

**Untersuchung des Blattfleckenregerkomplexes bei
Viola-Wittrockiana-Hybriden unter besonderer Berücksichtigung
der Virulenz von *Mycocentrospora acerina***

Dem Fachbereich Chemie und Chemietechnik
der Universität-Gesamthochschule Paderborn

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegte
Dissertation

von

BERND GUTTER

aus Kassel

Paderborn, 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Dezember 1995 bis Dezember 2001 im Labor für Biotechnologie und Qualitätssicherung des Fachbereiches Agrarwirtschaft der Universität-Gesamthochschule Paderborn angefertigt.

1. Referent:	Prof. Dr. K. Krohn
2. Referent:	Prof. Dr. V. H. Paul
3. Referent:	Prof. Dr. G. Masuch
Prüfungsvorsitz:	Prof. Dr. M. Grote

Mündliche Abschlussprüfung:

19.Dezember 2001

Summary

The work described in this thesis, on leaf spot inducing pathogens of Viola-Wittrockiana-Hybrids and the virulence of *Mycocentrospora acerina*, is divided into 4 parts: one plant pathology section, two biochemical sections and a final analytical chemistry section.

In the first plant pathology section, the pathology of leaf spots on Viola-Wittrockiana-Hybrids was investigated. Pansy leaf spot disease is caused by several plant pathogens, which cause great economic loss and are difficult to control. In this work, the fungal pathogens *M. acerina* and *Ramularia* sp. were investigated and their symptoms described. In the case of *M. acerina*, experiments were also done to investigate virulence.

Diseased pansies were collected over a period of 3 years from sites within the Federal Republic of Germany. In total, thirty-five isolates of *M. acerina* and twenty-eight isolates of *Ramularia* sp. were isolated. Of these, twenty-seven isolates were identified as *Ramularia agrestis* and one isolate was characterised as *R. lactea*. Investigations of the symptom development showed very large similarities in the symptoms caused by each genus in that necrosis caused by *M. acerina* could be differentiated from that caused by *Ramularia* spp.

A comparison of the virulence of the different *M. acerina* isolates indicated that there were great differences. Because of problems quantifying virulence, a scoring system was used throughout the study with scores ranging from 1,2 to 5,4. To avoid differences in growth parameters, the virulence tests, molecular experiments and some of the enzymatic experiments used the same fresh or lyophilised material. This was very important, since subsequent inoculation experiments indicated that after a storage period of 8 months at 4 °C, the isolates lost up to 32 % of their original virulence. The inoculation experiment also indicated that isolates initially characterised as being highly virulent maintained high levels of virulence during storage. These isolates were still able to cause considerable damage to plants after storage in comparison to isolates initially characterised as being less virulent and this relationship appeared to be stable throughout the experiments.

In the first biochemical section of the project, molecular investigations of *M. acerina* were done using RAPD-techniques. Isolates could be sub-divided by analysis of banding patterns produced using 10 Primers. A dendrogram generated using the 206 RAPD-product marker

Summary

bands indicated that the *M. acerina* isolates could be divided into two groups. The two groups did not correspond to geographical location of the material from which the isolate was obtained, but with the virulence classification of that isolate. The technique was validated using an fresh isolate, where the DNA-fingerprint suggested the isolate to be “highly virulent” and this was confirmed with an inoculation experiment with two highly and two weakly virulent “control” isolates for comparison.

Because of the complex nature of the basis of virulence, a number of different approaches were used to investigate the phenomenon. In the second biochemical section of the study, two pectin-degrading enzymes (PG and PME, from highly and weakly virulent isolates) were investigated. Focus on the study of enzyme production was considered to be important because of the reported central role that the pectin-degrading enzymes have in tissue disintegration during the infection process. A bioassay with PG indicated that leaf lesions similar to those produced by the pathogen could be produced by the enzyme in the absence of the plant pathogen. The effect was increased, if enzyme was extracted from a heavily infected plant. The presence of PG and PME from material infected with both highly virulent and weakly virulent isolates could be demonstrated.

Only PG activity could be found from protein extracts from lyophilised fungal material of *M. acerina*. Again, the degree of activity did not correlate with the degree of virulence exhibited by the infecting isolate and there were no differences found in PG and PME activity between the highly virulent and less virulent isolates. However, differences could be observed during culture on PDB-medium. A clear period of PG activity was observed between days 5 - 8. This activity was only observed for highly virulent isolates. In contrast, weakly virulent isolates were not able to change their enzyme synthesis after the glucose use up.

Taxonomically, until 1942, *M. acerina* was considered to belong to the closely related genus *Cercospora*. Members of the genus *Cercospora* produce the toxins cercosporin and beticolins. Both toxins are pigments: Cercosporin has a red color, whilst the beticolins are yellow. Because some of the *M. acerina* isolates are stained red, it has been suggested that there are probably toxins involved in the virulence. In the case of cercosporin, a toxic reaction is only initiated following light induction. Inoculation trials with and without light indicated that the symptoms, produced by *M. acerina*, are promoted by light. Cercosporin caused similar symptoms on pansy leaves in a bioassay. In the analytical chemistry part of the study, neither cerco-

Summary

sporin nor beticolins could be detected using GC-MS. However, two red pigments compounds were isolated. One substance was identified as cynodontin the other as emodin. Both pigments belong to the anthraquinones group of chemicals.

It could not be proven whether *M. acerina* was able to synthesize the toxin cercosporin or not. However, emodin could be a precursor in biosynthesis. Further experimentation is needed in order to ascertain whether cercosporin is synthesised by *M. acerina* and whether this plays a role in the infection process for the pathogen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Züchtung der Gartenstiefmütterchen	1
1.2	Wirtschaftliche Bedeutung von Stiefmütterchen	2
1.3	Pathogene an Stiefmütterchen	4
1.3.1	Pathogen <i>Mycocentrospora acerina</i>	6
1.3.2	Pathogen <i>Ramularia</i> spp.	9
1.4	Wechselwirkung von Pflanze und Pathogen.....	10
1.4.1	Toxine	11
1.4.2	Enzyme	17
1.5	Problemstellung	22
2	Material und Methoden	25
2.1	Pflanzenmaterial	25
2.2	Untersuchungen an pflanzenpathogenen Pilzen	25
2.2.1	Isolationsmethoden	25
2.2.1.1	Direkte in vitro-Isolation (Oberflächensterilisierung)	26
2.2.1.2	Indirekte in vitro-Isolation (Feuchte Kammer).....	26
2.3	Kulturbedingungen der Erreger	27
2.4	Inokulation	27
2.5	Kulturbedingungen der Stiefmütterchen.....	28
2.6	Genomuntersuchungen	29
2.6.1	Gewinnung des Pilzmaterials.....	29
2.6.2	Puffer und Lösungen.....	30
2.6.3	DNA-Extraktion.....	30
2.6.4	Bestimmung der Qualität und Quantität der extrahierten DNA	32
2.6.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
2.6.5.1	PCR-Programm.....	33
2.6.6	Agarosegelelektrophorese.....	34
2.6.6.1	DNA-Färbung	36
2.6.6.2	Dokumentation und Auswertung der Nukleinsäuregele	36
2.7	Proteomuntersuchungen.....	37
2.7.1	Proteinextraktion.....	37
2.7.2	Bestimmung der Proteinquantität	37
2.7.3	Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME)	38
2.7.3.1	Optimierung des pH-Wertes für Polygalakturonase	38
2.7.3.2	Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) aus lyophilisiertem Pilzmaterial	39
2.7.3.3	Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) von Isolaten ausgesuchter Herkünfte kultiviert in Pektinmedium	40
2.7.3.4	Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) von Isolaten ausgesuchter Herkünfte kultiviert in PDA-Medium	41
2.8	Biotest	42
2.8.1	Biotest mit Proteinen	43
2.8.2	Biotest mit Cercosporin und mit isoliertem roten Farbstoff	43
2.9	Toxinuntersuchungen.....	43

2.9.1	Toxinextraktion.....	43
2.9.2	Untersuchungen mit Dünnschichtchromatographie (DC)	44
2.9.3	Untersuchung mit GC-MS	44
2.9.3.1	Analysebedingungen.....	45
2.10	Statistische Auswertung.....	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Isolierte Pathogene.....	46
3.1.1	<i>Mycocentrospora acerina</i>	46
3.1.1.1	Herkunft der mit <i>M. acerina</i> infizierten <i>Viola</i> -Pflanzen.....	47
3.1.1.2	Krankheitssymptome und Bonitursystem.....	48
3.1.1.3	Isolationismethode	52
3.1.1.4	Inokulationsversuche	52
3.1.1.4.1	Inokulation mit Isolaten aller Herkünfte.....	52
3.1.1.4.2	Inokulation mit Isolaten von <i>M. acerina</i> ausgewählter Herkünfte nach Lagerung	54
3.1.1.4.3	Auswirkung der Beleuchtung auf die Symptomentwicklung	55
3.1.1.5	Morphologische Merkmale der <i>M. acerina</i> Isolate.....	57
3.1.2	<i>Ramularia</i>	59
3.1.2.1	Isolation	59
3.1.2.2	Herkunft der mit <i>Ramularia</i> sp. infizierten <i>Viola</i> -Pflanzen.....	60
3.1.2.3	Symptomverlauf.....	61
3.2	Ergebnisse der Genomuntersuchung	62
3.2.1	Ergebnisse der DNA Extraktion	62
3.2.2	PCR-Optimierung	62
3.2.3	Untersuchte Herkünfte und verwendete Primer.....	63
3.2.4	Ergebnisse der einzelnen Primer.....	64
3.2.4.1	Primer ABA 20	66
3.2.5	Dendrogramm aus den RAPD-Untersuchungen.....	68
3.3	Ergebnisse der Proteomuntersuchung.....	70
3.3.1	Biotest mit pektinolytischen Enzymen	70
3.3.2	Pektinaseaktivität (PG und PME)	71
3.3.2.1	Optimierung des pH-Wertes für Polygalakturonase	71
3.3.2.2	Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) aus dem lyophilisierten Material	72
3.3.2.3	Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) ausgesuchter Isolate auf Pektinmedium	75
3.3.2.4	Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) ausgesuchter Herkünfte von PDB-Medium.....	78
3.4	Ergebnisse der Toxinuntersuchungen	79
3.4.1	Biotest mit Cercosporin	79
3.4.2	Biotest mit extrahiertem roten Farbstoff.....	81
3.4.3	DC-Untersuchungen	81
3.4.4	Charakterisierung des roten Extraktes mit GC-MS	82

4	Diskussion.....	85
4.1	Phytopathologische Untersuchungen.....	85
4.1.1	Blattsymptome und Pathogene	85
4.1.2	Virulenz	87
4.2	Genomuntersuchungen	88
4.3	Enzymuntersuchungen.....	91
4.3.1	Biotest mit pektinolytischen Enzymen und Proteinextrakt aus infizierter Pflanze	93
4.3.2	Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) aus lyophilisiertem Material	94
4.3.3	Pektinaseaktivität (PG und PME) ausgesuchter Isolate (Pektinmedium).....	95
4.3.3.1	Polygalakturonaseaktivität.....	95
4.3.3.2	Pektinmethylesteraseaktivität (PME)	96
4.3.4	Pektinaseaktivität (PG und PME) ausgesuchter Isolate (PDB)	96
4.3.5	Einfluss der Enzymaktivität auf Pathogenität und Virulenz.....	97
4.4	Toxinuntersuchungen.....	99
4.4.1	Cercosporin	99
4.4.2	Identifikation des roten Farbstoffes	101
4.4.3	Biowirksamkeit der Farbstoffe	105
5	Zusammenfassung	109
6	Ausblick	112
7	Literatur	114
8	Anhang.....	129
8.1	Liste der Herkünfte	129
8.2	Verwendete Kulturmedien	131
8.3	Ergebnisse der Photometrischen DNA-Messung	132
8.4	Einzelergebnisse der Primer	133
8.4.1	Primer ABA 01	133
8.4.2	Primer ABA 02	134
8.4.3	Primer ABA 03	136
8.4.4	Primer ABA 04	137
8.4.5	Primer ABA 09	138
8.4.6	Primer ABA 12	140
8.4.7	Primer ABA 13	141
8.4.8	Primer ABA 17	143
8.4.9	Primer ABA 18	144

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Behandlungsschema für die Oberflächensterilisierung	26
Tab. 2: Für die Genomuntersuchungen verwendete Puffer und Lösungen	30
Tab. 3: Reaktionsansatz (Stoffe und Konzentrationen) für die PCR	33
Tab. 4: Basensequenz der eingesetzten Primer	33
Tab. 5: Verwendete Temperaturen bei der Optimierung der PCR	34
Tab. 6: Verwendetes Temperaturprofil für die PCR	34
Tab. 7: Zusammensetzung des PMA-Mediums	41
Tab. 8: Temperaturprofile bei der GC-MS Analyse von Injektor und Säulenofen	45
Tab. 9: <i>Viola</i> -Herkünfte, bei denen <i>Mycocentrospora acerina</i> identifiziert und isoliert werden konnte	47
Tab. 10: Bonitursystem für die <i>Mycocentrospora</i> -Blattfleckenkrankheit an <i>Viola-Wittrockiana</i> -Hybriden	49
Tab. 11: Vergleich ausgesuchter <i>M. acerina</i> -Isolate auf ihre Virulenz	54
Tab. 12: Beurteilung der <i>M. acerina</i> Isolate von zwei verschiedenen Nährböden anhand von morphologischen Merkmalen	57
Tab. 13: Herkünfte, bei denen <i>Ramularia sp.</i> nachgewiesen werden konnte	59
Tab. 14: Für die Auswertung der genomischen Untersuchung verwendete Primer mit ihrer Basensequenz	63
Tab. 15: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 20	67
Tab. 16: R _F -Werte der DC-Untersuchungen des Extraktes von M 013, M 307, M 375 und als Referenz Cercosporin	81
Tab. 17: Strukturen von Pigmenten aus der Flechtenfamilie Parmeliaceae	105
Tab. 18: Herkünfte der gesammelten Pflanzen	129
Tab. 19: Ergebnisse der photometrische Messungen der extrahierten DNA	132
Tab. 20: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 01	133
Tab. 21: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 02	135
Tab. 22: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 03	136
Tab. 23: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 04	138
Tab. 24: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 09	139
Tab. 25: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 12	140
Tab. 26: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 13	142
Tab. 27: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 17	144
Tab. 28: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 18	145

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bedeutung von unterschiedlichen Produktcharakteristika bei Stiefmütterchen. Erhebung der FH Osnabrück, 1994.	2
Abb. 2: Entwicklung von Verkaufszahlen und dem erzielten Preis für die Jahre 1997 bis 1999 im Bereich NBV & UGA.	3
Abb. 3: Vergleich der Jahresproduktion einiger wichtiger Beet- und Balkonpflanzen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2000.	4
Abb. 4: Auflistung bekannter Schadorganismen bei Stiefmütterchen.	5
Abb. 5: Strukturformel von Cercosporin.	13
Abb. 6: Photoaktivierung des Cercosporins.	14
Abb. 7: Strukturformel von Phleischrom.	14
Abb. 8: Strukturformel von Elsinochrom A, B und C.	15
Abb. 9: Strukturformel von Hypericin.	15
Abb. 10: Strukturformel von Fagopyrin.	16
Abb. 11: Strukturformeln der Beticoline 1,2,3 und 4.	17
Abb. 12: Molekülstruktur der Pektinstoffe, die an der Zellwandbildung beteiligt sind.	19
Abb. 13: Schematische Übersicht über die pektinabbauenden Enzyme.	20
Abb. 14: Verteilung der Zellwandbestandteile in den unterschiedlichen Schichten der Zellwand.	21
Abb. 15: Längenstandard D-7058 (Sigma).	35
Abb. 16: Geografische Herkunft der gesammelten <i>Viola</i> -Pflanzen, von denen <i>Mycocentrospora acerina</i> isoliert werden konnte.	48
Abb. 17: Stiefmütterchen nach Inokulation mit <i>M. acerina</i>	51
Abb. 18: Virulenzvergleich der <i>Mycocentrospora</i> -Herkünfte.	53
Abb. 19: Vergleich von fünf ausgesuchten <i>M. acerina</i> -Herkünfte auf ihre Virulenz nach einer Lagerung von acht Monaten bei 4 °C.	55
Abb. 20: Inokulation mit <i>Mycocentrospora</i> -Isolaten der Herkünfte M 013 und M 375. Kulturbedingungen: mit Licht und ohne Licht.	56
Abb. 21: Vergleich der Symptome einer <i>Mycocentrospora</i> -Inokulation mit Licht und ohne Licht.	56
Abb. 22: Geografische Herkunft der gesammelten <i>Viola</i> -Pflanzen, von denen <i>Ramularia</i> sp. isoliert werden konnte.	60
Abb. 23: Entwicklung der Symptome nach Inokulation mit <i>Ramularia agrestis</i>	61
Abb. 24: Gelelektrophorese von Temperaturgradienten-PCR der Herkunft M 339 mit Primer ABA 20.	63
Abb. 25: PCR von <i>Mycocentrospora</i> -Isolaten und Kontrollen mit Primer ABA 20.	65
Abb. 26: Schematisiertes Gel des Primers ABA 20.	67
Abb. 27: Dendrogramm der RAPD-Untersuchungen von 30 <i>M. acerina</i> Herkünften mit 10 Primern und 206 Merkmalen.	69
Abb. 28: Biotest mit Pektinase, PG.	70
Abb. 29: Optimierung des pH-Wertes der Polygalakturonase.	71
Abb. 30: Vergleich der lyophilisierten <i>Mycocentrospora</i> - und <i>Ramularia</i> (R 331) Herkünfte auf ihre Pektinaseaktivität (PG und PME).	72
Abb. 31: Polygalakturonaseaktivität aus lyophilisiertem Material und standardisiertem gesamt Proteingehalt aller untersuchten Herkünfte.	74
Abb. 32: Gel der Pektinaseaktivität (PG und PME) des Isolates M 307 kultiviert auf Pektinmedium (PMA) im Kulturverlauf von 27 Tagen.	75
Abb. 33: Polygalakturonaseaktivität ausgesuchten <i>M. acerina</i> -Isolate (M 013, M 375, M 307, M 341 und M 306) über einen Kulturzeitraum von 25 Tagen.	76
Abb. 34: Pektinase Gel-Assay mit Isolat M 013 kultiviert auf PMA.	77

