kirchmair *et al.*, 2008), verhältnismäßig groß (JGI MycoCosm Portal Version 12.122). Lediglich der Ektomykorrhiza-Pilz *Acephala macrosclerotiorum* zeichnet sich mit einer Gesamtgröße von 73,7 Mbp durch eine vergleichbar hohe Genomgröße aus (Münzenberger *et al.*, 2009). Mittels AntiSMASH- und anschließenden BLAST-Analysen konnte ein putatives Siderophor-Biosynthesecenter identifiziert werden, welches auf dem NODE 443 lokalisiert ist (3.4). Auf diesem wurden zwei Gene, welche für eine putative NRPS bzw. für eine L-Ornithin-N⁵-Monooxygenase kodieren, detektiert. Für die putative L-Ornithin-N⁵-Monooxygenase *Rsubomop* wurde eine Homologie mit einer Similarität von 74 % zu der L-Ornithin-N⁵-Monooxygenase *Omo1p* aus *M. oryzae* detektiert (7.7.1.3, Tab. 37). Darüber hinaus wurde über eine weitere NCBI BLAST-Analyse eine deutliche Homologie zu dem Pilz *Lachnellula hyalina* mit einer Similarität von 76 % in der NCBI-Datenbank festgestellt. *L. hyalina* ist ein saprophytischer Ascomyzet von Nadelhölzern, der wie *Rsub* zur Ordnung der Helotiales gezählt wird (Dharne, 1965; Kirchmair *et al.*, 2008). Allerdings ist über dessen

Siderophor-Metabolismus bisher nichts bekannt. Für die putative NRPS aus *Rsub* konnte neben einer Homologie mit einer Similarität von 57 % zur NRPS Nps2p (7.7.1.3, Tab. 38) aus dem Ascomyzeten *C. heterostrophus*, welche in der Synthese von Ferricrocin involviert ist (Oide *et al.*, 2007), des Weiteren eine signifikante Homologie mit einer Similarität von 73 % zu einer potenziellen Peptidsynthetase der Siderophorfamilie der Ferrichrome aus *L. hyalina* anhand der NCBI-Datenbank festgestellt werden. Ein potenzielles Siderophor-Biosynthesecluster, auf dem eine putative NRPS für die Synthese der in der vorliegenden Arbeit detektierten Coprogene aus *Rsub* (3.1.2) lokalisiert ist, konnte jedoch unter Zuhilfenahme der AntiSMASH-Analyse nicht festgestellt werden.

Zur Überprüfung der Funktion der putativen NRPS- und L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Gene in der Siderophor-Biosynthese von *Rsub* sollten molekularbiologische Methoden der reversen Genetik eingesetzt werden. Da bis dato jedoch kein Transformationssystem für diesen in der Literatur beschrieben worden ist, wurde zunächst versucht eine Transformationsmethode für *Rsub* zu etablieren (3.4). Es wurden diverse Transformationsmethoden, welche auf der Grundlage der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation (ATMT) (Bundock *et al.*, 1995; Groot *et al.*, 1998), Polyethylen Glycol-vermittelten Transformation (Brust, 2005) und Elektroporation von Protoplasten (Bowyer, 2001) basierten, angewandt. Die aufgeführten Methoden zählen zu den am häufig verwendeten Transformationssysteme in filamentösen Pilzen (Ruiz-Díez, 2002; Li *et al.*, 2017). Jedoch konnte trotz diverser Transformationsansätze mit variierenden Parametern im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine erfolgreiche, stabile Transformation von *Rsub* erzielt werden. Denkbar wäre, dass die Sequenz des *trpC*-Promotors der Tryptophan-Biosynthese aus *A. nidulans* (Hamer und Timberlake, 1987), welcher zur Expression des Hygromycin-Resistenzgens in *Rsub* verwendet wurde, in *Rsub* selbst nicht hoch konserviert ist und somit nicht kompatibel für eine Transformation von diesem ist. In weiterführenden Untersuchungen könnte ein Promotor-Austausch mit Sequenzen des pilzeigenen Promotors in *Rsub* für die Expression des Resistenzgens vorgenommen werden, wodurch das Expressionslevel und die Transformationseffizienz gesteigert werden könnte (Bowyer, 2001). Darüber hinaus könnten auch weitere Promotoren eingesetzt werden, wie beispielsweise der *EFAI*-Promotor des Elongationsfaktors 1 α aus dem Translationsprozess (Roger *et al.*, 1999) oder der *gpdA*-Promotor der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus der Glykolyse (El-Enshasy *et al.*, 2001). In *A. fumigatus* konnte beispielsweise mit dem *gpdA*-Promotor eine starke konstitutive Expression von GFP (*green fluorescent protein*) erzielt werden (Wasylnka und Moore, 2002). Darüber hinaus könnten auch weitere

Transformationsmethoden, wie beispielweise die biolistische Transformation oder die CRISPER (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*)/Cas₉ (*CRISPR-related nuclease*)-Genome *Editing*-Methode angewendet werden. Bei der biolistischen Transformation, die auch unter dem Namen Partikelbombardement bekannt ist, wird die Ziel-DNA an der Oberfläche von Wolfram- oder Goldpartikel adsorbiert und unter hohem Druck in die Wirtszelle injiziert (Li *et al.*, 2017). Diese Methode führte bereits zu einer erfolgreichen Transformation von beispielweise *A. nidulans* und *Cercospora caricis* (Herzog *et al.*, 1996; Aly *et al.*, 2001). Durch die CRISPER/Cas₉-Methode, die bereits für über 40 verschiedene Arten filamentöser Pilze und Oomyzeten etabliert worden ist, können hingegen gezielte genomische Modifizierungen, wie Gen-Disruptionen, Gen-Austausch oder gezielte Sequenzeditierungen, vorgenommen werden (Schuster und Kahmann, 2019).

Mit einer geeigneten Transformationsmethode könnte zukünftig der Biosynthesewege der Siderophore in *Rsub* näher analysiert werden, um die Funktion einzelner involvierter Gene charakterisieren und letztlich einen möglichen Einfluss der Siderophor-Biosynthese auf die Virulenz des Pilzes durch Generierung von „*loss-of-function*“-Mutanten überprüfen zu können. Durch die etablierte Methode zur Ascosporeninduktion von *Rsub*, um eine permanente, sterile Sporenquelle unter Laborbedingungen zu erhalten (Hackmer, 2017), und der Sequenzierung des Genoms sind nun Voraussetzungen gegeben worden, mit diesen weiterführende Transformationsversuche mit *Rsub* zukünftig erfolgen können.

4.3 Einfluss der Siderophor-Biosynthese auf die Vitalität und Virulenz der Esca-assoziierten Pilze

In vielen mikrobiellen Infektionsprozessen spielt der Wettbewerb um Eisen zwischen Wirt und Pathogen eine große Rolle (Weinberg, 1999). Einige pathogene Mikroorganismen produzieren hierfür Siderophore, die dem Wirt aber auch anderen konkurrierenden Organismen Eisen entziehen können und dadurch sich selbst unter eisenlimitierenden Bedingungen die Eisenakquirierung ermöglichen (Caza und Kronstad, 2013). In mehreren Studien konnte demonstriert werden, dass die Siderophor-Produktion von bakteriellen und pilzlichen Pathogenen essenziell für dessen Vitalität und Virulenz ist. Beispielsweise produziert das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*, welches schwerwiegende Lungenerkrankungen am Menschen verursachen kann, die Siderophore Pyoverdin und Pyochelin. Mutanten, die nicht mehr fähig waren, diese Siderophore zu produzieren, konnten keine Infektion im Mausmodellsystem auslösen (Cornelis und Dingemans, 2013).

4.3.1 Die Siderophor-Biosynthese ist nicht essenziell für die Konidiogenese und Resistenz gegenüber oxidativem Stress von *Phaeoaniella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum*

In Studien von Schrettl *et al.* (2004) und Hissen *et al.* (2005) wurde gezeigt, dass die Siderophor-Biosynthese in *A. fumigatus*, der die invasive Aspergillose in immunsupprimierten Menschen auslösen kann, ebenfalls entscheidend für dessen Virulenz und Vitalität ist (Schrettl *et al.*, 2004; Hissen *et al.*, 2005). Die Deletionsmutante $\Delta sidA$, in der die Siderophor-Biosynthese aufgrund der Inaktivierung der L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase unterbrochen worden ist, wurde im Mausmodellsystem avirulent und war nicht mehr fähig von Transferrin gebundenes Eisen aus menschlichem Blutserum zu akquirieren. Sowohl das Wachstum als auch die Konidienproduktion der Mutante war im Vergleich zum Wildtyp unter Kultivierungsbedingungen mit geringer Eisenverfügbarkeit deutlich reduziert. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass das intrazelluläre Siderophor Ferricrocin für die Konidienproduktion und -keimung in *A. fumigatus* essenziell ist und auch für die Resistenz gegenüber intrazellulärem, oxidativem Stress benötigt wird (Schrettl *et al.*, 2007). Da eine intrazelluläre Akkumulation von freiem Eisen, das Potenzial hat durch die Haber-Weiss/Fenton-Reaktion die Produktion von zytotoxischen reaktiven Sauerstoffspezies zu katalysieren (Halliwell und Gutteridge, 1992), ist die Fähigkeit für Pilze auf zellulären, oxidativen Stress zu reagieren ein essenzieller Prozess sich vor Eisen-Toxizität zu schützen (Howard, 1999). Während der Haber-Weiss/Fenton-Reaktion wird im ersten Schritt Dioxid(1-) zu Sauerstoff oxidiert und der Katalysator Eisen(III) zu Eisen(II) reduziert. Im zweiten Schritt wird Wasserstoffperoxid in Hydroxylradikale und Hydroxid-Ionen aufgespalten und Eisen(II) zu Eisen(III) oxidiert (Halliwell und Gutteridge, 1992). Die dabei entstandenen Hydroxylradikale können unter anderem schwerwiegende DNA-Schäden und Lipid-Peroxidationen verursachen (Halliwell und Gutteridge, 1984). In Studien von Hof *et al.* (2009) wurde ebenfalls ein stark reduziertes Wachstum, eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress und ein Verlust der Konidienproduktion der zu *SIDA*-orthologen „*loss-of-function*“-Mutante $\Delta omol$ von *M. oryzae* dokumentiert (Hof *et al.*, 2009).

Für die „*loss-of-function*“-Mutanten der putativen L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase aus *Pch* ($\Delta Pchomol$) und *Pmi* ($\Delta Pmiomo$) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Produktionsverlust der intra- und extrazellulären Siderophore (3.3.1.1.2, 3.3.2.1.2) und auch eine Reduzierung des vegetativen Wachstums im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp unter Eisenmangel-Kultivierungsbedingungen festgestellt werden (3.3.1.4.3, 3.3.2.4.3). Allerdings wurde im Gegensatz zu den Mutanten $\Delta sidA$ und $\Delta omol$ weder ein signifikanter Einfluss des

Siderophor-Produktionsverlustes auf die Konidienproduktion (3.3.1.4.1, 3.3.2.4.1) noch auf die Sensitivität gegenüber oxidativem Stress (3.3.1.4.2, 3.3.2.4.2) von $\Delta PchomI$ oder $\Delta Pmiomo$ im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Daher kann angenommen werden, dass die Siderophor-Produktion zwar das vegetative Wachstum von *Pch* und *Pmi* unter eisenlimitierenden Kultivierungsbedingungen verbessert, jedoch für die Reproduktion der beiden Pilze nicht essenziell ist. Dies konnte auch für die generierten „loss-of-function“-Mutanten $\Delta PchnrpsII$ und $\Delta PchaceII$, die nicht mehr fähig waren das extrazelluläre Siderophor Trihydroxyfusarinin C zu produzieren (3.3.1.3.2) sowie für $\Delta Pmiace$, dessen Triacetylfusarinin C-Produktion nicht mehr detektiert werden konnte (3.3.1.2.2), festgestellt werden. Weder die Konidienproduktion noch die Sensitivität gegenüber oxidativem Stress der Mutanten wurden im Vergleich zum Wildtyp durch die Inaktivierung der jeweiligen Gene signifikant beeinflusst. Allerdings wurde im Gegensatz zu $\Delta PchomI$ keine Reduzierung des vegetativen Wachstums von $\Delta PchnrpsII$ und $\Delta PchaceII$ unter eisenlimitierenden Kultivierungsbedingungen beobachtet, weshalb vermutet werden kann, dass das im Kulturfiltratextrakt detektierte Ferrichrysin der beiden Mutanten zur Eisenakquirierung weiterhin sekretiert werden könnte und dadurch diesen ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstumsverhalten ermöglicht. Das vegetative Wachstum von $\Delta Pmiace$ war unter Eisenmangelbedingungen dagegen in etwa vergleichbar zu dem Wachstumsverhalten von $\Delta Pmiomo$. Hierbei könnte vermutet werden, dass die extrazelluläre Eisenaufnahme durch Coprogen B, dessen Produktion in der Mutante weiterhin festgestellt werden konnte (3.3.2.2.2), den Verlust der Triacetylfusarinin C-Produktion und die damit verbundene reduzierte Eisenaufnahme nicht kompensieren konnte. Um dies final jedoch zu bestätigen, sollten zielgerichtete Disruptionen von *PmiNRPSI* und *PmiNRPSII* in *Pmi* zukünftig erfolgen und die generierten Mutanten im Hinblick darauf charakterisiert werden.

4.3.2 Kein Einfluss der Siderophor-Produktion von *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum* auf Interaktionen zwischen den Esca-assoziierten Pilzen

Esca ist eine komplexe Krankheit mit einer Vielzahl von Syndromen, die mit unterschiedlichen phytopathogenen Pilzen assoziiert werden (Mugnai *et al.*, 1999; Bertsch *et al.*, 2013). Diese Pilze können sowohl aus symptomatischen als auch asymptomatischen Weinreben isoliert werden (Hofstetter *et al.*, 2012). Jedoch ist bis heute noch nicht geklärt, inwiefern eine physiologische Veränderung in der Interaktion zwischen den kolonisierenden Pilzen untereinander sowie zwischen diesen und dem Wirt im Krankheitsverlauf eine Rolle spielen. Lediglich gaben Studien von Bruez *et al.* (2014) Hinweise darauf, dass eine Änderung in der Zusammensetzung der Pilzgemeinschaft innerhalb der Weinrebe im Zusammenhang mit der

Pflanzenphysiologie und somit auch auf das Nährstoffangebot stehen könne, welche darüber hinaus durch Umweltfaktoren beeinflusst werden (Bruez *et al.*, 2014). Von vielen Pilzen werden Siderophore produziert und sekretiert, um unter eisenlimitierenden Bedingungen die biologische Eisenverfügbarkeit gegenüber konkurrierenden Organismen für sich selbst zu steigern (Howard, 1999; Haas, 2003). Aufgrund dessen wurden die Interaktionen zwischen den Esca-assoziierten Pilzen unter Eisenmangel Bedingungen untersucht. Die Kokultivierungsstudien (3.3.1.4.4; 3.3.2.4.4), in denen der Einfluss der Siderophor-Produktion auf das Wachstumsverhalten zwischen den Esca-assoziierten Pilzen untereinander unter Laborbedingungen analysiert wurde, konnten keinen Hinweis darauf geben, dass die „*loss-of-function*“-Mutanten von *Pch* oder *Pmi*, in denen die Siderophor-vermittelte Eisenakquirierung zum Erliegen kam, ein Wachstumsnachteil im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp gegenüber eines der Esca-assoziierten Pilze hatten. Es konnte kein deutlich reduziertes Myzelflächenwachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Die Interaktionen der „*loss-of-function*“-Mutanten zu dem jeweiligen Antagonisten in den Kokultivierungsstudien waren sowohl auf eisensupplementierten Festmedium als auch unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen in etwa vergleichbar zu denen des jeweiligen Wildtypen. Es konnten zudem keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp bezüglich der dunklen Pigmentierung, welche im Konfrontationsbereich zwischen diesen und *Fmed* zu beobachten war und auf eine erhöhte Enzymaktivität von Phenoxidasen und Peroxidasen hinweist (Bruno und Sparapano, 2006), festgestellt werden. Somit kann angenommen, dass die Siderophor-Produktion auf die Interaktionen zwischen den genannten Esca-assoziierten Pilzen zumindest unter Laborbedingungen keinen Einfluss hat. Allerdings ist das pilzliche Microbicota innerhalb der Wirtspflanze nicht nur auf die aufgeführten Pilze zurückzuführen, sondern können nach Del Frari *et al.* auf bis zu 289 Pilz-Taxa und nach Bruez *et al.* sogar auf 515 verschiedene pilzliche und 403 verschiedene bakterielle sogenannte OTUs (*operational taxonomic units*) erweitert werden (Del Frari *et al.*, 2019; Bruez *et al.*, 2020), welche in Wechselbeziehungen untereinander stehen können. In Studien von Bruez *et al.* wird sogar vermutet, dass die Zusammensetzung der Microbiota in Kordonen von jungen Reben entscheidend für das „Ausbrechen“ der komplexen Esca-Krankheit ist (Bruez *et al.*, 2020). Aufgrund dessen wäre es denkbar, zukünftig auch Interaktionsstudien zwischen den generierten „*loss-of-function*“-Mutanten bzw. dem jeweiligen Wildtyp und weiteren Pilzen, welche mit der Krankheit Esca in Verbindung stehen, vorzunehmen.

4.3.3 Kein Einfluss der Siderophor-Produktion von *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum* auf die frühe Entwicklungsphase der Weinrebe

Neben dem bestätigten Einfluss der Siderophor-Produktion auf die Virulenz von *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2004) wurden auch in Studien von Oide *et al.* (2006) eine Reduzierung der Virulenz von den Pilzen *Cochliobolus miyabeanus* (Phytopathogen der Reispflanze), *F. graminearum* (Phytopathogen der Weizenpflanze) und *A. brassicicola* (Phytopathogen der Acker-Schmalwandpflanze) gegenüber der Wirtspflanze aufgrund der Disruption des Gens *nps6*, welches für die Biosynthese von extrazellulären Siderophoren in den einzelnen Pathogenen essenziell ist, in den jeweiligen Pilzen nachgewiesen (Oide *et al.*, 2006). Da die Weinrebenkrankheit Esca sich durch eine lange Latenzzeit von oft mehreren Jahren zwischen der Holz-Kolonisierung der Esca-assoziierten Pilze bis hin zu den sichtbaren, charakteristischen äußeren Symptomen an der Pflanze auszeichnet (Mugnai *et al.*, 1999; Surico *et al.*, 2000; Calzarano *et al.*, 2018), war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich die generierten „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pch* und *Pmi* innerhalb von langfristigen Feldstudien zu analysieren. Stattdessen wurde in ersten Infektionsstudien das Wachstumsverhalten von Einaugenstecklingen der Weinrebe nach Inokulation der zu untersuchenden Mutanten und dem jeweiligen Wildtyp untersucht (3.3.3). Studien mit Einaugenstecklingen haben den Vorteil, dass eine hohe Reproduktionsanzahl innerhalb eines kurzen Versuchszeitrahmes mit kontrollierten abiotischen Umweltfaktoren durchgeführt werden können. Dies ermöglicht eine direkte Beobachtung der Auswirkung des Inokulums auf das Wachstumsverhalten der Wirtspflanze. Innerhalb der durchgeführten Untersuchungen konnte allerdings im Rahmen der Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen den Mutanten und dem Wildtyp hinsichtlich deren Einfluss auf die Vitalität des Stecklings beobachtet werden. Weder die Blatt- noch die Wurzelentwicklung wurden negativ durch die Pilzinokulation tangiert. Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass die Siderophor-Biosynthese von *Pch* und *Pmi* im Einzelnen keinen Einfluss auf die frühe Entwicklungsphase einer Weinrebe hat, da weder Krankheitssymptome noch Wachstumsdefizite der Stecklinge festzustellen waren. Allerdings wird in diesem Testsystem eine gegenseitige Beeinflussung im Wachstumsverhalten der Esca-assoziierten Pilze sowie der Einfluss von zusätzlichen Stressfaktoren, welche beispielsweise das Nährstoffangebot oder die Wachstumstemperatur betreffen, nicht berücksichtigt. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass zunächst eine asymptomatische Kolonisierung der Esca-assoziierten Pilzen von der Weinrebe mit einer latenten Infektion erfolgt und ein invasives Verhalten durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden können (Hofstetter *et al.*, 2012; Fischer und Peigham

Ashnaei, 2019). Hierbei deuten mehrere Studien darauf hin, dass die Interaktionen innerhalb der Esca-assoziierten Pilzen, die Rebenphysiologie und die Umwelt das Verhalten jedes einzelnen Pilzes beeinflussen können (Bruno und Sparapano, 2006; Graniti *et al.*, 2000; Claverie *et al.*, 2020). Auch die Mikroflora soll hierbei eine Rolle spielen (Bruez *et al.*, 2014). In weiterführenden Untersuchungen könnten die Versuchsparameter dahingehend angepasst werden, indem zum einen eine Ko-Inokulation von mehreren Esca-assoziierten Pilzen erfolgen könnte und zum anderen künstliche Stressfaktoren, wie beispielweise ein induzierter Eisenmangel des Weinrebenstecklings, herbeigeführt werden. Hierfür sollte des Weiteren die Versuchsdauer auf einen längeren Zeitrahmen ausgedehnt werden. Um jedoch die Involvierung der generierten „*loss-of-function*“-Mutanten auch im Hinblick auf die Virulenz und Pathogenität der Esca-assoziierten Pilze gegenüber einer ausgewachsenen Weinrebenpflanze zu analysieren, ist die zukünftige Durchführung von langfristigen Feldstudien, die sowohl die abiotischen als auch biotischen Umweltfaktoren umfassend berücksichtigen, unabdingbar.

5 Ausblick

Für viele Pilze ist die Siderophor-Biosynthese ein essenzieller zellulärer Prozess, der die biologische Eisenverfügbarkeit unter eisenlimitierenden Umweltbedingungen für den Organismus steigert und intrazellulär die Eisenhomöostase sorgfältig reguliert. Mit den gewonnenen Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit konnte eine Grundlage zur Erforschung des Siderophoren-Metabolismus sowohl in den Esca-assoziierten Pilzen als auch in dem Wurzelfäule-assoziierten Pilz *Roesleria subterranea* gegeben werden.

Hierbei konnten für die Pilze *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) und *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*) sowohl intra- als auch extrazelluläre Siderophore identifiziert werden. Für *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) und *Eutypa lata* (*Ela*) wurden zwar verschiedene Siderophore der Coprogen-Familie nachgewiesen, jedoch war es im Rahmen der Arbeit nicht möglich die Identifizierung einzelner putativ, detektierten Siderophore final zu verifizieren. Daher sollte weiterhin versucht werden, die genannten, putativen Siderophore zu isolieren, um eine Strukturaufklärung von diesen durchführen zu können. Sowohl für *Pch* als auch für *Pmi* konnten Siderophor-Biosynthesegencluster identifiziert werden, von denen die Involvierung der Gene *PchOMOI*, *PchNRPSII* und *PchACEII* für *Pch* und *PmiOMO* und *PmiACE* für *Pmi* in der Siderophor-Biosynthese über zielgerichtete Geninaktivierungsexperimente in dem jeweiligen Pilz bestätigt wurde. In weiterführenden Studien sollte auch die Funktion der detektierten, putativen Siderophor-Biosynthesegene *PchNRPSI* und *PchNRPSII* aus *Pch* und *PmiNRPSI*, *PmiNRPII*, *PmiACEI* und *PmiACEII* aus *Pmi* analysiert werden, um den Siderophor-Biosyntheseweg der beiden Pilze weiter aufzuklären. Anhand der generierten Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Siderophor-Produktion nicht essenziell für die Vitalität, die Konidiogenese und der Sensitivität gegenüber oxidativem Stress von *Pch* und *Pmi* ist. Durch die Etablierung des Weinrebenstecklingsversuch konnte ein biologisches Testsystem gefunden werden, in welchem zukünftig weitere Fragestellungen bezüglich der Interaktionen zwischen den Esca-assoziierten Pilzen und der Wirtspflanze nachgegangen werden können. Hierbei könnten Ko-Inokulationen von mehreren Esca-assoziierten Pilzen erfolgen und zum anderen künstliche Stressfaktoren, wie beispielweise ein induzierter Eisenmangel des Weinrebenstecklings, herbeigeführt werden. Um den Einfluss der Siderophor-Produktion im Hinblick auf die Virulenz und Pathogenität der Esca-assoziierten Pilze gegenüber einer ausgewachsenen Weinrebenpflanze zu analysieren, sollten jedoch mehrjährige Feldstudien im Weinberg mit den generierten „*loss-of-function*“-Mutanten durchgeführt werden, um die lange Latenzzeit der Esca-Krankheit zu berücksichtigen.

Für *Rsub* wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit erstmalig die Siderophor-Produktion von verschiedenen Coprogen-Derivaten nachgewiesen. Jedoch war es im Rahmen der Arbeit nicht möglich von allen putativ, detektierten Siderophoren die Identifizierung final abzuschließen. Daher sollte weiterhin versucht werden, diese aus den Extrakten zu isolieren, um die chemische Struktur aufzuklären. Darüber hinaus wurden anhand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit betreuten und durchgeführten Studien Fortschritte in der Etablierung eines Transformationssystems zur zielgerichteten Mutagenese erlangt, die zukünftig weiterverfolgt werden sollten. Hierbei konnten geeignete Parameter zur kontinuierlichen Sporenproduktion unter Laborbedingungen definiert werden, die eine valide Verwendung von Sporen als Transformationsausgangsmaterial von *Rsub* gewährleisten. Nachdem das Genom von dem Isolat *IB-Rüd01-16* vollständig sequenziert wurde, ist es nun möglich in weiterführenden Versuchen ein Promotor-Austausch in *Rusb* mit Sequenzen des pilzeigenen Promotors für die Expression des Resistenzgens vorzunehmen, wodurch das Expressionslevel und die Transformationseffizienz gesteigert werden könnten. Darüber hinaus wurde eine erste *in silico* Clusteranalyse durchgeführt, mit welcher ein potenzielles Siderophor-Biosynthesecluster identifiziert werden konnte, das als Grundlage zur Aufklärung des Siderophor-Metabolismus in *Rusb* auf molekulargenetischer Ebene verwendet werden könnte. Sollte nach weiterer Versuchsoptimierung die ATMT oder PEG-vermittelte Transformation mit dem Isolat *IB-Rüd01-16* nicht standardisiert anzuwenden sein, könnten auch Transformationsexperimente mit weiteren *Rsub*-Isolaten durchgeführt werden, da im Zuge dieser Arbeit auch von diesen die Siderophor-Produktion von verschiedenen Coprogen-Derivaten festgestellt werden konnte.

Die bisherigen Ergebnisse zur Siderophor-Biosynthese der Weinrebenpathogene ergeben somit eine solide Basis um versierte, weiterführende Untersuchungen zum Siderophor-vermittelten Eisenaufnahmesystem der aufgeführten Pilze zukünftig durchführen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Abou-Elaid, H., El-Naggar, M.A., Abdel-Kareem, F., El-Deeb, H.M., El-Shahawy, I.E. (2014): Field application with biocontrol agents for controlling root-rot disease of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Middle East Journal of Agriculture Research* 3 (4), S. 775 – 781.
- Abou-Mansour, E., Couché, E., Tabacchi, R. (2004): Do Fungal Naphthalenones Have a Role in the Development of Esca Symptoms? *Phytopathologia Mediterranea* 43 (1), S. 75 – 82.
- Abou-Mansour, E., Polier, J., Pezet, R., Tabacchi, R. (2009): Purification and partial characterisation of a 60 KDa laccase from *Fomitiporia mediterranea*. *Phytopathologia Mediterranea* 48 (3), S. 447 – 453.
- Adalat, K., Whiting, C., Rooney, S., Gubler, W.D. (2000): Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. *Phytopathologia Mediterranea* 39 (1), S. 92 – 99.
- Agustí-Brisach, C., León, M., García-Jiménez, J., Armengol, J. (2015): Detection of grapevine fungal trunk pathogens on pruning shears and evaluation of their potential for spread of infection. *Plant Disease* 99 (7), S. 976 – 981.
- Ahmed, E., Holmström, S.J.M. (2014): Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology* 7 (3), S. 196 – 208.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3), S. 403 – 410.
- Aly, R., Halpern, N., Rubin, B., Dor, E., Golan, S., Hershenhorn, J. (2001): Biolistic transformation of *Cercospora caricis* a specific pathogenic fungus of *Cyperus rotundus*. *Mycological Research* 105 (2), S. 150 – 152.
- Amborabé, B.-E., Fleurat-Lessard, P., Bonmort, J., Roustan, J.-P., 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), S. 51 – 58.
- Amborabé, B.-E., Octave, S., Roblin, G. (2005): Influence of temperature and nutritional requirements for mycelial growth of *Eutypa lata*, a vineyard pathogenic fungus. *Comptes Rendus Biologies* 328 (3), S. 263 – 270.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., Evidente, A. (2011): Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* 3 (12), S. 1569 – 1605.
- Anke, H., Kinn, J., Bergquist, K.-E., Sterner, O. (1991): Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. *Biology of Metals* 4, S. 176 – 180.
- Antelo, L., Hof, C., Welzel, K., Eisfeld, K., Sterner, O., Anke, H. (2006): Siderophores produced by *Magnaporthe grisea* in the presence and absence of iron. *Zeitschrift für Naturforschung* 61, S. 461 – 464.
- Antonielli, L., Compant, S., Strauss, J., Sessitsch, A., Berger, H. (2014): Draft genome sequence of *Phaeomoniella chlamydospora* strain RR-HG1, a grapevine trunk disease (esca)-related member of the ascomycota. *Genome Announcements* 2 (2), S. 1 – 2.
- Armengol, Josep, Vicent, Antonio, Torné, Laura, García-Figueroles, Francesc, García-Jiménez, José (2001): Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (3), S. 325 – 329.
- Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Muñoz, D., Nuñez, C., Arce-Johnson, P. (2016): Grapevine pathogenic microorganisms: understanding infection strategies and host response scenarios. *Frontiers in Plant Science* 7 (382), S. 1 – 18.
- Aroca, A., Raposo, R. (2009): Pathogenicity of *Phaeoacremonium* species on grapevines. *Journal of Phytopathology* 157, S. 413 – 419.
- Aron, A., Petras, D., Schmid, R., Gauglitz, J., Büttel, I., Antelo, L. et al. (2019a): Native Electrospray-based Metabolomics Enables the Detection of Metal-binding Compounds.
- Aron, A., Gentry, E., McPhail, K., Nothias, L., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A. et al. (2019b): Reproducible Molecular Networking Of Untargeted Mass Spectrometry Data Using GNPS.
- Bachmann, O., Kemper, B., Musso, H. (1986): The green pigment from the fungus *Roesleria hypogea*. *Liebigs Annalen der Chemie*, S. 305 – 309.
- Baltussen, T.J.H., Coolen, J.P.M., Zoll, J., Verweij, P.E., Melchers, W.J.G. (2018): Gene co-expression analysis identifies gene clusters associated with isotropic and polarized growth in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Fungal Genetics and Biology* 116, S. 62 – 72.
- Barton, L.L., Hemming, B.C. (1993): Iron chelation in plants and soil microorganisms, S. 3 – 26.