Abb. 35: Pektinmethylesteraseaktivität der ausgesuchten Isolate M 013, M 375, M 307, M 341 und M 306 über einen Kulturzeitraum von 25 Tagen.	78
Abb. 36: Vergleich der ausgesuchten <i>M. acerina</i> -Isolaten auf ihre Polygalakturonaseaktivität über den Zeitraum der Kulturdauer von 35 Tagen.	79
Abb. 37: Reaktion eines <i>Viola</i> -Blattes nach Behandlung mit Cercosporin	80
Abb. 38: GC-Chromatogramme von den Chloroform-Extrakten der virulenten Isolate.	83
Abb. 39: Massenspektrum der Substanz mit der Retentionszeit von 30,5 min.	84
Abb. 40: Massenspektrum der Substanz mit der Retentionszeit von 28,1 min.	84
Abb. 41: Massenspektrum von Cercosporin.	84
Abb. 42: Hydrolyse der 1,4-D-galakturonosidischen Bindung durch Polygalakturonase.....	93
Abb. 43: Strukturformel von Cynodontin.	102
Abb. 44: Strukturformel von Catenarin.	102
Abb. 45: Strukturformel von Emodin.	103
Abb. 46: Strukturformel von Islandicin.	103
Abb. 47: Strukturformel von Helminthosporin.....	103
Abb. 48: Massenspektrum und Strukturformel von Emodin.....	104
Abb. 49: Vorgeschlagene Biosynthese des Hypericins nach BROCKMANN & SANNE (1953) bei <i>Hypericum perforatum</i>	107
Abb. 50: Synthese von Hypericin ausgehend vom Emodin	108
Abb. 51: Schematisiertes Gel des Primers ABA 01.	133
Abb. 52: Schematisiertes Gel des Primers ABA 02.	135
Abb. 53: Schematisiertes Gel des Primers ABA 03.	136
Abb. 54: Schematisiertes Gel des Primers ABA 04.	137
Abb. 55: Schematisiertes Gel des Primers ABA 09.	139
Abb. 56: Schematisiertes Gel des Primers ABA 12.	140
Abb. 57: Schematisiertes Gel des Primers ABA 13.	142
Abb. 58: Schematisiertes Gel des Primers ABA 17.	143
Abb. 59: Schematisiertes Gel des Primers ABA 18..	145

Abkürzungen

A	Adenin
Å	Angström
AP-PCR	Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction (s. RAPD)
BAB	Bad Berleburg
BSA	BovineRinderserum Albumin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalzium Ion (zweifach positiv geladen)
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CBT	Cercospora-Beticola-Toxin
CHCl ₃	Trichlormethan, Chloroform
DAD	Dahrendorf
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
demin.	demineralisiert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribunuceic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethylalkohol, Ethanol
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GC-MS	Gaschromatograf mit angeschlossenem Massenspektrometer
HCl	Salzsäure
IES	Indolessigsäure
IC ₅₀	inhibitory concentration 50%
kbp	Kilobasenpaare
M	<i>Mycocentrospora</i>
MER	Merklingsen
Mg ²⁺	Magnesium Ion (zweifach positiv geladen)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
NBV	Niederrheinische Blumenvermarktung
nm	Nanometer
NTC	No Template Control (Kontrolle ohne DNA)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDA	Potato-Dextrose Agar (Kartoffel-Dextrose Agar)
PDB	Potato-Dextrose Broth (Kartoffel-Dextrose Flüssigmedium)
PG	Polygalakturonase
PGTE	Polygalakturonatranseleminase (auch PATE: pectin acid transeleminase)
pH	potentia Hydrogenii
PKC	Proteinkinase C
PL	Pektin Lyase
PMA	Pektinmedium (Agar)
PME	Pektinmethylesterase
PMG	Polymethylgalakturonase

PMTE	Pektinmethyltranseleminase (auch: PTE pectin transeleminase)
PTK	Protein Tyrosin Kinase
PUT	Putlitz
R	<i>Ramularia</i>
r	Radius
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNAs
SNA	Synthetischer Nährstoff Agar
SO	Soest
sp.	Species
subsp.	Subspecies, Unterart
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Pufferlösung aus Tris-HCl und EDTA
TLC	Thin Layer Chromatography (Dünnschichtchromatographie)
UGA	Union Gartenbaulicher Absatzmärkte
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
µl	Microliter
µM	Micromolar
w/w	weight to weight

1 Einleitung

1.1 Züchtung der Gartenstiefmütterchen

Das Gartenstiefmütterchen (Viola-Wittrockiana-Hybriden) gehört zur Familie der Violaceae (Veilchengewächse). Die Familie beinhaltet 22 Gattungen mit etwa 900 Arten. Für den Zierpflanzenbau von Bedeutung ist nur die Gattung *Viola* (HORN, 1956).

An der Züchtung des heutigen Gartenstiefmütterchens sind verschiedene Arten beteiligt. Sie werden deshalb unter der Bezeichnung „Viola-Wittrockiana-Hybriden“ (Syn. *Viola x wittrockiana* GAMS, *V. tricolor* hort. non L., *V. tricolor* var. *maxima* hort., *V. hortensis* auct.; nach ENCKE et al., 1984) zusammengefasst. Ursprungsarten waren *V. tricolor*, *V. altaica*, *V. lutea*, *V. calcarata* und *V. calaminaria* (RUPPRECHT & MIEßNER, 1989).

Ende des vergangenen Jahrhunderts begann in Frankreich, der Schweiz und Deutschland eine sehr intensive Züchtung. Zuchtziele waren Farbenpracht, große Blumen, Winterhärte, Früh- und Reichblütigkeit, geschlossener Wuchs und Uniformität. Im Laufe der Jahre wechselten sich gewisse Moderichtungen ab. Pastelltöne wichen satten Farben, Einfarbigkeit ohne Auge war gefragt. In den 80er Jahren fiel durch Änderung der Kulturmethoden das bis dahin maßgebliche Zuchtziel Winterhärte weg, so dass ungeahnte neue Möglichkeiten zur Verfügung standen (WAGNER, K., 1989). Bei den Gärtnern sind Stiefmütterchen deshalb so beliebt, weil sie alle drei Primärfarben (Rot, Gelb, Blau) in einer Blüte besitzen (NICKIG & VON RADZIEWSKY, 1999). In der heutigen Zeit hat das Aussehen nicht mehr eine so große Priorität bei der Züchtung. Neue Farben sind zwar immer noch gewünscht, aber der Erwerbsgärtner legt mehr Gewicht auf eine geringere Krankheitsanfälligkeit und der Verbraucher möchte weniger Geld für seine Pflanzen bezahlen (Abb. 1).

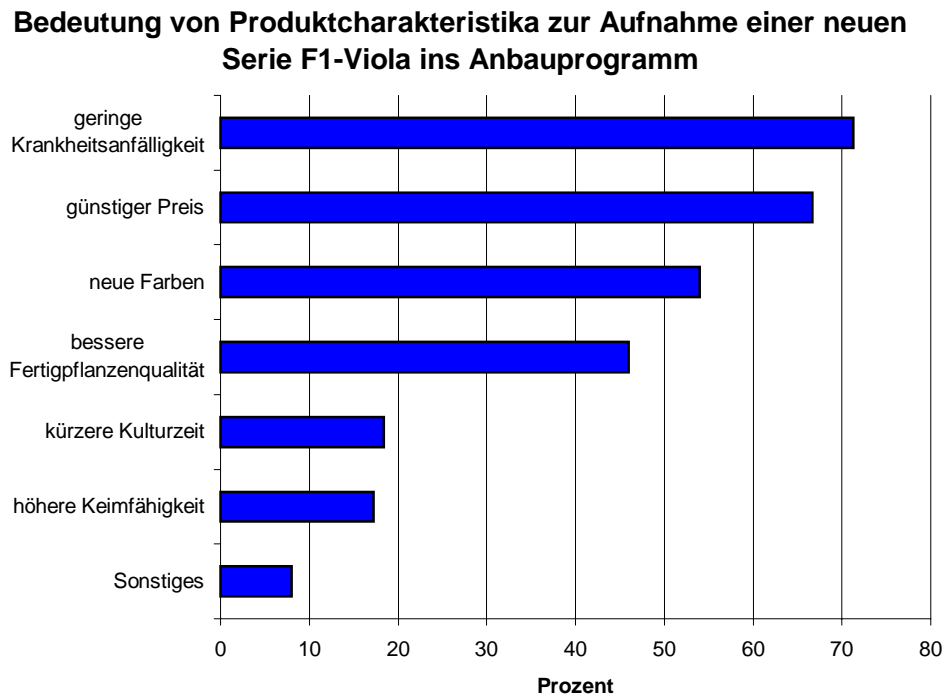


Abb. 1: Bedeutung von unterschiedlichen Produktcharakteristika bei Stiefmütterchen. Erhebung der FH Osnabrück, 1994.

1.2 Wirtschaftliche Bedeutung von Stiefmütterchen

Stiefmütterchen zählen zu den beliebtesten und bekanntesten Zierpflanzenkulturen für die Bepflanzung von Beeten mit Massen- und Fernwirkung, Balkonkästen, Schalen, Vorgärten, Einfassungen und auf Friedhöfen (PLENK, 1995). Sie bilden den Hauptanteil blühender Ware im Herbst und Frühjahr bei Grabbepflanzungen und bei den Beet- und Balkonpflanzen (ROTHER, 1988 und BONGARTZ, 1989). Die Anzucht stellt für eine große Zahl von Gärtnereien einen wichtigen Erwerbszweig dar und dementsprechend haben Schäden an der Kultur ein wirtschaftliches Gewicht (RINTELEN & KLEWITZ, 1976). Bereits Ende der 80er, Anfang der 90er Jahre stellte ELGNER (1993) anhand von Verkaufszahlen fest, dass die Stiefmütterchen stark an Bedeutung gewonnen hatten. Auch BAHNMÜLLER (1995) verzeichnet eine Steigerung der Bedeutung innerhalb des Beetpflanzensortimentes. Besonders sind hier die Topfviolen hervorzuheben. Neuere Zahlen (Abb. 2) zeigen, dass dieser Trend ununterbrochen anhält. In 1999 sind allein im Bereich der NBV & UGA (Niederrheinische Blumenvermarktung & Uni-

on Gartenbaulicher Absatzmärkte) über 20 Millionen Stiefmütterchen verkauft worden. Der Preis konnte dabei stabil gehalten werden.

Der Preis ist aber beim Kauf der Pflanze nicht das allein ausschlaggebende Kriterium. MEGGELEN-LAAGLAND (1995) stellt bei den Ansprüchen unterschiedlicher Kundengruppen fest, dass in den Gartencentern der Preis an zweiter Stelle steht und die Qualität erstrangig ist. Friedhofs- und Stadtgärtnereien legen besonderen Wert auf gesunde, krankheitsresistente Pflanzen.

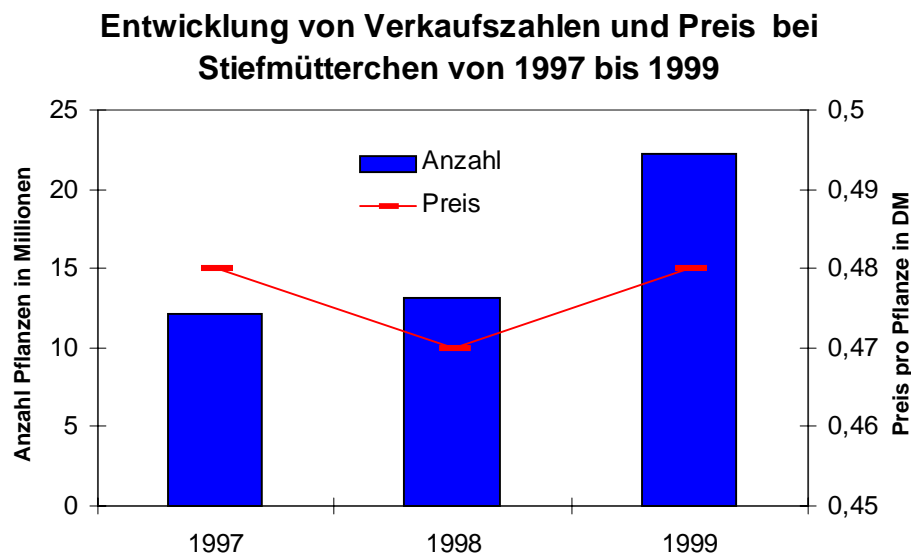


Abb. 2: Entwicklung von Verkaufszahlen und dem erzielten Preis für die Jahre 1997 bis 1999 im Bereich NBV & UGA (ANONYMUS, 2000).

Abb. 3 zeigt die Bedeutung der Stiefmütterchenkultur in Deutschland bei den Beet- und Balkonpflanzen. Keine andere Kultur ist bei den Verbrauchern so beliebt und wird so multifunktionell für Bepflanzungen verwandt. An zweiter Stelle kommen erst die Pelargonien gefolgt von den Primeln und Begonien. Hieraus lässt sich der Stellenwert der Pflanzengesundheit der Stiefmütterchen für den Erwerbsgartenbau ableiten, da diese Kultur ein wichtiges Standbein vieler Betriebe geworden ist.

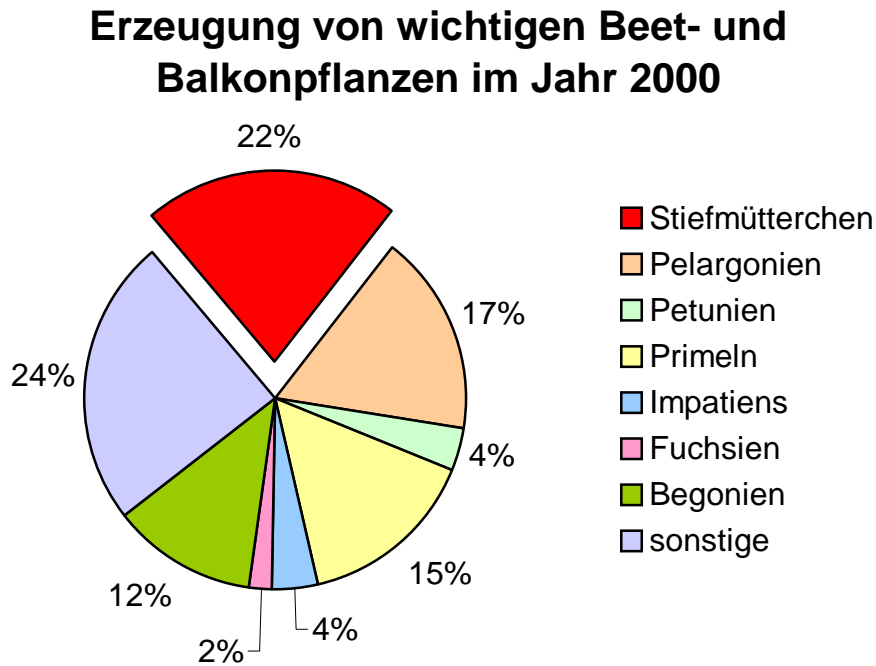


Abb. 3: Vergleich der Jahresproduktion einiger wichtiger Beet- und Balkonpflanzen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2000 (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2001).

1.3 Pathogene an Stiefmütterchen

Die Gesundheit von Stiefmütterchen und damit auch der Absatz der Pflanze wird von einer Reihe von Schadorganismen bedroht. Für den Gärtner problematisch ist die lange Standzeit der Stiefmütterchen, die längste von den im Gartenbau produzierten Kulturen (KUMMER, 2000), und die damit verbundene Gefahr einer Erkrankung. Abb. 4 gibt eine Übersicht über potentielle Krankheiten zu den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanze. Zusätzlich zu den in Abb. 4 aufgelisteten Erregern werden Stiefmütterchen auch von Schädlingen wie Blattläusen, Erdraupen, Spinnmilben und Wurzelälchen befallen.

Pflanzen- -stadium	Erreger	Krankheit/ Organ
Sämling	<i>Pythium sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Rhizoctonia sp.</i>	Fäule an Wurzel oder Wurzelhals
Jugend- phase	<i>Phytophthora cactorum</i> <i>Thielaviopsis basicola</i>	Stängelgrund- und Wurzelhalsfäule, Welke
	<i>Mycocentrospora acerina</i> <i>Ramularia lactea, R. agrestis</i> <i>Alternaria violae</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	Blattflecken (Wurzel- und Wurzelhalsfäule)
Adulte Pflanze	<i>Peronospora violae</i> <i>Oidium violae</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Falscher/Echter Mehltau Grauschimmel
<div>Gurkenmosaikvirus, Rosettenkrankheit (Beta-Virus 1), Rost</div>		

Abb. 4: Auflistung bekannter Schadorganismen bei Stiefmütterchen. Zusammengestellt nach:

BÖHMER & WOHANKA, 1999, DALCHOW, 1995, BÖHMER, 1989, RUPPRECHT & MIEßNER, 1989, SCHICKEDANZ, 1987 & WEISS et al., 1960.