- Beckwith, A.M. (1924): The life history of the grape rootrot fungus *Roesleria hypogaea* Thüm. et pass. *Journal of Agricultural Research* (27), 609-618.
- Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Bujard, A., Azzollini, A., Monod, M., Gindro, K., Wolfender, J.-L. (2013): Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Journal of Chromatography A* 1292, S. 219 – 228.
- Bertsch, C., Ramirez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C., Fontaine, F. (2013): Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62 (2), S. 243 – 265.
- Bester, M.C., Halleen, F., Mostert, L. (2015): A PCR detection system for South African basidiomycetous isolates from esca affected grapevine. *Australasian Plant Pathology* 44 (6), S. 647 – 651.
- Bjarnholt, N., Li, B., D'Alvise, J., Janfelt, C. (2014): Mass spectrometry imaging of plant metabolites--principles and possibilities. *Natural Product Reports* 31 (6), S. 818 – 837.
- Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P., Cantu, D. (2013b): Draft genome sequence of the ascomycete *Phaeoacremonium aleophilum* strain UCR-PA7, a causal agent of the esca disease complex in grapevines. *Genome Announcements* 1 (3), S. 1 – 2.
- Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P.E., Cantu, D. (2013a): Draft genome sequence of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* UCR-EL1. *Genome Announcements* 1 (3), S. 1 – 2.
- Blatzer, M., Schrettl, M., Sarg, B., Lindner, H.H., Pfaller, K., Haas, H. (2011): SidL, an *Aspergillus fumigatus* transacetylase involved in biosynthesis of the siderophores ferricrocin and hydroxyferricrocin. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (14), S. 4959 – 4966.
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S.Y., Medema, M.H., Weber, T. (2019): antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research* 47 (W1), W81-W87.
- Bohnert, S., Heck, L., Gruber, C., Neumann, H., Distler, U., Tenzer, S., Yemelin, A., Thines, E., Jacob, S. (2019): Fungicide resistance toward fludioxonil conferred by overexpression of the phosphatase gene MoPTP2 in *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology* 111 (3), S. 662 – 677.
- Borie, B., Jacquiot, L., Jamaux-Despréaux, I., Larignon, P., Péros, J.-P. (2002): Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France. *Plant Pathology* 51 (1), S. 85 – 96.
- Bortolami, G., Gambetta, G.A., Delzon, S., Lamarque, L.J., Pouzoulet, J., Badel, E., Burlett, R., Charrier, G., Cochard, H., Dayer, S., Jansen, S., King, A., Lecomte, P., Lens, F., Torres-Ruiz, J.M., Delmas, C.E.L. (2019): Exploring the Hydraulic Failure Hypothesis of Esca Leaf Symptom Formation. *Plant physiology* 181 (3), S. 1163 – 1174.
- Bowyer, P. (2001): DNA-mediated transformation of fungi: Talbot N., editor. *Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi*, Oxford: Oxford University Press.
- Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.-P., Guerin-Dubrana, L., Rey, P. (2014): Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *PLoS One* 9 (5), e95928.
- Bruez, E., Vallance, J., Gautier, A., Laval, V., Compant, S., Maurer, W., Sessitsch, A., Lebrun, M.-H., Rey, P. (2020): Major changes in grapevine wood microbiota are associated with the onset of esca, a devastating trunk disease. *Environmental microbiology* 22 (12), S. 5189 – 5206.
- Bruno, G., Sparapano, L. (2006): Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69 (4-6), S. 182 – 194.
- Bruno, G., Sparapano, L., Graniti, A. (2007): Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: IV. Diffusion through the xylem of metabolites produced by two tracheiphilous fungi in the woody tissue of grapevine leads to esca-like symptoms on leaves and berries. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71 (1-3), S. 106 – 124.
- Brust, D. (2005): Molekulargenetische Untersuchungen der nicht-ribosomalen Peptid-Synthetase-Gene *psol* und *pso3* aus *Omphalotus olearius*.
- Budde, A.D., Leong, S.A. (1989): Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. *Mycopathologia* 108, S. 125 – 133.
- Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., Hooykaas, P.J. (1995): Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 14 (13), S. 3206 – 3214.
- Burt, W.R. (1982): Identification of Coprogen B and Its Breakdown Products from *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity* 35 (4), 990-663.

- Calzarano, F., Osti, F., D'Agostino, V., Pepe, A., Della Pelle, F., Rosso, M. de, Flamini, R., Di Marco, S. (2017): Levels of phytoalexins in vine leaves with different degrees of grapevine leaf stripes disease symptoms (esca complex disease) 56 (3), S. 494 – 501.
- Calzarano, F., Osti, F., Baránek, M., Di Marco, F. (2018): Rainfall and temperature influence expression of foliar symptoms of grapevine leaf stripe disease (esca complex) in vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (3), S. 488 – 505.
- Carroll, C.S., Amankwa, L.N., Pinto, L.J., Fuller, J.D., Moore, M.M. (2016): Detection of a Serum Siderophore by LC-MS/MS as a Potential Biomarker of Invasive Aspergillosis. *PloS One* 11 (3), e0151260.
- Caza, M., Kronstad, J.W. (2013): Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, S. 80.
- Chapuis, L., Richard, L., Dubos, B. (1998): Variation in susceptibility of grapevine pruning wound to infection by *Eutypa lata* in south-western France. *Plant Pathology* 47, S. 463 – 472.
- Charlang, G., NG, B., Horowitz, N.H., Horowitz, R.M. (1981): Cellular and Extracellular Siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and Cellular Biology* 1 (2), S. 94 – 100.
- Cimmino, A., Cinelli, T., Evidente, M., Masi, M., Mugnai, L., Silva, M.A., Michereff, S.J., Surico, G., Evidente, A. (2016): Phytotoxic fungal exopolysaccharides produced by fungi involved in grapevine trunk diseases. *Natural Product Communications* 11 (10), 1481-1485.
- Claverie, M., Notaro, M., Fontaine, F., Wery, J. (2020): Current knowledge on Grapevine Trunk Diseases with complex etiology: a systemic approach. *Phytopathologia Mediterranea* 59 (1), S. 29 – 53.
- Clorat, S., Deswarte, C., Latché, A., Klaébé, A., Bouzayen, M., Fallot, J., 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, S. 544 – 550.
- Cobos, R., Martin, M.T. (2008): Molecular characterisation of *Phaeoconiella chlamydospora* isolated from grapevines in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 47 (1), S. 20 – 27.
- Comensoli, L., Bindschedler, S., Junier, P., Joseph, E. (2017): Iron and fungal physiology: a review of biotechnological opportunities. *Advances in Applied Microbiology* 98, S. 31 – 60.
- Comont, G., Corio-Costet, M.-F., Larignon, P., Delmotte, F. (2010): AFLP markers reveal two genetic groups in the French population of the grapevine fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydospora*. *European Journal of Plant Pathology* 127 (4), S. 451 – 464.
- Cooper, M., Klonsky, K.M., Moura, R.L. de (2012): Sample cost to establish a vineyard and produce winegrapes (Cabernet Sauvignon) in the North Coast Region (Napa County). *University of California Cooperative Extension*.
- Cornelis, P., Dingemans, J. (2013): *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 (75), S. 1 – 7.
- Coughlan, M.P. (1971): The role of iron in microbial metabolism. *Science Progress* 59 (233), S. 1 – 23.
- Crous, P.W., Gams, W., Wingfield, M.J., van Wyk, P.S. (1996): *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline disease of woody hosts and human infections. *Mycologia* 88 (5), S. 786 – 796.
- Crous, P.W., Gams, W. (2000): *Phaeoconiella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39 (1), S. 112 – 118.
- Crowley, D.E., Wang, Y.C., Reid, C.P.P., Szaniszló, P.J. (1991): Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil* 130 (12), S. 179 – 198.
- da Silva, M.A., Correia, K.C., Barbosa, M.A.G., Câmara, M.P.S., Gramaje, D., Michereff, S.J. (2017): Characterization of *Phaeoacremonium* isolates associated with petri disease of table grape in Northeastern Brazil, with description of *Phaeoacremonium nordesticola* sp. nov. *European Journal of Plant Pathology* 149 (3), S. 695 – 709.
- Darling, D. und Brickell, P. (1996): Nucleinsäure-Blotting. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. (Labor im Fokus).
- Degawa, Y., Hosoya, T., Hosaka, K., Hirayama, Y., Saito, Y., Zhao, Y.-J. (2015): Rediscovery of *Roesleria subterranea* from Japan with a discussion of its infraspecific relationships detected using molecular analysis. *MC* 9, S. 1 – 9.
- Del Frari, G., Gobbi, A., Aggerbeck, M.R., Oliveira, H., Hansen, L.H., Ferreira, R.B. (2019): Characterization of the Wood Mycobiome of *Vitis vinifera* in a Vineyard Affected by Esca. Spatial Distribution of Fungal Communities and Their Putative Relation With Leaf Symptoms. *Frontiers in Plant Science* 10, S. 910.
- Delatour, C., Guillaumin, J.J. (1985): Importance des pourridies dans les régions tempérées. *European Journal of Forest Pathology* 15 (5), S. 258 – 263.

- Dharme, C.G. (1965): Taxonomic investigations on the discomycetous genus *Lachnellula* Karst. *Journal of Phytopathology* 53 (2), S. 101 – 144.
- Di Marco, Stefano, Osti, Fabio, Mazzullo, Alessandro, Cesari, Augusto (2001): How iron could be involved in esca fungi development. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (3), S. 449 – 452.
- Dong, Y., Li, B., Malitsky, S., Rogachev, I., Aharoni, A., Kaftan, F., Svatoš, A., Franceschi, P. (2016): Sample Preparation for Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues: A Review. *Frontiers in Plant Science* 7, S. 60.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16 (13), S. 6127 – 6145.
- Dupont, J., Laloui, W., Roquebert, M.F. (1998): Partial ribosomal DNA sequences show an important divergence between *Phaeoacremonium* species isolated from *Vitis vinifera*. *Mycological Research* 102 (5), S. 631 – 637.
- Eisendle, M., Oberegger, H., Zadra, I., Haas, H. (2003): The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding l-ornithine N 5-monooxygenase (*sidA*) and a non-ribosomal peptide synthetase (*sidC*). *Molecular Microbiology* 49 (2), S. 359 – 375.
- Eisendle, M., Schrettl, M., Kragl, C., Müller, D., Illmer, P., Haas, H. (2006): The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 5 (10), S. 1596 – 1603.
- Elena, G., Sosnowski, M.R., Ayres, M.R., Lecomte, P., Benetreau, C., Garcia-Figueres, F., Luque, J. (2015): Effect of the inoculum dose three grapevine trunk pathogens on the infection of artificially inoculated pruning wounds. *Phytopathologia Mediterranea* 54 (2), S. 345 – 354.
- Elena, K., Fischer, M., Dimou, D., Dimous, D.M. (2006): *Fomitiporia mediterranea* infecting citrus trees in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* 45 (1), S. 35 – 39.
- El-Enshasy, H., Hellmuth, K., Rinas, U. (2001): GpdA-promoter-controlled production of glucose oxidase by recombinant *Aspergillus niger* using nonglucose carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 90 (1), S. 57 – 66.
- Eskalen, A., Gubler, D.W. (2001): Association of spores of *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (3), S. 429 – 432.
- Fedorova, N.D., Khaldi, N., Joardar, V.S., Maiti, R., Amedeo, P., Anderson, M.J., Crabtree, J., Silva, J.C., Badger, J.H., Albarraq, A., Angiuoli, S., Bussey, H., Bowyer, P., Cotty, P.J., Dyer, P.S., Egan, A., Galens, K., Fraser-Liggett, C.M., Haas, B.J., Inman, J.M., Kent, R., Lemieux, S., Malavazi, I., Orvis, J., Roemer, T., Ronning, C.M., Sundaram, J.P., Sutton, G., Turner, G., Venter, J.C., White, O.R., Whitty, B.R., Youngman, P., Wolfe, K.H., Goldman, G.H., Wortman, J.R., Jiang, B., Denning, D.W., Nierman, W.C. (2008): Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genetics* 4 (4), 1-13.
- Filip, P., Weber, R.W.S., Sterner, O., Anke, T. (2003): Hormonemate, a new cytotoxic and apoptosis-inducing compound from the endophytic fungus *Hormonema dematioides*. I. Identification of the producing strain, and isolation and biological properties of hormonemate. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* 58 (7-8), S. 547 – 552.
- Fischer, J. (2014): Untersuchungen zur Esca-Erkrankung von Weinpflanzen: Pilz-Pflanze und antagonistische Interaktionen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Fischer, M. (2002): A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress* 1 (3), S. 315 – 324.
- Fischer, M., Kassemeyer, H.-H. (2003): Fungi associated with esca disease of grapevine in Germany. *Vitis* 42 (3), S. 109 – 116.
- Fischer, M. (2006): Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S. 30 – 42.
- Fischer, M. (2019): Grapevine trunk diseases in German viticulture. III. Biodiversity and spatial distribution of fungal pathogens in rootstock mother plants and possible relation to leaf symptoms. *Vitis* 58 (4), S. 141 – 149.
- Fischer, M., Peighami Ashnaei, S. (2019): Grapevine, esca complex and environment: the disease triangle. *Phytopathologia Mediterranea* 58 (1), S. 17 – 37.
- Fleurat-Lessaed, P., Luini, E., Berjeaud, J.-M., Roblin, G. (2010): Diagnosis of grapevine esca disease by immunological detection of *Phaeoconiella chlamydospora*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16 (3), S. 455 – 463.
- Floros, D.J., Petras, D., Kapono, C.A., Melnik, A.V., Ling, T.-J., Knight, R., Dorrestein, P.C. (2017): Mass Spectrometry Based Molecular 3D-Cartography of Plant Metabolites. *Frontiers in Plant Science* 8, S. 429.

- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martínez, A.T., Otilar, R., Spatafora, J.W., Yadav, J.S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P.M., Vries, R.P. de, Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Górecki, P., Heitman, J., Hesse, C., Hori, C., Igarashi, K., Jurgens, J.A., Kallen, N., Kersten, P., Kohler, A., Kűes, U., Kumar, T.K.A., Kuo, A., LaButti, K., Larrondo, L.F., Lindquist, E., Ling, A., Lombard, V., Lucas, S., Lundell, T., Martin, R., McLaughlin, D.J., Morgenstern, I., Morin, E., Murat, C., Nagy, L.G., Nolan, M., Ohm, R.A., Patyshakuliyeva, A., Rokas, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Sabat, G., Salamov, A., Samejima, M., Schmutz, J., Slot, J.C., St John, F., Stenlid, J., Sun, H., Sun, S., Syed, K., Tsang, A., Wiebenga, A., Young, D., Pisabarro, A., Eastwood, D.C., Martin, F., Cullen, D., Grigoriev, I.V., Hibbett, D.S. (2012): The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336 (6089), S. 1715 – 1719.
- Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z.A., Borgo, M., Rego, C., Corio-Costet, M.-F. (2016b): Grapevine trunk disease: a review. *OIV Publications*.
- Fontaine, F., Pinto, C., Vallet, J., Clément, C., Gomes, A.C., Spagnolo, A. (2016a): The effects of grapevine trunk diseases (GTDs) on vine physiology. *European Journal of Plant Pathology* 144 (4), S. 707 – 721.
- Frank, A.M., Bandeira, N., Shen, Z., Tanner, S., Briggs, S.P., Smith, R.D., Pevzner, P.A. (2008): Clustering millions of tandem mass spectra. *Journal of Proteome Research* 7 (1), S. 113 – 122.
- Franken, A.C.W., Lechner, B.E., Werner, E.R., Haas, H., Lokman, B.C., Ram, A.F.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., Weert, S. de, Punt, P.J. (2014): Genome mining and functional genomics for siderophore production in *Aspergillus niger*. *Briefings in functional genomics* 13 (6), S. 482 – 492.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O. (2009): Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 6 (5), S. 343 – 345.
- Gillespie, R., Clarke, M. (2019). Economic contribution of the Australian wine sector 2019. *Gillespie Economics, Environmental and Resource Economics* 2019.
- Goufo, P., Marques, A.C., Cortez, I. (2019): Exhibition of local but not systemic induced phenolic defenses in *Vitis vinifera* L. affected by brown wood streaking, grapevine leaf stripe, and apoplexy (esca complex). *Plants* 8 (10), S. 1 – 19.
- Gramaje, D., Mostert, L., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2015): *Phaeoacremonium*: from esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Niology* 119 (9), S. 759 – 783.
- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J.R., Sosnowski, M.R. (2018): Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Disease* 102 (1), S. 12 – 39.
- Graniti, A., Surico, G., Mugnai, L. (2000): Esca of grapevine : a disease complex or a complex of diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 39 (1), S. 16 – 20.
- Greenshields, D.L., Liu, G., Feng, J., Selvaraj, G., Wei, Y. (2007): The siderophore biosynthetic gene *SID1*, but not the ferroxidase gene *FET3*, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Molecular Plant Pathology* 8 (4), S. 411 – 421.
- Grigoriev, I.V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., Shabalov, I. (2014): MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue), D699-704.
- Groot, M.J. de, Bundock, P., Hooykaas, P.J., Beijersbergen, A.G. (1998): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16 (9), S. 839 – 842.
- Gubler, W.D., Baumgartner, K., Browne, G.T., Eskalen, A., Latham, S.R., Petit, E., Bayramian, L.A. (2004): Root diseases of grapevines in California and their control. *Australasian Plant Pathology* 33 (2), S. 157.
- Guérin-Dubrana, L., Fontaine, F., Mugnai, L. (2019): Grapevine trunk disease in European and Mediterranean vineyards: occurrence, distribution and associated disease-affecting cultural factors. *Phytopathologia Mediterranea* 58 (1), S. 49 – 71.
- Haas, H. (2003): Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (4), S. 316 – 330.
- Haas, H., Eisendle, M., Turgeon, B.G. (2008): Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Review of Phytopathology* 46, S. 149 – 187.
- Haas, H. (2014): Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Natural Product Reports* 31 (10), S. 1266 – 1276.
- Hackmer, K. (2017): Untersuchung des Sekundärmetabolismus des Rebenpathogens *Roesleria subterranea*. Masterarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- Hallenn, F., Fourie, P.H., Crous, P.W. (2006): A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45 (1), S. 55 – 67.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219, S. 1 – 14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1992): Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *Federation of European Biochemical Societies* 307 (1), S. 108 – 112.
- Hamer, J.E., Timberlake, W.E. (1987): Functional organization of the *Aspergillus nidulans* trpC promoter. *Molecular and Cellular Biology* 7 (7), S. 2352 – 2359.
- Haselwandter, K., Passler, V., Reiter, S., Schmid, D.G., Nicholson, G., Hentschel, P., Albert, K., Winkelmann, G. (2006): Basidiochrome -- a novel siderophore of the orchidaceous mycorrhizal fungi *Ceratobasidium* and *Rhizoctonia* spp. *BioMetals* 19 (3), S. 335 – 343.
- Haselwandter, K., Häninger, G., Ganzera, M. (2011): Hydroxamate siderophores of the ectomycorrhizal fungi *Suillus granulatus* and *S. luteus*. *BioMetals* 24 (1), S. 153 – 157.
- Haselwandter, K., Häninger, G., Ganzera, M., Haas, H., Nicholson, G., Winkelmann, G. (2013): Linear fusigen as the major hydroxamate siderophore of the ectomycorrhizal basidiomycota *Laccaria laccata* and *Laccaria bicolor*. *BioMetals* 26 (6), S. 969 – 979.
- Herzog, R.W., Daniell, H., Singh, N.K., Lemke, P.A. (1996): A comparative study on the transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment of conidia and a more conventional procedure using protoplasts treated with polyethyleneglycol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45 (3), S. 333 – 337.
- Hiller, A.-L. (2017): Untersuchung der Biosynthese von Siderophoren in rebenpathogenen Pilzen. Bachelorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Hiller, A.-L. (2019): Untersuchung der Sekundärmetabolite aus Esca-assoziierten Pilzen. Masterarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Hissen, A.H.T., Wan, A.N.C., Warwas, M.L., Pinto, L.J., Moore, M.M. (2005): The *Aspergillus fumigatus* siderophore biosynthetic gene *sidA*, encoding L-ornithine N⁵-oxygenase, is required for virulence. *Infection and Immunity* 73 (9), S. 5493 – 5503.
- Hoenigl, M., Orasch, T., Faserl, K., Prattes, J., Loeffler, J., Springer, J., Gsaller, F., Reischies, F., Duettmann, W., Raggam, R.B., Lindner, H., Haas, H. (2019): Triacetylfusarinine C: A urine biomarker for diagnosis of invasive aspergillosis. *The Journal of Infection* 78 (2), S. 150 – 157.
- Hof, C., Eisfeld, K., Welzel, K., Antelo, L., Foster, A.J., Anke, H. (2007): Ferricrocin synthesis in *Magnaporthe grisea* and its role in pathogenicity in rice. *Molecular Plant Pathology* 8 (2), S. 163 – 172.
- Hof, C. (2008): Molekularbiologische Untersuchungen zur nicht-ribosomalen Peptid-Synthese in *Omphalotus*. Molekularbiologische Untersuchungen zur nicht-ribosomalen Peptid-Synthese in *Omphalotus olearius* und zur Siderophor-Biosynthese in *Magnaporthe grisea*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Hof, C., Eisfeld, K., Antelo, L., Foster, A.J., Anke, H. (2009): Siderophore synthesis in *Magnaporthe grisea* is essential for vegetative growth, conidiation and resistance to oxidative stress. *Fungal Genetics and Biology* 46 (4), S. 321 – 332.
- Höfer, M. (1992): Untersuchungen über *Roesleria hypogaea* Thüm & Pass, als Erreger des Wurzelschimmels der Weinrebe (Geisenheimer Berichte). Zugl.: Mainz, Univ., Diss., 1992. Geisenheim: Ges. zur Förderung der Forschungsanst. Geisenheim (Geisenheimer Berichte).
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., Gindro, K. (2012): What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity* 54 (1), S. 51 – 67.
- Holinsworth, B., Martin, J.D. (2009): Siderophore production by marine-derived fungi. *BioMetals* 22 (4), S. 625 – 632.
- Horowitz, N.H., Charlang, G., Horn, G., Williams, N.P. (1976): Isolation and identification of the conidial germination factor of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* 127 (1), S. 135 – 140.
- Howard, D.H. (1999): Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (3), S. 394 – 404.
- Huber, L., Scholz, C., Eisenbeis, G., Rühl, E.H., Neuhauser, S., Kirchmair, M. (2006): Field distribution of *Sorosphaera viticola* in commercial vineyards in Germany. *FEMS Microbiology Letters* 260 (1), S. 63 – 68.
- Huber, L., Hoffmann, M., Rühl, E.H., Kirchmair, M. (2009): Disease suppressiveness of vineyard soils infested with grape *Phylloxera*. *Acta Horticulturae* 816, S. 41 – 52.

- Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T., Kitade, Y., Morita, A., Tanaka, C., Gafur, A., Ohta, A., Kawai, M., Yamanaka, T., Neda, H., Ota, Y. (2012): Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* 53 (5), S. 396 – 401.
- Jalal, M. und van der Helm, D. (1991): Isolation and spectroscopic identification of fungal siderophores. Unter Mitarbeit von Günther Winkelmann. ed. Boca Raton: CRC Press (Handbook of microbial iron chelates).
- Jalal, M.A.F., Mocharla, R., Barnes, C.L., Hossain, M.B., Powell, D.R., Eng-Wilmot, D.L., Grayson, S.L., Benson, B.A., van der Helm, D. (1984): Extracellular Siderophores from *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Bacteriology* 158 (2), S. 683 – 688.
- Jalal, M.A.F., van der Helm, D. (1989): Siderophores of highly phytopathogenic *Alternaria longipes*. *Biology of Metals* 2, S. 11 – 17.
- Johnson, L. (2008): Iron and siderophores in fungal-host interactions. *Mycological Research* 112 (2), S. 170 – 183.
- Kassemeyer, H.-H. (2017): Fungi of Grapes. In: Helmut König, Gottfried Uden und Jürgen Fröhlich (Hg.): *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Bd. 32. Cham: Springer International Publishing, S. 103 – 132.
- Kazemzadeh Chakusary, M., Mohammadi, H., Khodaparast, S.A. (2017): Decline-associated *Phaeoacremonium* species occurring on forest trees in the north of Iran. *Forest Pathology* 47 (6), 1-15.
- Keller, N.P., Hohn, T.M. (1997): Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 21, S. 17 – 29.
- Khan, A., Singh, P., Srivastava, A. (2018): Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: a review. *Microbiological Research* 212-213, S. 103 – 111.
- Kirchmair, M., Neuhauser, S., Buzina, W., Huber, L. (2008): The taxonomic position of *Roesleria subterranea*. *Mycological Research* 112 (10), S. 1210 – 1219.
- Kiss, L., Holb, I.J., Rossi, V., Cadle-Davidson, L., Jeger, M.J. (2016): Foreword: Special issue on fungal grapevine diseases. *European Journal of Plant Pathology* 144 (4), S. 693 – 694.
- Konetschny-Rapp, S., Huschka, H.-G., Winkelmann, G., Jung, G. (1988): High-performance liquid chromatography of siderophores from fungi. *Biology of Metals* 1, S. 9 – 17.
- Kraus, C., Voegelé, R.T., Fischer, M. (2019a): Temporal development of the culturable, endophytic fungal community in healthy grapevine branches and occurrence of GTD-associated fungi. *Microbial Ecology* 77 (4), S. 866 – 876.
- Kraus, C., Voegelé, R.T., Fischer, M. (2019b): The esca complex in German vineyards: does the training system influence occurrence of GLSD symptoms? *European Journal of Plant Pathology* 155 (1), S. 265 – 279.
- Landi, L., Murolo, S., Romanazzi, G. (2012): Colonization of *Vitis* spp. wood by sGFP-transformed *Phaeoacremonium chlamydospora*, a tracheomycotic fungus involved in esca disease. *Phytopathology* 102 (3), S. 290 – 297.
- Larignon, P., Dubos, B. (1997): Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103 (2), S. 147 – 157.
- Lee, B.-N., Kroken, S., Chou, D.Y.T., Robbertse, B., Yoder, O.C., Turgeon, B.G. (2005): Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. *Eukaryotic Cell* 4 (3), S. 545 – 555.
- Letunic, I., Bork, P. (2018): 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research* 46 (D1), D493-D496.
- Letunic, I., Khedkar, S., Bork, P. (2021): SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Research* 49 (D1), D458-D460.
- Li, D., Tang, Y., Lin, J., Cai, W. (2017): Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories* 16 (1-13), S. 168.
- López-Berges, M.S., Capilla, J., Turrà, D., Schaffner, L., Matthijs, S., Jöchl, C., Cornelis, P., Guarro, J., Haas, H., Di Pietro, A. (2012): HapX-mediated iron homeostasis is essential for rhizosphere competence and virulence of the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* 24 (9), S. 3805 – 3822.
- Lunsford, K.A., Peter, G.F., Yost, R.A. (2011): Direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging of cellulose and hemicellulose in *Populus* tissue. *Analytical chemistry* 83 (17), S. 6722 – 6730.
- Mahoney, N., Lardner, R., Molyneux, R.J., Scott, E.S., Smith, L.R., Schoch, T.K. (2003): Phenolic and heterocyclic metabolite profiles of the grapevine pathogen *Eutypa lata*. *Phytochemistry* 64 (2), S. 475 – 484.
- Marchi, G., Roberti, S., D'Ovidio, R., Mugnai, L., Surico, G. (2001): Pectic enzymes production by *Phaeoacremonium chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (3), S. 407 – 416.

- Markakis, E.A., Ligoigakis, E.K., Roussos, P.A., Sergentani, C.K., Kavroulakis, N., Roditakis, E.N., Koubouris, G.C. (2019): Differential susceptibility responses of Greek olive cultivars to *Fomitiporia mediterranea*. *European Journal of Plant Pathology* 153 (4), S. 1055 – 1066.
- Martín, M.T., Cobos, R., Martín, L., López-Enríquez, L. (2012): Real-time PCR detection of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (11), S. 3985 – 3991.
- Masi, M., Cimmino, A., Reveglia, P., Mugnai, L., Surico, G., Evidente, A. (2018): Advances on Fungal Phytotoxins and Their Role in Grapevine Trunk Diseases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (24), S. 5948 – 5958.
- Matzanke, B.F., Bill, E., Trautwein, A.X., Winkelmann, G. (1987): Role of siderophores in iron storage in spores of *Neurospora crassa* and *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Bacteriology* 169 (12), S. 5873 – 5876.
- Matzanke, B.F., Bill, E., Trautwein, A.X., Winkelmann, G. (1988): Ferricrocin functions as the main intracellular iron-storage compound in mycelia of *Neurospora crassa*. *Biology of Metals* 1, S. 18 – 25.
- Medema, M.H., Blin, K., Cimermancic, P., Jager, V. de, Zakrzewski, P., Fischbach, M.A., Weber, T., Takano, E., Breitling, R. (2011): antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research* 39 (Web Server issue), W339-46.
- Mei, B., Budde, A.D., Leong, S.A. (1993): *sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: Molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, S. 903 – 907.
- Michele, R. de, La Bella, F., Gristina, A.S., Fontana, I., Pacifico, D., Garfi, G., Motisi, A., Crucitti, D., Abbate, L., Carimi, F. (2019): Phylogenetic Relationship Among Wild and Cultivated Grapevine in Sicily: A Hotspot in the Middle of the Mediterranean Basin. *Frontiers in Plant Science* 10, S. 1506.
- Mieland, A. (2017): Untersuchung zur Siderophor-Biosynthese von Esca-assoziierten Pilzen. Bachelorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Miles, T.D., Schilder, A.M.C. (2009): First report of grape root rot caused by *Roesleria subterranea* in Michigan. *Plant Disease* 93 (7), S. 765.
- Molyneux, R.J., Mahoney, N., Bayman, P., Wong, R.Y., Meyer, K., 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), S. 1393 – 1399.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., Clément, C., Mugnai, L., 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), S. 1189 – 1217.
- Morales-Cruz, A., Amrine, K.C.H., Blanco-Ulate, B., Lawrence, D.P., Travadon, R., Rolshausen, P.E., Baumgartner, K., Cantu, D. (2015): Distinctive expansion of gene families associated with plant cell wall degradation, secondary metabolism, and nutrient uptake in the genomes of grapevine trunk pathogens. *BMC Genomics* 16 (469), S. 1 – 22.
- Mostert, L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Gams, W., Summerbell, R.C. (2003): *Togninia* (Calosphaerales) Is Confirmed as Teleomorph of *Phaeoacremonium* by Means of Morphology, Sexual Compatibility and DNA Phylogeny. *Mycologia* 95 (4), S. 646.
- Mostert, L., Halleen, F., Fourie, P., Crous, W., Pedro (2006): A review of *Phaeoacremonium* species involved in petri disease and esca of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S. 12 – 29.
- Moyo, P., Allsopp, E., Roets, F., Mostert, L., Halleen, F. (2014): Arthropods vector grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathology* 104 (10), S. 1063 – 1069.
- Mugnai, L., Graniti, A., Surico, G. (1999): Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 404 (5), S. 404 – 418.
- Mullen, A.K., Clench, M.R., Crosland, S., Sharples, K.R. (2005): Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* 19 (18), S. 2507 – 2516.
- Mundy, D.C. (2015): Ecology and control of grapevine root diseases in New Zealand: a review. *New Zealand Plant Protection* 68, S. 396 – 404.
- Munkvold, G.P., Duthie, J.A., Marois, J.J. (1994): Reductions in yield and vegetative growth of grapevines due to *eutypa dieback*. *Phytopathology* 84 (2), S. 186 – 192.
- Münzenberger, B., Bubner, B., Wöllecke, J., Sieber, T.N., Bauer, R., Fladung, M., Hüttl, R.F. (2009): The ectomycorrhizal morphotype *Pinirhiza sclerotia* is formed by *Acephala macrosclerotiorum* sp. nov., a close relative of *Phialocephala fortinii*. *Mycorrhiza* 19 (7), S. 481 – 492.

- Murolo, S., Romanazzi, G. (2014): Effects of grapevine cultivar, rootstock and clone on esca disease. *Australasian Plant Pathology* 43 (2), S. 215 – 221.
- Neilands, J.B. (1981): Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry* 50, S. 715 – 731.
- Neilands, J.B. (1995): Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (45), S. 26723 – 26726.
- Neuhauser, S., Huber, L., Kirchmair, M. (2011): Is *Roesleria subterranea* a primary pathogen or a minor parasite of grapevines? Risk assessment and a diagnostic decision scheme. *European Journal of Plant Pathology* 130 (4), S. 503 – 510.
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I.V., Dubchak, I. (2014): The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue), D26-31.
- Octave, S., Roblin, G., Fleurat-Lessard, P. (2008): Effects of non-glycosylated and glycosylated polypeptides secreted by the grapevine pathogen *Eutypa lata* on the structural features and membrane processes in grapevine cells. *Journal of Plant Pathology* 90 (2), S. 211 – 224.
- Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K., Turgeon, B.G. (2006): NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *The Plant Cell* 18 (10), S. 2836 – 2853.
- Oide, S., Krasnoff, S.B., Gibson, D.M., Turgeon, B.G. (2007): Intracellular siderophores are essential for ascomycete sexual development in heterothallic *Cochliobolus heterostrophus* and homothallic *Gibberella zeae*. *Eukaryotic Cell* 6 (8), S. 1339 – 1353.
- Oide, S., Berthiller, F., Wiesenberger, G., Adam, G., Turgeon, B.G. (2014): Individual and combined roles of malonichrome, ferricrocin, and TAFC siderophores in *Fusarium graminearum* pathogenic and sexual development. *Frontiers in Microbiology* 5, S. 759.
- OIV (2018): OIV statistical report on world vitiviniculture 2018, <http://www.oiv.int/public/medias/6371/oiv-statistical-report-on-world-vitiviniculture-2018.pdf>.
- Pascoe, I., Cottral, E. (2000): Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea* 39 (1), S. 68 – 75.
- Pedras, M.S.C., Park, M.R. (2015): Metabolite diversity in the plant pathogen *Alternaria brassicicola*: factors affecting production of brassicicolin A, depudecin, phomapyrone A and other metabolites. *Mycologia* 107 (6), S. 1138 – 1150.
- Péros, J.-P., Berger, G., Jamaux-Despréaux, I. (2008): Symptoms, wood lesions and fungi associated with esca in organic vineyards in Languedoc-Roussillon (France). *Journal of Phytopathology* 156 (5), S. 297 – 303.
- Petras, D., Jarmusch, A.K., Dorrestein, P.C. (2017): From single cells to our planet-recent advances in using mass spectrometry for spatially resolved metabolomics. *Current opinion in chemical biology* 36, S. 24 – 31.
- Philpott, C.C. (2006): Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 (7), S. 636 – 645.
- Pintos, C., Redondo, V., Costas, D., Aguín, O., Mansilla, P. (2018): fungi associated with grapevine trunk diseases in nursery-produced vitis vinifera plants. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (3), S. 407 – 424.
- Pluháček, T., Lemr, K., Ghosh, D., Milde, D., Novák, J., Havlíček, V. (2016): Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 35 (1), S. 35 – 47.
- Redhead, S.A. (1984): *Roeslerina* gen. nov. (Caliciales, Caliciaceae), an ally of *Roesleria* and *Coniocybe*. *Canadian Journal of Botany* 62 (12), S. 2514 – 2519.
- Renaud, J.-M., Tsoupras, G., Stoeckli-Evans, H., Tabacchi, R. (1989): A novel allenic epoxy cyclohexane and related compounds from *Eutypa lata* (Pers: F.) Tul. *Helvetica Chimica Acta* 72 (6), S. 1262 – 1267.
- Renshaw, J.C., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., Wiebe, M.G., Livens, F.R., Collison, D., Taylor, R.J. (2002): Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycological Research* 106 (10), S. 1123 – 1142.
- Research, M.K.F. (2007): The impact of wine, grapes and grape products on the American economy 2007. *MKF Research LLC* 2007.
- Roger, A.J., Sandblom, O., Doolittle, W.F., Philippe, H. (1999): An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 16 (2), S. 218 – 233.
- Rolshausen, P.E., Greve, L.C., Labavitch, J.M., Mahoney, N.E., Molyneux, R.J., Gubler, W.D. (2008): Pathogenesis of *Eutypa lata* in grapevine: identification of virulence factors and biochemical characterization of cordon dieback. *Phytopathology* 98 (2), S. 222 – 229.

- Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Gubler, W.D. (2005b): Ascospore release of *Togninia minima*, cause of esca and grapevine decline in California. *Plant Health Progress* 6 (1), S. 16.
- Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Gubler, W.D. (2005a): Teleomorph formation of *Phaeoacremonium aleophilum*, cause of esca and grapevine decline in California. *Plant Disease* 89 (2), S. 177 – 184.
- Ruiz-Diez, B. (2002): Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* 92 (2), S. 189 – 195.
- Sambrook, J. und Russell, D. (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, C., Fragoeiro, S., Oliveira, H., Phillips, A. (2006): Response of *Vitis vinifera* L. plants inoculated with *Phaeoacremonium angustius* and *Phaeomoniella chlamydospora* to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite. *Scientia Horticulturae* 107 (2), S. 131 – 136.
- Schmidt, C.S., Wolf, G.A., Lorenz, D. (1999): Production of extracellular hydrolytic enzymes by the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. *Journal of Plant Disease and Protection* 106 (1), S. 1 – 11.
- Schönberger, P. (2017): Roesleria subterranea: Siderophoren-Analyse, genetische Transformation und Entwicklung eines Sporenkeimungstests. Bachelorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Joechl, C., Rogers, T., Arst, H.N., Haynes, K., Haas, H. (2004): Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *The Journal of Experimental Medicine* 200 (9), S. 1213 – 1219.
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., Wallner, A., Arst, H.N., Haynes, K., Haas, H. (2007): Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathogens* 3 (9), S. 1195 – 1207.
- Schunke, J. (2017): Entwicklung von molekularbiologischen Tools zur Untersuchung des Sekundärmetabolismus von *Penicillium steckii*. Bachelorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Schuster, M., Kahmann, R. (2019): CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 130, S. 43 – 53.
- Schwertmann, U., Fitzpatrick, R.W. (1992): Iron minerals in surface environments. *Catena Supplement* 21, S. 7 – 30.
- Serra, S., Mannoni, M.A., Ligios, V. (2008): Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 47 (3), S. 234 – 246.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T. (2003): Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* 13 (11), S. 2498 – 2504.
- Siebert, J.B. (2001): Eutypa: the economic toll on vineyards. *Wines & Vines* 2001, S. 50 – 56.
- Silva-Bailão, M.G., Bailão, E.F.L.C., Lechner, B.E., Gauthier, G.M., Lindner, H., Bailão, A.M., Haas, H., Almeida Soares, C.M. de (2014): Hydroxamate production as a high affinity iron acquisition mechanism in *Paracoccidioides* spp. *PloS One* 9 (8), 1-14.
- Sparapano, Lorenzo, Bruno, Giovanni, Graniti, Antonio (2001b): Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (3).
- Sparapano, L., Bruno, G., Graniti, A. (2000): Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea* 39 (1), S. 169 – 177.
- Spies, C.F.J., Mazzola, M., McLeod, A. (2011): Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 131 (1), S. 103 – 119.
- Stachniuk, A., Fornal, E. (2016): Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Anal. Methods* 9 (6), S. 1654 – 1665.
- States, D.J., Gish, W. (1994): Combined use of sequence similarity and codon bias for coding region identification. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 1 (1), S. 39 – 50.
- Stehr, M., Diekmann, H., Smau, L., Seth, O., Ghisla, S., Singh, M., Macheroux, P. (1998): A hydrophobic sequence motif common to N-hydroxylating enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 23 (2), S. 56 – 57.
- Sujatha, N., Ammani, K. (2013): Siderophore production by the isolates of fluorescent pseudomonads 50 (20), S. 1 – 7.
- Sundström, K.-R. (1964): Studies of the physiology, morphology and serology of *Exobasidium*. *Symbolae Botanicae Upsalienses* 18, S. 1 – 89.

- Surico, G., Marchi, G., Braccini, P., Mugnai, L. (2000): Epidemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39 (1), S. 190 – 205.
- Surico, G., Mugnai, L., Marchi, G. (2006): Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* 45 (1), S. 68 – 86.
- Surico, G., Mugnai, L., Marchi, G. (2008): The esca disease complex. *A Ciancio, KG Mukerji, eds. Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria*, S. 119 – 136.
- Surico, G. (2009): Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 48 (1), S. 5 – 10.
- Sweigard, J.A., Chumley, F., Carroll, A., Farrall, L., Valent, B. (1997): A series of vectors for fungal transformation. *Fungal Genetics Reports* 44 (1), S. 52 – 53.
- Tabacchi, R., Fkyera, Abdellatif, Poliart, Christine, Dubin, G.-M. (2000): Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 39 (1), S. 156 – 161.
- Tello, M.L., Gramaje, D., Gómez, A., Abad-Campos, P., Armengol, J. (2010): Analysis of henotypic and molecular diversity of *Phaeoemoniella chlamydospora* isolates in Spain. *Journal of Plant Pathology* 92 (1), S. 195 – 203.
- Tey-Rulh, P., Philippe, I., Renaud, J.-M., Tsoupras, G., Angelis, P. de, Fallot, J., Tabacchi, R. (1991): Eutypine, a phytotoxin produced by *Eutypa lata* the causal agent of dying-arm disease of grapevine. *Phytochemistry* 30 (2), S. 471 – 473.
- Thieken, A., Winkelmann, G. (1992): Rhizoferrin: a complexone type siderophore of the mcorales and entomophthorales (Zygomycetes). *FEMS Microbiology Letters* 94, S. 37 – 42.
- Thümen, F. (Hg.) (1878): Monographische Bearbeitung der sämtlichen bisher bekannten, auf den Arten der Gattung *Vitis L.* vorkommenden Pilze. Unter Mitarbeit von W. Braunmüller. Wien (Die Pilze des Weinstockes).
- Tobiasen, C., Aahman, J., Ravnholt, K.S., Bjerrum, M.J., Grell, M.N., Giese, H. (2007): Nonribosomal peptide synthetase (NPS) genes in *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* and identification of NPS2 as the producer of ferricrocin. *Current Genetics* 51 (1), S. 43 – 58.
- Trouillas, F.P., Urbez-Torres, J.R., Gubler, W.D. (2010): Diversity of diatrypaceous fungi associated with grapevine canker diseases in California. *Mycologia* 102 (2), S. 319 – 336.
- Turgeon, B.G., Oide, S., Bushley, K. (2008): Creating and screening *Cochliobolus heterostrophus* non-ribosomal peptide synthetase mutants. *Mycological Research* 112 (2), S. 200 – 206.
- Úrbez-Torres, J.R., Peduto, F., Smith, R.J., Gubler, W.D. (2013): Phomopsis Dieback: a grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease* 97 (12), S. 1571 – 1579.
- Valtaud, C., Larignon, P., Roblin, G., Fleurat-Lessard, P. (2009): Developmental and ultrastructural features of *Phaeoemoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* relation to xylem degradation in esca disease of the grapevine. *Journal of Plant Pathology* 91 (1), S. 37 – 51.
- Véghelyi, K. (1985): Root rot fungi on apricot in Hungary. *Acta Horticulturae* 192, S. 217 – 225.
- Voß, B., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiß, G., Fischer, R. (2020): *Alternaria alternata* uses two siderophore systems for iron acquisition. *Scientific Reports* 10 (1), S. 3587 – 3597.
- Wallner, A., Blatzer, M., Schrettl, M., Sarg, B., Lindner, H., Haas, H. (2009): Ferricrocin, a siderophore involved in intra- and transcellular iron distribution in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (12), S. 4194 – 4196.
- Walsh, J.P., DesRochers, N., Renaud, J.B., Seifert, K.A., Yeung, K.K.-C., Sumarah, M.W. (2019): Identification of N,N',N''-triacetylfulvarinine C as a key metabolite for root rot disease virulence in American ginseng. *Journal of Ginseng Research* in press, <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.08.008>.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapon, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Meehan, M.J., Liu, W.-T., Crüseman, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.-C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrewe, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., P, C.A.B., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarque, D.P., Pociute, E., O'Neill, E.C., Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K.,

- Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.O., Pogliano, K., Linington, R.G., Gutiérrez, M., Lopes, N.P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Bandeira, N. (2016): Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* 34 (8), S. 828 – 837.
- Wasylnka, J.A., Moore, M.M. (2002): Uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infection and Immunity* 70 (6), S. 3156 – 3163.
- Weinberg, E.D. (1999): The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46 (3), S. 231 – 238.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In: T. J. White, T. Bruns, S. Lee und J. Taylor (Hg.): PCR Protocols, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics: Elsevier, S. 315 – 322.
- Whiting, E.C., Khan, A., Gubler, W.D. (2001): Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeoemoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Disease* 85 (2), S. 195 – 201.
- Wijesundera, R.L.C., Amarasekera, A.S., Yapa, D.N.D. (1995): Production of a siderophore by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 23 (3), S. 97 – 100.
- Winkelmann, G. (1992): Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complexone type iron binding ligands. *Mycological Research* 96 (7), S. 529 – 534.
- Winkelmann, G. (2007): Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *BioMetals* 20 (3-4), S. 379 – 392.
- Yuan, W.M., Gentil, G.D., Budde, A.D., Leong, S.A. (2001): Characterization of the *Ustilago maydis* *sid2* gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster. *Journal of Bacteriology* 183 (13), S. 4040 – 4051.

7 Anhang

7.1 Oligonukleotid-Primer

Im nachfolgenden sind die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer mit der jeweiligen Sequenzabfolge tabellarisch bezüglich Funktion in den einzelnen Versuchen aufgelistet (Tab. 28-31).

7.1.1 Oligonukleotid-Primer zur Generierung der Geninaktivierungsvektoren

Unter Zuhilfenahme der in Tabelle 28 aufgelisteten Oligonukleotid-Primer wurden die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten zielgerichteten Geninaktivierungsvektoren generiert. Zur Herstellung der Komplementationsvektoren wurden die in Tabelle 29 genannten Oligonukleotid-Primer verwendet. Die Oligonukleotid-Primersequenzen wurden jeweils mit Hilfe des NEBuilder®_{v2.2.5} Assembly Tool der Firma New England BioLabs® designt.

Tabelle 28: Oligonukleotid-Primer zur Generierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geninaktivierungsvektoren.

Primername	Sequenz (5'-3')	Vektor
<i>GA Pch Fll o.-mox f</i>	gggcccgcgcgccgaattcccgggCAAGCGGACATGCTCGCC	<i>pCAMB-PchOMOI-HPT</i>
<i>GA Pch Fll o.-mox r</i>	agttaacgtcgacAAGTGCCTTTTTATGCAGGATCTG	
<i>GA Pch HPT o.-mox f</i>	taaaaacgcacttGTCGACGTTAACTGATATTGAAG	
<i>GA Pch HPT o.-mox r</i>	atcgctctcttttCGTTAACTGGTTCCTCCGGT	

<i>GA Pch Fl2 o.-mox f</i>	gaaccagttaacgAAAAGAGAGCGATTTGAG	
<i>GA Pch Fl2 o.-mox r</i>	atctaccatggtggactcctcttaaAAATTGTCTACGGTCACC	
<i>GA flank1 PchomoxII f</i>	ggatataattggtgtaaacagaatctCGAGTTCGCAGGTCTCAGCA C	<i>pCAMB- PchOMOII- G418</i>
<i>GA flank1 PchomoxII r</i>	cttcaatatcaTCCTTGAAGTGATGAGAGAGAATGTG	
<i>GA G418 PchomoxII f</i>	cactcaaggaTGATATTGAAGGAGCATTITTTTG	
<i>GA G418 PchomoxII r</i>	agacattcaaaATCATGCAACATGCATGTAC	
<i>GA flank2 PchomoxII f</i>	tgtgcatgatTTTGAATGTCTTTTCTCCAGGATGCAAAC	
<i>GA flank2 PchomoxII r</i>	ctctttctcttaggtttacctgcaGAAGACGTGCCGGCGACGAT	
<i>GA Pch Fl1 NRPS 8 f</i>	gggcccggcgcgcgaattcccgggAAGCTGCAGAGGATGATG	<i>pCAMB- PchNRPSI- HPT</i>
<i>GA Pch Fl1 NRPS 8 r</i>	agttaacgtcgacTGACACGTAAAGAAATGG	
<i>GA Pch HPT NRPS 8 f</i>	tctttacgtgcaGTCGACGTTAACTGATATTGAAG	
<i>GA Pch HPT NRPS 8 r</i>	ctaaccgaggtcgCGTTAACTGGTTCCCGGT	
<i>GA Pch Fl2 NRPS 8 f</i>	gaaccagttaacgCGACCTGCGTTAGAATTT	
<i>GA Pch Fl2 NRPS 8 r</i>	atctaccatggtggactcctcttaaATATTGCTTGCAATATTCTTC	
<i>GA flank1 PchNRPSIV f</i>	attcccgggatccgctgacactgcaAGATGGAGGAACGAAGCG	<i>pCAMB- PchNRPSII- HPT</i>
<i>GA flank1 PchNRPSIV r</i>	tcctcaatatcaCAGAATGAGATTAGATATTACCCTTG	
<i>GA HPT PchNRPSIV f</i>	taatctcattctgTGATATTGAAGGAGCATTITTTTGGGCTTG	
<i>GA HPT PchNRPSIV r</i>	cgtgaattggtatCCCTCGGACGAGTGCTGG	
<i>GA flank2 PchNRPSIV f</i>	actcgtccgagggATACCAATTCACGGAGCAG	
<i>GA flank2 PchNRPSIV r</i>	atctaccatggtggactcctcttaaTCTTCTTCGCTCAGACAG	
<i>GA flank1 PchNRPSII f</i>	ggatataattggtgtaaacaaACAATACATAATATTTCAATGTGT GC	<i>pCAMB- PchNRPSIII- HPT</i>
<i>GA flank1 PchNRPSII r</i>	cttcaatatcaGGTGTITTCGTTTCTTAGATAAAG	
<i>GA HPT PchNRPSII f</i>	acgcaaacaccTGATATTGAAGGAGCATTITTTTG	
<i>GA HPT PchNRPSII r</i>	tgtggaccccaCTATTCCTTTGCCCTCGGAC	
<i>GA flank2 PchNRPSII f</i>	caaaggaatagTGGGGTCCACACAGAGAGGTTG	
<i>GA flank2 PchNRPSII r</i>	ctctttctcttaggtttacctgcaACGGGAAAGGTATCGGTGAGAA G	
<i>GA flank1 PchACE Sc199 f</i>	attcccgggatccgctgacactgcaCGCTAATTATTGAAAGCG	<i>pCAMB- PchACEII- HPT</i>
<i>GA flank1 PchACE Sc199 r</i>	tcctcaatatcaCTTGAATGCGATGTTAATG	
<i>GA HPT PchACE Sc199 f</i>	catcgcattcaagTGATATTGAAGGAGCATTITTTTGGGCTTG	
<i>GA HPT PchACE Sc199 r</i>	tcattccatccctCCCTCGGACGAGTGCTGG	
<i>GA flank2 PchACE Sc199 f</i>	actcgtccgagggAGGGATGGAATGAAACAG	
<i>GA flank2 PchACE Sc199 r</i>	atctaccatggtggactcctcttaaCTATAGCTTCGATGGAAG	
<i>GA Flank1 PchACEII f</i>	attcccgggatccgctgacactgacatgaatgacgtggaacag	<i>pCAMB- PchACEIII- HPT</i>
<i>GA Flank1 PchACEII r</i>	ccttcaatatcattcgtggtattcaagtaaac	
<i>GA HPTRes PchACEII f</i>	aataccacacgaatgatattgaaggagcatttttg	
<i>GA HPTRes PchACEII r</i>	agattctaaggaactattcctttgcccctcgg	
<i>GA Flank2 PchACEII f</i>	gcaaaggaatagttccttagaatctggtgagc	
<i>GA Flank2 PchACEII r</i>	atctaccatggtggactcctcttaaaaaattgccccttagggc	
<i>GA Pal Fl1 o.-mox f</i>	gggcccggcgcgcgaattcccgggGCATAAGGTACTTATTCTCC AGTCCC	<i>pCAMB- PmiOMO- HPT</i>
<i>GA Pal Fl1 o.-mox r</i>	agttaacgtcgacCTTGCCCCCTGGAAGCAG	
<i>GA Pal HPT o.-mox f</i>	tccagggccaagGTCGACGTTAACTGATATTGAAG	
<i>GA Pal HPT o.-mox r</i>	attgctcccggcGTAACTGGTTCCCGGT	
<i>GA Pal Fl2 o.-mox f</i>	gaaccagttaacgACCGGGACGCAATTGTTT	
<i>GA Pal Fl2 o.-mox r</i>	atctaccatggtggactcctcttaaCATAGTGTACACAAAGCGGAT G	
<i>GA flank1 PmiNRPSI f</i>	attcccgggatccgctgacactgcaAACGCCCCCTCCGGCCAA	<i>PCAMB- PmiNRPSI- HPT</i>
<i>GA flank1 PmiNRPSI r</i>	cagtaacgtcgaGGTCAGCTTTGGGAAGACCGGG	
<i>GA HPT PmiNRPSI f</i>	cccaaagctgaccTCGACGTTAACTGATATTGAAGG	
<i>GA HPT PmiNRPSI r</i>	aagtcgagatagtCGTTAACTGGTTCCCGGTC	
<i>GA flank2 PmiNRPSI f</i>	gaaccagttaacgACTATCTCGACTTTCTTCTTCCAAAGTC AC	

<i>GA flank2 PmiNRPSI r</i>	atctaccatggtggactcctcttaaGCCGGCCTGGAGAGGCGT	PCAMB- PmiNRPSII- HPT
<i>GA flank1 PmiNRPSII f</i>	attcccggggatccgctgacctgcaTATATCCTGGAGATACGCC	
<i>GA flank1 PmiNRPSII r</i>	cagttaacgtcgaATTAGCGGCTTACTGTGC	
<i>GA HPT PmiNRPSII f</i>	gtaagccgctaatTCGACGTTAACTGATATTGAAGG	
<i>GA HPT PmiNRPSII r</i>	atgatatgggtttCGTTAACTGGTTCCCGGTC	
<i>GA flank2 PmiNRPSII f</i>	gaaccagtaacgAAACCCATATCATCGCTAG	
<i>GA flank2 PmiNRPSII r</i>	atctaccatggtggactcctcttaaTATAAAAGTTATATGGGCCATG	
<i>GA PmiACE flank1 f</i>	attcccggggatccgctgacctgcaGGATGCCGGGCCGGGGCT	PCAMB- PmiACE- HPT
<i>GA PmiACE flank1 f</i>	cagttaacgtcgaGTTTGC GAAAGAAGAAGGATGATTGGGG G	
<i>GA PmiACE hpt f</i>	ttcttcgcaaacTCGACGTTAACTGATATTGAAGG	
<i>GA PmiACE hpt r</i>	ctctgagcgggatCGTTAACTGGTTCCCGGTC	
<i>GA PmiACE flank2 f</i>	gaaccagtaacgATCCCGCTCAGAGATAAG	
<i>GA PmiACE flank2 r</i>	atctaccatggtggactcctcttaaGTTGGGAGAATCTTTGCTG	

Tabelle 29: Oligonukleotid-Primer zur Generierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Komplementationsvektoren.

Primername	Sequenz (5'-3')	Mutante
<i>GAII_PchOMOXI komp_f</i>	tcaaaaagagagacaccaaaccgccacATGGCGCCCTATC TTGAC	$\Delta PchomI/OMOI$
<i>GAII_PchOMOXI komp_r</i>	tctgcagccggcgccgctttacttCTAATGACCGAACA TCGAATC	
<i>GAII_PchNRPSII komp_f</i>	tcaaaaagagagacaccaaaccgccacATGCCGGCTATGA GAGAG	$\Delta PchnrpsII/NRPSII$
<i>GAII_PchNRPSII komp_r</i>	tctgcagccggcgccgctttacttTTAATGAAAAATGA AACGATGGG	

7.1.2 Oligonukleotid-Primersequenz für das Screening potenzieller Geninaktivierungs- und Komplementationsmutanten

Die in Tabelle 30 aufgelisteten Oligonukleotid-Primer wurden für das Screening von potenziellen Geninaktivierungsmutanten über die Kolonie-PCR verwendet (2.3.2.3). Der Tabelle 31 sind dagegen Oligonukleotid-Primer zu entnehmen, welche für das Screening von Komplementationsmutanten eingesetzt worden sind. Die jeweiligen Primersequenzen wurde mit Hilfe des *Primer Design Tools* von der Firma Eurofins Genomics entworfen und von der gleichen Firma auch bezogen.

Tabelle 30: Oligonukleotid-Primer für das Screening potenzieller Geninaktivierungsmutanten.

Primername	Sequenz (5'-3')	Mutante
<i>CP Pchomox f</i>	GCCATTGCTCTGCGTGAGAG	$\Delta PchomI$
<i>CP Pchomox r</i>	ATTCGCCGCTCCGTTTCAGCTTTC	
<i>CP hpt f (CP omox-hpt f)</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	
<i>CP PchOMOXII f</i>	ACCAACAACACTCCCTTTTAC	$\Delta PchomII$
<i>CP PchOMOXII r</i>	ACTTGGACGACATAAAGCAC	
<i>CP G418-PchOMOXII f</i>	GCCTTCTATCGCCTTCTTGAC	
<i>CP Pchomox f</i>	GCCATTGCTCTGCGTGAGAG	$\Delta PchomII/omI$
<i>CP Pchomox r</i>	ATTCGCCGCTCCGTTTCAGCTTTC	
<i>CP hpt f (CP omox-hpt f)</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	
<i>CP PchOMOXII f</i>	ACCAACAACACTCCCTTTTAC	
<i>CP PchOMOXII r</i>	ACTTGGACGACATAAAGCAC	

<i>CP G418-PchOMOXII f</i>	GCCTTCTATCGCCTTCTTGAC	
<i>CP Pch FINRPS8 f</i>	GCATCGCTAGAGGTGCCAGAG	
<i>CPII PchNRPSI r</i>	TTCCGAGACATTGGAGCACCTG	<i>ΔPchnrpsI</i>
<i>CP hpt f (CP omox-hpt f)</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	
<i>CP PchNRPSII f</i> <i>(CPII PchNRPSIV f)</i>	AGGAACGAAGCGATGATGATGC	
<i>CP PchNRPSII r</i> <i>(CPII PchNRPSIV r)</i>	AACGACACCCCGAAACGAAC	<i>ΔPchnrpsII</i>
<i>CP hpt f (CP omox-hpt f)</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	
<i>SeqIII PchACEfl2 NRPSfl1 f</i>	TCGACCCTCCTTTACCGATG	
<i>CP PchNRPSII r</i>	CGAAGAGGTGAGTAGTGGAG	<i>ΔPchnrpsIII</i>
<i>CP hpt f (CP omox-hpt f)</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	
<i>CP PchACE f</i>	ACGGTGGACTTAGACTTAGCAG	
<i>CP PchACE r</i>	TAGAGGTACGCACGAGGAG	<i>ΔPchaceII</i>
<i>CP hpt f (CP omox-hpt f)</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	
<i>CP PchACEII f</i>	GCACATTATCCAGACAAGCAC	
<i>CP PchACEII r</i>	GAATTAGACTTTCCCACCAGAC	<i>ΔPchaceIII</i>
<i>CP hpt f (CP omox-hpt f)</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	
<i>CP Palomox f</i>	TCCTTCGTCAAGGACCTCGC	
<i>CP Palomox r</i>	AGATAGGCCCTAACTGCCCTGTC	<i>ΔPmiomo</i>
<i>CP omox-hpt f</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	
<i>CPIII PmiNRPSI f</i>	TTCTTGCTCAGACTATTGCAC	
<i>CPIII PmiNRPSI r</i>	GCTTACGACATTGCCAAAAC	<i>ΔPminrpsI</i>
<i>CP hpt f (CP omox-hpt f)</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	
<i>CPII PmiNRPSII f</i>	GTGCTCCCTCCTTATGCCATCC	
<i>CPII PmiNRPSII r</i>	CTTCGATCTTGTGCTCAGTGACC	<i>ΔPminrpsII</i>
<i>CP omox-hpt f</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	
<i>CP PmiACE f</i>	TGCGGCGGATCAGATAAG	
<i>CP PmiACE r</i>	TGAAGACGACGATGAGGAG	<i>ΔPmiace</i>
<i>CP hpt f (CP omox-hpt f)</i>	TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC	

Tabelle 31: Oligonukleotid-Primer für das Screening potenzieller Komplementationsmutanten.