Blattflecken, als Zeichen eines Befalls, werden von mehreren Schaderregern ausgelöst. Eine Unterscheidung der einzelnen Erreger anhand der von ihnen verursachten Symptome ist, gerade im Anfangsstadium der Krankheit, nur schwer möglich. Neben den Pilzen sind hier die Bakterien der Art *Pseudomonas viridiflava* zu erwähnen. Die Krankheit äußert sich nach An-

gaben von HEUPEL & SCHMITZ (1996) durch im Gegenlicht ölig wirkende, wasserdurchtränkte, später dunkle Flecken auf den Blättern. Die Flecken sind zunächst stecknadelgroß, nehmen im Durchmesser zu und werden dann nekrotisch. Die Schäden treten vorwiegend auf den älteren Blättern auf (WIEDEMANN et al., 1995 und BRIELMAIER-LIEBETANZ et al., 1996). BÖHMER & WOHANKA (1999) sehen in diesen Symptomen eine Verwechslungsgefahr mit *Mycocentrospora acerina*. Diese Verwechslungsgefahr besteht allerdings auch mit den anderen pilzlichen Erregern *Ramularia* spp. und *Alternaria violae* GALLOWAY & DORSETT. Nach NEUBAUER (1994) ist *Mycocentrospora* der Blattfleckenerreger an Stiefmütterchen mit der größten wirtschaftlichen Bedeutung. Dies bestätigt ein Bericht aus der San Francisco Bay Region von TOMPKINS & HANSEN (1950). In den Jahren 1928-1939 war die Produktion und die Verwendung von Stiefmütterchen ernsthaft durch Blattflecken eingeschränkt. Die Krankheit breitete sich schnell aus und führte nicht selten zum Totalausfall der Kultur.

1.3.1 Pathogen *Mycocentrospora acerina*

An Stiefmütterchen beschrieb OSTERWALDER 1924 eine Blattfleckenkrankheit. Als Erreger identifizierte er einen Pilz, den er *Cercospora macrospora* nannte. Vermutlich der erste, der diesen Pilz beschrieb war HARTIG im Jahre 1880. Er untersuchte Ahornkeimlinge, die bei entsprechend feuchter Witterung vollständig abstarben. Der Pilz wird heute als *Mycocentrospora acerina* bezeichnet.

M. acerina ist unter folgenden von Synonymen bekannt:

- = *Spermospora impatientis* MELNIK; Mikol. i Fitopatol. 1: 255 (1967).
- = *Anguillospora flagellifera* INGOLD; Trans. Br. mycol. Soc. 32: 345 (1949).
- = *Centrospora acerina* (HARTIG) NEWHALL; Phytopathology, 36: 894 (1946).
- = *Ansatospora acerina* (HARTIG) HANSEN & TOMPKINS; Phytopathology 35: 220 (1945), nomen non rite publicatum.
- = *Ansatospora macrospora* (OSTERW.) NEWHALL; Phytopathology 34: 98 (1944), nomen non rite publicatum.
- = *Centrospora macrospora* (Osterw.) Neergaard; Gartner-Tidende 59 (8): 95-98 (1943).
- = *Centrospora ohlsenii* NEERGAARD; Zentbl. Bakt. ParasitKde, Abt. 2, 104:(1942).
- = *Cercospora praegrandis* SPRAGUE; Mycologia 29: 431 (1937).

= *Cercospora macrospora* OSTERWALDER; Mitt. thurgau. naturf. Ges. 25: 73 (1924).

= *Cercospora cari* WESTERDIJK & VAN LUIJK; Meded. phytopath. Lab. Willie Commelin Scholten 8: 54 (1924).

= *Cercosporella acerina* (HARTIG) ARNAUD; Bull. Soc. Path. vég. Fr. 5: 59 (1918).

= *Sporidesmium acerinum* (HARTIG) FRANK; Krankheiten der Pflanzen 2:318.(1896).

= *Cercospora ailanthe* P. SYDOW; Hedwigia 38: 140 (1889).

= *Cercospora acerina* HARTIG; Unters. forstbot. Inst. München 1: 58 (1880).

(Nach: VIENNOT-BOURGIN, 1945, NEERGAARD & NEWHALL, 1951, DEIGHTON, 1971, DEIGHTON, 1972 und SUTTON & GIBSON, 1977).

Nach einer Infektion mit *M. acerina* entstehen auf den Blättern ein bis zwei mm große Flecken, die sich zu etwa drei mm Größe ausweiten, wobei das Gewebe eine braun-schwarze Farbe annimmt. Gelegentlich sind die Flecken von einem hellgrünen, später durchscheinendem Hof umgeben, der den Symptomen einer *Pseudomonas*-Infektion ähnelt. Bei der Bakteriöse kommt es zu vergleichbaren durchscheinenden Flecken an Blättern und Stängel, die zum Absterben der Triebe führen können. Sobald sich das geschädigte Gewebe weiter vergrößert, stirbt im Inneren das Gewebe ab und färbt sich hellbraun, während der Rand dunkelbraun bis blauschwarz bleibt (DALCHOW, 1995).

M. acerina ist als Pflanzenpathogen in den temperierten Regionen (Europa, Nordamerika, Australien und Neu Seeland) weit verbreitet. Ein Auftreten in tropischen Regionen als Phytopathogen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (DEIGHTON, 1971).

Mycocentrospora ist nicht spezialisiert, so dass der Wirtspflanzenkreis sehr groß ist. HERMANSEN, 1992, berichtet von 90 betroffenen Pflanzenarten, von denen bei 57 eine natürliche Infektion beobachtet wurde. Die anderen Arten zeigten nach einer Inokulation Symptome. Betroffen sind die unterschiedlichsten Pflanzen, darunter Gehölze, Zierpflanzen, Gemüse und Unkräuter (GÜNDEL, 1976). Außer auf Wirtspflanzen kann der Pilz auch im Boden überdauern. Untersuchungen von WALL & LEWIS (1980) zeigten, dass die Chlamydosporen, über den untersuchten Zeitraum von zwei Jahren, bei einer Tiefe von fünf Millimetern zu 99 % und bei einer Tiefe von 20 mm zu 96,5 % keimfähig waren. Für Sellerie sind diese Chlamydosporen, die im Boden nahe an den Pflanzen sind, die Hauptinfektionsquelle (DAY et al., 1972).

Eine weitere Infektionsquelle kann Flusswasser sein, mit dem die Kulturen gewässert oder nach der Ernte (z. B. Pastinak, Möhren) gewaschen werden. Das Infektionsmaterial stammt

hierbei von Wasserpflanzen, die von *M. acerina* befallen sind. Die Konidien werden vom Wasser abgewaschen und verteilt (IQBAL & WEBSTER, 1969).

Bei Stiefmütterchen führt dieses Überdauerungspotential bei genügender Bodenfeuchtigkeit zu einem direkten Befall der unterirdischen Organe. Für die Infektion von Stielen und Blättern bildet der Pilz Sporen, die bei Regenfällen durch das Spritzwasser auf die Pflanze gelangen (NEUBAUER, 1994).

Das Problematische an diesem Pilz ist seine Toleranz gegenüber niedrigen Temperaturen. Infektionen können bereits bei Temperaturen nahe 0 °C erfolgen. Bei Temperaturen über 5 bis 8 °C kommt es zu einer schnellen Entwicklung der Symptome. Bei kühler Witterung kann die Krankheit zu Misswuchs und Absterben der Pflanzen führen (RINTELEN & KLEWITZ, 1976). Ein Pilzwachstum ist nach NEUBAUER (1994) bereits ab einer Temperatur von -3 °C zu beobachten. Ab einer Temperatur von 30 °C stellt der Pilz das Wachstum ein (NEERGAARD & NEWHALL, 1951).

Abgesehen von der Einstufung als Blattfleckenerreger ist *Mycocentrospora* auch bekannt als Auslöser für eine Wurzelhals- und Wurzelfäule (HEDDERGOTT & KOCK, 1986). Hierbei faulen die Bereiche unter dem Wurzelhals. Diese Fäule kann zum Totalausfall gesamter Stiefmütterchenkulturen führen (RINTELEN & KLEWITZ, 1976).

Neben den beschriebenen phytopathogenen Eigenschaften existieren auch Hinweise darauf, dass *Mycocentrospora acerina* unter bestimmten Umständen auch ein Humanpathogen ist. EMMONS et al. berichteten 1957 von hornhäutigen Läsionen im Gesicht eines zwölfjährigen, indonesischen Jungen. Das ganze Gesicht inklusive Lippen, Augenlider und beide Ohren waren betroffen. Die Infektion war über mehrere Jahre persistent und eine Therapie schlug fehl. Sie isolierten bei vier Biopsien insgesamt 150 Kolonien, die sie als *Cercospora apii* identifizierten. Durch Inokulationsversuche an Kopfsalat, Kartoffel und Tomate konnten Blattflecken hervorgerufen werden. 1977 untersuchten DEIGHTON & MULDER einen Stamm von EMMONS et al. (1957) und identifizierten ihn als *Mycocentrospora acerina*. Dies ist nicht nur der erste Bericht von *Mycocentrospora* als Humanpathogen, sondern auch der erste über eine Verbreitung im tropischen Raum.

Eine Bekämpfung ist aus mehreren Gründen schwierig. Obwohl *Mycocentrospora* auch über den Samen übertragen werden kann (GILL, 1971), ist der Boden als Hauptinfektionsquelle anzusehen. Aber aus Mangel an freien Flächen werden in vielen Betrieben die Pflanzen jedes

Jahr wieder auf den gleichen Flächen kultiviert. Aus diesem Grund reichert sich der Pilz im Boden an.

Aufgrund seines sehr großen Wirtspflanzenkreises lässt sich *Mycocentrospora* nie ganz ausschalten. Eine Bekämpfung der Unkräuter auf den Flächen ist unumgänglich, um so die Menge an Infektionspotential zu verringern.

Ein weiteres Problem ist die Temperatur, bei der der Erreger auftritt. Bei diesen niedrigen Temperaturen ist die Wirksamkeit von Fungiziden stark eingeschränkt (NEUBAUER, 1994). Für eine ausreichende Wirkung muß die Temperatur für die meisten Fungizide mehr als 13 °C betragen (NENNMANN, 1996a).

Stiefmütterchen gelten als eine Kultur, die gegenüber Pflanzenschutzmitteln relativ verträglich ist. In der gärtnerischen Praxis kommen deshalb immer wieder Präparate mit anderen Indikationen zum Einsatz, die im Zierpflanzenbau keine Zulassung haben (NENNMANN, 1996b). Erschwerend für eine Bekämpfung mit Pflanzenschutzmitteln ist deshalb die seit dem 01.07.2001 in Kraft getretene Gebotsindikation. Ab diesem Zeitpunkt dürfen nur noch die Mittel eingesetzt werden, die auch für die entsprechende Kultur zugelassen sind. Die Krankheitsresistenzzüchtung erlangt dadurch noch größere Bedeutung.

1.3.2 Pathogen *Ramularia* spp.

Neben *Mycocentrospora* gehört auch *Ramularia* zu den Blattfleckenerregern. FLACHS stellte bereits 1927 bei seinen Untersuchungen fest, dass zwei Arten beteiligt waren. Er identifizierte sie als *Ramularia lactea* und *R. agrestis*. Letzterer hat besonders im Gewächshaus die größte Bedeutung erlangt (MERZ, 1997). Wie bei *Mycocentrospora* sind auch die beiden *Ramularia*-Arten in der Lage, Stiefmütterchen schon bei niedrigen Temperaturen zu infizieren (SCHICKEDANZ, 1987). Welche der beiden Gattungen nun die größere Bedeutung hat ist nicht eindeutig zu entscheiden. Für ALSCHER (1995) ist *Ramularia* der wichtigste Erreger der Blattkrankheiten.

R. lactea verursacht auf den Blättern bleiche, runde, weiß eingetrocknete Flecken mit weißem, reifartigem Belag auf der Blattunterseite aus Konidienträgern und Konidien (DALCHOW, 1995). Die Flecken sind kreisrund, oft auch in die Länge gestreckt, von anfänglich bräunlicher, später weißlicher Färbung. Ihr Durchmesser beträgt 5 mm und mehr. Von dem gesunden

Gewebe sind die Flecken meist durch einen deutlichen braunen Saum abgegrenzt. Mit Vorliebe tritt die Krankheit an älteren Blättern auf und wird durch Feuchtigkeit in hohem Grade begünstigt (FLACHS, 1927).

R. agrestis erzeugt ähnliche Blattflecken wie *R. lactea*, die jedoch seltener einen Durchmesser von 5 mm erreichen. Die befallenen Gewebepartien sind, im Gegensatz zu den durch *R. lactea* verursachten, anfänglich hellgrün gefärbt, eingesunken und zeigen einen dunkelbraunen Mittelpunkt. Später werden die Flecken gelblich und lassen einen feinen, deutlichen Saum sowie konzentrische Ringe erkennen. Im Endstadium brechen diese nekrotischen Gewebepartien heraus, so dass die Blätter durchlöchert erscheinen (FLACHS, 1927).

1.4 Wechselwirkung von Pflanze und Pathogen

Die beschreibende Terminologie der Wechselwirkungen von Pflanzen und Pathogenen wird in der Literatur kontrovers diskutiert (ANDRIVON, 1993 und ANDRIVON, 1995). Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf das System *Viola-Wittrockiana*-Hybriden/*Mycocentrospora acerina* und verwendet die folgende Terminologie zur Beschreibung der Krankheitsausprägung.

Als Pathogenität wird die Fähigkeit eines Organismus bezeichnet, eine Krankheit auszulösen (DURBIN, 1981 und HAWKSWORTH et al., 1995). Die Pathogenität ist ein qualitatives Merkmal, d. h. ein Parasit kann entweder pathogen sein oder er ist es nicht (PRELL, 1996).

Die Virulenz dagegen ist ein quantitativer Begriff und beschreibt die relative Krankheitsinduzierungsfähigkeit eines Mikroorganismus (DURBIN, 1981 und HAWKSWORTH et al., 1995). Es wird daher auch in schwach, mittel und hoch virulente Pathogene unterschieden (PRELL, 1996).

Wechsel der Wirtsspezifität bedeutet Wechsel der Pathogenität, Wechsel in der Stärke der Krankheit bedeutet Wechsel der Virulenz (DURBIN, 1981).

Auf den Begriff der Aggressivität wird aus Gründen der Übersichtlichkeit in dieser Arbeit verzichtet. Er umfasst zwei Aspekte. Erstens die Fähigkeit eines Organismus eine Pflanze zu befallen, sich in oder auf ihr zu vermehren und zweitens bezeichnet sie die Eigenschaft eines Erregers, die die Schwere der von ihm verursachten Krankheit widerspiegelt (AUST et al., 1993). Der Begriff Aggressivität umfasst somit die beiden Begriffe Pathogenität und Virulenz.

1.4.1 Toxine

Bakterielle und pilzliche Pflanzenpathogene sind bekannt für ihre Toxinproduktion. Symptome, die für Toxine sprechen sind Chlorosen, Nekrosen, Fäulnis und Welke. Sie entstehen noch bevor Hyphen oder Bakterien den Ort erreichen (GRANITI, 1991). FAJOLA (1978) gibt als ein zusätzliches Symptom noch Wachstumsabnormalitäten an. Die Virulenz von Pflanzenpathogenen ist abhängig von der Fähigkeit ein oder mehrere Toxine zu produzieren (GRANITI, 1991) und die Pflanze damit anzugreifen und zu schädigen.

In der Literatur wird der Begriff Toxin kontrovers beschrieben. Ein Toxin ist ein Produkt von Mikroorganismen, welches Schäden am Pflanzengewebe hervorruft und in die Krankheitsentwicklung involviert ist. Von dieser Definition ausgenommen sind allerdings die Enzyme. Einige Enzyme von Pflanzenpathogenen sind an der Gewebedesintegration beteiligt und sind so indirekt toxisch für die Pflanzen (BATEMAN & BASHAM, 1976). PRELL (1996) bezeichnet Stoffe als Toxine, die selbst in sehr großen Verdünnungen noch wirksam sind und ein Molekulargewicht von bis zu 1000 Dalton haben. Für GRANITI (1991) haben die pektolytischen Enzyme zwar eine toxische Wirkung auf die Pflanzenzellen, gehören im engeren Sinne aber nicht zu den Toxinen. MITCHELL (1984) definiert Toxine als vom Pathogen produzierte Substanzen, die einige oder alle Symptome hervorrufen und von der Pflanze nicht synthetisiert werden können. Dies trifft somit nicht für die Gruppe der pektinabbauenden Enzyme zu, da sie auch von Pflanzen, z. B. zur Fruchtreife, produziert werden.

Anders bei Polysacchariden und anderen ähnlich hochmolekularen Produkten von pathogenen Mikroorganismen. Solche Metabolite führen zu Gefäßverstopfungen und damit verbunden zu Welkeerscheinungen. Der Mechanismus beruht auf reiner Mechanik.

Eine Trennung der extrazellulären Enzymen von den Toxinen ist sehr unbefriedigend. Klar ist, dass einige Enzyme von Pflanzenpathogenen in Gewebedesintegrationen beteiligt sind und so auch toxisch für Pflanzenzellen sind (DURBIN, 1981). Toxine lassen sich zusammenfassend folgendermaßen charakterisieren:

- Metabolit eines Pathogens.
- Kein Enzym.
- Fügt dem Wirt Schaden zu.
- Faktor, der entweder Pathogenität oder Virulenz bedingt.