Primername	Sequenz (5'-3')	Mutante
<i>CP PchOMOXI komp f</i>	ACCGACGATGTTCTTGACC	<i>ΔPchomol/OMOI</i>
<i>CP PchOMOXI komp r</i>	TCAACCATTTCCTCCTC	
<i>CP PchNRPSII komp f</i>	TCCCTCTCAGATGAAGCAC	<i>ΔPchnrpsII/NRPSII</i>
<i>CP PchNRPSII komp r</i>	TTTCTCCAACAGCCCCTAC	

7.1.3 Oligonukleotid-Primersequenz zur Bestätigung der Geninaktivierungsmutanten über Southern Blot Analyse

Die in Tabelle 32 aufgelisteten Oligonukleotid-Primer wurden für die Generierung der zur Bestätigung der Geninaktivierungsmutanten über Southern Blot-Analyse (2.3.10) verwendeten DIG-markierten DNA-Sonden eingesetzt. Die jeweiligen Primersequenzen wurden mit Hilfe des *Primer Design Tools* von der Firma Eurofins Genomics entworfen und von der gleichen Firma auch bezogen.

Tabelle 32: Oligonukleotid-Primer zur Sonden-Generierung für die Southern Blot Analyse.

Primername	Sequenz (5'-3')	Mutante
<i>Sonde Pch omox f</i>	CATGTCAGAACAGAGCGTGTC	<i>ΔPchomol</i> ;
<i>Sonde Pch omox r</i>	TCGCCAAAAGTCTCTTGCCC	<i>ΔPchomol/omol</i>

Sonde <i>PchOMOXII f</i>	CATCACAATGGACAGCGATAG	$\Delta PchomII$;
Sonde <i>PchOMOXII r</i>	GAGAGAATGTGAGATGAGCAAG	$\Delta PchomII/omOI$
Sonde <i>PchNRPSI f</i>	TGTCTGTTGATTCTGAACACC	$\Delta PchnrpsI$
Sonde <i>PchNRPSI r</i>	ATGCCGACCCAAGTTTTCC	
Sonde <i>PchACE f</i>	GTGCTATCGCAGTGTAACC	$\Delta PchaceII$;
Sonde <i>PchACE r</i>	ACTGCTAAGTCTAAGTCCACC	$\Delta PchnrpsII$
Sonde <i>PchNRPSII f</i>	ACTCATCGACCCTCCTTTAC	$\Delta PchnrpsIII$
Sonde <i>PchNRPSII r</i>	GCATCTTTCAACATCGTCCTTC	
Sonde <i>PchACEII f</i>	GCCGCTCCATTCCAATGTAACC	$\Delta PchaceIII$
Sonde <i>PchACEII r</i>	TGCAACACATGCTGCCAACC	
Sonde <i>Pal omox f</i>	GTCTCTTCACTCTTCGTCTTAC	$\Delta Pmiomo$
Sonde <i>Pal omox r</i>	GCCTGCTTTTCCAAGAATAAC	
Sonde <i>KOPmiNRPSI f</i>	CGGCACCATTACAAAAGGAC	$\Delta PminrpsI$
Sonde <i>KOPmiNRPSI r</i>	TGGCAGGACGTGAGGAAAAG	
Sonde <i>KOPmiNRPSII f</i>	CCTACTGAGGTTACGACAGAG	$\Delta PminrpsII$
Sonde <i>KOPmiNRPSII r</i>	TCACCCGTCATTTTCGCTAC	
Sonde <i>KOPmiACE f</i>	TAACTGCTAATCCCACGCC	$\Delta Pmiace$
Sonde <i>KOPmiACE r</i>	CTTCGTGTATTGCTGTACCTC	

7.2 Plasmidkonstruktion für die zielgerichtete Geninaktivierung und Komplementation der zu untersuchenden Gene der Esca-assoziierten Pilze

7.2.1 *PchOMOI*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des putativ kodierenden L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase I (*PchOMOI*) Gens (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 22, scaffold_1:93185-94654) in *Pch IBWF 1315* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PchOMOI-HPT* unter Zuhilfenahme der Gibson Assembly-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PchOMOI* Gen sollte vollständig disruptiert werden. Hierfür wurden die flankierenden DNA-Sequenzbereiche des putativen *PchOMOI* Gens von jeweils 500 bp mit den Primerpaaren *GA_Pch_Fl1_o.-mox_f* + *GA_Pch_Fl1_o.-mox_r* und *GA_Pch_Fl2_o.-mox_f* + *GA_Pch_Fl2_o.-mox_r* (7.1.1), welche basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pch UCRPC4* designt wurden, ausgehend von der genomischen DNA des Stamms *Pch IBWF 1315* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Für die Amplifizierung der *HPT*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_Pch_HPT_o.-mox_f*+ *GA_Pch_HPT_o.-mox_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor pCB1636 als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix (2.3.6) der Firma NEB wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III linearisierte und dephosphorylierte pCAMBIA0380-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von *Pch IBWF 1315* verwendet.

Für die Komplementation des inaktivierten putativen Gens *PchOMOI* in der $\Delta PchomOI\#16$ -Mutante wurde der Komplementationsvektor *pSJ-komp PCHOMO-G418* verwendet, welcher ebenfalls über die Methode des Gibson Assembly (2.3.6) generiert worden ist. Hierfür wurde das *PchOMOI* Gen mit Hilfe der Primerpaare *GAII_PchOMOXI_komp_f* + *GAII_PchOMOXI_komp_r* (7.1.1), welche basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pch UCRPC4* designt wurden, über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Als *Template* diente die genomische DNA von *Pch IBWF 1315*. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde in das zuvor mit den Enzymen *BsrGI* und *PmII* linearisierte und dephosphorylierte *pSJ+GFP(G418_II)*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix der Firma NEB (2.3.6) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) und einer Sequenzierung des integrierten *orf* von *PchOMOI* verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von $\Delta PchomOI\#16$ eingesetzt.

7.2.2 *PchOMOII*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des zweiten putativ kodierenden L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase (*PchOMOII*) Gens (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 2772, scaffold_199:36922-38274) in *Pch IBWF 1315* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pSJ-PchOMOII-G418* unter Zuhilfenahme der *Gibson Assembly*-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PchOMOII* Gen sollte vollständig disruptiert werden. Hierfür wurden die flankierenden DNA-Sequenzbereiche des putativen *PchOMOII* Gens von jeweils 500 bp mit den Primerpaaren *GA_flank1_PchomoxII_f* + *GA_flank1_PchomoxII_r* und *GA_flank2_PchomoxII_f* + *GA_flank2_PchomoxII_r* (7.1.1), welche basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pch UCRPC4* designt wurden, ausgehend von der genomischen DNA des Stamms *Pch IBWF 1315* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Für die Amplifizierung der *G418*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_G418_PchomoxII_f* + *GA_G418_PchomoxII_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor *pCB1636* als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix der Firma NEB (2.3.9) wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *PstI* und *BglII* linearisierte und dephosphorylierte *pSJ+GFP(G418)*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von *Pch IBWF 1315* verwendet.

7.2.3 *PchOMOI/PchOMOI*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung der beiden putativ kodierenden L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase I JGI (*Pch UCRPC4* Protein ID: 22, scaffold_1:93185-94654) (*PchOMOI*) und II (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 2772, scaffold_199:36922-38274) (*PchOMOI*) Gene in *Pch IBWF 1315* wurde eine ATMT (2.3.9) von der Mutante $\Delta PchomOI\#24$ mit dem generierten Vektor *pCAMB-PchOMOI-HPT* (7.2.1) durchgeführt.

7.2.4 *PchNRPSI*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des putativ nichtribosomale Peptid-Synthetase (*PchNRPSI*) kodierenden Gens (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 21, scaffold_1:75606-90203) in *Pch IBWF 1315* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PchNRPSI-HPT* unter Zuhilfenahme der *Gibson Assembly*-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PchNRPSI* Gen sollte partial disruptiert werden. Hierfür wurde der *up-stream* flankierende DNA-Sequenzbereich des putativen *PchNRPSI* Gens von 500 bp mit den Primerpaaren *GA_Pch_F11_NRPS 8_f* + *GA_Pch_F11_NRPS 8_r* (7.1.1) und der Gensequenzabschnitt in 3000 bp Entfernung zum Startcodon des *PchNRPSI* Gens mit einer Größe von 500 bp mit den Primerpaaren *GA_Pch_F12_NRPS 8_f* + *GA_Pch_F12_NRPS 8_r* (7.1.1) ausgehend jeweils von der genomischen DNA des Stamms *Pch IBWF 1315* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Die Primer wurden basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pch UCRPC4* designt. Für die Amplifizierung der *HPT*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_Pch_HPT_NRPS 8_f* + *GA_Pch_HPT_NRPS 8_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor *pCB1636* als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA *Assembly Mix* der Firma NEB (2.3.6) wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III linearisierte und dephosphorylierte *pCAMBIA0380*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse verifiziert (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) und für die ATMT (2.3.9) von *Pch IBWF 1315* verwendet.

7.2.5 *PchNRPSII*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des putativ nichtribosomale Peptid-Synthetase (*PchNRPSII*) kodierenden Gens (JGI Protein *Pch UCRPC4* ID: 2770, scaffold_199:25887-31772) in *Pch IBWF 1315* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PchNRPSII-HPT* unter Zuhilfenahme der *Gibson Assembly*-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PchNRPSII* Gen sollte partial disruptiert werden. Hierfür wurde der *up-stream* flankierende DNA-Sequenzbereich des putativen *PchNRPSII* Gens von 500 bp mit den Primerpaaren

GA_flank1_PchNRPSIV_f + *GA_flank1_PchNRPSIV_r* (7.1.1) und der Gensequenzabschnitt in 3000 bp Entfernung zum Startcodon des *PchNRPSII* Gens mit einer Größe von 500 bp mit den Primerpaaren *GA_flank2_PchNRPSIV_f* + *GA_flank2_PchNRPSIV_r* (7.1.1) ausgehend jeweils von der genomischen DNA des Stamms *Pch IBWF 1315* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Die Primer wurden basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pch UCRPC4* designt. Für die Amplifizierung der *HPT*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_HPT_PchNRPSIV_f* + *GA_HPT_PchNRPSIV_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor *pCB1636* als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA *Assembly Mix* der Firma NEB (2.3.6) wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *PstI* und *HindIII* linearisierte und dephosphorylierte *pCAMBIA0380*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse verifiziert (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) und für die ATMT (2.3.9) von *Pch IBWF 1315* verwendet.

Für die Komplementation des inaktivierten putativen *PchNRPSII* Gens in der $\Delta PchnrpsII$ #41-Mutante wurde der Komplementationsvektor *pSJ-komp PCHNRPSII-G418* verwendet, welcher ebenfalls über die Methode des Gibson *Assembly* (2.3.6) generiert worden ist. Hierfür wurde das *PchNRPSII* Gen mit Hilfe der Primerpaare *GAII_PchNRPSII_komp_f* + *GAII_PchNRPSII_komp_r* (7.1.1), welche basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pch UCRPC4* designt wurden, über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Als *Template* diente die genomische DNA von *Pch IBWF 1315*. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde in das zuvor mit den Enzymen *BsrGI* und *PmlI* linearisierte und dephosphorylierte *pSJ+GFP(G418_II)*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) mit Hilfe des NEB® HiFi DNA *Assembly Mix* der Firma NEB (2.3.6) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit Restriktionsanalysen (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) und einer Sequenzierung des integrierten *orf* von *PchNRPSII* verifiziert und für die ATMT von $\Delta PchnrpsII$ #41 (2.3.9) eingesetzt.

7.2.6 *PchNRPSIII*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des putativ nichtribosomale Peptid-Synthetase (*PchNRPSIII*) kodierenden Gens (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 4211, scaffold_41:211084-225412) in *Pch IBWF 1315* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PchNRPSIII-HPT* unter Zuhilfenahme der Gibson *Assembly*-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PchNRPSIII* Gen sollte partial disruptiert werden. Hierfür wurde der *up-stream* flankierende DNA-Sequenzbereich des putativen *PchNRPSIII* Gens von 500 bp mit den

Primerpaaren *GA_flank1_PchNRPSII_f* + *GA_flank1_PchNRPSII_r* (7.1.1) und der Gensequenzabschnitt in 3000 bp Entfernung zum Startcodon des *PchNRPSIII* Gens mit einer Größe von 500 bp mit den Primerpaaren *GA_flank2_PchNRPSII_f*+ *GA_flank2_PchNRPSII_r* (7.1.1) ausgehend jeweils von der genomischen DNA des Stamms *Pch IBWF 1315* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Die Primer wurden basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pch UCRPC4* designt. Für die Amplifizierung der *HPT*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_HPT_PchNRPSII_f*+ *GA_HPT_PchNRPSII_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor *pCB1636* als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix der Firma NEB (2.3.6) wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *Pst*I und *Hind*III linearisierte (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) und dephosphorylierte *pCAMBIA0380*-Plasmid ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von *Pch IBWF 1315* verwendet.

7.2.7 *PchACEII*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des putativ Transacetylase II (*PchACEII*) kodierenden Gens (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 2769, scaffold_199:23180-24472) in *Pch IBWF 1315* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PchACEII-HPT* unter Zuhilfenahme der *Gibson Assembly*-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PchACEII* Gen sollte vollständig disruptiert werden. Hierfür wurden die flankierenden DNA-Sequenzbereiche des putativen *PchACEII* Gens von jeweils 500 bp mit den Primerpaaren *GA_flank1_PchACE Sc199_f* + *GA_flank1_PchACE Sc199_r* und *GA_flank2_PchACE Sc199_f* + *GA_flank2_PchACE Sc199_r* (7.1.1), welche basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pch UCRPC4* designt wurden, ausgehend von der genomischen DNA des Stamms *Pch IBWF 1315* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Für die Amplifizierung der *HPT*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_HPT_PchACE Sc199_f* + *GA_HPT_PchACE Sc199_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor *pCB1636* als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix der Firma NEB (2.3.6) wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *Pst*I und *Hind*III linearisierte und dephosphorylierte *pCAMBIA0380*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von *Pch IBWF 1315* verwendet.

7.2.8 *PchACEIII*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des putativ Transacetylase III (*PchACEIII*) kodierenden Gens (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: -, scaffold_41:208377-209819) in *Pch IBWF 1315* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PchACEIII-HPT* unter Zuhilfenahme der Gibson Assembly-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PchACEIII* Gen sollte vollständig disruptiert werden. Hierfür wurden die flankierenden DNA-Sequenzbereiche des putativen *PchACEIII* Gens von jeweils 500 bp mit den Primerpaaren *GA_Flank1_PchACEII_f* + *GA_Flank1_PchACEII_r* und *GA_Flank2_PchACEII_f* + *GA_Flank2_PchACEII_r* (7.1.1), welche basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pch UCRPC4* designt wurden, ausgehend von der genomischen DNA des Stamms *Pch IBWF 1315* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Für die Amplifizierung der *HPT*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_HPTRes_PchACEII_f* + *GA_HPTRes_PchACEII_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor *pCB1636* als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix der Firma NEB (2.3.6) wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *PstI* und *HindIII* linearisierte und dephosphorylierte *pCAMBIA0380*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von *Pch IBWF 1315* verwendet.

7.2.9 *PmiOMO*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des putativ L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase (*PmiOMO*) kodierenden Gens (JGI *Pmi UCRPA7* Protein ID: 6736, scaffold_509:107131-108534) in *Pmi IBWF 1189* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PmiOMO-HPT* unter Zuhilfenahme der Gibson Assembly-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PmiOMO* Gen sollte vollständig disruptiert werden. Hierfür wurden die flankierenden DNA-Sequenzbereiche des putativen *PmiOMO* Gens von jeweils 500 bp mit den Primerpaaren *GA_Pal_Fl1_o.-mox_f* + *GA_Pal_Fl1_o.-mox_r* und *GA_Pal_Fl2_o.-mox_f* + *GA_Pal_Fl2_o.-mox_r* (7.1.1), welche basierend auf der DNA-Sequenz von JGI *Pmi UCRPA7* designt wurden, ausgehend von der genomischen DNA des Stamms *Pmi IBWF 1189* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Für die Amplifizierung der *HPT*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_Pal_HPT_o.-mox_f* + *GA_Pal_HPT_o.-mox_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor *pCB1636* als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix der Firma NEB (2.3.6) wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *BamHI* und *HindIII*

linearisierte und dephosphorylierte *pCAMBIA0380*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von *Pmi IBWF 1189* verwendet.

Für die Komplementation des inaktivierten putativen *PmiOMO* Gens in der $\Delta Pmiomo\#14$ -Mutante wurde der Komplementationsvektor *pSJ-komp PmiOMO-G418* verwendet, welcher ebenfalls über die Methode des Gibson Assembly (2.3.6) generiert worden ist. Hierfür wurde das *PmiOMO* Gen mit Hilfe der Primerpaare *GAII_PmiOMOX_komp_f* + *GAII_PmiOMOX_komp_r* (7.1.1) über eine PCR (2.3.2.2), welche basierend auf der DNA-Sequenz von JGI *Pmi UCRPA7* designt wurden, amplifiziert. Als *Template* diente die genomische DNA von *Pmi IBWF 1189*. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde in das zuvor mit den Enzymen *BsrGI* und *PmlI* linearisierte und dephosphorylierte *pSJ+GFP(G418_II)*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix der Firma NEB (2.3.6) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalysen (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) und einer Sequenzierung des integrierten *orf* von *PmiOMO* verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von $\Delta Pmiomo\#14$ eingesetzt.

7.2.10 *PmiNRPSI*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des putativ nichtribosomale Peptid-Synthetase (*PmiNRPSI*) kodierenden Gens (JGI *Pmi UCRPA7* Protein ID: -, scaffold_509: 90516-105363) in *Pmi IBWF 1189* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PmiNRPSI-HPT* unter Zuhilfenahme der Gibson Assembly-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PmiNRPSI* Gen sollte partial disruptiert werden. Hierfür wurde der *up-stream* flankierende DNA-Sequenzbereich des putativen *PmiNRPSI* Gens von 500 bp mit den Primerpaaren *GA_flank1_PmiNRPSI_f* + *GA_flank1_PmiNRPSI_r* (7.1.1) und der Gensequenzabschnitt in 3000 bp Entfernung zum Startcodon des *PmiNRPSI* Gens mit einer Größe von 500 bp mit den Primerpaaren *GA_flank2_PmiNRPSI_f* + *GA_flank2_PmiNRPSI_r* (7.1.1) ausgehend jeweils von der genomischen DNA des Stamms *Pmi IBWF 1189* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Die Primer wurden basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pmi UCRPA7* designt. Für die Amplifizierung der *HPT*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_HPT_PmiNRPSI_f* + *GA_HPT_PmiNRPSI_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor *pCB1636* als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix der Firma NEB (2.3.6) wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *PstI* und *HindIII*

linearisierte und dephosphorylierte pCAMBIA0380-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von *Pmi IBWF 1189* verwendet.

7.2.11 *PmiNRPSII*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des putativ nichtribosomale Peptid-Synthetase (*PmiNRPSII*) kodierenden Gens (JGI *Pmi UCRPA7* Protein ID: -, scaffold_447: 50038-55947 bp) in *Pmi IBWF 1189* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PmiNRPSII-HPT* unter Zuhilfenahme der Gibson Assembly-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PmiNRPSII* Gen sollte partial disruptiert werden. Hierfür wurde der *up-stream* flankierende DNA-Sequenzbereich des putativen *PmiNRPSII* Gens von 500 bp mit den Primerpaaren *GA_flank1_PmiNRPSII_f* + *GA_flank1_PmiNRPSII_r* (7.1.1) und der Gensequenzabschnitt in 3000 bp Entfernung zum Startcodon des *PmiNRPSII* Gens mit einer Größe von 500 bp mit den Primerpaaren *GA_flank2_PmiNRPSII_f* + *GA_flank2_PmiNRPSII_r* (7.1.1) ausgehend jeweils von der genomischen DNA des Stamms *Pmi IBWF 1189* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Die Primer wurden basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pmi UCRPA7* designt. Für die Amplifizierung der *HPT*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_HPT_PmiNRPSII_f* + *GA_HPT_PmiNRPSII_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor *pCBI636* als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix der Firma NEB (2.3.6) wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *PstI* und *HindIII* linearisierte und dephosphorylierte *pCAMBIA0380*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von *Pmi IBWF 1189* verwendet.

7.2.12 *PmiACE*

Für die zielgerichtete Geninaktivierung des putativ Acyltransferase (*PmiACE*) kodierenden Gens (JGI *Pmi UCRPA7* Protein ID: 5313, scaffold_447:39769-40347) in *Pmi IBWF 1189* wurde zunächst ein Geninaktivierungsvektor *pCAMB-PmiACE-HPT* unter Zuhilfenahme der *Gibson Assembly*-Methode (2.3.6) generiert. Das putative *PmiACE* Gen sollte partial disruptiert werden. Hierfür wurde der *up-stream* flankierende DNA-Sequenzbereich des putativen *PmiACE* Gens von 500 bp mit den Primerpaaren *GA_PmiACE_flank1_f* + *GA_PmiACE_flank1_r* (7.1.1) und der Gensequenzabschnitt in 3000 bp Entfernung zum Startcodon des *PmiACE* Gens mit einer Größe von 500 bp mit den Primerpaaren

GA_PmiACE_flank2_f + *GA_PmiACE_flank2_r* (7.1.1) ausgehend jeweils von der genomischen DNA des Stamms *Pmi IBWF 1189* als *Template* über eine PCR (2.3.2.2) amplifiziert. Die Primer wurden basierend auf den DNA-Sequenz-Daten von JGI *Pmi UCRPA7* designt. Für die Amplifizierung der *HPT*-Resistenzkassette wurden die Primerpaare *GA_PmiACE_hpt_f* + *GA_PmiACE_hpt_r* (7.1.1) verwendet und der Vektor *pCB1636* als *Template* eingesetzt. Mit Hilfe des NEB® HiFi DNA Assembly Mix der Firma NEB (2.3.6) wurden die amplifizierten Fragmente in das zuvor mit den Enzymen *PstI* und *HindIII* linearisierte und dephosphorylierte *pCAMBIA0380*-Plasmid (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für Klonierungszwecke) ligiert. Der generierte Vektor wurde mit einer Restriktionsanalyse (2.3.3, Restriktionsverdauansatz für analytische Zwecke) verifiziert und für die ATMT (2.3.9) von *Pmi IBWF 1189* verwendet.

7.3 ITS-Sequenzen

Fomitiporia mediterranea IB-Her01-16:

TTTGAGGTCAAGGAGTCAAATGGTTTAAGGTAACAGAGTACCTGTCCGACATATA
GGCGGACTATTAGAAGCAGACAGTCTAAGTAAGCACTGTAGTGAATATAGATAG
AAAAC TATTACTACACCAAACAATGCGAACTACAGTCCAGCTAATGCATTTTAGA
GGAGCCGATACAGACAGTACCAGCATGTATATATTAACCTCCAAGTCCAAGCCCC
CTCCTTCAATTAAGAAAAAAGAGAATTGAGAATTACATGACACTCAAACAGGCAT
GCCCTCGGAATACCAAGGGGCGCAAGGGGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTG
AATTCTGCAATT

Roesleria subterranea IB-Rüd01-16:

CCTTAAAAAAGTTGGGGGTTGTTGGCCAGCATCCCTCCGGAACGTCTATAGCGAG
GAGATTTACTACGCTTAGAGCCGGACGGCACCGCCACTGATTTCAAGGCTCGCCC
AGAGGCGAAGCCCAAGACCCCGCAAGCGGGAGTGGTCAAATGACGCTCGAACA
GGCATGCCCTCGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATT
CACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATG
CCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTATTAATAGTACTCAGACG
ACACTACACTTCAGGGTTTGGGGTCCTTCGGCGGGCGGAGCCAGCGTGAGCCGG
TTGCCCGCGAGGGGCGGCCCGCCAAAGCAACAATATATAATACACAAGGGTGGGG
GGTTTCTACCCGTGAGGGCAGGAACTCTGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTA
CGGAAACCTTGTTA

7.4 Identifizierung der extrazellulären Siderophore

7.4.1 Identifizierung des putativen, extrazellulären Siderophors I aus *Phaeomoniella chlamydospora*

In der nachfolgenden Tabelle 33 ist die Auswertung der NMR-Analyse des putativen Siderophors I, welches aus der Kultivierung von *Pch CBS 229.95* in eisenlimitiertem Sundström-Medium (M10) isoliert worden war (3.1.1.1.1), zu entnehmen. Die NMR-Analyse wurde freundlicherweise vom [REDACTED] durchgeföhrt.

Tabelle 33: Auswertung der NMR-Analyse des putativen Siderophors I aus *Phaeomoniella chlamydospora CBS 229.95*. Durchgeföhrt wurde die Analyse vom Arbeitskreis von [REDACTED]. Gemessen in DMSO (600 MHz). (s: *singlet*, d: *doublet*, t: *triplet*, m: *multiplet*)

Position	δ H [ppm]	Multiplicity	J [Hz]	δ C [ppm]
1	-	-	-	171.0
2	2.60 2.54	d d	15.2 15.2	41.9
3	-	-	-	69.5
3-OH	4.96	s	-	-
3-CH ₃	1.19	s	-	27.3
4	1.92–1.81	m	-	39.0
5	4.35–4.22	m	-	62.5
7	-	-	-	169.5
8	4.03	t	6.2	51.5
8-NH ₂	8.40	s	-	-
9	1.79–1.69	m	-	27.1
10	1.68–1.54	m	-	21.7
11	3.58–3.49	m	-	46.0
N-OH	9.95	s	-	-

7.4.2 LC-MS/MS-Analyse zur Identifizierung putativer Siderophore

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Visualisierung des molekularen Spektral-Netzwerks über Cytoscape 3.7.1 (Abb. 47) und die MS/MS-Fragmentationsspektren über Xcalibur™ (Abb. 48) der LC-MS/MS-Analyse des Kulturfiltratextrakts aus der 14-tägigen Kultivierung unter Eisendefizienten Bedingungen von *Ela* gezeigt.

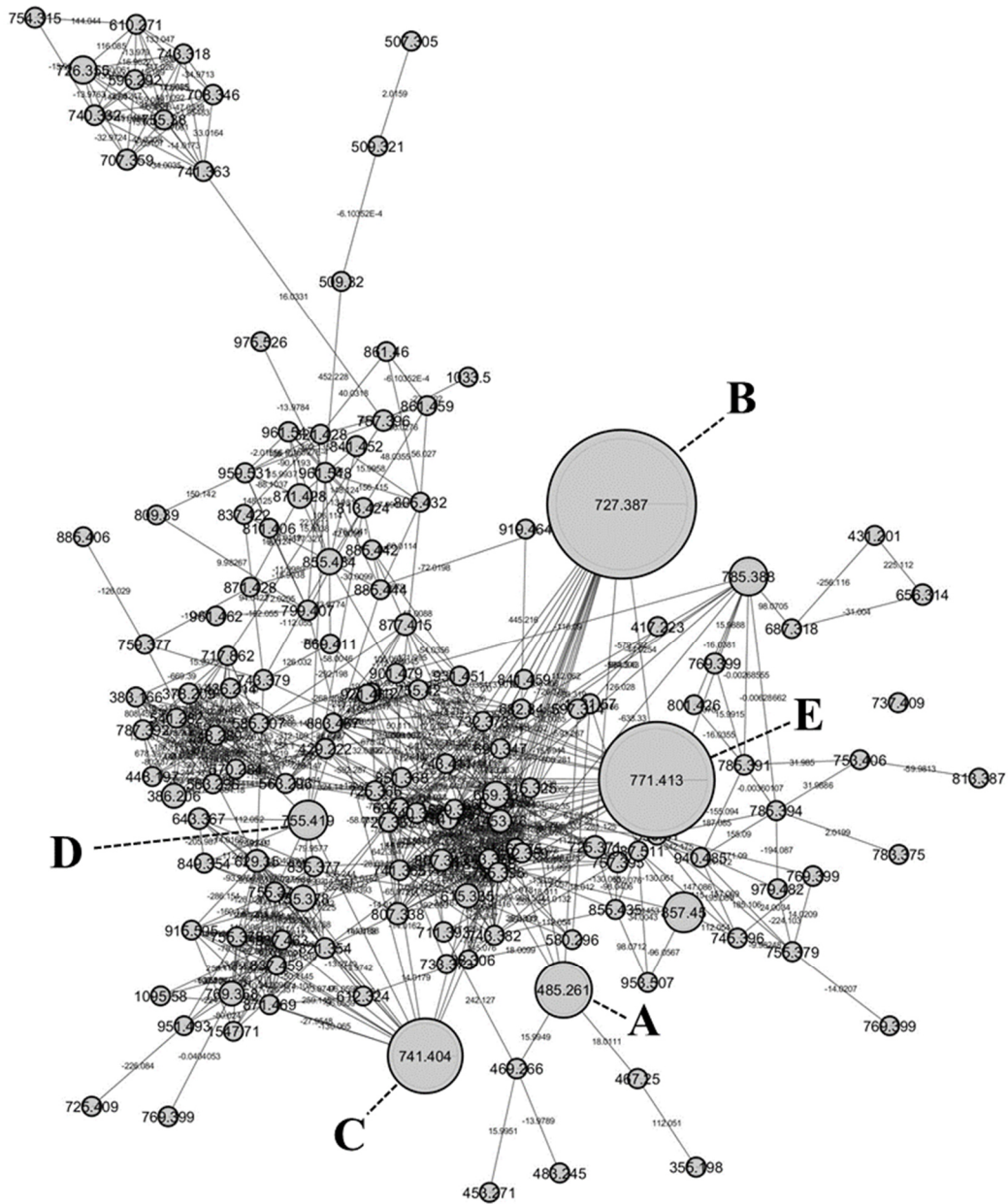


Abbildung 47: Visualisierung des molekularen Netzwerks von spektralen Similaritäten der MS/MS-Fragmentationsspektren zu verschiedenen Coprogen-Derivaten aus *Eutypa lata*. A: putative Dimerumsäure ($[M+H]^+$ m/z 485), B: Coprogen B ($[M+H]^+$ m/z 727), C: Methylcoprogen B ($[M+H]^+$ m/z 741), D: putatives Dimethylcoprogen B ($[M+H]^+$ m/z 755), E: Hydroxydimethylcoprogen B ($[M+H]^+$ m/z 771). LC-MS/MS-Analyse erfolgte von einem Kulturfiltratextrakt aus der 14-tägigen Kultivierung mit *Ela* unter eisendefizienten Bedingungen, die Visualisierung der LC-MS/MS-Analyse über Cytoscape 3.7.1 (Shannon *et al.*, 2003). Daten sind zu entnehmen aus <ftp://massive.ucsd.edu/MSV000082999/>.