(DURBIN, 1983).

Eine große Gruppe phytotoxischer Substanzen sind häufig an der Ausbildung von Symptomen bei Pflanzen mitverantwortlich. Sie sind jedoch nicht notwendigerweise mit einer spezifischen Wirt-Parasit-Beziehung verknüpft. Solche Pathogene können mit ihren Toxinen, neben ihrem eigentlichem Wirt, auch andere Pflanzenarten schädigen. Solche Toxine werden "nicht-wirtsspezifische Toxine" genannt (HOCK & ELSTNER, 1988). Demgegenüber werden Toxine, die nur in einer spezifischen Wirt-Parasit-Beziehung am Krankheitsverlauf beteiligt sind als "wirtsspezifische Toxine" bezeichnet.

Toxine werden je nach Wirkungsweise und Organismus den sie befallen unterschiedlich bezeichnet. Toxine, die von Pilzen produziert werden, die Nahrungsmittel befallen und schädlich für Wirbeltiere sind, bezeichnet man als „Mycotoxin“. Einige Mycotoxine sind aber auch in der Lage pflanzliches Gewebe zu schädigen.

Der Terminus "Phytotoxin" wird verwendet, wenn es sich um Stoffe handelt, die für Krankheitssymptome in höheren Pflanzen verantwortlich sind. Dieser Begriff umfasst auch Substanzen, die nur in vitro gebildet werden. Aus diesem Grund wurde der Begriff „Vivotoxin“ eingeführt. Er bezeichnet Giftstoffe, die explizit aus einer Pflanze-Pilz Interaktion hervorgehen. Der Begriff „Pathotoxin“ beschreibt eine Substanz, die wirtsspezifisch ist, in geringer Konzentration Symptome auslösen kann und selektiv den anfälligen Wirt schädigt, aber nicht einen resistenten Stamm (HARBORNE, 1983).

Ein Blick in die Phylogenie zeigt, dass *Mycocentrospora* sich morphologisch nur wenig von *Cercospora* unterscheidet. Früher zählte *Mycocentrospora* zur Gattung *Cercospora* und FRANDSEN, 1955, hält *Centrospora acerina* für eine *Cercospora*-Art. *Cercospora*, insbesondere *Cercospora beticola*, ist aufgrund seiner wirtschaftlichen Bedeutung bei Zuckerrüben gut untersucht. Gefunden wurde hier ein rotes Toxin, das nach der Gattung Cercosporin genannt wurde und eine Reihe von gelben toxischen Farbstoffen, die unter dem Namen Cercospora-Beticola-Toxin (CBT) zusammengefasst wurden.

Cercosporin wurde zum erstenmal 1953 von Deutschmann aus *Cercospora kikuchii* MATSUMOTO et TOMOYASU isoliert. 1957 wurde der rote Farbstoff von KUYAMA und TAMURA Cercosporin genannt. Als Summenformel postulierten sie $C_{30}H_{28}O_{10}$. Die Struktur (Abb. 5) wurde erst 1971 von LOUSBERG et al. aufgeklärt. Cercosporin (1,12-bis (2-hydroxypropyl)-2,11-dimethoxy-6,7-methylenedioxy-4,9-dihydroxyperylene-3,10-chinon) ist ein roter

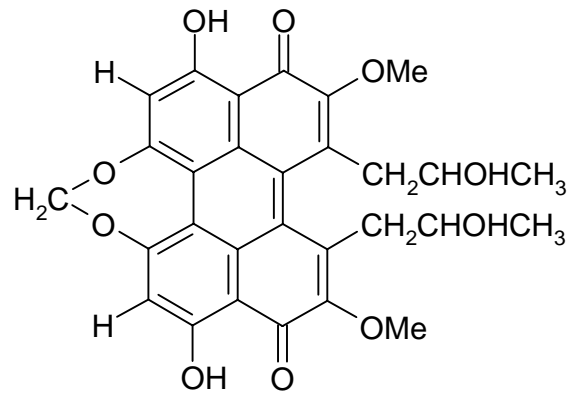


Abb. 5: Strukturformel von Cercosporin.

Farbstoff, der durch Licht aktiviert wird. Diese Energie (Abb. 6) wird dann auf Sauerstoff übertragen, es entsteht singulett Sauerstoff (DAUB, 1987 und DOBROWOLSKI & FOOTE, 1983) und Superoxid. Diese Sauerstoffspezies schädigen die Pflanzen durch Peroxidation der Membranlipide. Aus den spontan peroxidierten Fettsäuremolekülen, z. B. Linolensäure als Hauptbestandteil pflanzlicher Membranen, können unter Metallkatalyse Stoffe wie Ethan und Aldehyde entstehen (HOCK & ELSTNER, 1988). Diese Membranbeschädigung führt zu einem Verlust von Membranfluidität, dies wiederum hat einen Verlust von Nährstoffen zur Folge. Beides führt zu einem raschen Tod der Zelle (DAUB, 1987). YAMAZAKI et al. (1975) begründet den Zelltod von Mäusen und Bakterien durch eine Oxidierung von Zellbestandteilen, insbesondere von Aminosäureresten, Proteinen und den Basen von Nukleinsäuren. YOUNGMAN et al. (1983) zeigten in ihrer Arbeit, dass es neben der Lipidperoxidation bei Carotinoiden (Crocine) zu einem Ausbleichen kommen kann.

Cercosporin kann bei einem breiten Wirtspflanzenspektrum die entsprechenden Symptome der Krankheit reproduzieren (DAUB, 1982). ASSANTE et al. (1977) untersuchten bei einem Screening der Gattung *Cercospora* unter anderem auch *Cercospora cari* (= *Mycocentrospora acerina*). Bei dem untersuchten Isolat (CBS 148.52) konnten sie kein Cercosporin feststellen.

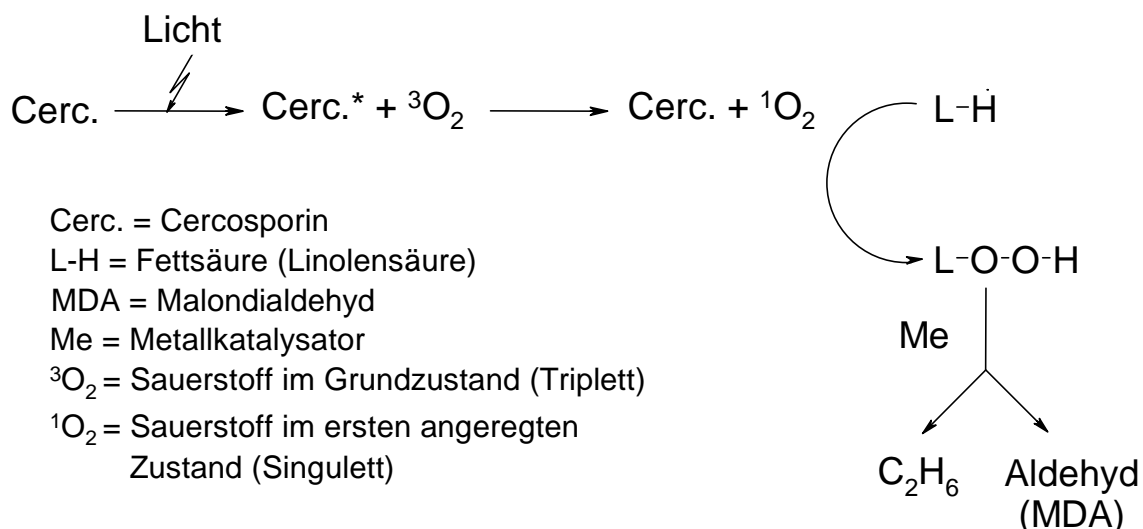


Abb. 6: Photoaktivierung des Cercosporins (nach HOCK & ELSTNER, 1988).

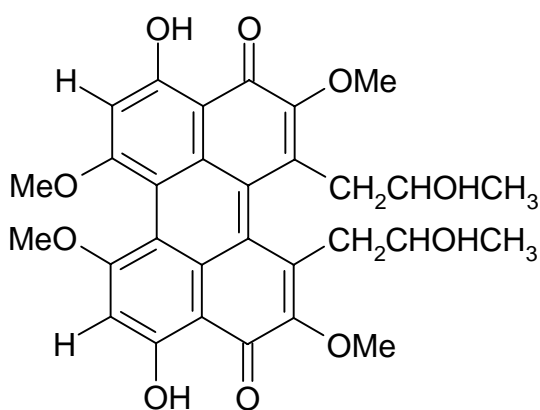


Abb. 7: Strukturformel von Phleichrom.

Eine ähnliche Struktur (4,9-dihydroxyperylen-3,10-chinon Grundkörper) wie das Cercosporin hat auch das Phleichrom (Abb. 7). Auch hier handelt es sich um einen roten Farbstoff, der von dem Pilz *Cladosporium phlei* (GREGORY) DE VRIES gebildet wird. Dieser ist Erreger der Blattfleckenkrankheit bei *Phleum pratense*. Phleichrom zeigt die gleiche phytotoxische Aktivität wie Cercosporin (YOSHIHARA et al., 1975). Einziger

struktureller Unterschied sind die Methoxygruppe in Position 6 und 7.

Eine dritte Gruppe der Perylenchinone stellen die Elsinochrome (Abb. 8) dar. Sie werden von der Gattung *Elsinoë* gebildet. Das Interesse an diesen Verbindungen steigt, weil ihnen durch ihre photodynamische Aktivität eine Wirkung gegen Krebs zugeschrieben wird. Weiter sind sie durch ihre Hemmung der Proteinkinase C potentielle Kandidaten für eine HIV-Therapie (ARNONE et al., 1993).

Elsinochrom A

$R^1 = \text{COCH}_3$, $R^2 = \text{COCH}_3$

Elsinochrom B

$R^1 = \text{COCH}_3$, $R^2 = \text{CHOHCH}_3$

Elsinochrom C

$R^1 = \text{CHOHCH}_3$, $R^2 = \text{CHOHCH}_3$

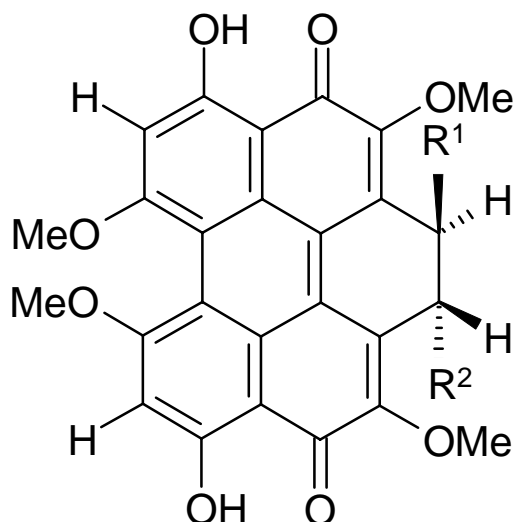


Abb. 8: Strukturformel von Elsinochrom A, B und C.

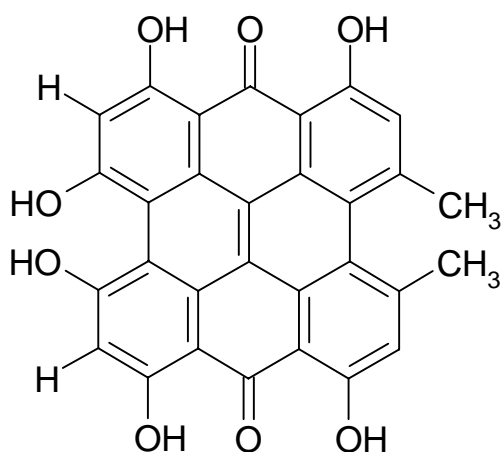


Abb. 9: Strukturformel von Hypericin.

Ein ähnlicher Grundkörper wie der des Cercosporins findet sich in Pflanzen wieder. Auch hier handelt es sich um einen roten Farbstoff, der mit Hilfe von Licht seine toxische Wirkung entfaltet. Es handelt sich um das Hypericin (Abb. 9). Einem hydroxylierten polycyclischen Chinon. Nach Genuß von *Hypericum*-Pflanzen durch nicht pigmentierte Tiere (weiße Pferde, Schafe, Ratten, Mäuse), die anschließend hellem Licht ausgesetzt werden, ist eine Photosensibilisierung zu beobachten. Die Tiere werden unruhig, wälzen sich auf dem Boden, Kinn

und Lippen schwellen an, in schweren Fällen sterben sie unter Krämpfen. Wird Tieren reines Hypericin in Phosphatpufferlösung subkutan gespritzt oder per os gegeben, so treten die gleichen Symptome auf. 1 mg Hypericin reicht aus, um eine 100 g schwere weiße oder gescheckte Ratte bei Sonnenbestrahlung innerhalb von zwei Stunden zu töten. Ohne Belichtung bleibt die Ratte am Leben. Schon in geringer Menge führt Hypericin bei anschließender Belichtung zur Hämolyse von roten Blutkörperchen (ROTH et al., 1994). In der Medizin werden Hypericin und Cercosporin auf ihre Antitumoreigenschaften überprüft. Sie verfügen über eine hohe Affinität zu Membranen von Tumorzellen und durch ihre starke Produktion von singulett Sauerstoff führen sie zur Inhibierung der Zellproliferation (LAVIE et al., 1998). Neben der Antitumorwirkung zeigt Hypericin auch antivirale Eigenschaften. So hat es z. B. eine Wirkung gegen HIV (immunodeficiency virus), Herpes Simplex (HSV) und weitere Viren. Hinzu

kommt noch eine inhibitorische Wirkung gegen verschiedene Proteine wie Proteinkinase C (nach GRUSZECKA-KOWALIK & ZALKOW, 2000).

Ein Pflanzenfarbstoff mit verwandter Struktur und phototoxischen Fähigkeiten wie das Hypericin ist das Fagopyrin (Abb. 10). Fagopyrin kommt bei Pflanzen der Gattung *Fagopyrum* und hier insbesondere bei *Fagopyrum esculentum* vor. Der Samen enthält nur sehr wenig Fagopyrin. Der Hauptanteil ist in den grünen Teilen der Pflanze zu finden. Bei Verfütterung an Nutztiere kann es zu ersten Photosensibilisierungen kommen. Aus

diesem Grund wird die Pflanze weniger als früher angebaut. Zur Aktivierung der phototoxischen Reaktion durch Hypericin und Fagopyrin ist Licht und Sauerstoff gleichermaßen notwendig (JOHNSON, 1983).

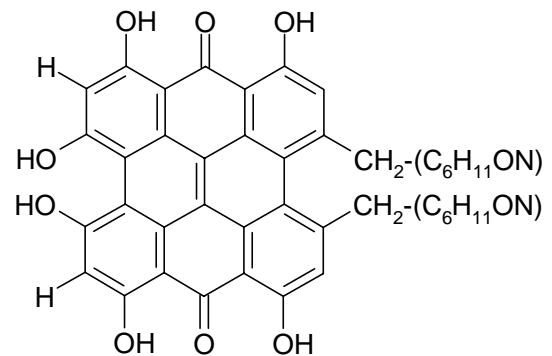
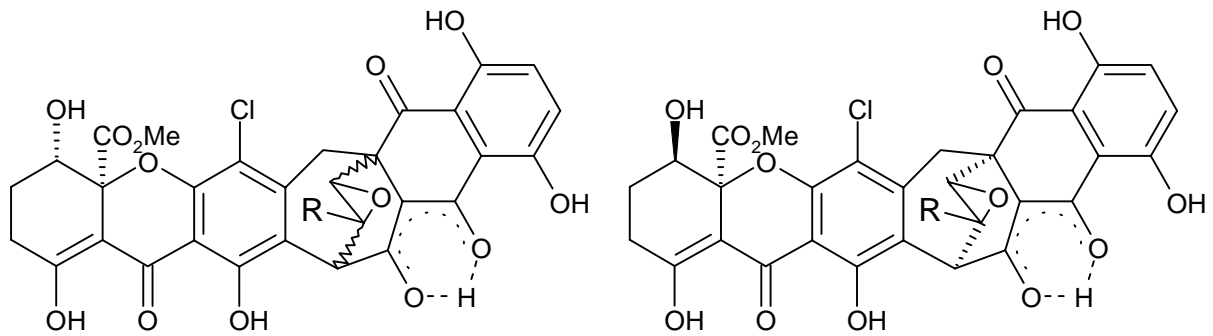


Abb. 10: Strukturformel von Fagopyrin

SCHLÖSSER (1962) extrahierte aus *Cercospora beticola* SACC. eine gelbe Fraktion, die eine antibiotisch und phytotoxische Wirkung besitzt. Er vermutete (SCHLÖSSER, 1964), dass diese Fraktion verantwortlich für die Virulenz des Pilzes ist. Diese *Cercospora-Beticola-Toxine* (CBT) erhielten später den Namen Beticolin und wurden, beginnend bei null, durchnummeriert. DUCROT et al. (1996) schlugen den Namen Beticolin 0 vor, weil sie diese Struktur für den Vorläufer aller anderen Beticoline halten. Mittlerweile sind 20 Substanzen dieser Gruppe isoliert und identifiziert worden (GOUDET et al., 2000). Abb. 11 zeigt einige Strukturbeispiele. Beticoline haben ein breites Spektrum an zytotoxischen Effekten. DUCROT et al. (1994) wiesen nach, dass Beticoline (jeweils zwei Moleküle Beticolin 0) in der Lage sind Mg^{2+} -Ionen zu komplexieren, was vielfältige Einflüsse auf die Pflanzenzelle hat (Verlust an gelösten Stoffen, Depolarisierung des Membranpotentials usw.). Dieser Verlust an gelösten Stoffen wurde verursacht durch Ionenkanäle, die von zwei Beticolinen, mit Hilfe von zwei Mg^{2+} -Ionen, gebildet wurden. Diese Kanäle sind so groß ($r = 7,5 \text{ \AA}$), dass dadurch Stoffe, wie z. B. Glukose, entweichen können (GOUDET et al., 1999).