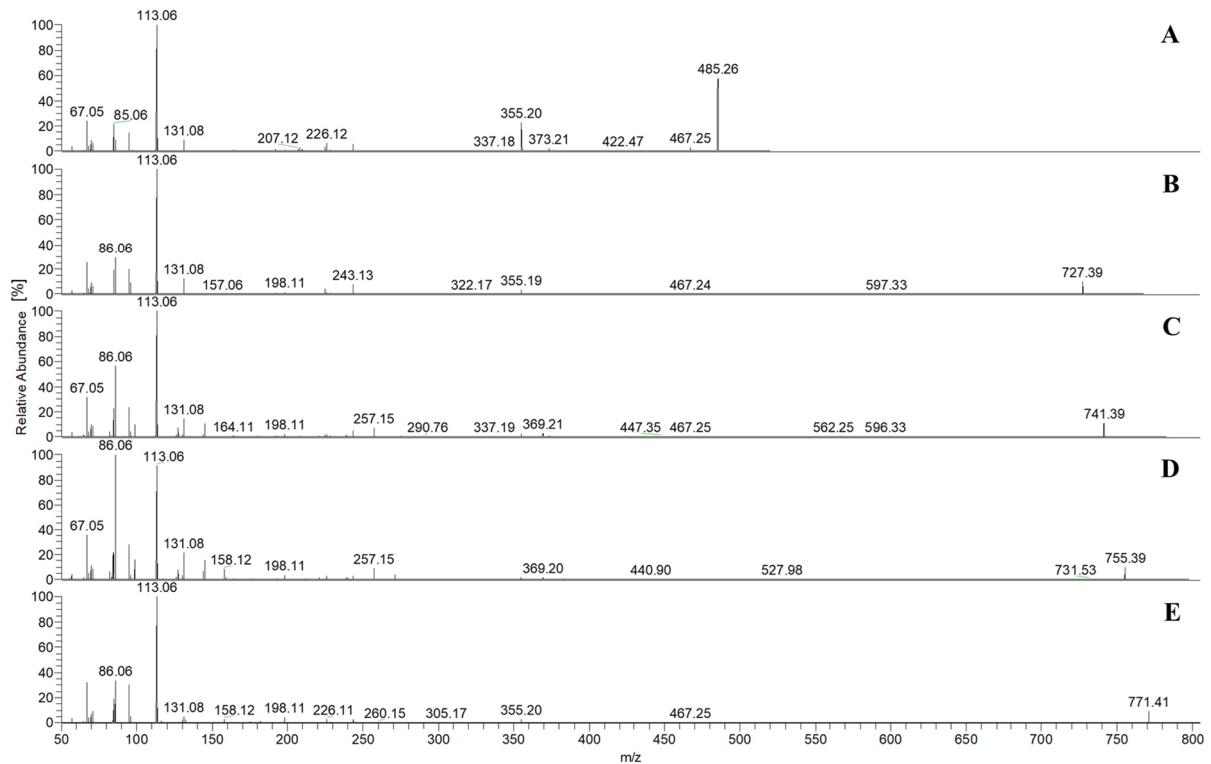


Abbildung 48: MS/MS-Fragmentationsspektren der detektierten Desferri-Formen der extrazellulären Siderophore aus *Eutypa lata*. Gezeigt sind die MS/MS-Fragmentationsspektren der putativen Siderophore Dimerumsäure (A) ($[M+H]^+$ m/z 485) und Dimethylcoprogen B (D) ($[M+H]^+$ m/z 755) und die identifizierten Siderophore Coprogen B (B) ($[M+H]^+$ m/z 727), Methylcoprogen B (C) ($[M+H]^+$ m/z 741) und Hydroxydimethylcoprogen B (E) ($[M+H]^+$ m/z 771). LC-MS/MS-Analyse erfolgte von einem Kulturfiltratextrakt aus der 14-tägigen Kultivierung mit *Ela* unter eisendefizienten Bedingungen. Daten zu entnehmen aus <ftp://massive.ucsd.edu/MSV000082999/>. Visualisierung erfolgte über Xcalibur™.

7.5 Detektion der intrazellulären Siderophore

Den nachfolgenden Abbildungen sind die HPLC-MS-Analysen (mit ESI und im SIM-Mode) zur Detektion der intrazellulären Siderophore aus *Pch IBWF 1315* (Abb. 49, 50), *Pmi IBWF 1189* (Abb. 51, 52) und *Ela IBWF 16012* (Abb. 53) zu entnehmen.

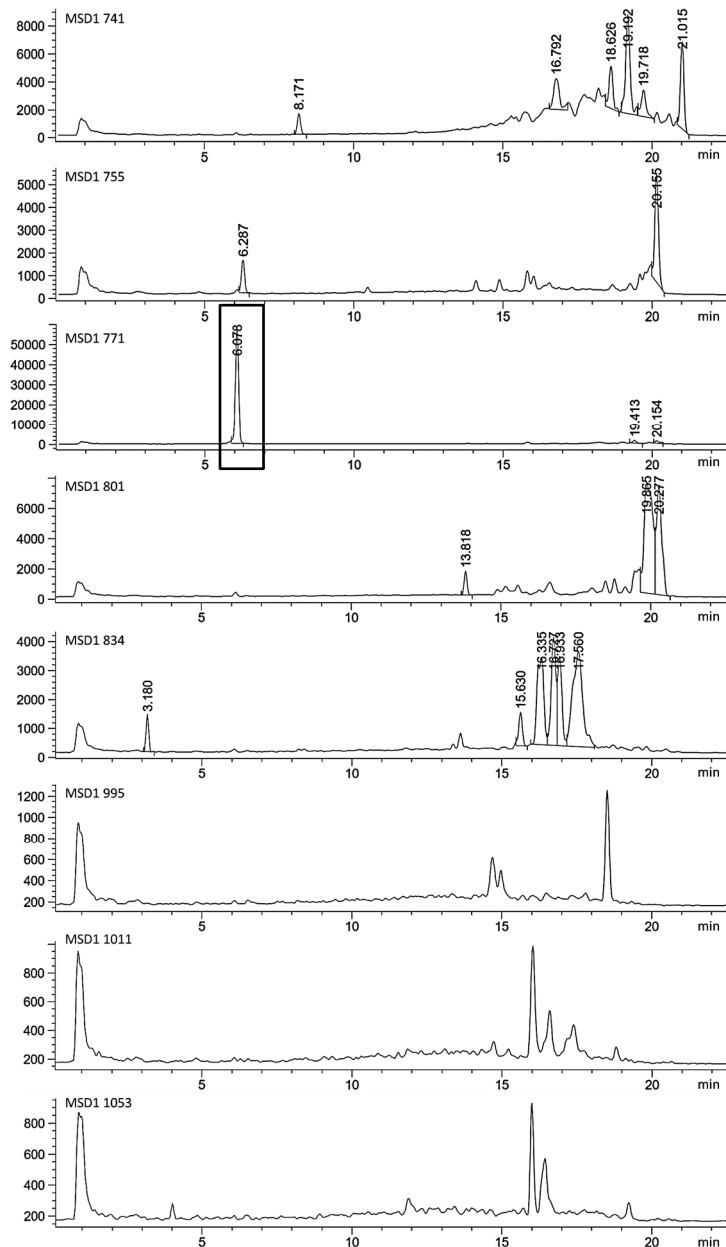


Abbildung 49: Detektion der intrazellulären Siderophore im Konidienextrakt aus der Kultivierung mit *Phaeoconiella chlamydospora*. Gezeigt sind die jeweiligen Massen-Chromatogramme aus der HPLC-MS-Analyse (ESI, SIM-Mode) des Konidienextrakts, welches aus der siebentägigen Kultivierung mit *Pch IBWF 1315* in eisensupplementiertem Sundström-Medium gewonnen wurde. Für die SIM-Messung wurden Ionen der folgenden Siderophor-Molekülmassen $[M-2H+Fe]^+$ selektioniert gemessen: m/z 741 (Ferrichrom), m/z 755 (Ferrichrom C), m/z 801 (Ferrichrysin), m/z 834 (Trihydroxyfusarinin C), m/z 995 (Asperchrom A), m/z 1011 (Asperchrom E/ Ferrirhodin/ Ferrirubin) und m/z 1053 (Ferrichrom A/ Asperchrom C). Ein eindeutiges Signal wurde für Ferricrocin (schwarz markiert) mit der Masse $[M-2H+Fe]^+$ von m/z 771 detektiert. (MSD1: mass selective detector 1).

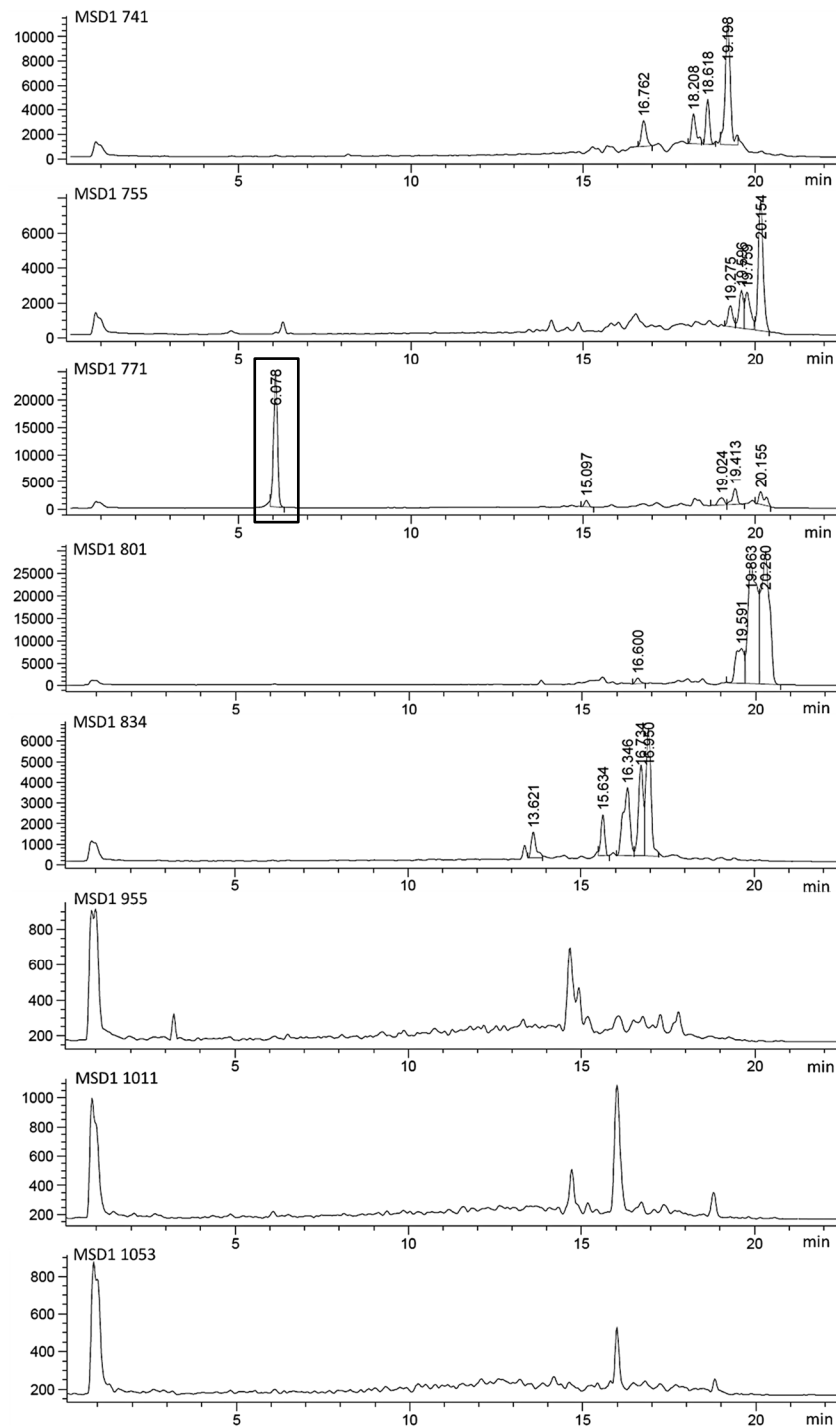


Abbildung 50: Detektion der intrazellulären Siderophore im Myzelextrakt aus der Kultivierung mit *Phaeomonella chlamydospora*. Gezeigt sind die jeweiligen Massen-Chromatogramme aus der HPLC-MS-Analyse (ESI, SIM-Mode) des Myzelextrakts, welches aus der siebentägigen Kultivierung mit *Pch IBWF 1315* in eisensupplementiertem Sundström-Medium gewonnen wurde. Für die SIM-Messung wurden Ionen der folgenden Siderophor-Molekülmassen $[M -2H+Fe]^+$ selektioniert gemessen: m/z 741 (Ferrichrom), m/z 755 (Ferrichrom C), m/z 801 (Ferrichrysin), m/z 834 (Trihydroxyfusarinin C), m/z 995 (Asperchrom A), m/z 1011 (Asperchrom E/ Ferrirhodin/ Ferrirubin) und m/z 1053 (Ferrichrom A/ Asperchrom C). Ein eindeutiges Signal wurde für Ferricrocin (schwarz markiert) mit der Masse $[M -2H+Fe]^+$ von m/z 771 detektiert. (MSD1: mass selective detector 1).

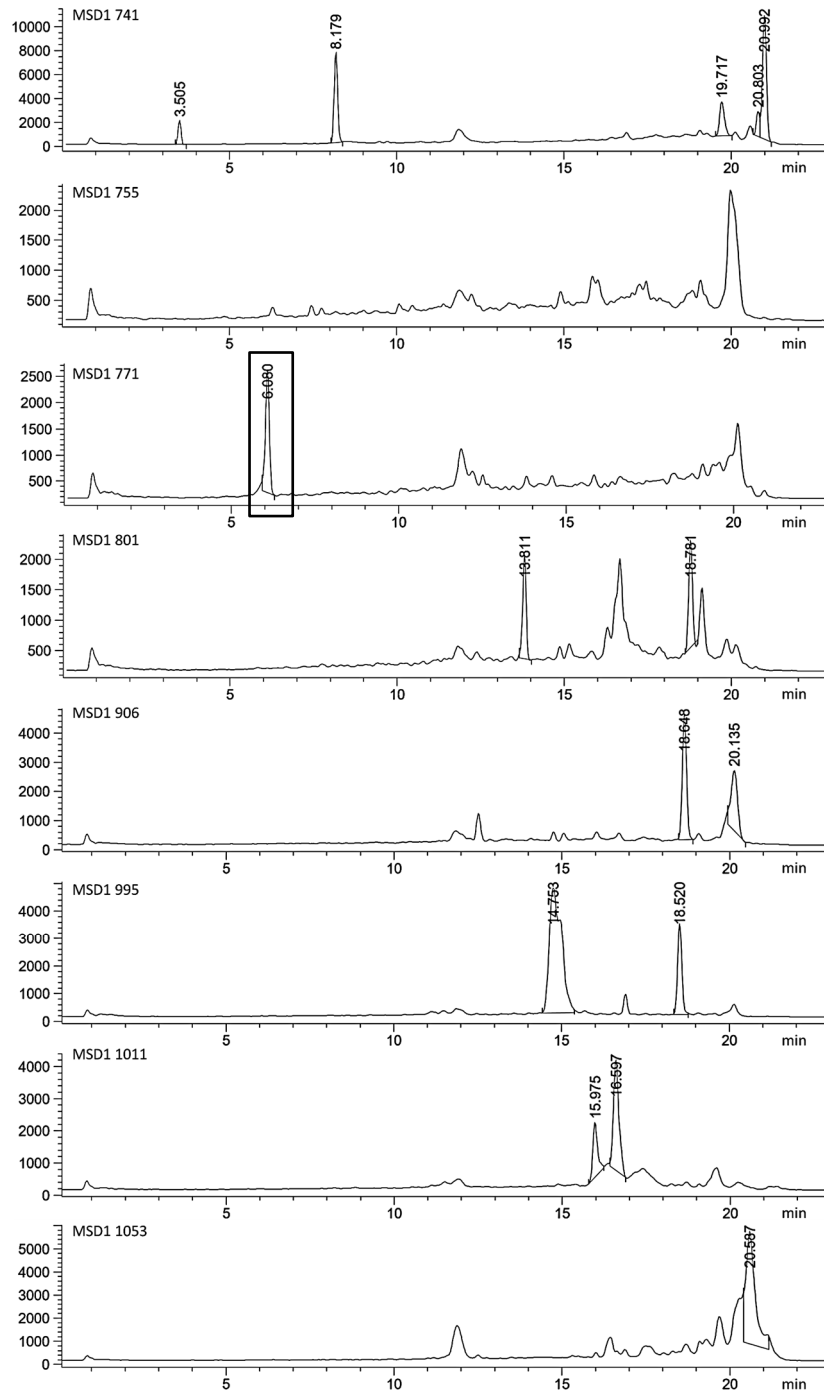


Abbildung 51: Detektion der intrazellulären Siderophore im Konidienextrakt aus der Kultivierung mit *Phaeoacremonium minimum*. Gezeigt sind die jeweiligen Massen-Chromatogramme aus der HPLC-MS-Analyse (ESI, SIM-Mode) des Konidienextrakts, welches aus der siebentägigen Kultivierung mit *Pmi IBWF 1189* in eisensupplementiertem Sundström-Medium gewonnen wurde. Für die SIM-Messung wurden Ionen der folgenden Siderophor-Molekülmassen $[M -2H+Fe]^+$ selektioniert gemessen: m/z 741 (Ferrichrom), m/z 755 (Ferrichrom C), m/z 801 (Ferrichrysin), m/z 906 (Triacetylfusarinin C), m/z 995 (Asperchrom A), m/z 1011 (Asperchrom E/ Ferrirhodin/ Ferrirubin) und m/z 1053 (Ferrichrom A/ Asperchrom C). Ein eindeutiges Signal wurde für Ferricrocin (schwarz markiert) mit der Masse $[M -2H+Fe]^+$ von m/z 771 detektiert. (MSD1: mass selective detector 1).

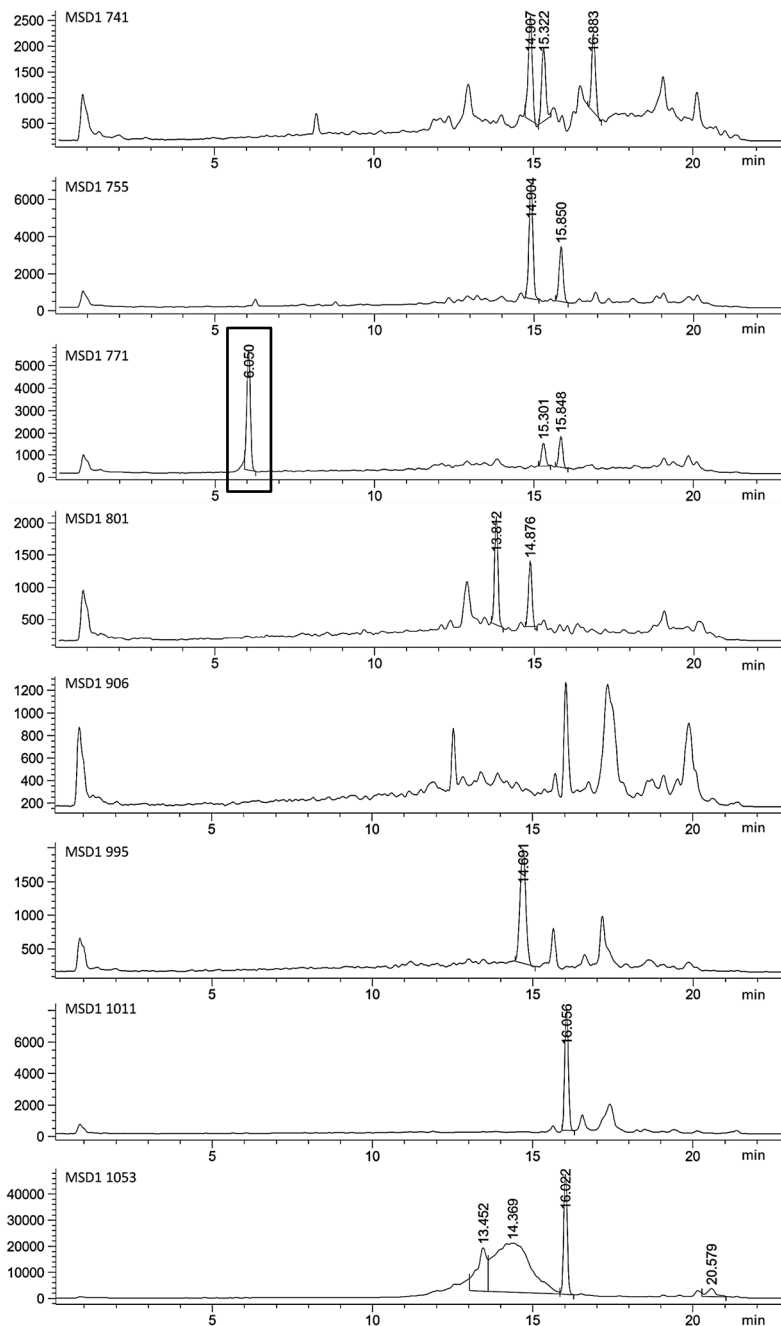


Abbildung 52: Detektion der intrazellulären Siderophore im Myzelextrakt aus der Kultivierung mit *Phaeoacremonium minimum*. Gezeigt sind die jeweiligen Massen-Chromatogramme aus der HPLC-MS-Analyse (ESI, SIM-Mode) des Myzelextrakts, welches aus der siebentägigen Kultivierung mit *Pmi IBWF 1189* in eisensupplementiertem Sundström-Medium gewonnen wurde. Für die SIM-Messung wurden Ionen der folgenden Siderophor-Molekülmassen $[M -2H+Fe]^+$ selektioniert gemessen: m/z 741 (Ferrichrom), m/z 755 (Ferrichrom C), m/z 801 (Ferrichrysin), m/z 906 (Triacetylfusarinin C), m/z 995 (Asperchrom A), m/z 1011 (Asperchrom E/ Ferrirhodin/ Ferrirubin) und m/z 1053 (Ferrichrom A/ Asperchrom C). Ein eindeutiges Signal wurde für Ferricrocin (schwarz markiert) mit der Masse $[M -2H+Fe]^+$ von m/z 771 detektiert. (MSD1: mass selective detector 1).

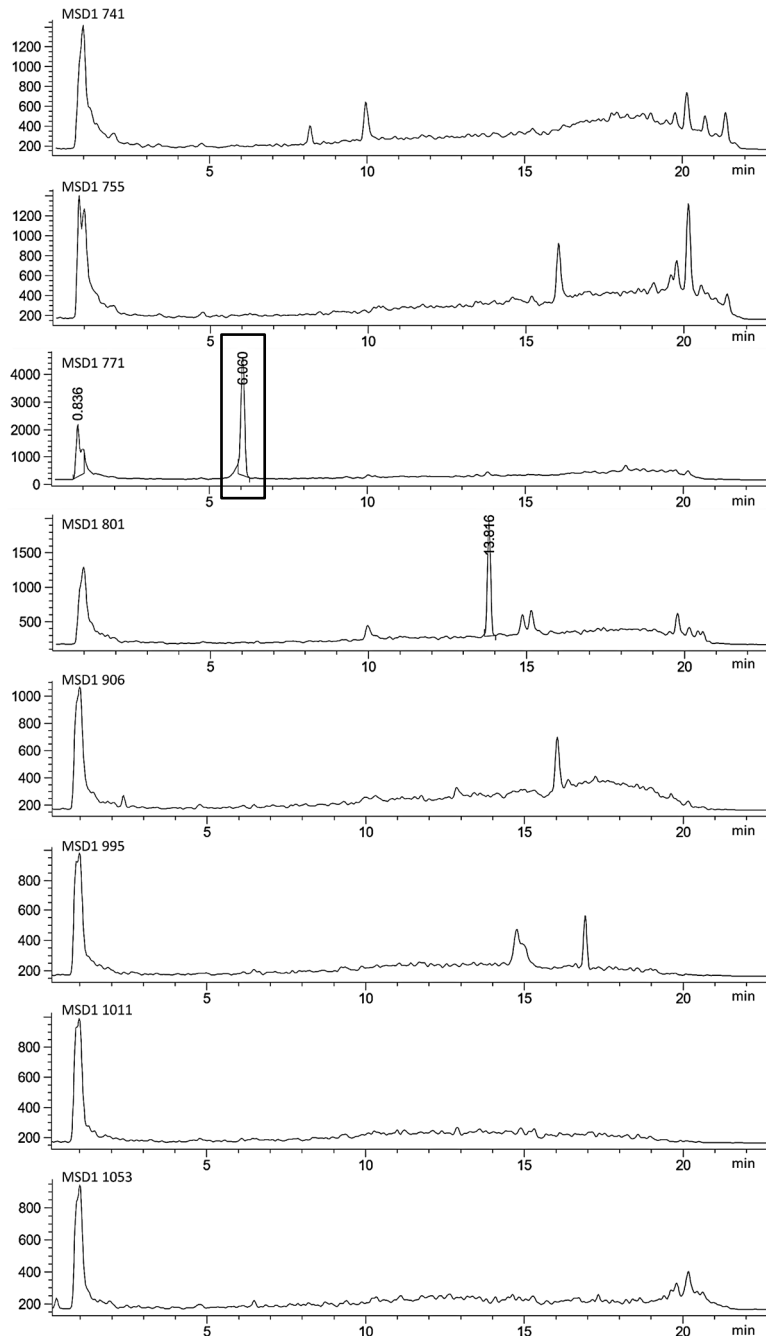


Abbildung 53: Detektion der intrazellulären Siderophore im Myzelextrakt aus der Kultivierung mit *Eutypa lata*. Gezeigt sind die jeweiligen Massen-Chromatogramme aus der HPLC-MS-Analyse (ESI, SIM-Mode) des Myzelextrakts, welches aus der siebentägigen Kultivierung mit *Ela IBWF 16012* in eisensupplementiertem Sundström-Medium gewonnen wurde. Für die SIM-Messung wurden Ionen der folgenden Siderophor-Molekülmassen $[M-2H+Fe]^+$ selektioniert gemessen: m/z 741 (Ferrichrom), m/z 755 (Ferrichrom C), m/z 801 (Ferrichrysin), m/z 906 (Triacetylfusarinin C), m/z 995 (Asperchrom A), m/z 1011 (Asperchrom E/ Ferrirhodin/ Ferrirubin) und m/z 1053 (Ferrichrom A/ Asperchrom C). Ein eindeutiges Signal wurde für Ferricrocin (schwarz markiert) mit der Masse $[M-2H+Fe]^+$ von m/z 771 detektiert. (MSD1: mass selective detector 1).

7.6 Identifizierung von Esca-assoziierten Siderophore in der Weinrebenpflanze

In der nachfolgenden Tabelle 34 ist die Zusammenstellung der untersuchten Weinrebenproben aufgeführt.

Tabelle 34: Auflistung der analysierten Weinrebenproben zur Detektion von Esca-assoziierten Siderophoren.

Bezeichnung	Weinrebenpflanze	Esca-Krankheitsbild	Herkunft/ Jahr
Blattprobe #1	Dornfelder-Weinrebe 1, SO4	asymptomatisch	Weingut Schäfer Herrnsheim, 2016
Blattprobe #2	Dornfelder-Weinrebe 2, SO4	asymptomatisch	
Blattprobe #3,	Dornfelder-Weinrebe 3, SO4	symptomatisch (chronisch)	
Blattprobe #4	Portugieser-Weinrebe 1, SO4	asymptomatisch	
Blattprobe #5	Portugieser-Weinrebe 2, SO4	symptomatisch (chronisch)	
Blattprobe #6	Portugieser-Weinrebe 3, SO4	symptomatisch (chronisch)	
Stammprobe #1A	Portugieser-Weinrebe 2, SO4	symptomatisch (chronisch)	
Stammprobe #1B	Portugieser-Weinrebe 2, SO4	symptomatisch (chronisch)	
Stammprobe #2A	Portugieser-Weinrebe 3, SO4	symptomatisch (akut)	
Stammprobe #2B	Portugieser-Weinrebe 3, SO4	symptomatisch (akut)	
Stammprobe #3	Portugieser-Weinrebe 13/188	symptomatisch	
Stammprobe #4	Portugieser-Weinrebe 16/18	symptomatisch	
Stammprobe #5	Portugieser-Weinrebe 14/18	asymptomatisch	
Blattprobe #7	Müller-Thurgau-Weinrebe 1, SO4	asymptomatisch	Weingut Schäfer Herrnsheim, 2019
Blattprobe #8	Müller-Thurgau-Weinrebe 2, SO4	symptomatisch (chronisch)	
Wurzelprobe #1	Müller-Thurgau-Weinrebe 2, SO4	symptomatisch (chronisch)	
Wurzelprobe #2	Müller-Thurgau-Weinrebe 3, SO4	symptomatisch (akut)	
Stammprobe #6	Müller-Thurgau-Weinrebe 2 A, SO4	symptomatisch (chronisch)	
Stammprobe #7	Müller-Thurgau-Weinrebe 2 B, SO4	symptomatisch (chronisch)	
Stammprobe #8	Müller-Thurgau-Weinrebe 2 C, SO4	symptomatisch (chronisch)	
Stammprobe #9	Müller-Thurgau-Weinrebe 3 A, SO4	symptomatisch (akut)	
Stammprobe #10	Müller-Thurgau-Weinrebe 3 B, SO4	symptomatisch (akut)	
Stammprobe #11	Müller-Thurgau-Weinrebe 3 C, SO4	symptomatisch (akut)	

7.7 Identifizierung der an der Siderophore-Biosynthese beteiligten Gene in Esca- und Wurzelfäule-assoziierten Pilzen

7.7.1 Homologievergleich der putativen Siderophor-Biosynthese-Gene aus *Phaeoconiella chlamydospora* UCRPC4, *Phaeoacremonium minimum* UCRPA7 und *Roesleria subterranea* IB-Rüd01-16 mit bekannten, identifizierten Genen der Siderophor-Biosynthese aus verschiedenen Organismen

7.7.1.1 *Phaeoconiella chlamydospora* UCRPC4

In der nachfolgenden Tabelle 35 sind die über die BLAST-Analyse von NCBI errechneten Sequenzidentitäts- und -similaritätswerte (Substitutionsmatrix BLOSUM62) anhand der Aminosäuresequenz (AS) der Gene *SIDC* (Afu1g17200) und *SIDD* (Afu3g03420) aus *Aspergillus fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007), *NPS2* (AY884187) und *NPS6* (AY884191) aus *Cochliobolus heterostrophus* (Lee *et al.*, 2005; Turgeon *et al.*, 2008) und *NPS2* (EYB30114.1)

und *NPS6* (EYB32861.1) aus *Fusarium graminearum* (Oide *et al.*, 2006; Tobiasen *et al.*, 2007), *SSM1* (MGG_04211) und *SSM2* (MGG_14767T0) aus *Magnaporthe oryzae* (Hof *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2009), *SID2* (AAB93493) aus *Ustilago maydis* (Yuan *et al.*, 2001; Oide *et al.*, 2007) und der AS der putativen NRPS-Genen *PchNRPSI*, *PchNRPSII* und *PchNRPSIII* aus *Pch UCRPC4*.