Beticolin 1: $R=CH_3$

Beticolin 2: $R=CH_3$

Beticolin 3: $R=CH_2OH$

Beticolin 4: $R=CH_2OH$

Abb. 11: Strukturformeln der Beticoline 1,2,3 und 4 (aus: MILAT et al., 1993 und DUCROT et al., 1994).

1.4.2 Enzyme

Das Eindringen des Erregers in die Pflanze, der Abbau der Zellwände und die damit verbundene Desintegration des Gewebes sind wesentliche Schritte in der Pathogenese. Bei diesen Prozessen spielen Enzyme eine entscheidende Rolle.

Ein phytopathogener Pilz kann zur Infektion, wenn er nicht Öffnungen in der Pflanze wie z. B. Stomata oder Läsionen benutzt, eine intakte Oberfläche (Kutikula) eines Blattes direkt mechanisch penetrieren oder aber Kutinasen einsetzen. Die Kutikula besteht hauptsächlich aus Kutin, aber auch aus Beimischungen mit Wachsen, Pektin und Zellulose (AGRIOS, 1978). Kutin ist ein hochpolymerer Ester aus gesättigten und ungesättigten Fett- und Oxifettsäuren. Die Aktivität von Esterasen führen zur Degradation der Kutikula (HOFFMANN et al., 1994).

Pflanzenpathogene produzieren eine Reihe von Enzymen, die in der Lage sind Zellwandkomponenten anzugreifen. Eine entscheidende und auch gesicherte Rolle in der Pathogenese spielen die Enzyme, die die pektinhaltigen Teile der Zellwand angreifen (COOPER, 1983 und COLLMER & KEEN, 1986).

Pektinsubstanzen (Abb. 12) sind langkettige Polymere aus Galakturonsäure- bzw. Methylgalakturonsäureeinheiten, die α -1,4 glykosidisch verbunden sind. Die Zahl dieser Einheiten beträgt jeweils einige Hundert. Im einzelnen unterscheidet man zwischen Pektinsäuren, Pektinen und Protopektin. Die Pektinsäuren bestehen aus Galakturonsäureketten (Polygalakturonsäuren). Bei den Pektinen sind die Carboxylgruppen der Galakturonsäureeinheiten teilweise methyliert. Bei den Protopektinen handelt es sich um unlösliche Pektinsubstanzen mit wechselnder Zusammensetzung (HEß, 1981). Hier sind die Polygalakturonsäureketten miteinander oder mit Zellulose über Kalzium oder Phosphorsäure vernetzt (WAGNER, H., 1988).

Pektinabbauende Enzyme bauen diese Polymere ab und schaffen somit die Voraussetzung, dass auch andere Enzymgruppen (Zellulasen, Hemizellulasen) angreifen können.

Durch diese Zellmazeration sterben die Zellen sehr schnell ab (AGRIOS, 1978).

Bei Pflanzen finden sich Pektinstoffe hauptsächlich in den Primordialwänden (spätere Mittellamellen) und in den Primärwänden in Form von Protopektin (DENFFER et al., 1983). Besonders hoch ist der Anteil der Pektinstoffe an der Mittellamelle (Abb. 14), die häufig als interzellulärer Zement angesehen wird. Primäre Zellwände von dikotylen Pflanzen besitzen ca. 35 % pektische Polysaccharide, bei Monokotylen liegt dieser Wert bei 8 bis 9 % (COOPER, 1983).

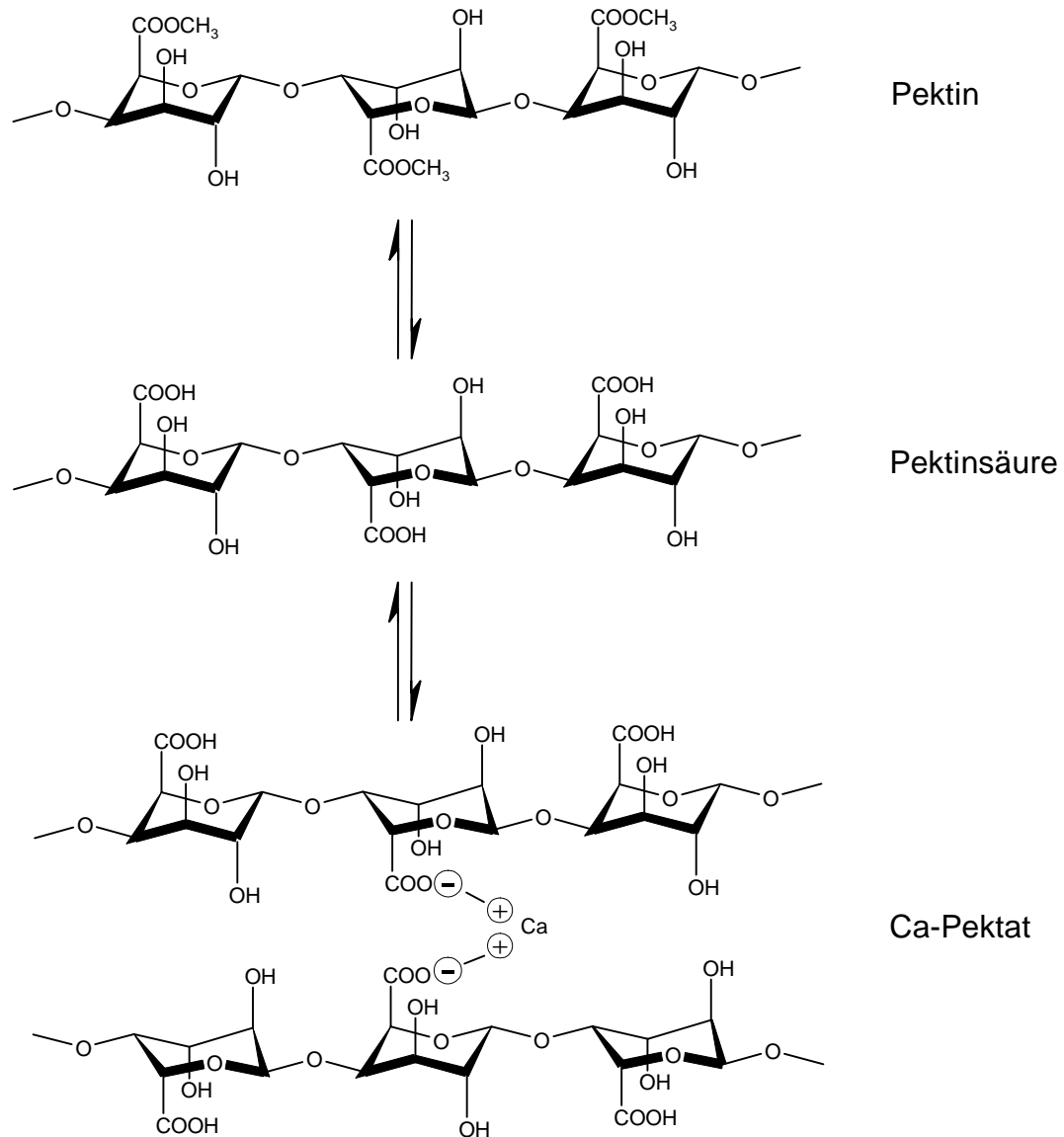
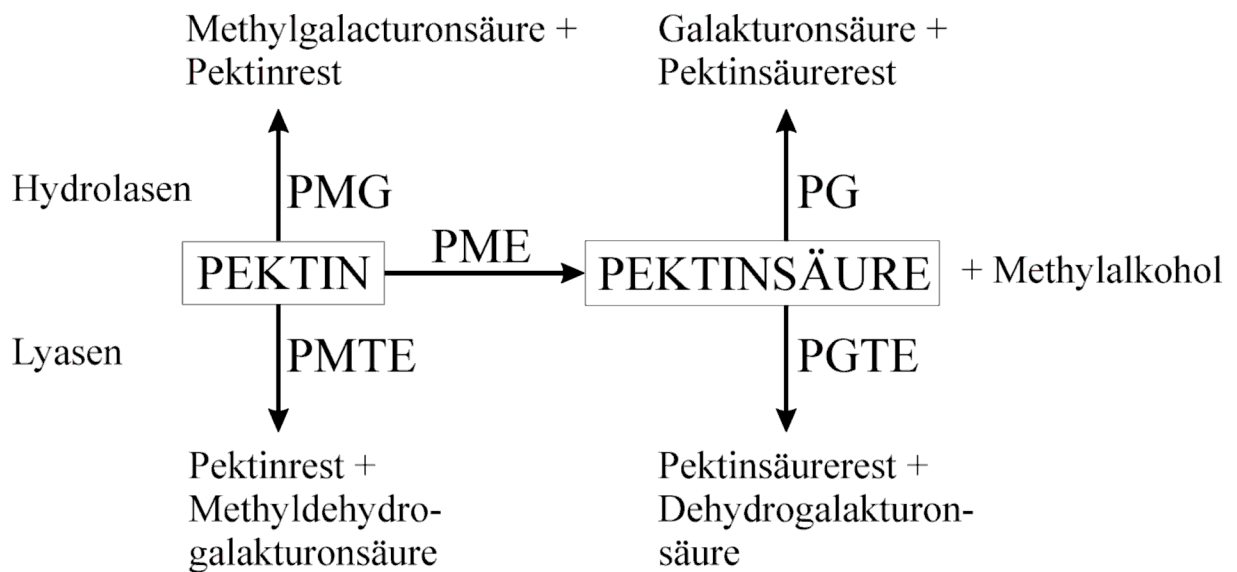


Abb. 12: Molekülstruktur der Pektinstoffe, die an der Zellwandbildung beteiligt sind (nach: FELLEBERG, 1978).

Am Abbau der Polygalakturonsäurekette sind vier Enzyme beteiligt (Abb. 13). Einmal die Hydrolasen Polymethylgalakturonase (PMG) und Polygalakturonase (PG) zum anderen die Lyasen Pektinmethyltranseleminase (PMTE) und Polygalakturonatranseleminase (PGTE). Von allen vier Enzymen gibt es eine Exo- und eine Endo-Form. Die Exo-Form baut die Polygalakturonsäureketten von den Enden her ab, die Endo-Form ist dagegen in der Lage die Kette an einer beliebigen Stelle, außer den Enden, zu spalten. Die Pektinmethylesterase (PME) hat im Gegensatz zu den anderen pektinabbauenden Enzymen keine kettenspaltende, sondern lediglich eine gruppenabspaltende Funktion (hydrolytische Abspaltung der Methylgruppen) (HOFFMANN et al., 1994).



PME: Pektinmethylesterase

PMG: Polymethylgalacturonase

PG: Polygalacturonase

PMTE: Pektinmethyltranseliminase

PGTE: Polygalacturonatranseleminase

Abb. 13: Schematische Übersicht über die pektinabbauenden Enzyme. Nach HOFFMANN et al., 1994.

Lyasen benötigen komplett oder zumindest teilweise Ca^{2+} -Ionen und ein alkalisches Medium (pH-Wert 8-10), wohingegen Polygalacturonasen (Hydrolasen) durch Ca^{2+} -Ionen inhibiert werden und ein niedrigeres pH-Optimum (4-5) haben (McFEETERS et al., 1975 und COOPER et al., 1978).

Weitere zellwandabbauende Enzyme sind die Zellulasen. Sie wurden in zahlreichen pathogenen und saprophytischen Pilzen nachgewiesen, allerdings tragen sie zur Mazeration des Gewebes kaum bei. Bevor sie angreifen können, muss die Zellwand von Pektinasen degradiert werden.

Des weiteren existieren je nach pathogenem Organismus eine Reihe von Hemizellulasen (Hemizellulose abbauende Enzyme) und Ligninasen (Lignin abbauende Enzyme) (HOFFMANN et al., 1994), die nötig sind, um die Zellwand vollständig abzubauen.

Neben den Toxinen und Enzymen gibt es noch von Mikroorganismen produzierte Wachstumshormone, die eine signifikante Rolle in der Virulenz eines Pathogens spielen (MITCHELL, 1984). Der Einfluss dieser Substanzen ist schwierig zu klären, da nicht immer klar ist, wie

viel der identifizierten Wachstumsregulatoren vom Pathogen und wie viel von der Wirtspflanze selbst gebildet wurde (SPRECHER, E. & URBASCH, I., 1984).

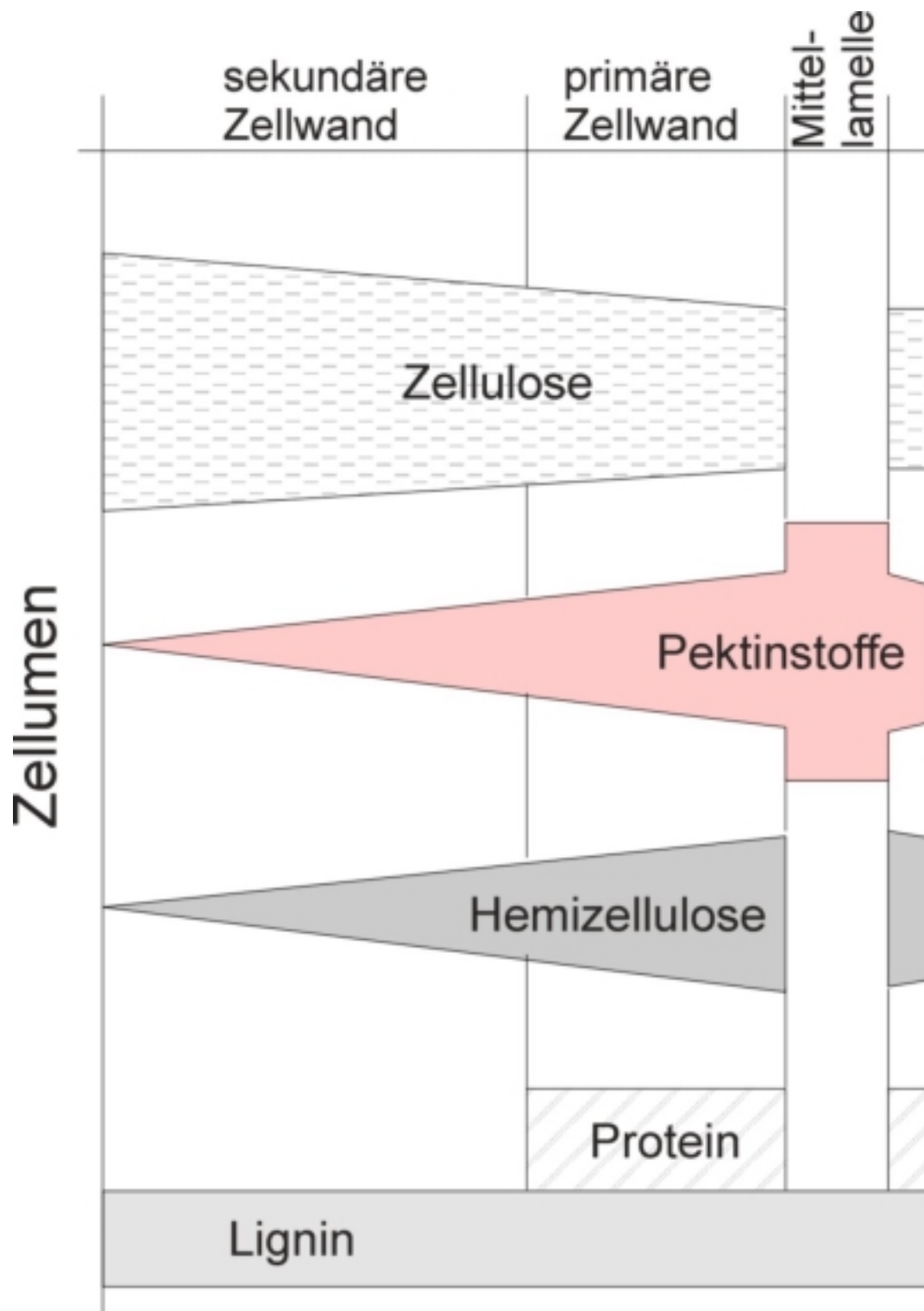


Abb. 14: Verteilung der Zellwandbestandteile in den unterschiedlichen Schichten der Zellwand (aus: HOFFMANN et al., 1994).

Die biologische Funktion eines Toxins oder Enzyms ist ein Kriterium für seine weitere Klassifizierung. Entweder wird es als Pathogenitätsfaktor oder als Virulenzfaktor eingestuft. Bei Pathogenitätsfaktoren sind Toxine/Enzyme essentiell für den Erreger, erst durch sie kommt es zu den krankheitstypischen Symptomen. Virulenzfaktoren verstärken dagegen die Krankheit (MITCHELL, 1984).

1.5 Problemstellung

Obwohl Stiefmütterchen eine wirtschaftlich wichtige Kultur ist und die Blattfleckenerreger einen großen Schaden für den Erwerbsgartenbauer verursachen, sind Untersuchungen über dieses Wirt-Parasit-System kaum vorhanden. Die Problematik der Bekämpfung bei kühler Witterung ist dagegen seit langem bekannt.

Erstmals erwähnt wurde *M. acerina* 1880 von HARTIG, die erste Beschreibung als Erreger der Blattfleckenkrankheit an Stiefmütterchen stammt von OSTERWALDER, 1924. NEERGAARD, & NEWHALL 1951 und GÜNDEL, 1976 erarbeiteten für *M. acerina* die ersten Grundlagen und zeigten die Schwierigkeit der Bekämpfung bei den sehr niedrigen Temperaturen auf, bei denen der Pilz in der Lage ist, Pflanzen zu infizieren. Durch den sehr großen Wirtspflanzenkreis, zu dem auch Kulturpflanzen wie z. B. Möhren und Sellerie gehören, besteht großes Interesse an Virulenzuntersuchungen. Virulenzuntersuchungen beschränken sich meist auf einen Aspekt (Toxine, Enzyme). Für das Teilgebiet der zellwandabbauenden Enzyme liegen erste Untersuchungen von LECAM et al., 1993, 1994 und 1997 vor.

Keine der bisher in der Literatur durchgeführten Untersuchungen konnte auf eine derart große Sammlung von Isolaten zurückgreifen. Dies ist aber für Aussagen, die die Virulenz betreffen, unabdingbar. Weiterhin unverzichtbar für eine wissenschaftlich fundierte Aussage über die Unterschiede ist die Stabilität der Merkmale. Nur LECAM et al. (1994) versuchten die Kultivierungsbedingungen bei den Virulenzuntersuchungen zu berücksichtigen. Es existiert keine Untersuchung, ob die Unterschiede der Isolate über einen Zeitraum stabil sind, oder ob die unterschiedliche Bewertung der Isolate evtl. auf die Kulturbedingungen zurückzuführen sind. Als möglicher Toxinbildner ist *M. acerina* in der Literatur nicht bekannt. ASSANTE et al. (1977) fanden bei einem Screening von Stoffwechselprodukten lediglich die nicht phytotoxische Substanz Cynodontin.

Genetische Untersuchungen an *M. acerina* wurden laut Literatur noch nicht durchgeführt.

Der Blattfleckenerregerkomplex bei Stiefmütterchen wird von einer Reihe von Schaderregern (Bakterien und Pilze) hervorgerufen. Eine eindeutige Zuordnung scheint anhand der Literatur nur sehr schwer möglich zu sein, da einige Autoren (BÖHMER & WOHANKA, 1999) die Möglichkeit einer Verwechslung sehen. Es ist durch eine Sammlung von kranken Stiefmütterchen zu klären, welche Erreger verantwortlich für die Blattflecken sind und welche Anteile sie am Blattfleckenkomplex haben. Hierbei sind phytopathologische Methoden der Isolierung, Kultivierung, Vermehrung, Inokulumproduktion und Lagerung zu erarbeiten und anzuwenden. Durch Inokulationen mit Reinkulturen ist zu überprüfen, ob die Blattfleckenerreger mit dem Auge erkennbare unterschiedliche Symptome ausbilden, so dass eine schnelle und einfache Bestimmung des Schaderregers auf dem Blatt ohne Laboraufwand möglich ist.

Für die folgenden Untersuchungen muss sich auf eine Art (*M. acerina*), aufgrund des Proben- und Analysenumfanges, konzentriert werden.

Bei der Sammlung von *M. acerina* soll eine genetische Charakterisierung der Isolate verschiedener Herkünfte vorgenommen werden. Über den Organismus liegen allerdings keinerlei DNA-Sequenzdaten vor, so dass die Untersuchung in Form von RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) sinnvoll ist. Die RAPD oder AP-PCR Technik hat den Vorteil, dass neben dem Fehlen von genetischen Daten, ein Screening des Genoms auf individuelle Unterschiede sehr schnell möglich ist (KARP et al. 1998). Zum anderen hat diese Methode dieselben Vorteile wie eine RFLP-Untersuchung (RestrictionsFragment-LengthPolymorphism) ohne deren Nachteile (große DNA Menge, radioaktive Markierung) zu haben (WILLIAMS & KUBELIK, 1991). Die erhaltenen Daten sollen in Bezug zu den weiteren Charakterisierungen der einzelnen Herkünfte gesetzt und analysiert werden. Ziel ist es mit den erhaltenen Daten eine Gruppierung der Isolate von den Herkünften vorzunehmen und bereits Aussagen über spezifische Charakteristika der Herkunft machen zu können, bevor sie aufwendig im Labor geprüft werden.

Die Symptome mit Ausbildung von Chlorosen und Nekrosen sprechen für das Vorhandensein von Toxinen. Bei den verantwortlichen Pathogenen ist eine Synthese solcher chemischer Stoffe nicht bekannt, obwohl die mit *Mycocentrospora* nah verwandte Gattung *Cercospora* bekannt für ihre Produktion von Cercosporin und Beticolinen ist. Aus diesem Grund soll vorerst überprüft werden, ob diese Stoffe auch bei den gesammelten Isolaten gefunden werden können. Sollte dies nicht der Fall sein, ist nach Substanzen zu suchen, die aufgrund ihrer Eigenschaften in der Lage sind, die entsprechenden Symptome bei Stiefmütterchen auszulösen.

Diese sollen in einem zu entwickelnden Biotest auf ihre Toxizität geprüft werden. Sollten andere Stoffe als die von *Cercospora* bekannten für die Krankheit ursächlich sein, so soll versucht werden, diese zu isolieren und zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Im Zeitraum von 1995 bis 1998 wurden in den Herbst- und Frühjahrsmonaten von der Firma Nebelung Stiefmütterchen von Gärtnereien gesammelt, die Krankheitssymptome zeigten (Liste der Herkünfte s. Kap. 8.1). Diese wurden im ersten Jahr per Post, später mit dem PKW ins Labor für Biotechnologie und Qualitätssicherung zur weiteren phytopathologischen Untersuchung gebracht. Dieser Wechsel der Versandart war nötig, um die Verweildauer der Pflanzen in ihren Verpackungen bis zum Eintreffen im Labor zu verkürzen. Die Folge des langen Transportweges im ersten Jahr war eine Vielzahl von saprophytischen Pilzen, die eine Isolation der Pathogene erschwerten, bzw. die Isolation von langsam wachsenden Pilzen wie z. B. *Ramularia* verhinderten. Im Labor erfolgte eine Dokumentation der Symptome und anschließend die Isolation der Erreger. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus aufgestellt und weiter beobachtet.

2.2 Untersuchungen an pflanzenpathogenen Pilzen

2.2.1 Isolationsmethoden

Um möglichst sicherzugehen, dass alle Pathogene isoliert werden konnten, wurden bis auf Pflanzen die nur mit echtem oder falschem Mehltau befallen waren, die Methoden der Oberflächensterilisierung und der Feuchten Kammer angewendet.

2.2.1.1 Direkte in vitro-Isolation (Oberflächensterilisierung)

Blätter mit typischen Krankheitssymptomen wurden von der Pflanze abgeschnitten. Nachdem das befallene Gewebe mit dem Skalpell in ca. 5 x 5 mm Stücke zerkleinert war, wurden die Blattstückchen in ein Teesieb gelegt und nach dem Schema in Tab. 1 behandelt.

Tab. 1: Behandlungsschema für die Oberflächensterilisierung

Behandlung	Dauer
Isopropanol	30 Sekunden
Natriumhyperchlorid	45 Sekunden
steriles Wasser 1	60 Sekunden
steriles Wasser 2	60 Sekunden
steriles Wasser 3	60 Sekunden

Das oberflächensterilisierte Gewebe wurde nun direkt aus dem Sieb, mit Hilfe einer Pinzette, auf die Nährmedien (Wasser-Agar, Czapek und PDA; s. Kap. 8.2) gelegt. Der gesamte Vorgang der Oberflächensterilisation geschah unter aseptischen Bedingungen. Abschließend wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und im Brutschrank bei 22 °C inkubiert.

Da aus einem Blattstückchen oft mehrere verschiedene Pilze auswuchsen, mussten diese umgesetzt werden, um sie zu vereinzeln. Je nachdem wie schnell die verschiedenen Pilze auf dem Nährgewebe wuchsen, erfolgte das Umsetzen auf frisches Nährmedium nach zwei bis vier Tagen.

2.2.1.2 Indirekte in vitro-Isolation (Feuchte Kammer)

Als Sporulationsgefäß wurde eine Gerda-Schale (20 x 20 x 6 cm) verwendet. In diese Schale wurde ein Drahtgeflecht aus Edelstahl gestellt, dass mit einem saugfähigem Papier umwickelt wurde. Das Sporulationsgefäß wurde dann ca. 1 cm mit Wasser gefüllt. Der Deckel konnte in zwei Positionen geschlossen werden. Entweder konnte ein Gasaustausch stattfinden oder in der zweiten Position schloss er dicht. Beide Positionen wurden verwendet, um die besten Bedingungen für den Pilz zu testen (GIEFFERS et al., 1989).

Nach zwei Tagen bei Raumtemperatur wurden die ausgelegten Pflanzenteile kontrolliert. War noch nichts ausgewachsen, wurde am nächsten Tag nochmals kontrolliert. War Pilzmyzel zu

sehen, wurde dieses mit einer Lanzette abgenommen, auf Medium (PDA) transferiert und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Tagen wurden diese Platten kontrolliert. Waren nur Saprophyten ausgewachsen, wurden die Blätter von diesen erkrankten Pflanzen, erneut ausgelegt.

2.3 Kulturbedingungen der Erreger

Die isolierten Pilze wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert. Das dazu benutzte Festmedium (PDA) wurde 15 min bei 121 °C autoklaviert und in sterile Kunststoffpetrischalen (Fa. Greiner, Ø 8,4 cm) gegossen (20 ml). Die Platten wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Umsetzung auf frisches Medium erfolgte im Zeitraum von 80 bis 100 Tagen.

Neben einer Kultivierung auf Agar wurde auch die Kultivierung in Flüssigmedium (PDB) eingesetzt. Das Medium und die Erlenmeyerkolben (500 ml) wurden autoklaviert und dann 200 ml Medium unter sterilen Bedingungen in die Erlenmeyerkolben gefüllt. Nach der Inokulation erfolgte die Kultivierung bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler (120 rpm).

2.4 Inokulation

Für eine Inokulation mit *Mycocentrospora* können sowohl Chlamydosporen als auch Konidien verwendet werden. Chlamydosporen sind Zellen, deren Zellwände verdickt und gewöhnlicherweise pigmentiert sind. Zusätzlich enthalten sie Nahrungsreserven (DICKINSON & LUCAS, 1982) und können somit längere Zeit auch unter ungünstigen Lebensbedingungen überdauern. Zum Zeitpunkt der Bonitur (ca. 10 Tage nach Inokulation) gibt es zwischen den beiden Methoden keinen signifikanten Unterschied (WITSKEN, 1997). Eine Inokulation mit Konidien ist allerdings nur im Labor zu empfehlen, da sich die Konidien als sehr empfindlich erwiesen. So zeigte sich, dass leichte Zentrifugation, die zur Konzentrierung eingesetzt wurde, bereits zur vollständigen Zerstörung der Konidien führte. Ebenso ist das längere Lagern oder der Transport in einer Suspension nicht möglich. Da Teile der Inokulationsversuche aufgrund ihres Umfanges bei der Fa. Nebelung durchgeführt wurden, kam nur eine Inokulation mit Chlamydosporen in Frage.

Fünf Wochen vor Inokulation wurde *Mycocentrospora acerina* von der Erhaltungskultur auf PDA umgesetzt. Nach drei Wochen Kultivierung bei Raumtemperatur hatte der Pilz das Medium komplett durchwachsen. Die Hälfte des Inhaltes einer Petrischale wurde zusammen mit 10 ml PDB im Warring Blendor homogenisiert und unter sterilen Bedingungen in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml PDB überführt. Der Kolben wurde mit einer Alufolie abgedeckt und auf einen Orbitalschüttler mit 120 upm bei Raumtemperatur 145 Tage inkubiert.

Die Ernte der Chlamydosporen erfolgte durch Gießen des Kulturmediums durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm. Auf diese Weise konnten die Chlamydosporen vom Pilzmyzel getrennt werden.

Die Konzentration der Suspension wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und durch Aufkonzentrieren (Zentrifugation) oder Verdünnen mit Wasser auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Für Inokulationsversuche wurde die für die Inokulation optimale Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Chlamydosporen/ml gewählt (WITSKEN, 1997).

Die Inokulation erfolgte an Jungpflanzen im vier- bis acht-Blattstadium (Kultivierung s. Kap. 2.5). Die Chlamydosporensuspension wurde mit einem Druckluftzerstäuber gleichmäßig auf die Pflanzen aufgebracht, bis sie tropfnass waren. Anschließend wurden sie mit einer transparenten Haube abgedeckt, um ein Eintrocknen der Chlamydosporen zu verhindern. Die weitere Kultivierung wurde in einer Klimakammer bei einer Tag-/Nachttemperatur von 17/15 °C durchgeführt. Die 12stündige Beleuchtung (Tag) erfolgte mit drei Leuchtstofflampen (Osram L 58 W/31).

Für die Inokulation bei der Fa. Nebelung wurden Multitopfplatten verwendet. Die Pflanzen wurden direkt gesät (Einzelkornaussaat), um das Pikieren zu sparen. Nach der Inokulation wurde die Luftfeuchtigkeit mit einer Nebelanlage hoch gehalten. Inokuliert wurden 27 bis 36 Pflanzen (je nach Auflauf) von vier Genotypen mit 23 Herkünften in zwei Wiederholungen (insgesamt 6731 Stiefmütterchen).

2.5 Kulturbedingungen der Stiefmütterchen

Die Stiefmütterchen wurden in Aussaatschalen (18 x 13 cm) ausgesät und mit gesiebter Erde (Typ P, Fa. Balster) ca. 2 bis 3 mm abgedeckt. Eine Wässerung erfolgte, bevor die oberste

Erdschicht abzutrocknen begann, so dass die Samen nie austrockneten und immer feucht waren. Wichtig war dabei, dass die Erde nie nass sein durfte. Nach etwa vier Wochen waren die Pflanzen im zwei-Blatt-Stadium und konnten pikiert werden. Das Pikieren erfolgte in Multi-topfplatten (M 50, 51 Töpfe, Durchmesser 4,7 cm, Tiefe 5,5 cm, Bodenloch 6 mm, Fa. Meyer). Jede Platte hatte einen 50 x 30 cm Untersetzer, über den die Bewässerung erfolgte. Als Substrat wurde immer, sowohl für die Aussaat als auch zum Pikieren, Einheitserde Typ P (Fa. Balster) verwendet. Die Inokulationsversuche wurden im Vier- bis Achtblattstadium durchgeführt. Eine Düngung der Pflanzen war für dieses Stadium nicht nötig. Ebenfalls in diesem Pflanzenalter wurden die Blätter für den Biotest abgenommen. Diese Blätter hatten eine Mindestgröße von 1,5 cm².

In der Zeit von Oktober bis April wurde eine Zusatzbeleuchtung mit Natriumdampflampen (400 W) durchgeführt (12 Stunden 08.00 bis 20.00 Uhr).

Ausgesät wurden drei von der Firma Nebelung zur Verfügung gestellte Sorten: Blau mit Auge, Weiß mit Auge und Orange ohne Auge.

2.6 Genomuntersuchungen

2.6.1 Gewinnung des Pilzmaterials

Die Erreger wurden über drei Jahre isoliert und auf PDA-Schrägar bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Um für die Genomuntersuchungen nicht unterschiedlich altes Pilzmaterial zu verwenden, wurden zeitgleich Inokulationen mit allen Herkünften durchgeführt. Nach 10 Tagen wurde der Erreger wieder reisoliert und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die Gewinnung von Pilzmaterial erfolgte wie im Kapitel 2.4 beschrieben. Für die Genomuntersuchungen wurden sowohl die Chlamydosporen als auch das Pilzmyzel verwendet. Dieses Material wurde durch einen Büchnertrichter (Filter: Schleicher & Schuell 595, Ø 90 mm) abfiltriert und auf dem Filter bei - 21 °C eingefroren. Nach 24 Stunden war das Myzel ausreichend gefroren, so dass es lyophilisiert werden konnte. In der Lyophile (Christ Alpha I-5) verblieb es bis zur vollständigen Trocknung (ein bis zwei Tage). Anschließend wurde das Myzel vom Filter genommen und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Die Lagerung bis zu weiteren Untersuchungen erfolgt in Glasröhrchen bei -21 °C.

2.6.2 Puffer und Lösungen

Für die Extraktion der DNA wurden die in Tab. 2 aufgeführten Puffer und Lösungen angesetzt.

Tab. 2: Für die Genomuntersuchungen verwendete Puffer und Lösungen

Extraktions-Puffer	RNase-Lsg.
50 mM Tris HCl	20 mg/ml RNase A
50 mM EDTA	10 mM pH 7,5 Tris-HCl
3 % SDS	15 mM NaCl
1 % 2-Mercaptoethanol	
pH 8,0	
TE 1	TE 2
10 mM Tris HCl	10 mM Tris HCl
1 mM EDTA	0,1 mM EDTA
pH 8,0	pH 8,0

2.6.3 DNA-Extraktion

Aus dem in Kapitel 2.6.1 gewonnenen Pilzmaterial wurde für die Extraktion verwendet. Hierfür wurden die Protokolle von LEE et. al. (1988) und RAEDER & BRODA, (1985) wie folgt abgewandelt:

- Ca. 70 mg von lyophilisiertem und in flüssigem Stickstoff gemörsertem Myzel in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße (E-Cups) einwiegen.
- 750 µl Extraktionspuffer zugeben. 7,5 µl 2-Mercaptoethanol dazupipettieren. 1 Stunde bei 65 °C im Wasserbad inkubieren. Während dieser Zeit mehrmals kräftig schütteln.
- 700 µl Chloroform:Phenol (1:1 (w/w)) zugeben und solange schütteln bis sich beide Phasen durchmischt haben.