Tabelle 35: Homologievergleich zwischen putativen NRPS aus *Phaeoemoniella chlamydospora UCRPC4* und verschiedenen NRPS der Siderophor-Biosynthese aus den Organismen *Aspergillus fumigatus*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* und *Ustilago maydis*. Aufgeführt sind die ermittelten Identitäts (I)- und Similaritäts (S)-werte in Prozent aus der BLAST-Analyse von NCBI (Substitutionsmatrix BLOSUM62) mit der Aminosäuresequenz (AS) von ausgewählten NRPS-Genen, welche in der Siderophor-Biosynthese der genannten Pilze involviert sind, und der AS von putativen NRPS-Genen aus *Pch UCRPC4*.

		PchnrpsIp (ID 21)		PchnrpsIp (ID 2770)		PchnrpsIIIp (ID 4211)	
		I [%]	S [%]	I [%]	S [%]	I [%]	S [%]
Ferrichrom NRPS	SidCp (Afu1g17200, <i>A. fumigatus</i>)	25	44	26	43	45	61
	Nps2p (AY884187, <i>C. heterostrophus</i>)	37	55	26	45	26	44
	Nps2p (EYB30114.1, <i>F. graminearum</i>)	36	54	26	44	26	43
	Ssm1p (MGG_04211, <i>M. oryzae</i>)	36	53	27	44	26	43
	Sid2p (AAB93493, <i>U. maydis</i>)	26	43	25	44	30	49
Coprogen NRPS	Nps6p (AY884191, <i>C. heterostrophus</i>)	25	42	45	64	25	43
	Ssm2p (MGG_14767T0, <i>M. oryzae</i>)	36	53	41	58	26	43
Fusarinin NRPS	SidDp (Afu3g03420, <i>A. fumigatus</i>)	27	45	47	66	24	43
	Nps6p (XM_383923, <i>F. graminearum</i>)	27	44	46	63	28	46

7.7.1.2 *Phaeoacremonium minimum UCRPA7*

In der nachfolgenden Tabelle 36 sind die über die BLAST-Analyse von NCBI errechneten Identitäts- und Similaritätswerte anhand der Aminosäuresequenz (AS) der putativen NRPS-Gene *PmiNRPSI* und *PmiNRPSII* aus *Pmi UCRPA7* und der AS von ausgewählten, bekannten Genen der Siderophor-Biosynthese aus verschiedenen Organismen: *SIDC* (EDP56937.1) und *SIDD* (EDP53310.1) aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007), *NPS2* (AAX09984.1) und *NPS6* (AY884191) aus *C. heterostrophus* (Lee *et al.*, 2005; Turgeon *et al.*, 2008) und *NPS2*

(EYB30114.1) und *NPS6* (EYB32861.1) aus *F. graminearum* (Oide *et al.*, 2006; Tobiasen *et al.*, 2007), *SSM1* (XP_003719607.1) und *SSM2* (ABY26907.1) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2009), *SID2* (AAB93493.1) aus *U. maydis* (Yuan *et al.*, 2001; Oide *et al.*, 2007).

Tabelle 36: Homologievergleich zwischen putativen NRPS aus *Phaeoacremonium minimum* UCRPA7 und verschiedenen NRPS der Siderophor-Biosynthese aus den Organismen *Aspergillus fumigatus*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* und *Ustilago maydis*. Aufgeführt sind die ermittelten Identitäts (I)- und den Similaritäts (S)-werte aus der BLAST-Analyse von NCBI (Substitutionsmatrix BLOSUM62) mit der Aminosäuresequenz (AS) der putativen NRPS-Genen *PmiNRPSI* und *PmiNRPSII* mit der AS von ausgewählten NRPS-Genen, welche in der Siderophor-Biosynthese der genannten Pilze involviert sind.

		PminrpsIp		PminrpsIIp	
		I [%]	S [%]	I [%]	S [%]
Ferrichrom NRPS	SidCp (EDP56937.1, <i>A. fumigatus</i>)	26	44	27	42
	Nps2p (AAX09984.1, <i>C. heterostrophus</i>)	41	58	26	44
	Nps2p (EYB30114.1, <i>F. graminearum</i>)	45	62	27	43
	Ssm1p (MGG_04211, <i>M. oryzae</i>)	47	64	40	57
	Sid2p (AAB93493.1, <i>U. maydis</i>)	26	43	26	43
Coprogen NRPS	Nps6p (AY884191, <i>C. heterostrophus</i>)	26	45	42	61
	Ssm2p (MGG_14767T0, <i>M. oryzae</i>)	44	59	41	60
Fusarinin NRPS	SidDp (EDP53310.1, <i>A. fumigatus</i>)	27	45	45	62
	Nps6p (EYB32861.1, <i>F. graminearum</i>)	28	46	66	80

7.7.1.3 *Roesleria subterranea* IB-Rüd01-16

In der nachfolgenden Tabelle 37 und 38 sind die über die BLAST-Analyse von NCBI errechneten Identitäts- und Similaritätswerte anhand der Aminosäuresequenz (AS) der putativen L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase- und NRPS-Gene *RsubOMO* und *RsubNRPS* aus *Rsub IB-Rüd01-16* und der AS von ausgewählten, aus der Literatur bekannten Genen der Siderophor-Biosynthese aus verschiedenen Organismen: L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Gene *OMO1* (MGG_04212) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007) und *SIDA* (Afu2g07680) aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2004; Baltussen *et al.*, 2018) und NRPS-Gene *SIDC* (EDP56937.1) und *SIDD* (EDP53310.1) aus *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2007), *NPS2*

(*AAX09984.1*) und *NPS6* (AY884191) aus *C. heterostrophus* (Lee *et al.*, 2005; Turgeon *et al.*, 2008) und *NPS2* (EYB30114.1) und *NPS6* (EYB32861.1) aus *F. graminearum* (Oide *et al.*, 2006; Tobiasen *et al.*, 2007), *SSM1* (XP_003719607.1) und *SSM2* (ABY26907.1) aus *M. oryzae* (Hof *et al.*, 2007; Hof *et al.*, 2009), *SID2* (AAB93493.1) aus *U. maydis* (Yuan *et al.*, 2001; Oide *et al.*, 2007).

Tabelle 37: Homologievergleich von der putativen L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase aus *Roesleria subterranea* IB-Rüd01-16 mit SidAp aus *Aspergillus fumigatus* und Omo1p aus *Magnaporthe oryzae*. Aufgeführt sind die ermittelten Identitäts (I)- und Similaritäts (S)-werte in Prozent aus der BLAST-Analyse von NCBI (Substitutionsmatrix BLOSUM62) mit der Aminosäuresequenz (AS) von *OMO1* und *SIDA*, welche in der Siderophor-Biosynthese der genannten Pilze involviert sind, mit der AS von *RsubOMO* aus *Rsub* IB-Rüd01-16.

	Omo1p (MGG_04212)		SidAp (Afu2g07680)	
	I [%]	S [%]	I [%]	S [%]
Rsubomop	62	74	51	64

Tabelle 38: Homologievergleich zwischen putativen NRPS aus *Roesleria subterranea* IB-Rüd01-16 und verschiedenen NRPS der Siderophor-Biosynthese aus den Organismen *Aspergillus fumigatus*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* und *Ustilago maydis*. Aufgeführt sind die ermittelten Identitäts (I)- und den Similaritäts (S)-werte aus der BLAST-Analyse von NCBI (Substitutionsmatrix BLOSUM62) mit der Aminosäuresequenz (AS) des putativen NRPS-Gens *RsubNRPS* mit der AS von ausgewählten NRPS-Genen, welche in der Siderophor-Biosynthese der genannten Pilze involviert sind.

		Rsubnrpsp	
		I [%]	S [%]
Ferrichrom NRPS	SidCp (EDP56937.1, <i>A. fumigatus</i>)	26	44
	Nps2p (AAX09984.1, <i>C. heterostrophus</i>)	41	57
	Nps2p (EYB30114.1, <i>F. graminearum</i>)	38	56
	Ssm1p (MGG_04211, <i>M. oryzae</i>)	39	55
	Sid2p (AAB93493.1, <i>U. maydis</i>)	25	44
Coprogen NRPS	Nps6p (AY884191, <i>C. heterostrophus</i>)	25	43
	Ssm2p (MGG_14767T0, <i>M. oryzae</i>)	26	42
Fusarinin NRPS	SidDp (EDP53310.1, <i>A. fumigatus</i>)	27	44
	Nps6p (EYB32861.1, <i>F. graminearum</i>)	27	44

7.7.2 Southern Blot Analyse der generierten Geninaktivierungsmutanten

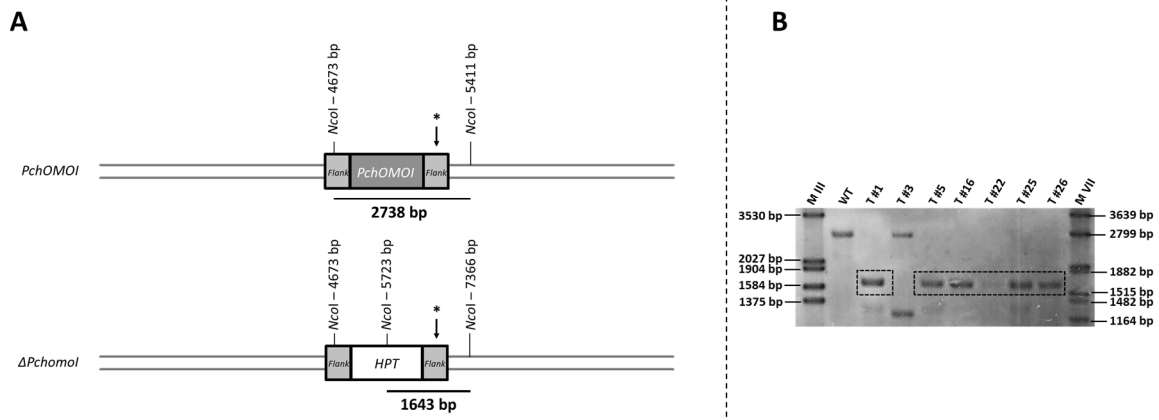


Abbildung 54: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta PchomOI$. A: Schematische Darstellung von dem Genlocus *PchOMOI* im Genom von *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) Wildtyp (WT) und $\Delta PchomOI$. Angegeben ist jeweils die DNA-Bindestelle der Sonde (*) sowie das verwendete Enzym zum jeweiligen Restriktionsverdau der genomischen DNA. B: Röntgenfilm der detektierten Hybridisierungssignale des Southern Blots. Schwarz markiert ist das Hybridisierungssignal zum Nachweis für die Geninaktivierung. M: DIG-labeled DNA molecular weight marker, WT: Wildtyp, T: Transformante.

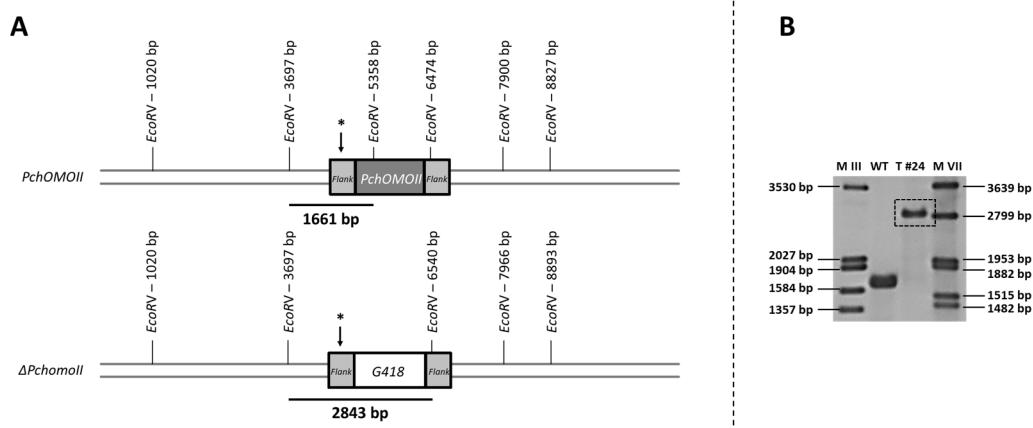


Abbildung 55: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta PchomOII$. A: Schematische Darstellung von dem Genlocus *PchOMOII* im Genom von *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) Wildtyp (WT) und $\Delta PchomOII$. Angegeben ist jeweils die DNA-Bindestelle der Sonde (*) sowie das verwendete Enzym zum jeweiligen Restriktionsverdau der genomischen DNA. B: Röntgenfilm der detektierten Hybridisierungssignale des Southern Blots. Schwarz markiert ist das Hybridisierungssignal zum Nachweis für die Geninaktivierung. M: DIG-labeled DNA molecular weight marker, WT: Wildtyp, T: Transformante.

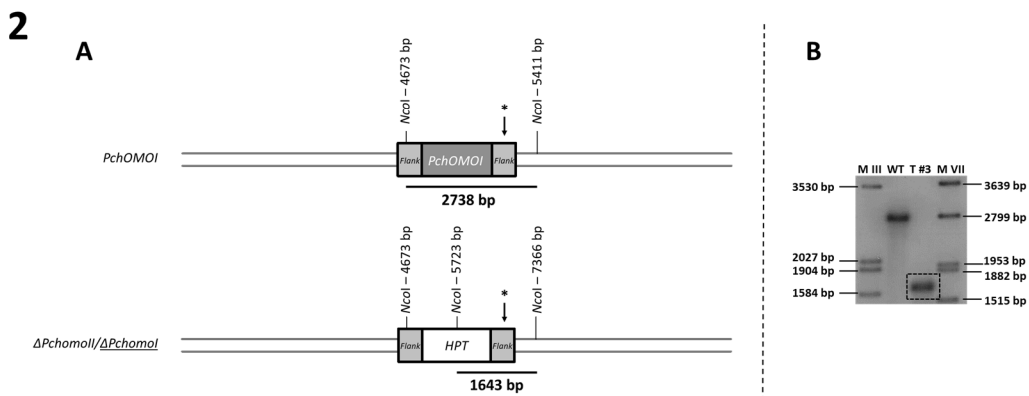
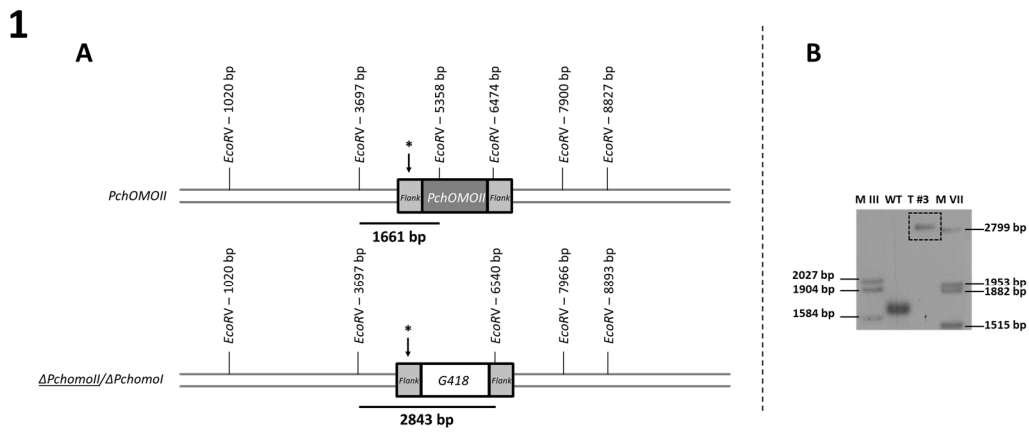


Abbildung 56: Southern Blot Analyse zur Bestätigung der homologen Rekombinationsereignisse im Genom der Doppel-Geninaktivierungsmutante $\Delta PchomoII/\Delta PchomoI$. A: Schematische Darstellung von den Genloci *PchOMOII* (1) und *PchOMOI* (2) im Genom von *Phaeomonieella chlamydozpora* (*Pch*) Wildtyp (WT) und $\Delta PchomoII/\Delta PchomoI$. Angegeben ist jeweils die DNA-Bindestelle der Sonde (*) sowie die verwendeten Enzyme zum jeweiligen Restriktionsverdau der genomischen DNA. B: Röntgenfilm der detektierten Hybridisierungssignale des Southern Blots. Schwarz markiert ist das Hybridisierungssignal zum Nachweis für die Geninaktivierung. M: *DIG-labeled DNA molecular weight marker*, WT: Wildtyp, T: Transformante.

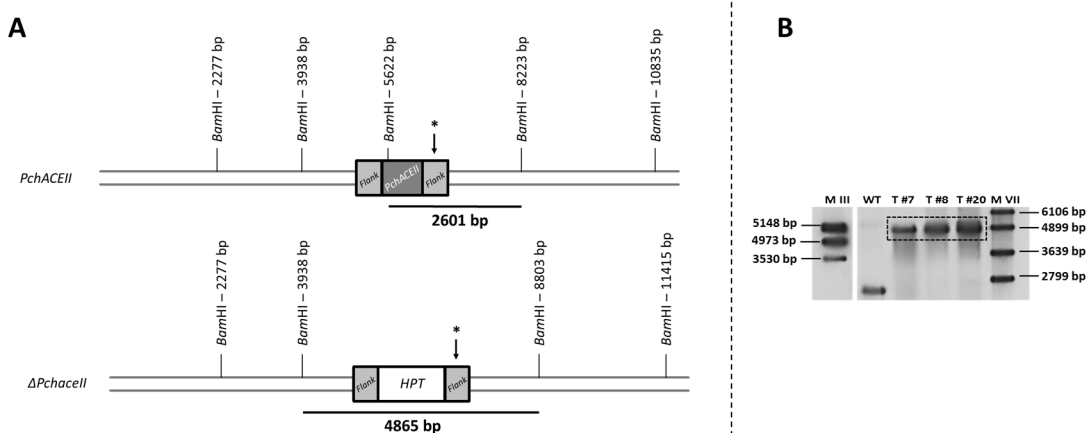


Abbildung 57: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta PchaceII$. A: Schematische Darstellung von dem Genlocus *PchACEII* im Genom von *Phaeomonieella chlamydozpora* (*Pch*) Wildtyp (WT) und $\Delta PchaceII$. Angegeben ist jeweils die DNA-Bindestelle der Sonde (*) sowie das verwendete Enzym zum jeweiligen Restriktionsverdau der genomischen DNA. B: Röntgenfilm der detektierten Hybridisierungssignale des Southern Blots. Schwarz markiert ist das Hybridisierungssignal zum Nachweis für die Geninaktivierung. M: *DIG-labeled DNA molecular weight marker*, WT: Wildtyp, T: Transformante.

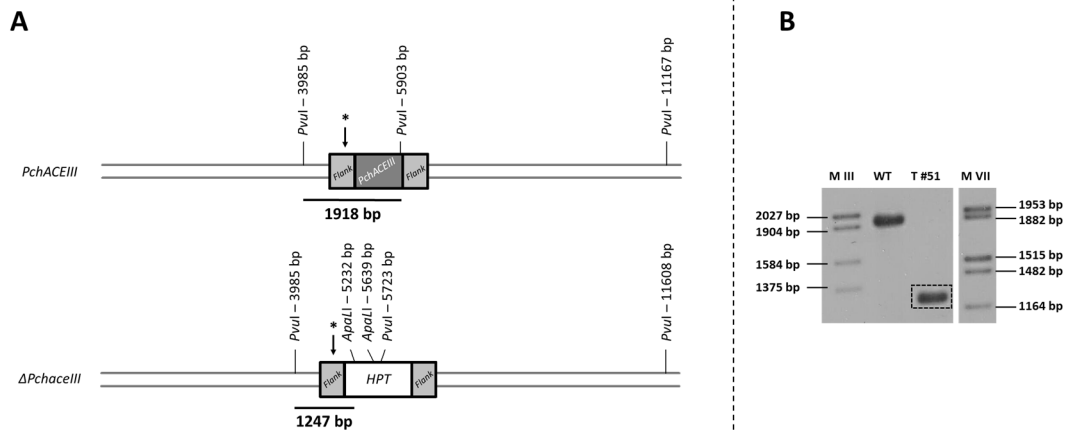


Abbildung 58: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta PchaceIII$. A: Schematische Darstellung von dem Genlocus *PchACEIII* im Genom von *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) Wildtyp (WT) und $\Delta PchaceIII$. Angegeben ist jeweils die DNA-Bindestelle der Sonde (*) sowie die verwendeten Enzyme zum jeweiligen Restriktionsverdau der genomischen DNA. B: Röntgenfilm der detektierten Hybridisierungssignale des Southern Blots. Schwarz markiert ist das Hybridisierungssignal zum Nachweis für die Geninaktivierung. M: *DIG-labeled DNA molecular weight marker*, WT: Wildtyp, T: Transformante.

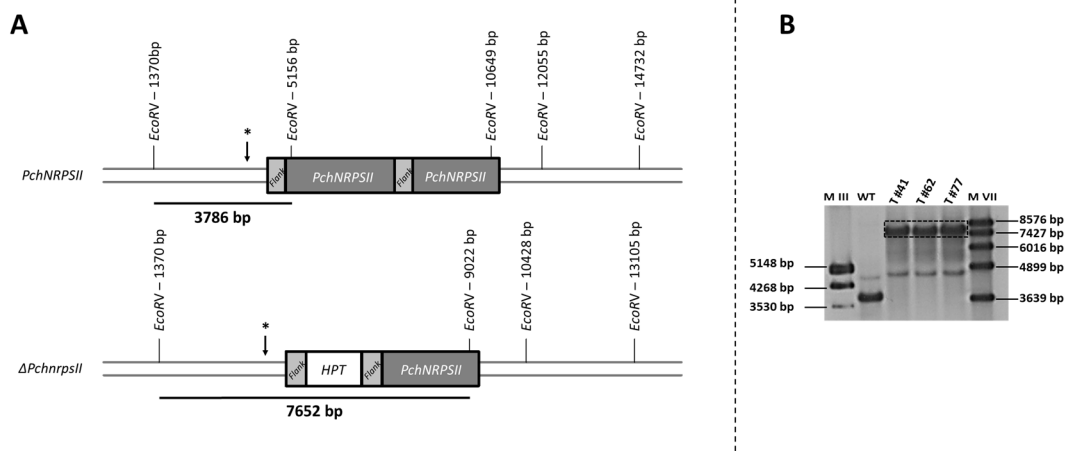


Abbildung 59: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta PchnrpsII$. A: Schematische Darstellung von dem Genlocus *PchNRPSII* im Genom von *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) Wildtyp (WT) und $\Delta PchnrpsII$. Angegeben ist jeweils die DNA-Bindestellen der Sonde (*) sowie das verwendete Enzym zum jeweiligen Restriktionsverdau der genomischen DNA. B: Röntgenfilm der detektierten Hybridisierungssignale des Southern Blots. Schwarz markiert ist das Hybridisierungssignal zum Nachweis für die Geninaktivierung. M: *DIG-labeled DNA molecular weight marker*, WT: Wildtyp, T: Transformante.

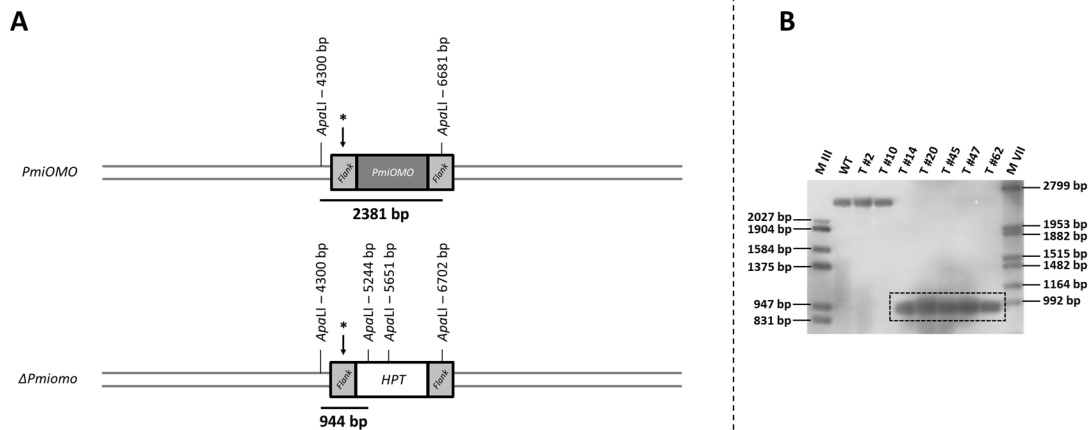


Abbildung 60: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta Pmiomo$. A: Schematische Darstellung von dem Genlocus *PmiOMO* im Genom von *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*) Wildtyp (WT) und $\Delta Pmiomo$. Angegeben ist jeweils die DNA-Bindestelle der Sonde (*) sowie das verwendete Enzym zum jeweiligen Restriktionsverdau der genomischen DNA. B: Röntgenfilm der detektierten Hybridisierungssignale des Southern Blots. Schwarz markiert ist das Hybridisierungssignal zum Nachweis für die Geninaktivierung. M: *DIG-labeled DNA molecular weight marker*, WT: Wildtyp, T: Transformante.

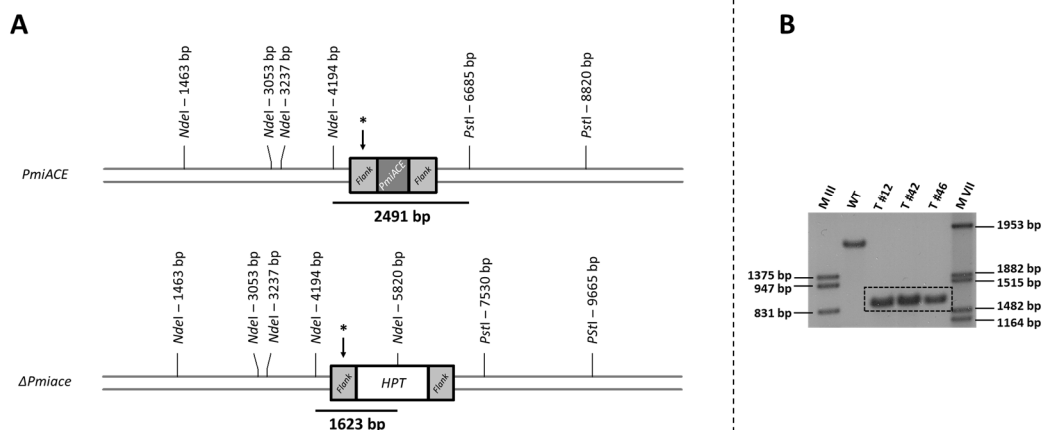


Abbildung 61: Southern Blot Analyse zur Bestätigung des homologen Rekombinationsereignisses im Genom der Geninaktivierungsmutante $\Delta Pmiace$. A: Schematische Darstellung von dem Genlocus *PmiACE* im Genom von *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*) Wildtyp (WT) und $\Delta Pmiace$. Angegeben ist jeweils die DNA-Bindestelle der Sonde (*) sowie die verwendeten Enzyme zum jeweiligen Restriktionsverdau der genomischen DNA. B: Röntgenfilm der detektierten Hybridisierungssignale des Southern Blots. Schwarz markiert ist das Hybridisierungssignal zum Nachweis für die Geninaktivierung. M: *DIG-labeled DNA molecular weight marker*, WT: Wildtyp, T: Transformante.

7.7.3 Nachweis der Komplementation der Geninaktivierungsmutanten über Kolonie-PCR

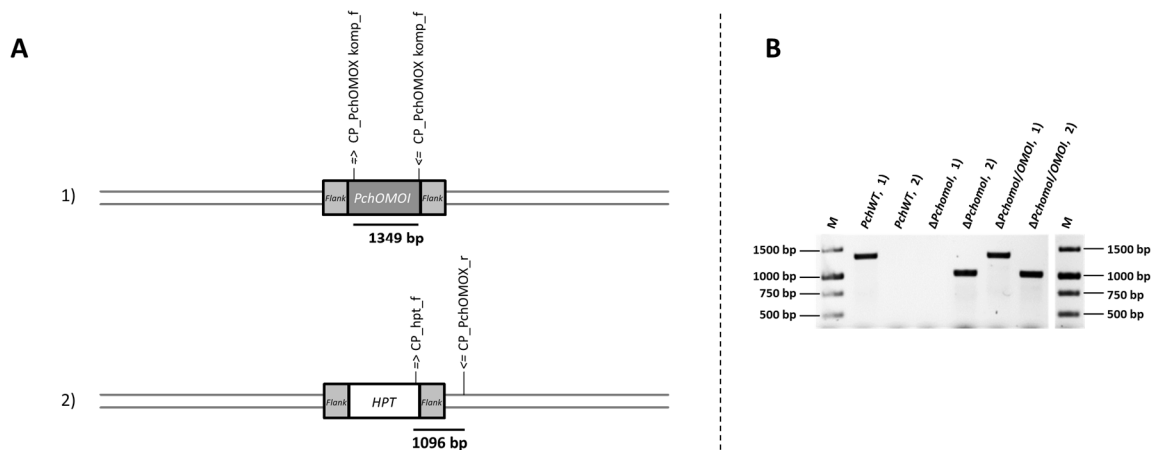


Abbildung 62: Nachweis der Komplementation von *PchOMOI* in $\Delta Pchomoi/OMOI$ über PCR. A: Schematische Darstellung des genomischen Gensequenzbereichs von *PchOMOI* (1) und dem deletierten *PchOMOI* durch die Resistenzkassette *HPT* (2) in *Pch*. Angegeben sind jeweils die DNA-Bindestellen der Oligonukleotidprimerpaare CP_PchOMOX komp_f, CP_PchOMOX komp_r an (1) und CP_hpt_f, CP_PchOMOX_r an (2) zur Bestätigung des Vorhandenseins oder des Verlustes der funktionellen Genamplifikation von (1) bzw. (2) in *PchWT*, $\Delta Pchomoi$ und $\Delta Pchomoi/OMOI$ über PCR. B: Dokumentation der gelelektrophoretisch, aufgetrennten PCR-Produkte nach der PCR mit der DNA von *PchWT*, $\Delta Pchomoi$ und $\Delta Pchomoi/OMOI$ zur Bestätigung des Vorhandenseins oder des Verlustes der funktionellen Genamplifikation von (1) und (2). M: *Gene Ruler™ 1 kb* Molekulargewichtsmarker.

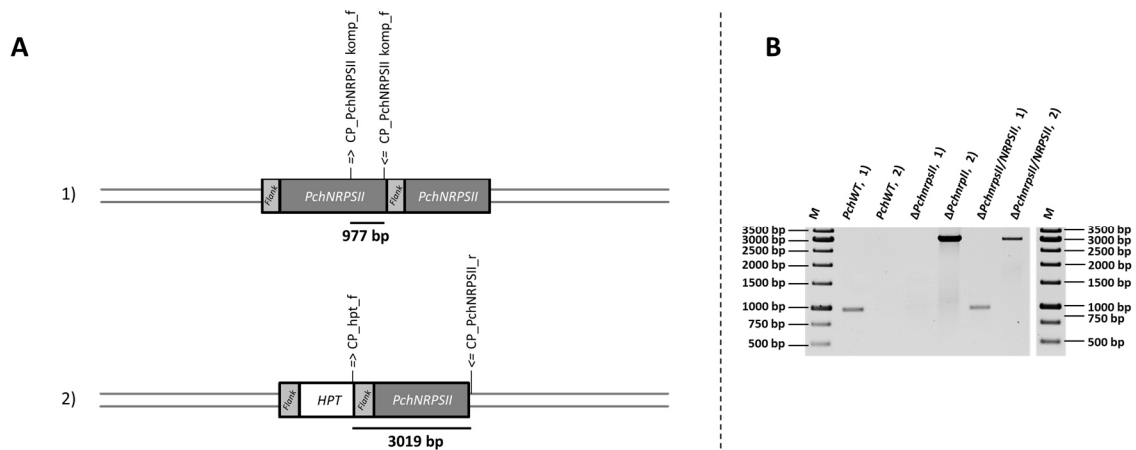


Abbildung 63: Nachweis der Komplementation von *PchNRPSII* in $\Delta PchnrpsII/NRPSII$ über PCR. A: Schematische Darstellung des genomischen Gensequenzbereichs *PchNRPSII* (1) und dem deletierten *PchNRPSII* durch die Resistenzkassette *HPT* (2) in *Pch*. Angegeben sind jeweils die DNA-Bindestellen der Oligonukleotidprimerpaare CP_PchNRPSII komp_f, CP_PchNRPSII komp_r an (1) und CP_hpt_f, CP_PchNRPSII_r an (2) zur Bestätigung des Vorhandenseins oder des Verlustes der funktionellen Genamplifikation von (1) bzw. (2) in *PchWT*, $\Delta PchnrpsII$ und $\Delta PchnrpsII/NRPSII$ über PCR. B: Dokumentation der gelelektrophoretisch, aufgetrennten PCR-Produkte nach der PCR mit der DNA von *PchWT*, $\Delta PchnrpsII$ und $\Delta PchnrpsII/NRPSII$ zur Bestätigung des Vorhandenseins oder des Verlustes der funktionellen Genamplifikation von (1) und (2). M: *Gene Ruler™ 1 kb* Molekulargewichtsmarker.

7.7.4 Siderophor-Produktion der generierten Mutanten von *Phaeoacremonium minimum* und *Phaeoacremonium chlamydospora*

7.7.4.1 Detektion der extrazellulären Siderophore der generierten Mutanten $\Delta PchomI$, $\Delta PchomI/OMOI$, $\Delta PchnrpsII$ und $\Delta PchnrpsII/NRPSII$

Den nachfolgenden Abbildungen 64 und 65 sind die HPLC-MS-Analysen (ESI, SIM-Mode) zur Detektion der extrazellulären Siderophore der generierten Mutanten $\Delta PchomI$ und $\Delta PchnrpsII$, der Komplementationsmutanten $\Delta PchomI/OMOI$ und $\Delta PchnrpsII/NRPSII$ sowie des Wildtyps *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) zu entnehmen.

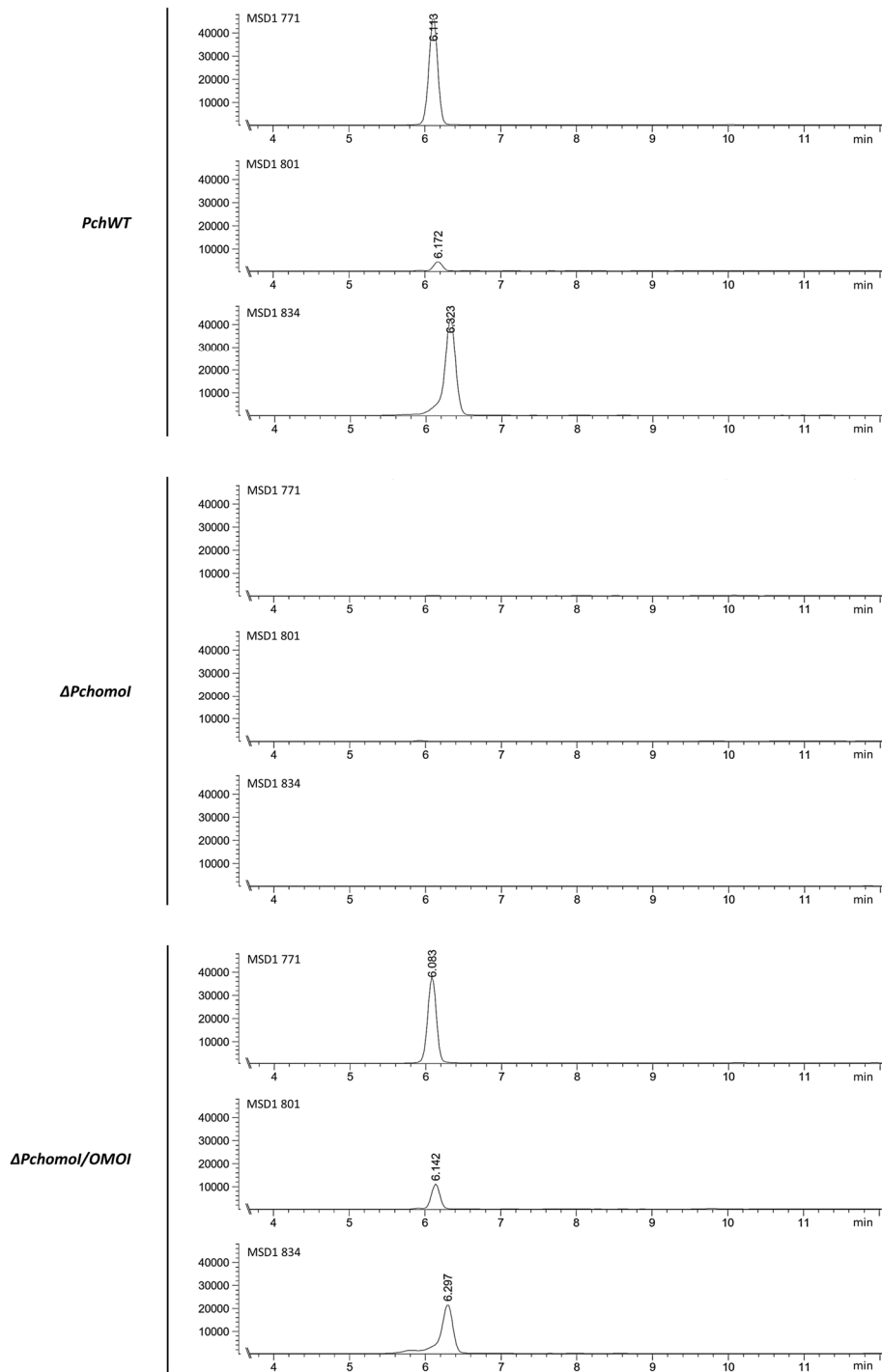


Abbildung 64: Detektion extrazellulärer Siderophore von *PchWT*, $\Delta Pchomol$ und $\Delta Pchomol/OMOI$. Gezeigt sind die Massen-Chromatogramme aus der HPLC-MS-Analyse (ESI, SIM-Mode) der Kulturfiltratextrakte, welche aus der jeweiligen siebentägigen Kultivierung mit den Mutanten $\Delta Pchomol$, $\Delta Pchomol/OMOI$ und dem Wildtyp *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) in eisendefizientem Sundström-Medium gewonnen wurden. Für *PchOMOI* konnten keine signifikanten Signale für Ferricrocin (MSD1 771), Ferrichrysin (MSD1 801) oder Trihydroxyfusarinin C (MSD1 834) detektiert werden. Für *PchWT* und die Komplementationsmutante $\Delta Pchomol/OMOI$ wurde jeweils ein signifikantes Signal für die genannten Siderophore vorgefunden. (MSD1: mass selective detector 1).

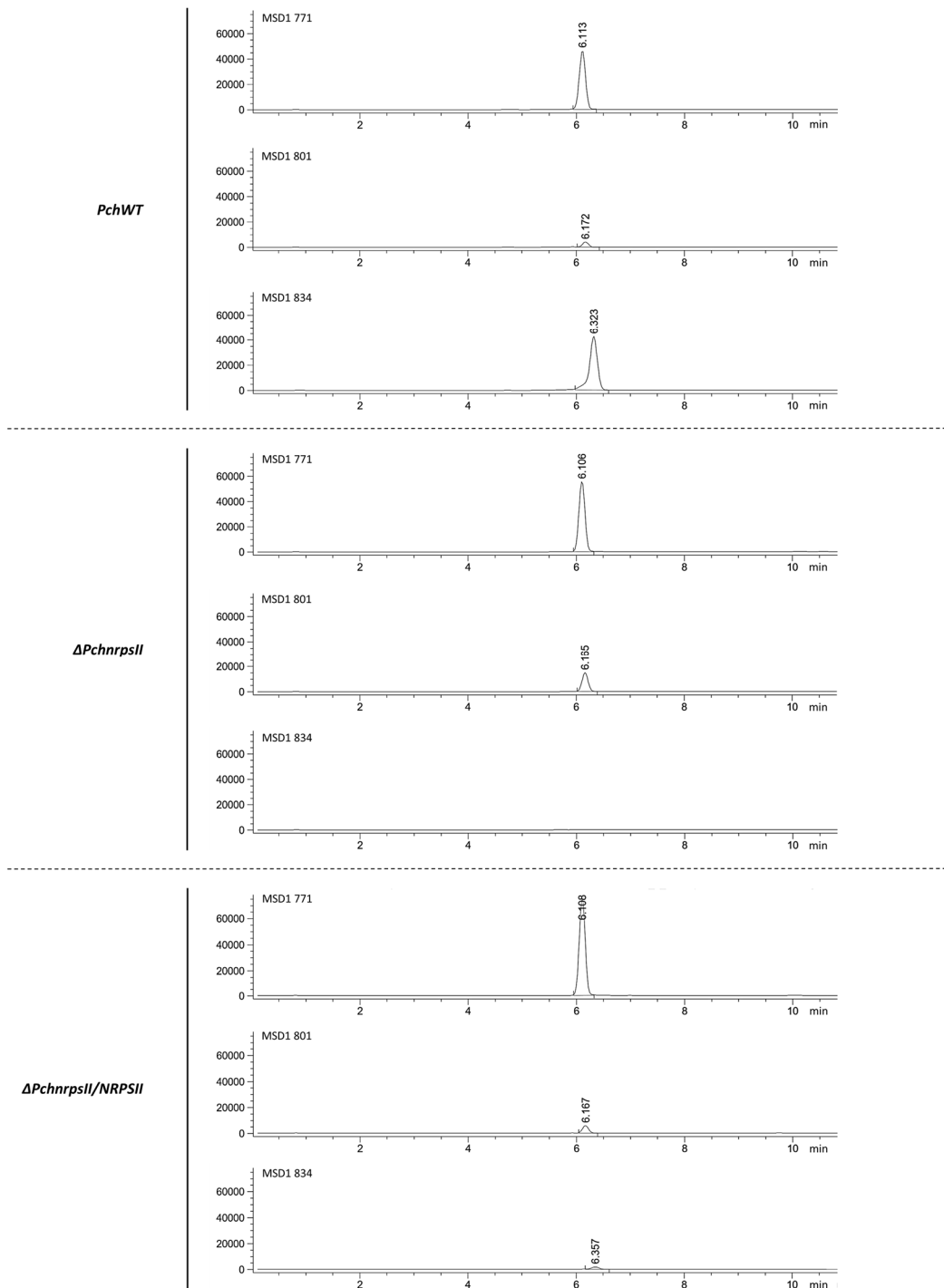


Abbildung 65: Detektion extrazellulärer Siderophore von *PchWT*, $\Delta PchnrpsII$ und $\Delta PchnrpsII/NRPSII$. Gezeigt sind die Massen-Chromatogramme aus der HPLC-MS-Analyse (mit ESI, im SIM-Mode) der Kulturfiltratextrakte, welche aus der jeweiligen siebentägigen Kultivierung mit den Mutanten $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchnrpsII/NRPSII$ und dem Wildtyp *PchIBWF 1315* (*PchWT*) in eisendefizientem Sundström-Medium gewonnen wurden. Für *PchNRPSII* konnte kein signifikantes Signal für Trihydroxyfusarinin C (MSD1 834) detektiert werden. Für *PchWT* und die Komplementationsmutante $\Delta PchnrpsII/NRPSII$ wurde jeweils ein Signal für das genannte Siderophore vorgefunden. Sowohl Ferricrocin (MSD1 771) als auch Ferrichrysin (MSD1 801) wurden in allen Extrakten festgestellt. (MSD1: mass selective detector 1).

7.7.4.2 Detektion der intrazellulären Siderophore der generierten Mutanten der Siderophor-Biosynthese

Den nachfolgenden Abbildungen sind die HPLC-MS-Analysen (ESI, SIM-Mode) zur Detektion der intrazellulären Siderophore der generierten Mutanten $\Delta PchomOI$, $\Delta PchomOI/OMOI$, $\Delta PchomOII$, $\Delta PchomOII/\Delta PchomOI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchnrpsII/NRPSII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ sowie der Wildtyp *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) (Abb. 66) und die generierten Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ und der Wildtyp *Pmi IBWF 1189* (Abb. 67) zu entnehmen.

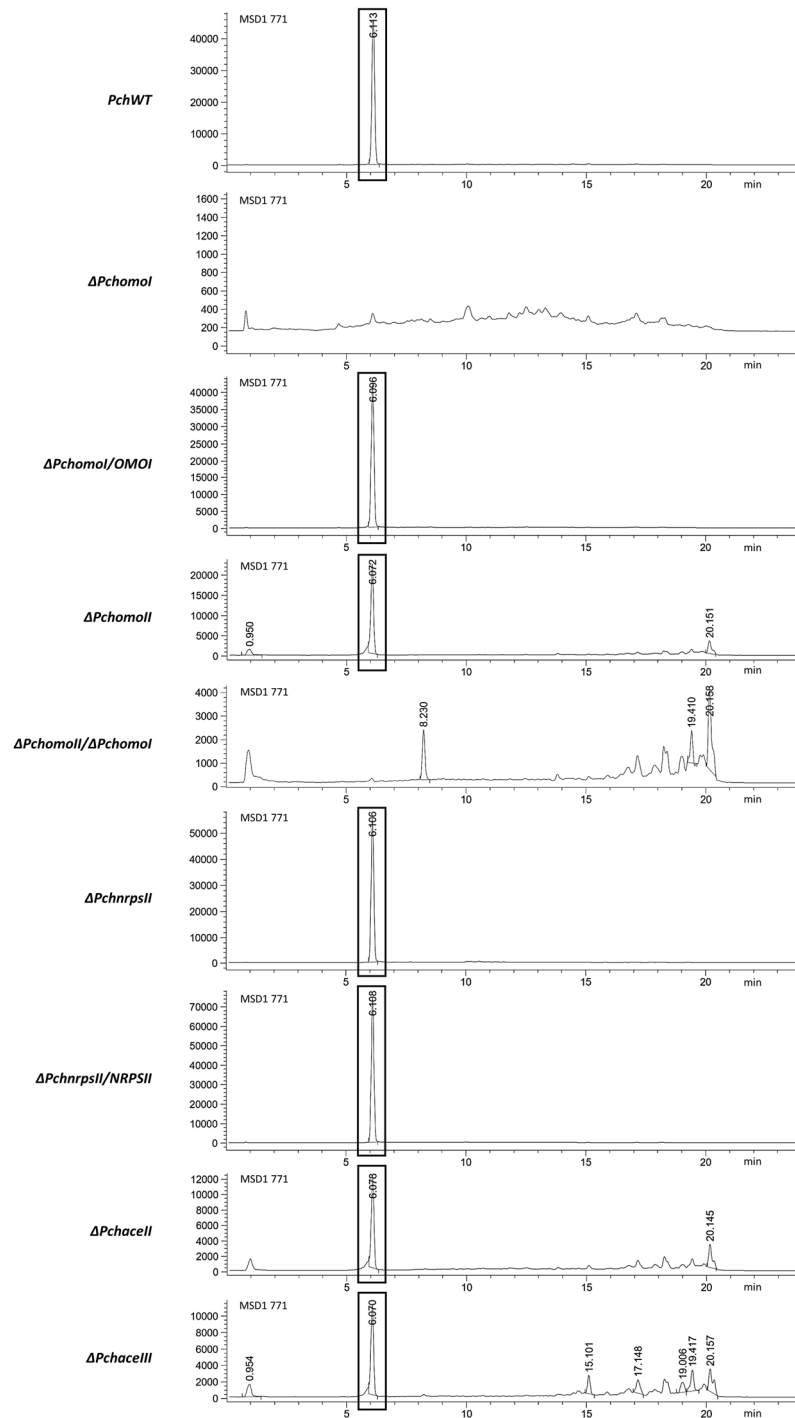


Abbildung 66: Detektion intrazellulärer Siderophore der zur Siderophor-Biosynthese-Analyse generierten Mutanten aus *Phaeomonella chlamydozoora*. Gezeigt sind die Massen-Chromatogramme aus der HPLC-MS-Analyse (mit ESI, im SIM-Mode) der Myzelextrakte, welche aus der jeweiligen siebentägigen Kultivierung mit den Mutanten $\Delta Pchomol$, $\Delta Pchomol/OMOI$, $\Delta PchomolII$, $\Delta PchomolII/\Delta PchomolI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchnrpsII/NRPSII$, $\Delta PchaceII$, $\Delta PchaceIII$ und dem Wildtyp *Pch* IBWF 1315 (*PchWT*) in eisensupplementiertem Sundström-Medium gewonnen wurden. Für alle Mutanten, in Ausnahme von $\Delta Pchomol$ und $\Delta PchomolII/\Delta PchomolI$, und für den Wildtyp *PchWT* wurde ein signifikantes Signal für Ferricrocin (schwarz markiert) mit der Masse von m/z 771 [$M - 2H + Fe$]⁺ (MSD1 771) detektiert. (MSD1: mass selective detector 1).

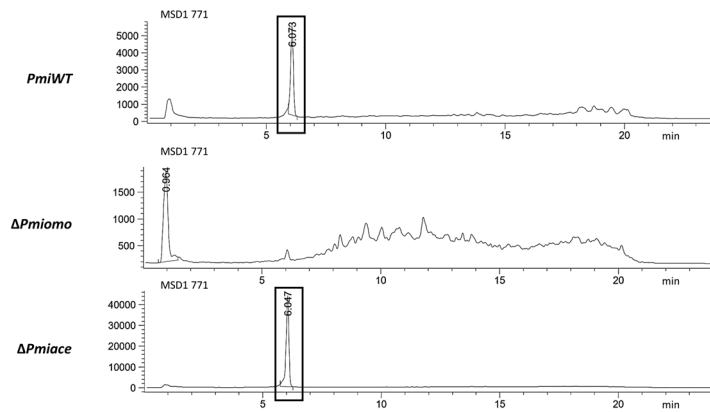


Abbildung 67: Detektion intrazellulärer Siderophore der zur Siderophor-Biosynthese-Analyse generierten Mutanten aus *Phaeoacremonium minimum*. Gezeigt sind die Massen-Chromatogramme aus der HPLC-MS-Analyse (mit ESI, im SIM-Mode) der Myzelextrakte, welche aus der jeweiligen siebentägigen Kultivierung mit den Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$, sowie der Wildtyp *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*) in eisensupplementiertem Sundström-Medium gewonnen wurden. Für *PmiWT* und $\Delta Pmiace$ wurde ein eindeutiges Signal für Ferricrocin (schwarz markiert) mit der Masse von m/z 771 [$M - 2H + Fe$]⁺ (MSD1 771) detektiert. Für $\Delta Pmiomo$ wurde kein signifikantes Signal vorgefunden. (MSD1: mass selective detector 1).

7.7.5 Phänotypische Charakterisierung der „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese aus *Phaeomoniella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum*

7.7.5.1 Analyse des Wachstumsverhalten auf HMG-Festmedium

Den nachfolgenden Abbildungen 68 und 69 können exemplarisch das Wachstumsverhalten der „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Pch* ($\Delta PchomoI$, $\Delta PchomoII$, $\Delta PchomoII/\Delta PchomoI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$, $\Delta PchaceIII$) und *Pmi* ($\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$) sowie der Referenzstämme *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) für *Pch* und *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*) für *Pmi* nach 24-tägiger Kultivierung auf HMG-Festmedium entnommen werden.

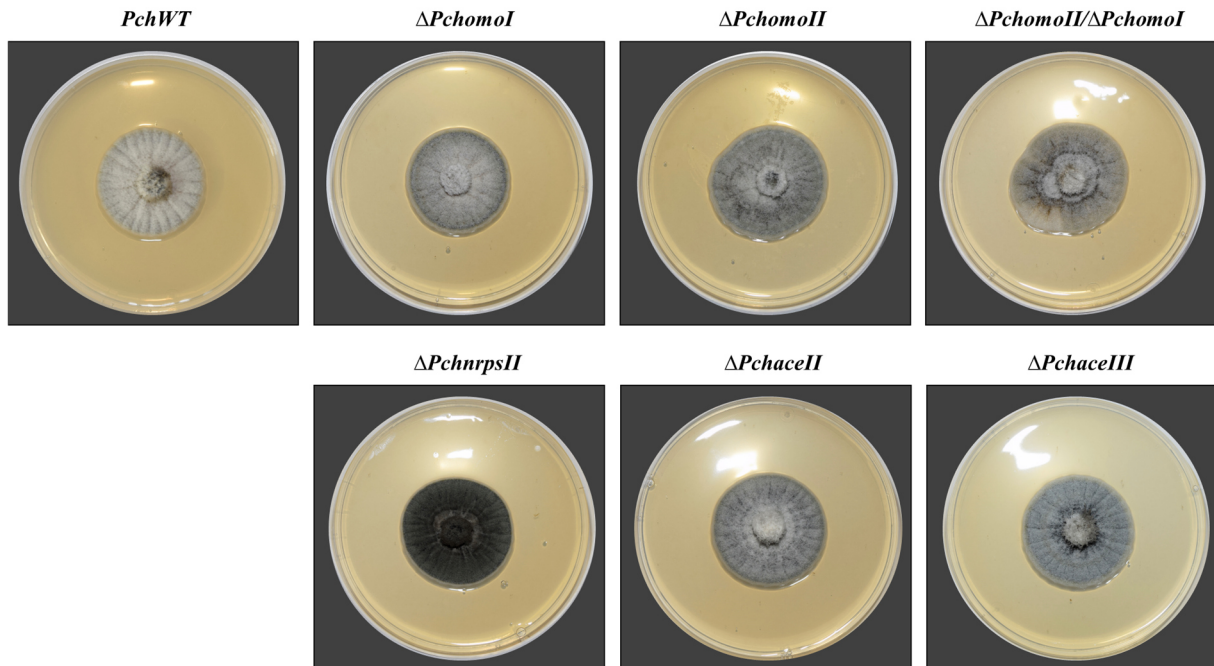


Abbildung 68: Vergleich des vegetativen Myzelwachstums der „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeoacremonium chlamydospora* und dem Wildtyp auf HMG-Festmedium. Gezeigt sind exemplarisch die Mutanten $\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ und der Referenzstamm *Pch* IBWF 1315 (*PchWT*) jeweils nach 24-tägiger Kultivierung auf HMG-Festmedium bei RT.



Abbildung 69: Vergleich des vegetativen Myzelwachstums der „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeoacremonium minimum* und dem Wildtyp auf HMG-Festmedium. Gezeigt sind exemplarisch die Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ und der Referenzstamm *Pmi* IBWF 1189 (*PmiWT*) jeweils nach 24-tägiger Kultivierung auf HMG-Festmedium.

7.7.5.2 Analyse des Wachstumsverhalten unter oxidativem Stress

Den nachfolgenden Abbildungen 70 und 71 kann die Dokumentation exemplarisch für die „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese aus *Pch* ($\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$, $\Delta PchaceIII$) und *Pmi* ($\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$) sowie für die Referenzstämme *Pch* IBWF 1315 (*PchWT*) für *Pch* und *Pmi* IBWF 1189 (*PmiWT*) für *Pmi* nach 24-tägiger Kultivierung auf HMG-Festmedium, welches 0,05 % H₂O₂ enthält, entnommen werden.

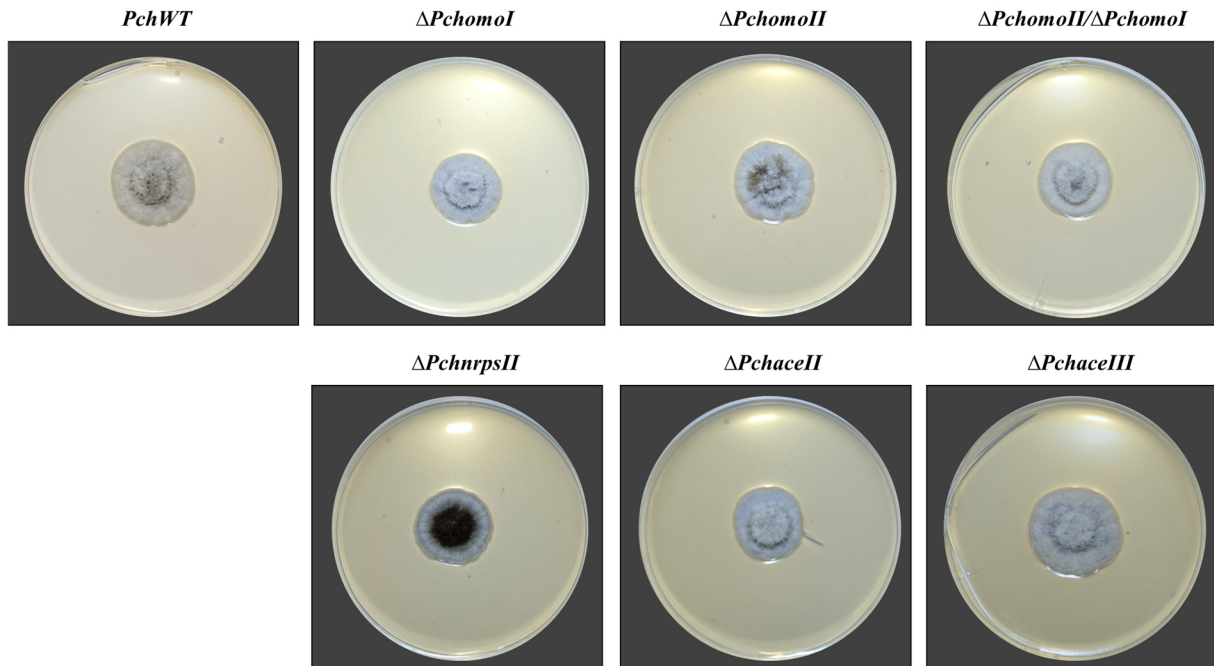


Abbildung 70: Vergleich des vegetativen Myzelwachstums der „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeoconiella chlamydospora* und dem Wildtyp unter oxidativem Stress. Gezeigt sind exemplarisch die Mutanten $\Delta PchomI$, $\Delta PchomII$, $\Delta PchomII/\Delta PchomI$, $\Delta PchnrpsII$, $\Delta PchaceII$ und $\Delta PchaceIII$ und der Referenzstamm *Pch IBWF 1315* (*PchWT*) jeweils nach 24-tägiger Kultivierung auf HMG-Festmedium, supplementiert mit 0,05 %H₂O₂, bei RT.

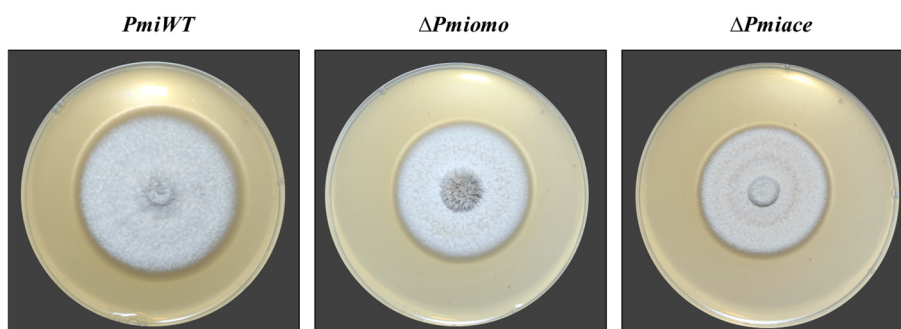


Abbildung 71: Vergleich des vegetativen Myzelwachstums der „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeoacremonium minimum* und dem Wildtyp unter oxidativem Stress. Gezeigt sind exemplarisch die Mutanten $\Delta Pmiomo$ und $\Delta Pmiace$ und der Referenzstamm *Pmi IBWF 1189* (*PmiWT*) jeweils nach 24-tägiger Kultivierung auf HMG-Festmedium, supplementiert mit 0,05 %H₂O₂, bei RT.

7.7.5.3 Analyse des Wachstumsverhalten unter Kokultivierungsbedingungen

7.7.5.3.1 Vergleich der Interaktionen der generierten „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeoconiella chlamydospora* mit dem Wildtyp

Sowohl unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen als auch mit der Kultivierung auf eisenhaltigen Festmedium konnten bei RT (Abb. 72) aber auch bei 30 °C (Abb. 73) keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen dem Wildtyp und den

verschiedenen Mutanten bezüglich der Interaktionen zu *Pmi*, *Fmed* oder *Ela* beobachtet werden.