- Zentrifugation 15 min 15000 g bei 4 °C (Beckman Allegra™ 21 R, Rotor F2402H, max. Beschleunigung/Abbremsung).
- Obere, wässrige Phase abnehmen und in neues E-Cup überführen, 15 µl RNase A (DNase frei)¹ zugeben und 15 min bei 37 °C inkubieren.
- 700 µl Chloroform:Phenol (1:1 (w/w)) zugeben und solange schütteln bis sich beide Phasen durchmischt haben. Zentrifugation 15 min 15000 g bei 4 °C.
- Obere, wässrige Phase in neues E-Cup überführen. 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1 (v/v)) zugeben. Kräftig schütteln.
- Zentrifugation 5 min 15000 g bei 4 °C.
- Obere, wässrige Phase in neues E-Cup. 20 µl 3 M NaOAc zugeben. Lösungen gut durchmischen. E-Cup mit eiskaltem Isopropanol auffüllen. Vorsichtig schwenken! E-Cups für 15 min in Eis stellen, danach noch einmal kurz schwenken.
- Zentrifugation 15 min 15000 g bei 4 °C.
- Überstand abgießen. Pellet mit 70 %igem Ethanol waschen und anschließend in der SpeedVac® (SpeedVac® Plus SC110 A Savant) trocknen.
- Pellet in 300 µl TE 1 lösen (mehrmals schütteln). Wenn sich das Pellet nicht löst, das Reaktionsgefäß 10-15 min bei 65 °C im Wasserbad inkubieren.
- 10 µl 3M NaOAc zugeben und mischen. E-Cup mit 100 %igen eiskaltem EtOH auffüllen. Vorsichtig schwenken! E-Cups für 15 min in Eis stellen. Anschließend Zentrifugation 15 min 15000 g bei 4 °C.
- Überstand abgießen. Pellet mit 70 %igen eiskaltem EtOH waschen, danach trocknen (Speedvac®).
- DNA in 300 µl TE 2 aufnehmen und schütteln bis sich das Pellet gelöst hat. Eventuell wieder 10-15 min bei 65 °C im Wasserbad inkubieren, um das Pellet zu lösen.
- Bestimmung der Qualität und Quantität mit Photometer.
- Lagerung bis zur weiteren Untersuchung bei -21 °C.

¹ Lösung muß bei der ersten Benutzung zur Aktivierung 10 min bei 100 °C inkubiert werden.

2.6.4 Bestimmung der Qualität und Quantität der extrahierten DNA

Von der in Kapitel 2.6.3 extrahierten DNA wird eine Verdünnungsreihe mit TE 2 hergestellt und die Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm im Photometer (Pharmacia LKB Ultrospec III) gegen TE 2 gemessen. Verwendet wurden Quarzglasküvetten. Die Messwerte der Verdünnungen müssen zwischen 0,3 und 0,7 liegen, da sonst die Standardabweichung zu groß ist (SAUER et al., 1998). Die von der DNA-Lösung absorbierte Menge an UV-Strahlung ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Ein Absorptionswert von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (BROWN, 1996).

Für jede Probe wurde eine Konzentration von 4 µg/ml errechnet und die Verdünnung hergestellt. Für jeden PCR-Lauf wurden aus dieser Verdünnung 10 µl für die Reaktion eingesetzt, dies entspricht einer DNA-Menge von 40 ng.

Die Qualität wurde aus dem Wert von A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} berechnet. Der Wert A_{260}/A_{280} sollte über 1,8 liegen, um die DNA für die PCR verwenden zu können. Kleinere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen und Phenol hin (BROWN, 1996). War der Wert kleiner, mußte die DNA weiter aufgereinigt werden, da bereits Spuren von Phenol die PCR inhibieren können. Je nach Bedarf wurden die Schritte der Extraktion mit Chloroform:Isoamylalkohol (49:1 (v/v)) und die Ethanolpräzipitation wiederholt (NEWTON & GRAHAM, 1994), bis das Verhältnis von A_{260}/A_{280} größer als 1,8 war. Das gleiche traf für den Wert A_{260}/A_{230} zu.

2.6.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In einem 1,5 ml E-Cup wurden folgende Stoffe (Tab. 3) in folgender Reihenfolge pipettiert: Demin Wasser, Puffer (Sigma P-2317), $MgCl_2$ -Lösung (Sigma M-8787), Nucleotide (Advanced Biotechnologies Ltd., AB-0241), Primer (Tab. 4), Taq (Sigma D-4545). Dies wurde gut gemischt und anschließend anzentrifugiert, damit sich die Lösung vollständig am Boden des E-Cups befand. In jedes 200 µl PCR-Reaktionsgefäß kamen dann 40 µl dieser Lösung. Zu diesen 40 µl wurde 10 µl der zu untersuchenden DNA pipettiert, durch Aufziehen mit der Pipette gemischt und in den Thermal-Cycler gestellt.

Bei jedem PCR-Lauf gab es eine Kontrolle. Diese bestand aus allen Reaktionspartnern ohne DNA (No Template Control, NTC). Statt der 10 µl DNA-Lösung wurde das Wasser verwendet, mit dem der Reaktionsansatz verdünnt wurde.

Tab. 3: Reaktionsansatz (Stoffe und Konzentrationen) für die PCR.

Konzentration	Stoff
x 1	Puffer
0,2 mM	dATP
0,2 mM	dCTP
0,2 mM	dGTP
0,2 mM	dTTP
1,5 mM	MgCl ₂
0,5 µM	Primer
1-1,5 u	Taq
15-20 ng	DNA
ad 50 µl	Wasser

Für die Untersuchungen wurde ein Primer-Kit für RAPDs (Kit A [ABA], Nr. 52611) der Fa. Biomol verwendet. In jeder Reaktion wurde nur ein Primer eingesetzt. Folgende Primer wurden getestet.

Tab. 4: Basensequenz der eingesetzten Primer (Biomol Primer Kit for RAPD's, Kit A No.: 52611).

ABA 01	ABA 06	ABA 11	ABA 16
CAGGCCCTTC	GGTCCCTGAC	CAATCGCCGT	AGCCAGCGAA
ABA 02	ABA 07	ABA 12	ABA 17
TGCCGAGCTG	GAAACGGGTG	TCGGCGATAG	GACCGCTTGT
ABA 03	ABA 08	ABA 13	ABA 18
AGTCAGCCAC	GTGACGTAGG	CAGCACCCAC	AGGTGACCGT
ABA 04	ABA 09	ABA 14	ABA 19
AATCGGGCTG	GGGTAACGCC	TCTGTGCTGG	CAAACGTCGG
ABA 05	ABA 10	ABA 15	ABA 20
AGGGGTCTTG	GTGATCGCAG	TTCCGAACCC	GTTGCGATCC

2.6.5.1 PCR-Programm

Für die Polymerasekettenreaktion wurde ein Thermal-Cycler von Biometra (T-Gradient) verwendet. Mitentscheidend für den Erfolg einer PCR ist die optimale Hybridisierungstemperatur. In Vorversuchen wurde ein Temperaturbereich ermittelt, in dem die Primer in der Lage waren, an die komplementären Basen zu binden und es somit zu einer Polymerisationsreakti-

on kam. Dieser Temperaturbereich lag zwischen 36 und 40 °C. Zur Ermittlung der optimalen Temperatur wurde ein Gradient in dem ermittelten Temperaturbereich gefahren (Tab. 5). Die Konzentrationen der Reaktionspartner und sonstige Bedingungen waren in allen Reaktionsgefäßen identisch. Das Temperaturprofil entsprach, außer der Hybridisierungstemperatur, dem in Tab. 6.

Tab. 5: Verwendete Temperaturen im Bereich von 36 bis 40 °C bei der Optimierung der PCR.

Reaktionsgefäß	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur [°C]	36,0	36,1	36,3	36,8	37,2	37,7	38,2	38,7	39,1	39,6	39,8	39,9

Mit dem Ergebnis der Optimierung wurde folgendes Temperaturprofil, abgewandelt nach INNIS et al., 1990, für den Ablauf der Reaktion programmiert (Tab. 6).

Tab. 6: Verwendetes Temperaturprofil für die PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	94 °C	4 min
2	95 °C	1 min
3	38,7 °C	1 min
4	72 °C	2 min
5	72 °C	5 min
6	4 °C	Ende

Nach Schritt fünf war eine Schleife programmiert, so dass die Schritte zwei bis fünf 39 mal wiederholt wurden. Insgesamt also 40 Zyklen durchlaufen wurden. Nach Abschluss des letzten Zyklusses und Erreichen von 4 °C wurde entweder sofort das Agarosegel beladen oder die Proben bei –21 °C bis zur weiteren Untersuchung eingefroren.

2.6.6 Agarosegelelektrophorese

In 130 ml 0,5 x TBE (Tris-Borate-EDTA Buffer) wurde 0,9 % Agarose (Agarose für die analytische Nucleinsäureelektrophorese, Merck 1.01236.0100) in einen 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben und in der Mikrowelle mehrmals bis zum Sieden erhitzt. Wenn sich die Agarose vollständig gelöst hatte, wurde die entwichene Flüssigkeit durch demin Wasser ersetzt. Nach

Abkühlung auf 55 °C konnte die Agarose in die Gelform gegossen und der Kamm eingehängt werden. Nach ca. 30 min war das Gel fest und konnte in die Elektrophoreseeinheit (Hoefer Submarine Agarose Gel Unit, HE 99) gelegt werden, die mit 0,5 x TBE als Puffer gefüllt war. Der Puffer wurde zuvor mindestens 12 Std. im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und diente zur Kühlung während der Elektrophorese, um ein ungleichmäßiges Wandern der Banden ("Smile"-Effekt) zu verhindern (ALPHEY, 1997).

Zu 25 µl PCR-Probe kamen 10 µl einer 30 % igen Saccharose-Lösung. Durch Aufziehen mit der Pipette wurden die beiden Lösungen gemischt. Anschließend wurden die so behandelten Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Ein Gel hatte 15 Taschen, in die 13 Proben kamen. Mit aufgetragen wurde in den beiden Außenbahnen je ein DNA Längenstandard (Sigma D-7058), bestehend aus 16 Fragmenten (Abb. 15). Insgesamt wurden zur Auftrennung aller Proben (*Mycocentrospora*, *Fusarium* und NTC) drei Gele verwendet.

Das Gel wurde bei einer konstanten Spannung von 125 V und variabler Stromstärke gefahren (Pharmacia Biotech EPS 600 Electrophoresis Power Supply). Nach ca. 1,5 Std. waren die Banden ausreichend getrennt, dass man das Gel färben und auswerten konnte.

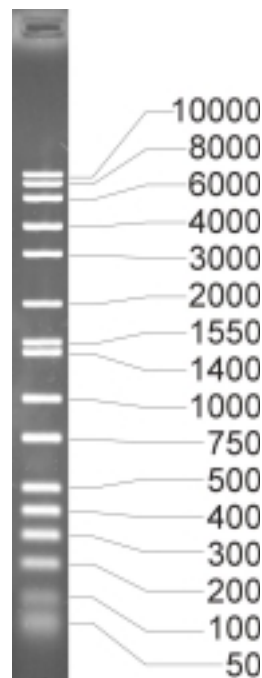


Abb. 15: Längenstandard D-7058 (Sigma) mit 16 Fragmenten (10; 8; 6; 4; 3; 2; 1,55; 1,4; 1; 0,75; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 und 0,05 kb).

2.6.6.1 DNA-Färbung

Das Gel wurde 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (700 µg/ml, Sigma E-8751) auf dem Schüttler gefärbt. Anschließend wurde das Gel in demineralisiertem Wasser 20 min entfärbt, um auch die schwachen Banden deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden (SAMBROOCK et al. 1989).

2.6.6.2 Dokumentation und Auswertung der Nukleinsäuregele

Mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage (Fa. MWG) erfolgte die Auswertung. Das Gel wurde mit Strahlung der Wellenlänge 254 nm durchleuchtet und mit einer Kamera (CCD-Chip) digitalisiert. Als Software zur Aufnahme wurde PhotoFinish V 3.0 verwendet. Die weitere Bearbeitung der digitalisierten Gele erfolgte mit RFLPScan V 3.21 und die Speicherung der Daten in einer Datenbank mit RFLP DB V 3.21. Mit dieser Datenbank wurden auch die für die Dendrogramme benötigten 0/1-Matrizes generiert. Die Dendrogramme wurden mit Treecon V 1.2 (VAN DE PEER & DE WACHTER, 1994) erstellt. Die Bilder zum Druck wurden mit Corel PhotoPaint 7.0 SE bearbeitet.

Durch die Vielzahl der Proben mussten für jeden Primer drei Gele gefahren werden. Über den Längenstandard konnte für jede Bande die Anzahl der Basenpaare bestimmt werden, die in der Datenbank gespeichert und dann in einem schematisierten Gel zusammengefasst wurden. So konnten die drei Gelläufe zu einer Grafik (Beispiel s. Abb. 51) zusammengefasst werden. Für die 0/1-Matrix wurde die Anzahl der Basenpaare der Banden verglichen und sogenannte Bins gebildet. Hierbei wurde mit einer Toleranz von 2 % gerechnet. Alle Banden, die in diesem Toleranzbereich lagen wurden als gleiche Bande angesehen und verrechnet. Hat eine *Mycocentrospora*-Herkunft in diesem Bereich eine Bande, erhält sie eine 1 in der Matrix, ansonst eine 0, bzw. in den Tabellen (Tab. 15 und Tab. 20 bis Tab. 28) ein + für eine vorhandene Bande und ein -, wenn keine Bande vorhanden war. Jeder Bin entspricht einem Merkmal.

2.7 Proteomuntersuchungen

Von dem gleichen lyophilisiertem Material, welches für die Genomuntersuchungen verwendet wurde, wurden Proteine extrahiert und für die weiteren Untersuchungen verwendet (s. Kap. 2.6.1).

2.7.1 Proteinextraktion

Alle Präparationen mit Proteinen wurden auf Eis durchgeführt.

- Ca. 70 mg von lyophilisiertem und in flüssigem Stickstoff gemörsertem Pilzmaterial (Myzel und Chlamydosporen) in E-Cup einwiegen.
- 1 ml einer 0,1 M Tris-HCl-Lösung, pH 7,0 (gekühlt) hinzupipettieren.
- Anschließend 30 sec. schütteln.
- Zentrifugation 5 min 15000 g bei 4 °C.
- 300 µl des Überstandes in neues E-Cup transferieren.
- Mit Aceton bis auf 1,5 ml auffüllen und 5 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugieren.
- Pellet in 300 µl Tris-HCl, pH 7,0 aufnehmen.
- Bis zur weiteren Untersuchung bei –21 °C lagern.

2.7.2 Bestimmung der Proteinquantität

Da die quantitative Bestimmung der Gesamtproteine nach Bradford (BRADFORD, M. M., 1976) zu große Abweichungen zwischen den Wiederholungen ergaben, erfolgte die Bestimmung mit der Bicinchoninic acid (BCA, B-9643)-Methode von Sigma (Procedure No. TPRO-562).

Das Reagenz bestand aus 5 ml Kupferlösung (4 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ in 100 ml Wasser) und 125 ml Bicinchoninic acid Solution. In die Küvetten wurden 2 ml Reagenz mit 100 µl Probe gemischt und anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Messung im Photometer bei 562 nm. Der Nullwert wurde gegen Wasser gemessen.

Eine Eichgerade wurde mit BSA (Rinderserumalbumin) aufgenommen. Die Werte der Eichgerade wurden in dreifacher, die Werte der Proben in doppelter Wiederholung gemessen.

2.7.3 Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME)

Zur Bestimmung der Pektinaseaktivität wurde die „Cup-Plate“ Diffusionstechnik angewandt. Sie eignet sich für eine quantitative Bestimmung der Enzymaktivität wie z. B. bei Amylasen, Zellulasen, Proteasen und Pektinasen (DINGLE et al., 1953), und ebenfalls für immunochemische Quantifizierungen von Antigenen (MANCINI et al., 1965).

2.7.3.1 Optimierung des pH-Wertes für Polygalakturonase

Die Aktivität von Enzymen hängt stark von der Temperatur und dem pH-Wert ab. Die optimale Temperatur für die Polygalakturonase von 37 °C wurde aus der Literatur (DINGLE et al., 1953) übernommen.

Zur Optimierung des pH-Wertes wurde ein „Cup-Plate“ Assay verwendet. Hierzu wurden Greiner Petrischalen (Durchmesser 5,5 cm) ca. 3 bis 4 mm mit Medium gefüllt. Das Medium bestand aus 1 % Agarose, 0,1 % Pektin (Sigma P-9135) und einem Puffer, der auf den entsprechenden pH-Wert (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9) eingestellt wurde. Für den Bereich 7 bis 9 wurde 0,1 M Tris-HCl und für den Bereich 2 bis 6 Phosphatpuffer verwendet. Das Medium wurde in der Mikrowelle solange bis zum Sieden erhitzt, bis sich alle Komponenten gelöst hatten. Anschließend wurde das Medium in Petrischalen gegossen.

Nach dem Erstarren und Abkühlen wurde mit einem Korkbohrer ein 3 mm großes Loch in die Mitte des Mediums gestanzt. In dieses pipettierte man 10 µl Pektinase (Polygalakturonase aus *Aspergillus niger*, EC 3.2.1.15, Merck 1.06021.0025, 50 mg/ml). Um Austrocknung des Mediums zu vermeiden, wurde der Deckel mit Parafilm® abgedichtet. Anschließend erfolgte die Inkubation 18 Std. bei 37 °C.