In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 72) sind exemplarisch die Interaktionen von *PchWT* und $\Delta Pchom1$ zu *Pmi*, *Ela* und *Fmed* bei RT sowohl unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen (Abb. 72, I) als auch auf eisenhaltigen Festmedium zur Kontrolle (Abb. 72, II) zu entnehmen. Gemäß der Einordnung in die Interaktionskategorien (Bertrand *et al.*, 2013) wurde zwischen *Pch* (*PchWT*, $\Delta Pchom1$) und *Pmi* und zwischen *Pch* (*PchWT*, $\Delta Pchom1$) und *Fmed* eine Kontaktinhibition festgestellt, welche unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen aber auch in den Kontrollansätzen beobachtet werden konnte. Zusätzlich wurden die Ansätze mit *Pch* (*PchWT*, $\Delta Pchom1$) und *Fmed* in die Kategorie der Zonen-Linie eingeordnet, da eine deutliche dunkle Verfärbung im Konfrontationsbereich der Pilze dokumentiert wurde (Abb. 72, C2). Die Interaktion zwischen *Pch* (*PchWT*, $\Delta Pchom1$) und *Ela* wurde unter Eisenmangelbedingungen ebenfalls der Kategorie der Kontaktinhibition zugeschrieben. Auf den Kontrollplatten konnte dagegen ein deutlich stärkeres Wachstum von *Ela* im Vergleich zu *Pch* (*PchWT*, $\Delta Pchom1$) beobachtet werden, weshalb die Interaktion hierbei in die Kategorie Überwachsen eingeordnet wurde. Die beschriebenen Interaktionskategorien für *PchWT* und $\Delta Pchom1$ konnten auch für die anderen „*loss-of-function*“-Mutanten von *Pch* gegenüber den Esca-assoziierten Pilzen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

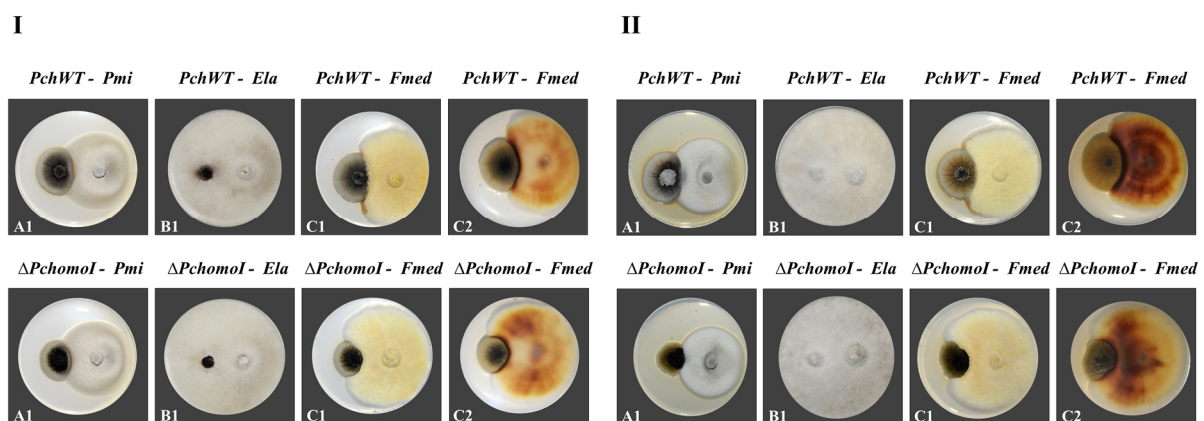


Abbildung 72: Vergleich der Interaktionen von *PchWT* und $\Delta Pchom1$ zu *Pmi*, *Ela* und *Fmed* unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen bei RT. Gezeigt ist exemplarisch die Dokumentation der Interaktionen von *PchWT* und $\Delta Pchom1$ zu *Pmi* (A), *Ela* (B) und *Fmed* (C) auf eisenfreiem (I) und eisenhaltigem (II) Sundström-Festmedium bei RT. (1: Dokumentation der Oberseite; 2: Dokumentation der Unterseite).

Bei 30 °C wurde hingegen in allen Ansätzen mit *Pch* (*PchWT*, $\Delta Pchom1$) und *Pmi* sowohl unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen (Abb. 73, I) als auch auf den Kontrollplatten (Abb. 73, II) eine Kontaktinhibition beobachtet. In den Ansätzen mit *Pch* (*PchWT*, $\Delta Pchom1$)

und *Ela* bzw. *Fmed* wurde jedoch ein deutlich stärkeres Wachstum von *Ela* und *Fmed* im Vergleich zu *Pch* (*PchWT*, $\Delta Pchom1$) festgestellt, welches sich jeweils in ein partielles Überwachsen des *Pch* (*PchWT*, $\Delta Pchom1$) von beiden äußerte. Daher wurde hierbei zusätzlich die Kategorie des Überwachsens dokumentiert. Die beschriebenen Interaktionskategorien für *PchWT* und $\Delta Pchom1$ konnten auch für die anderen „*loss-of-function*“-Mutanten von *Pch* gegenüber den Esca-assoziierten Pilzen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

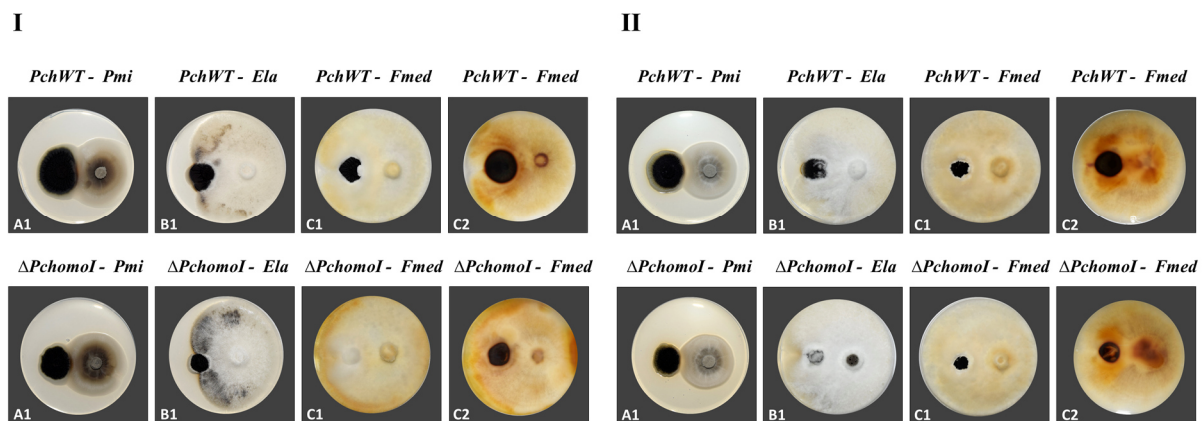


Abbildung 73: Vergleich der Interaktionen von *PchWT* und $\Delta Pchom1$ zu *Pmi*, *Ela* und *Fmed* unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen bei 30 °C. Gezeigt ist exemplarisch die Dokumentation der Interaktionen von *PchWT* und $\Delta Pchom1$ zu *Pmi* (A), *Ela* (B) und *Fmed* (C) auf eisenfreiem (I) und eisenhaltigem (II) Sوندström-Festmedium bei 30 °C. (1: Dokumentation der Oberseite; 2: Dokumentation der Unterseite).

7.7.5.3.2 Vergleich der Interaktionen der generierten „*loss-of-function*“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeoacremonium minimum* mit dem Wildtyp

Sowohl unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen als auch mit der Kultivierung auf eisenhaltigen Festmedium konnten bei RT (Abb. 74) aber auch bei 30 °C (Abb. 75) nur geringfügige, nicht signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen dem Wildtyp und den verschiedenen Mutanten bezüglich der Interaktionen zu *Pch*, *Fmed* oder *Ela* beobachtet werden.

In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 74) sind exemplarisch die Interaktionen von *PmiWT* und $\Delta Pmiomo$ zu *Pch*, *Ela* und *Fmed* bei RT sowohl unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen (Abb. 74, I) als auch auf eisenhaltigen Kontrollplatten (Abb. 74, II) zu entnehmen. Gemäß der Einordnung in die Interaktionskategorien wurde zwischen *PmiWT* und *Pch*, *Ela* bzw. *Fmed* eine Kontaktinhibition festgestellt, welche unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen aber auch in den Kontrollansätzen beobachtet werden konnte. Zusätzlich wurden die Interaktionen von *PmiWT* und *Fmed* in die Kategorie der Zonenlinie eingeordnet, da eine deutliche dunkle Verfärbung im Konfrontationsbereich der Pilze

dokumentiert wurde (Abb. 74, C2). Das Wachstumsverhalten von $\Delta Pmiace$ zu *Pch*, *Ela* und *Fmed* war in etwa zu dem von *PmiWT* vergleichbar. Allerdings war die Zonen-Linie zu *Fmed* etwas geringer ausgeprägt. Für $\Delta Pmiomo$ wurden die Interaktionen zu *Pch*, *Ela* und *Fmed* zwar in die gleichen Kategorien eingeordnet, jedoch war ein reduzierteres Wachstum von diesem im Vergleich zu *PmiWT* und $\Delta Pmiace$ zu beobachten.

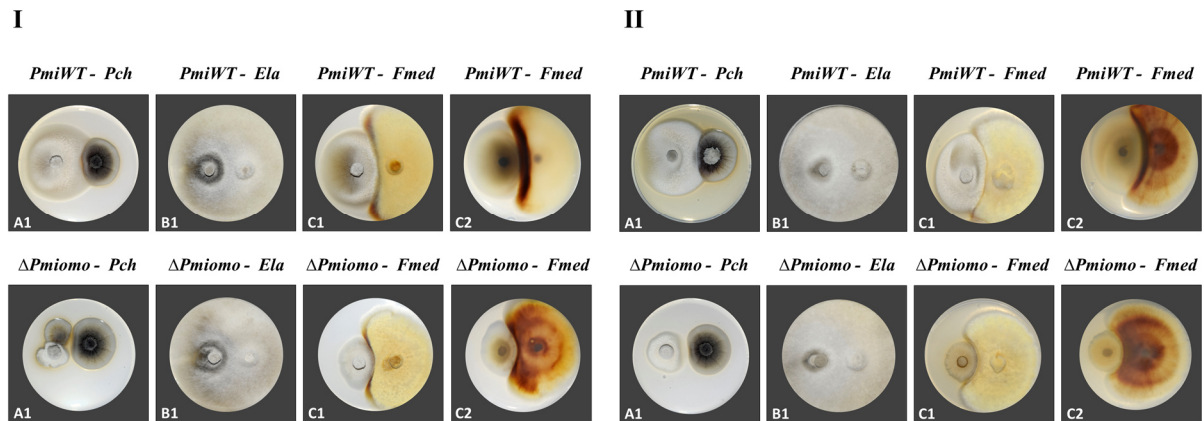


Abbildung 74: Vergleich der Interaktionen von *PmiWT* und $\Delta Pmiomo$ zu *Pch*, *Ela* und *Fmed* unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen bei RT. Gezeigt ist exemplarisch die Dokumentation der Interaktionen von *PmiWT* und $\Delta Pmiomo$ zu *Pch* (A), *Ela* (B) und *Fmed* (C) auf eisenfreiem (I) und eisenhaltigem (II) Sundström-Festmedium bei RT. (1: Dokumentation der Oberseite; 2: Dokumentation der Unterseite).

Bei 30 °C wurde hingegen ein deutlich geringeres Wachstum von $\Delta Pmiomo$ im Vergleich zu $\Delta Pmiace$ und *PmiWT* beobachtet. Unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen (Abb. 75, I) konnte für *PmiWT* und *Pch*, *Ela* bzw. *Fmed* eine Kontaktinhibition vorgefunden. Des Weiteren wurden die Interaktionen von *Pmi WT* zu *Fmed* der Zonen-Linie zugeordnet, da auch hierbei eine dunkle Verfärbung im Konfrontationsbereich der Pilze zu erkennen war (Abb. 75, C2). In den Kontrollansätzen (Abb. 75, II) wurden die Interaktionen mit *PmiWT* den gleichen Kategorien, in Ausnahme dieser zu *Fmed*, von dem ein Überwachsen dokumentiert werden konnte, zugeschrieben. Für $\Delta Pmiomo$ wurde ein in etwa vergleichbares Wachstumsverhalten beobachtet. Allerdings konnte aufgrund des zu geringen Flächenwachstums von $\Delta Pmiomo$ bei 30°C keine Interaktion zwischen diesem und *Pch* beschrieben werden. Für $\Delta Pmiomo$ wurden die Interaktionen zu *Ela* und *Fmed* in die gleichen Kategorien wie *PmiWT* eingeordnet. Das Wachstumsverhalten von $\Delta Pmiace$ zu *Pch*, *Ela* und *Fmed* war in etwa zu dem von *PmiWT* vergleichbar. Allerdings war die Zonen-Linie etwas geringer ausgeprägt.

I

II

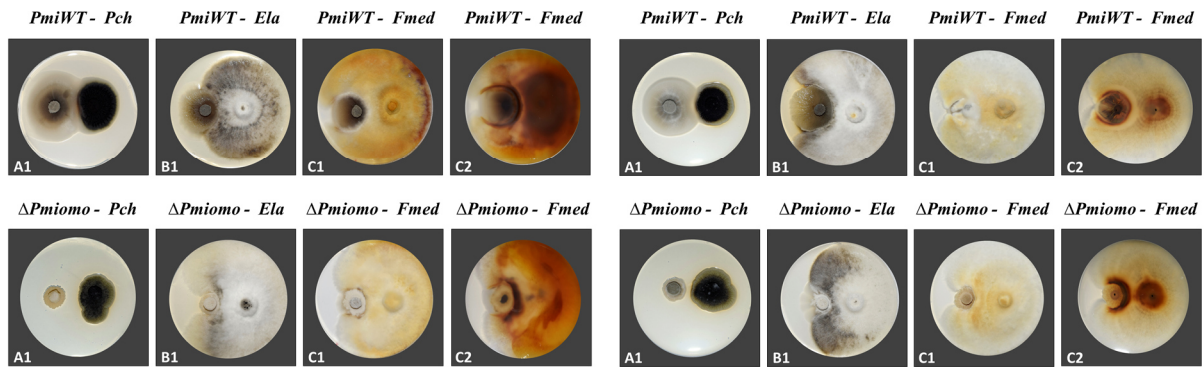


Abbildung 75: Vergleich der Interaktionen von *PmiWT* und $\Delta Pmiomo$ zu *Pch*, *Ela* und *Fmed* unter Eisenmangelkultivierungsbedingungen bei 30 °C. Gezeigt ist exemplarisch die Dokumentation der Interaktionen von *PmiWT* und $\Delta Pmiomo$ zu *Pch* (A), *Ela* (B) und *Fmed* (C) auf eisenfreiem (I) und eisenhaltigem (II) Sundström-Festmedium bei 30 °C. (1: Dokumentation der Oberseite; 2: Dokumentation der Unterseite).

7.7.6 Infektionsuntersuchung zu den generierten Siderophor-Biosynthese-Mutanten von *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum* an Weinrebenstecklingen

Der nachfolgenden Tabellen ist die Auswertung der Infektionsuntersuchung (3.3.3) mit den in der vorliegenden Arbeit generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum* (3.3.2) an Einaugenstecklingen der Weinrebe (2.4.5) im Hinblick auf die Entwicklung des Blattaustriebs (Tab. 39) und der Wurzelbildung (Tab. 40) zu entnehmen.

Tabelle 39: Auswertung der Infektionsuntersuchung von Weinrebenstecklingen mit generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeoconiella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum* im Hinblick auf die Entwicklung des Blattaustriebs. Die Bonitur der Einaugenstecklinge der Weinrebensorte Müllerthurgau erfolgte 5 Wochen nach der jeweiligen Inokulation. Pro Ansatz wurden 10 biologische Replikate angefertigt. Hierbei wurde die Wachstumsentwicklung der ausgetriebenen Blätter in vier Kategorien (K) eingeteilt (K3: mind. 5 Blätter sichtbar, Blattspreite ≥ 4 cm; K2: mind. 3 Blätter sichtbar, Blattspreite ≥ 2 cm; K1: mind. 1 Blatt sichtbar, Blattspreite ≥ 1 cm; K0: keine Blätter sichtbar).

Inokulum \ Steckling	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	Mittelwert
Kontrolle (2 % Malzagar)	2	3	3	2	2	3	2	3	3	3	2,6
<i>PchWT</i>	1	2	3	3	3	2	3	3	3	3	2,6
$\Delta PchomoI$	2	2	3	3	1	2	2	2	1	2	2,0
$\Delta PchomoII$	3	2	1	2	3	3	1	3	3	1	2,2
$\Delta PchomoII/\Delta PchomoI$	3	2	2	2	3	3	2	2	2	3	2,4
$\Delta PchnrpsII$	3	3	1	2	3	1	2	1	2	2	2,0
$\Delta PchaceII$	2	2	3	3	2	2	2	2	3	3	2,4
$\Delta PchaceIII$	3	2	3	2	2	2	1	3	3	3	2,4
<i>PmiWT</i>	2	2	3	2	2	2	3	2	2	1	2,1
$\Delta Pmiomo$	1	3	3	3	2	3	2	1	2	2	2,2
$\Delta Pmiace$	2	2	2	3	3	3	3	3	2	1	2,4

Tabelle 40: Auswertung der Infektionsuntersuchung von Weinrebenstecklingen mit generierten „loss-of-function“-Mutanten der Siderophor-Biosynthese von *Phaeomoniella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum* im Hinblick auf die Wurzelbildung. Die Bonitur der Einaugenstecklinge der Weinrebenart Müllerthurgau erfolgte 5 Wochen nach der jeweiligen Inokulation. Pro Ansatz wurden 10 biologische Replikate angefertigt. Hierbei wurde die Wurzelbildung in vier Kategorien (K) eingeteilt (K3: mind. 5 Wurzeln sichtbar, K2: mind. 3 Wurzeln sichtbar, K1: mind. eine Wurzel sichtbar, K0: keine Wurzelbildung sichtbar).

Inokulum \ Steckling	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	Mittelwert
Kontrolle (2 % Malzagar)	3	3	2	1	3	2	3	3	2	2	2,4
<i>PchWT</i>	1	2	0	3	2	0	2	2	1	1	1,4
$\Delta PchomI$	1	1	2	3	2	2	2	2	2	3	2,0
$\Delta PchomII$	2	2	3	3	2	2	2	2	1	1	2,0
$\Delta PchomII/\Delta PchomI$	1	2	3	2	3	3	2	1	2	1	2,0
$\Delta PchnrpsII$	3	2	1	1	2	2	1	1	2	3	1,8
$\Delta PchaceII$	2	1	3	3	2	2	1	2	1	1	1,8
$\Delta PchaceIII$	1	2	3	3	1	1	2	2	2	3	2,0
<i>PmiWT</i>	3	3	1	2	3	1	2	1	2	2	2,0
$\Delta Pmiomo$	2	1	1	2	1	1	0	3	1	3	1,5
$\Delta Pmiace$	1	2	1	2	2	2	3	2	2	1	1,8

7.8 Sequenzen zur L-Ornithin- N^5 -Monooxygenase-Gene in *Phaeomoniella chlamydospora* und *Phaeoacremonium minimum*

Im nachfolgenden sind die putativen Bindedomänen (FAD-, NADP- und Substratbindedomäne) (schwarz umrandet) aufgeführt, welche für ω -Aminosäure-Hydroxylasen charakteristisch sind (Stehr *et al.*, 1998).

7.8.1 *PchOMOI* (JGI *Pch UCRPC4* Protein ID: 22) aus *Phaeomoniella chlamydospora*

```

1 ATGGCGCCCTATCTTGACCACGATGCAGCTGCGCCTGTGAACGCCTACAA 50
  M A P Y L D H D A A A P V N A Y N

51 TTTTCAAACAATCAAAGAGCCACACTGCCTTCTCAGATCGAAGGCCCG 100
  F Q N N Q R A T L P S Q I E G P

101 CTACCGACGATGTTCTTGACCTACTCTCGCTCGGGTTTGGCCCTGCATCA 150
  A T D D V L D L L C V G F G P A S
                        putative FAD-Bindedomäne
151 TTGGCCATCGCCATTGCTCTGCGTGAGAGGTTTGAAGATCTCGATGGCCC 200
  L A I A I A L R E R F E D L D G P

201 AAAACCAAGTGTGGCCTTCTCGAGAAACAGTCTCAATTCGCTTGGCAGC 250
  K P S V A F L E K Q S Q F A W H

251 CCGAATGCTTCTTCCGGGCTCGAGGATGCAGATTTCTTCATTAAGGAC 300
  A G M L L P G S R M Q I S F I K D

301 CTGGCTACCTTGCGAACCCCAAGAGCGAATTCACATTCTTGAACCTATCT 350
  L A T L R N P K S E F T F L N Y L

351 CCATAAACACGACCGCTTAATTCATTTACGAATTTGAATACCTTCTCTCC 400
  H K H D R L I Q F T N L N T F L

401 CATCGCGTATAGAGTTTGGAGACTACATGAGATGGTGTGCAGACCATTTT 450
  P S R I E F E D Y M R W C A D H F

```

451 AGTGACCACGTTACTTATGGCCAAGAGGTTATTGATATCAAATCCGGCTT 500
 S D H V T Y G Q E V I D I K S G L

501 GCAAGTGAAGGGAAGGGCCAAACTTTCTCTGTGTCTCGAGGAACTTGG 550
 Q V K G R A Q T F S V S S R N L

551 TCACAAATCAAGTCGAGGTCAGACATGCTCGCAACGTTGTCATTGCTATA 600
 V T N Q V E V R H A R N V V I A I

601 GGTGGCAAGCCACGTATTCCGGCCCCCTTCCCGAAAGAGCATCCGAAGGT 650
 G G K P R I P A P F P K E H P K V

651 CATTCACTCTTCGGCATACTTAAAAGGGTACACGAAGCACTGCCGGATC 700
 I H S S A Y V K R V H E A L P D

701 GAGAGAAACCGTACCGAATTGCCGTCGTCGTAATGGCCAGTCGGGGCA 750
 R E K P Y R I A V V **putative NADP-Bindedomäne**
 G N G Q S G A

751 GAGATATTTAACGATCTTCATTTCGGGTTCCCTAATTCAAAGACATATCT 800
 E I F N D L H S R F P N S K T Y L

801 AATCATCAAAGACACTGCCCTGCGACCGAGCGACTCTCCTTTGTAAG 850
 I I K D T A L R P S D D S P L *

851 GGAAACACACTCCTTGAAGCCCACATTCACTAACAATCTGTAGTGTC AAC 900
 G K H T P * S P H S L T I C S V N

901 GAAGTTTTCAATCCCGAACGTGTCGAGCCCTTCTTCCAAAAACCTGCCTC 950
 E V F N P E R V E P F F Q K P A S

951 GATCCGCACCCGGGAAGTGTGGCTGACAAGGGACCAATTATGGTGTGC 1000
 I R T R E L L A D K A T N Y G V

1001 TCAGGTTGGAACCTTTGGAGCGCATGTATGGGACCCTCTACCAGCAGAG 1050
 V R L E L L E R M Y G T L Y Q Q R

1051 ATCATGAGTGACAACGAAGACGACTGGCAACATCGCATTCTGCCTTG CAG 1100
 I M S D N E D D W Q H R I L P C R

1101 AATCACCTCACAGATGGATATACTGTCCGAAAAAGGACCCCTGCGATTGA 1150
 I T S Q M D I L S E K G P L R L

1151 AACTCCAGGACTCGGAGACAGCCGTTTCTCGAGAGGAACTGGAAGTAGAT 1200
 K L Q D S E T A V S R E E L E V D

putative Substrat-Bindedomäne
 1201 GCGGTCTTCGTGGCCACGGGCTATCTACGCAACGGTCATGAAGAGATGAT 1250
 A V F V A T G Y L R N G H E E M M

1251 GGAGCCTCTCAAGGATTTGATCTCCTCTCCTGTACAGTCTGACACGACAT 1300
 E P L K D L I S S P V Q S D T T

1301 GGCACGTCCGCCGAGATTACAGTGTGGCGCTAGACGAATCAAAGGTGGAC 1350
 W H V R R D Y S V A L D E S K V D

1351 GAACACGCAGGCATCTGGCTACAGGGTTGCAACCAAGAAACCCACGGCCT 1400
 E H A G I W L Q G C N Q E T H G L

1401 TGCCGATTCTTATTGTCCATTTTGGCCATTCGAGGAGGGGAAATGGTTG 1450
 A D S L L S I L A I R G G E M V

1451 ATTCGATGTTTCGGTCATTAG 1470
 D S M F G H *

7.8.2 *PmiOMO* (JGI *Pmi* UCRPA7 Protein ID: 6736) aus *Phaeoacremonium minimum*

1 ATGCAAATCTCCTTCGTCAAGGACCTCGCAACACTGCGAGACCCGCGATC 50
 M Q I S F V K D L A T L R D P R S

51 GCATTTTCACATTTTTGAATTATCTTCACAAGAACGACAGACTCGTCGAGT 100
 H F T F L N Y L H K N D R L V E

101 TTACCAACCTCAGCACATTTTTGCCCGCCAGAATCGAGTACGAAGACTAC 150
 F T N L S T F L P A R I E Y E D Y

151 CTGCGGTGGTGC GCGAGCTTTTT CAGCGACGTAGTCCGTTACAACAATGA 200
 L R W C A S F F S D V V R Y N N E

201 AGTAGTTTTAGTCGTCCCCGATATCGAAACAAGCGATTCTGTGAGGACCT 250
 V V S V V P D I E T S D S V R T

251 TCACTGTAGTCTCCAGGAACACAAAGACCGGCGGATAACCAAGCACCGT 300
 F T V V S R N T K T G A I T K H R

301 GCTCGCAATGTGGTTCTCG **CAGTGGGCGCCAGCCAT** CTATTCCGCAAGT 350
 A R N V V L **A V G G Q P** S I P Q V

351 GGTGCCAGCAAACCACCCCAAGGTCGTCCACTCTTCCCAGTATGCGCATA 400
 L P A N H P K V V H S S Q Y A H

401 TGATTCCCAAGATTCTGAAAAATAAGGATGCGCCATATCGGGTGGCAGTC 450
 M I P K I L K N K D A P Y R V A V

451 GTGG **GAGCCGGGCGAGGTGCCG** CTGAGATTTTCAACAATATTCAAGTCAT 500
 V **G A G Q S A** A E I F N N I Q V M

501 GTATCCAAACTCAAAAACATCCCTGGTGATGAAGTCGGAATTCCTCAAGC 550
 Y P N S K T S L V M K S E F L K

551 CCAGCGACGACTCGCCTTTGTGAGTAAATTGCGCAATGGAGCAAGATCTA 600
 P S D D S P L * V N C A M E Q D L

601 AGCTAATTATATATGCAGCGTGAACCTCGATCTTCAATCCGGAATTCGTGG 650
 A N Y I C S V N S I F N P E F V

651 ATGTCCTCTATCCCCGGCCACCTCAATATCGCCAGAGTCTTATCAGTGAC 700
 D V L Y P R P P Q Y R Q S L I S D

701 GCAAAGGCCACAAACTACGGTGTGTTCGGCTAGAGCTTATTGAGAACT 750
 A K A T N Y G V V R L E L I E K L

751 TTACGAAGTTATGTACGACCAGCGCCGGGAGATCGGGAGCGACGAGACGA 800
 Y E V M Y D Q R R E I G S D E T

801 AGTGGCCACACAGAATTCTAGGTGGAAGACGCGTGGTCCGGCGTTGAAGAA 850
 K W P H R I L G G R R V V G V E E

851 ACCTCTAACGGGCTCCGTCTTCGTGTGCGCCATGCGCCAGCCGGCGAGGT 900
 T S N G L R L R V R H A P A G E V

901 TGCTTTGGAAGCGGATGGCCTCGTAGATGTCGAGACACAGGAGAGTGCCA 950
 A L E A D G L V D V E T Q E S A

951 AGGCTGTTGAAGTTGTGAAGGACGACGACGAGTTGCTGGACGTC **GATTC** 1000
 K A V E V V K D D D E L L D V **D L**

putative Substrat-Bindedomäne

1001 ATCATCGCAGCTACTGGATACCGCAGAAACGCACATGTAGAGATGCTCAA 1050
 I I A A T G Y R R N A H V E M L K

1051 GGATGCATGGCACCTGCTCCCTCAGAACAAGGAAGACAACCCAGAACGTT 1100
 G C M A P A P S E Q G R Q P R T F

1101 CAGACCAGTGGGCGGTCCGGGACGTGACCAAGACATGCAGGGTCATGGAG 1150
 R P V G G P G R D Q D M Q G H G

1151 GTGTACGAGACTATCGCGTACAGTTCGGTCCGGGTGTTGTTGCCCTGG 1200
 G V T R L S R T V P S G C C C P W

1201 CTCTGGTGTCTGGCTTCAGGGTTGCTGTGAAGGCACTCACGGAGTAAGTG 1250
 L W C L A S G L L * R H S R S K C

1251 CAACATTTCAACATAACTACAGACATGGTATTCTAACTAACAATTCCTCT 1300
 N I S T * L Q T W Y S N * Q F L

1301 AGCTGAGCGATAACCTTCTTTTCAGTATTGGCAACGAGATCTGGAGAAATG 1350
 * L S D T L L S V L A T R S G E M

1351 GTCAAGTCTATCTTCGGAACAAAGGAGGGGAGCGTCGTGAGAGCACACTT 1400
 V K S I F G T K E G S V V R A H L

1401 GTAG 1404
 *

Danksagung

▼

Lebenslauf

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Aron A., Petras D., Schmid R., Gauglitz J. M., Büttel I., Antelo L., Zhi H., Saak C. C., Malarney K. P., Thines E., Dutton R. J., Raffatellu M., Dorrestein P. C. (2019), Native electrospray-based metabolomics enables the detection of metal-binding compounds, BioRxiv, 824888 (DOI: 10.1101/824888) (Preprint)

Poster und Präsentation

“Identification of Siderophores Produced by Esca-associated Fungi”

Rhein-Wein Symposium am KIT, Karlsruhe (2017) (Posterausstellung und -präsentation)

“Siderophore Biosynthesis Pathways of Esca-associated Fungi“

Rhein-Wein Symposium 2018 am KIT, Karlsruhe (2018) (Posterausstellung und-präsentation)

“Identification of Siderophores Produced by Esca-associated Fungi”

Annual Meeting of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Wolfsburg (2018) (elektronische Posterpräsentation)

“Siderophore Biosynthesis Pathways of Esca-associated Fungus

Phaeomoniella chlamydospora”

VAAM, Mainz (2019) (Posterausstellung)

“Siderophore Biosynthesis Pathway in the Esca associated Fungus

Phaeomoniella chlamydospora”

Rheinland-Pfalz Mikrobiologie Symposium, Kaiserslautern (2019) (Präsentation)