Als Färbereagenz wurde eine 0,005 % ige, wässrige Rutheniumrotlösung (Merck 1.19249.0001) verwendet (JENSEN, 1962). Nach ca. 3 Std. zeigte sich ein nicht angefärbter Kreis ausgehend von der Auftragsstelle, dessen Durchmesser gemessen wurde. Der Versuch wurde in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

Das eingesetzte Pektin war zu 8 % methoxyliert und bestand zu 78 % aus Galakturonsäure.

2.7.3.2 Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) aus lyophilisiertem Pilzmaterial

Mit der Untersuchung der Pektinase (PG und PME) aus lyophilisiertem Pilzmaterial soll überprüft werden, ob pektinabbauende Enzyme vorhanden waren und ob Unterschiede in der Aktivität ein Grund für die Virulenz sein könnte.

Zur quantitativen Bestimmung der Pektinaseaktivität musste das „Cup-Plate“ Assay abgewandelt werden, da die Dicke des Agarosegels nicht variieren durfte. Verwandt wurde ein Gießstand ähnlich dem von MANCINI et al., 1965. Die Agarose wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch einen Plexiglasrahmen einen Abstand von 2 mm hatten. Eine Glasplatte war silanisiert. Diese Silanisierung mit Dimethyldichlorsilan hydrophobisiert die Glasoberfläche, um die Platte nach dem Gießen ohne Beschädigungen wieder von dem Gel lösen zu können (KLEINERT, 1990). Das Gel hatte eine Größe von 17,5 x 12,5 cm.

Vor dem Einfüllen des Mediums wurde der Gießstand und der Trichter zum Einfüllen auf 56 °C temperiert, um ein ungleichmäßiges Erstarren des Geles zu verhindern. Das Medium bestand aus 1 % Agarose, 0,1 % Pektin in Phosphatpuffer (0,1 M NaH_2PO_4 / 0,01 M Na_2HPO_4) pH 5.

Im Anschluss an das Gießen kühlte das Gel 2 Std. auf Raumtemperatur ab. Nach dem Abnehmen der oberen Glasplatte wurden mit einem Korkbohrer (Durchmesser 3 mm) Löcher im Abstand von 2 cm in das Gel gestanzt. In diese Vertiefungen kamen je 10 µl der Probe, zusätzlich wurde zweimal der Standard (10 µl Pektinase (PG) in einer Konzentration von 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 µg/ml) mit aufgetragen. Alle Proben mussten vor dem Auftragen auf die gleiche Proteinkonzentration verdünnt werden. Gewählt wurde die nach der Proteinextraktion kleinste Konzentration von 2,4 µg/ml (M 128). Alle anderen Proben wurden mit Tris-HCl pH 7,0 verdünnt.

Nach dem Auftragen wurde die Glasplatte wieder aufgelegt und mit Klammern befestigt. Um Austrocknung zu verhindern, kam der komplette Gießstand mit den Proben in eine Plastiktüte und wurde dann 18 Std. bei 37 °C waagrecht inkubiert.

Anschließend wurde das Gel vorsichtig aus dem Gießstand entnommen und wie in Kapitel 2.7.3.1 beschrieben, unter ständiger Bewegung, 2 bis 3 Std. gefärbt. Zur Orientierung wurde

das Gel an der linken oberen Seite durch Abschneiden markiert. Das Rutheniumrot färbt das Pektin. Transparent blieben die Bereiche auf dem Gel, bei denen die Polygalakturonase die Polygalakturonsäureketten gespalten hatte. Die Durchmesser der entstandenen, nicht gefärbten Höfe, wurden vermessen.

Eine Dokumentation und Digitalisierung erfolgte durch Einscannen mit einer Durchlichteinheit (Linotype, Jade II). Da in den Proben nur geringe Mengen an Polygalakturonase waren, wurden die Farbkanäle des aufgenommenen digitalen Bildes getrennt. Zur Auswertung verwandt wurde der Sättigungskanal des HSB-Farbraumes (Helligkeit, Sättigung, Buntheit), der auf der menschlichen Wahrnehmung basiert.

2.7.3.3 Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) von Isolaten ausgesuchter Herkünfte kultiviert in Pektinmedium

Im Gegensatz zu den in Kap. 2.7.3.2 durchgeführten Untersuchungen der Pektinaseaktivität auf glukosehaltigem Medium soll mit einer Kultivierung auf PMA die Enzymaktivität unter optimalen Bedingungen und die Fähigkeit zum Umstellen des Stoffwechsels überprüft werden.

Für die Untersuchungen wurden zwei stark virulente Herkünfte (M 013 und M 375), zwei schwach virulente Herkünfte (M 341 und M 306) sowie die nicht auf ihre Virulenz geprüfte Herkunft M 307 verwendet.

Um Variationen weitestgehend zu vermeiden, dienten für die beschriebenen Versuche der Kapitel 2.7.3.3 und 2.7.3.4 die selben Ausgangskulturen (selbe Petrischale) auf PDA.

Die Kulturen wurden von PDA auf festes Pektinmedium (PMA, Zusammensetzung Tab. 7) umgesetzt. Das Medium bestand aus einem abgewandeltem SNA-Medium. Ersetzt wurde die Kohlenstoffquelle Glukose durch 1 % Pektin. Die Zugabe des Pektins erfolgte nach dem Autoklavieren.

Tab. 7: Zusammensetzung des PMA-Mediums.

Menge	Stoff
1 g	KH ₂ PO ₄
1 g	KNO ₃
0,5 g	MgSO ₄
0,5 g	KCl
1 %	Pektin
15 g	Agar
ad 1 l	demin. H ₂ O

Nach 21 Tagen Kulturdauer bei Raumtemperatur wurde der Inhalt einer halben Petrischale in einem Warring Blendor homogenisiert und in einen 500 ml Erlenmeyerkolben, in dem sich 200 ml Kulturmedium befanden, gegeben. Das Kulturmedium (PMB: Pektinmedium Broth) bestand ebenfalls aus dem abgewandeltem SNA-Medium mit 1 % Pektin, diesmal jedoch ohne Zugabe von Agar. Die Kultivierung wurde bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler mit 120 upm durchgeführt.

Ab dem 4. Tag wurden, unter sterilen Bedingungen, täglich über einen Zeitraum von drei Wochen Proben gezogen. 1,5 ml Kulturmedium mit Pilzmyzel wurden in einem E-Cup bei - 21 °C eingefroren.

Die Untersuchung auf Pektinaseaktivität (PG und PME) erfolgte auf Pektingelen wie in Kapitel 2.7.3.2 beschrieben. Aufgetragen wurden dreimal der Standard (10 µl Pektinase, PG, in einer Konzentration von 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 µg/ml) und 10 µl des Kulturmediums der Probe eines jeden Tages der Kulturdauer.

Inkubation, Färbung und Dokumentation erfolgte wie in Kapitel 2.7.3.2 beschrieben. Durch die Enzymreaktionen entstanden unterschiedlich gefärbte Kreise. Zum einen klare, entfärbte Bereiche, zum anderen rot gefärbte Kreise, wobei sich das Rot deutlich von dem rosa gefärbten Pektinbereich des Geles abhob. Bei beiden Bereichen wurde die Diagonale der Kreise gemessen.

2.7.3.4 Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) von Isolaten ausgesuchter Herkünfte kultiviert in PDA-Medium

Sind die pektinabbauenden Enzyme für die Virulenz des Erregers verantwortlich, ist es notwendig zu überprüfen, ob und in welchem Zeitraum die Isolate in der Lage sind, diese Enzy-

me neu zu synthetisieren. Verwendet wurde PDA-Medium, welches Glukose enthält, die die Synthese von Pektinasen inhibiert.

Untersucht wurden die gleichen *Mycocentrospora*-Herkünfte wie in Kapitel 2.7.3.3. Die Kulturen wurden auf PDA umgesetzt und 21 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Der halbe Inhalt einer Petrischale wurde mit einem Waring Blendor homogenisiert und anschließend in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml PDB gegeben.

Kultivierung, Probennahme und Gel-Assay erfolgte wie im vorherigen Kapitel 2.7.3.3 beschrieben.

2.8 Biotest

Zur Überprüfung der toxischen Aktivität wurden Biotests an *Viola*-Blättern durchgeführt. Hierfür wurden Blätter geerntet, die eine Blattfläche von mindestens 1,5 cm² hatten. Diese Blätter wurden auf Papiertücher in eine Gerda-Schale gelegt, die mit ca. 1 cm Wasser gefüllt war und einen Edelstahlrost beinhaltete. Die zu untersuchenden Proben wurden als Tröpfchen von 10 µl auf verschiedene Stellen der Laubblätter pipettiert. Anschließend wurde die Kutikula mit einer Pasteurpipette leicht aufgeraut, damit die toxischen Stoffe schneller an das Gewebe gelangen. Als Kontrolle wurde das jeweilige Lösungsmittel appliziert. Der Deckel wurde so geschlossen, dass kein Luftaustausch möglich war und somit eine hohe Luftfeuchtigkeit in der Schale herrschte. Dies war nötig, damit die Tropfen auf den Blättern nicht eintrockneten und der applizierte Stoff über einen längeren Zeitraum in das Blattgewebe eindringen konnte. Aufgestellt wurden die Schalen in einer Klimakammer mit einer Tag-/Nachttemperatur von 17/10 °C und einem Tag-/Nachtrhythmus von 14/10 Std. Bonitiert wurden die Blätter, nach dem Auftreten der ersten Symptome. Dies war je nach eingesetzter Probe variabel und lag zwischen zwei und sieben Tagen.

Die Dokumentation des Biotests erfolgte durch Einscannen der Blätter mit einem CCD-Scanner mit Durchlicht (Linotype, Jade II). Diese Durchlichttechnik war nötig, um die Symptome besser erkennen zu können.

2.8.1 Biotest mit Proteinen

Untersucht wurde die Wirkung eines Proteinextrakts aus einer infizierten Pflanze und von unterschiedlichen Pektinase-Konzentrationen (PG).

Die Proteinextraktion von der infizierten Pflanze erfolgte aus eingefrorenem Material (ganze Pflanze) wie in Kap. 2.7.1 beschrieben. Der Extrakt wurde in Tris-HCl, pH 7,0 aufgenommen und 10 µl im Biotest appliziert. Als Kontrolle wurde nur der Tris-HCl-Puffer verwendet.

Pektinase (PG) wurde in folgenden Konzentrationen in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0 gelöst: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05 und 0,1 mg/ml. Jeweils 10 µl wurden auf ein Blatt mit einer Läsion aufgetragen. Als Kontrolle wurde Tris-HCl verwendet.

2.8.2 Biotest mit Cercosporin und mit isoliertem roten Farbstoff

Cercosporin (Sigma C-6696, CAS 35082-49-6) wurde in 98 %igem Ethanol gelöst und anschließend mit der 4fachen Menge demin Wasser verdünnt (abgewandelt nach MACRI & VIANELLO, 1979). Als Kontrolle wurde Ethanol in der gleichen Verdünnung (1:4) verwendet.

Appliziert wurde ein Tropfen (10 µl) auf die Blattoberseite ohne die Kutikula und Epidermis zu verletzen und ein Tropfen (10 µl) wo mit einer Pasteurpipette die Blattoberfläche verletzt wurde, um das Eindringen der zu untersuchenden Stoffe zu erleichtern. Alle weiteren Bedingungen s. Kap. 2.8 .

2.9 Toxinuntersuchungen

2.9.1 Toxinextraktion

Für die Toxinextraktion wurden Isolate der Herkunft M 307 verwendet, da sie durch eine starke Rotfärbung der Kultur auffielen und deshalb als mögliche Produzenten von Cercosporin und Beticolinen in Frage kamen.

Die Kultivierung erfolgte 21 Tage auf PDA-Medium bei Raumtemperatur. Zur Extrahierung wurden 50 ml Aceton mit dem durchwachsenen Medium einer halben Petrischale in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben und homogenisiert (Ultra-Turrax T25 Fa. Janke & Kunkel). Anschließend wurde die Lösung filtriert und das Filtrat bei 12.000 x g, 15 min zentrifugiert. Der Überstand kam in ein neues Reaktionsgefäß und das Aceton wurde in der Speedvac® abgezogen. Bis zu weiteren Untersuchungen wurde der Extrakt bei -21 °C gelagert.

2.9.2 Untersuchungen mit Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Dünnschichtchromatografie wurde der extrahierte rote Farbstoff (s. Kap. 2.9.1) in Aceton gelöst und auf TLC-Platten (10 x 4 cm, Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck 1.05554.) aufgetragen. Als Laufmittel wurde Ethylacetat:Methanol im Verhältnis 4:1 verwendet (FAJOLA, 1978).

Nach der Entwicklung wurden die Banden unter UV-Licht der Wellenlängen 254 und 366 nm sichtbar gemacht und mit Bleistift markiert. Um die Fleckposition unabhängig vom Dünnschichtchromatografielauf angeben zu können, wurde sie auf die Fließmittelfront bezogen (R_f-Wert). Der R_f-Wert (Relate to Front) wurde mit folgender Gleichung errechnet:

$$R_f = \frac{\text{Distanz Start – Fleck}}{\text{Distanz Start – Lösungsmittelfront}}$$

(FREY & ZIELOFF, 1992).

2.9.3 Untersuchung mit GC-MS

Untersucht wurde der Extrakt von M 307. Verwendet wurde der in Kap. 2.9.1 gewonnene Rohextrakt, der in Acetonitril aufgenommen wurde.

Als Vergleichssubstanz diente Cercosporin (s. Kap. 2.8.2), das ebenfalls in Acetonitril gelöst wurde.

2.9.3.1 Analysebedingungen

Für die Analysen wurden jeweils 2 µl, von der Probe und dem Cercosporin, manuell in das GC-MS (Varian Saturn 2000) eingespritzt. Nach jeder Messung wurde ein Lauf nur mit Acetonitril durchgeführt um sicherzustellen, dass keine Substanz vom Vorlauf mehr auf der Säule war. Die Temperaturbedingungen der Läufe sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 8: Temperaturprofile bei der GC-MS Analyse von Injektor und Säulenofen.

Injektor				
Schritt	Temp. [°C]	Rate [°C/min]	Halten [min]	Total [min]
1	100	-	1,00	1,00
2	200	20,0	2,00	8,00
3	100	20,0	27,00	40,00
Säulenofen				
Schritt	Temp. [°C]	Rate [°C/min]	Halten [min]	Total [min]
1	120	-	1,00	1,00
2	280	5,0	7,00	40,00

Die Temperatur der Ion-Trap lag bei 180 °C, des Manifold bei 70 °C und der Transferline bei 200 °C. Die Dauer eines Laufes betrug 40 min

Als Säule wurde VA-5MS (30m x 0,250 mm, SN 8707854) verwandt. Als Trägergas diente Helium mit einer durchschnittlichen Flussrate von zwei ml/min Die Ionisierung erfolgte elektrisch (70 eV).

2.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS V. 9.0 durchgeführt. Nach Prüfung der Homogenität der Varianzen (Levene Test) wurde die Auswertung mittels ein- und mehrfaktorieller Varianzanalyse durchgeführt und anschließend die Grenzdifferenz ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierte Pathogene

Die gesammelten Stiefmütterchen wurden auf ihre pilzlichen Blattpathogene hin untersucht. Dabei wurden insgesamt vier Gattungen identifiziert und isoliert. Von den vier Gattungen gehörten zwei zum Blattfleckenerregerkomplex (*Mycocentrospora acerina* und *Ramularia* spp.) und zwei zu den Mehltaupilzen (*Peronospora violae* und *Oidium violae*). Der laut Literatur (BÖHMER & WOHANKA, 1999) ebenfalls zu den Blattfleckenerregern gehörende Pilz *Alternaria violae* konnte bei keiner untersuchten Pflanze identifiziert werden.

3.1.1 *Mycocentrospora acerina*

Von den gesammelten Pflanzen konnte *Mycocentrospora* bei den folgenden Herkunftten (Tab. 9) bestimmt werden. Die Identifizierung erfolgte durch mikroskopische Untersuchung der Chlamydosporen (Form, Farbe, Größe) sowie durch Vergleich mit einer *M. acerina* Kultur von der DSMZ (*M. acerina* (HARTIG) DEIGHTON, Stamm 62101, W. Gerlach, IMB 11493 (*Centrospora acerina*), von *Pastinaca sativa*, scurfy root, Germany, 1971). In den Versuchen wurde der Stamm als M DSM gekennzeichnet. Weiterhin wurden alle Isolate nach den kochschen Postulaten zwecks eindeutigen Erregernachweises überprüft.

Um die Diagnose abzusichern, erfolgte bei einigen Herkunftten die Identifizierung auch über Konidien (Vergleich der morphologischen Daten mit den Literaturwerten (CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria, 1977)).

Tab. 9: *Viola*-Herkünfte, bei denen *Mycocentrospora acerina* identifiziert und isoliert werden konnte. Die infizierte Pflanze aus Putlitz (PUT) erhielt keine Nummer, da sie nicht von der Fa. Nebelung gesammelt wurde.

006	013	017	031	032	112	116
118	127	127	128	205	212	212
303	306	307	308	310	326	327
335	339	340	341	343	347	355
359	362	365	372	373	375	PUT

3.1.1.1 Herkunft der mit *M. acerina* infizierten *Viola*-Pflanzen

Abb. 16 zeigt die geografische Verteilung der Isolate für *M. acerina*. Jedes Fähnchen symbolisiert einen Ort. Sind an den Markierungen mehrere Nummern, so stammen mehrere Isolate unabhängig vom gleichen Fundort. Diese Isolate können z. B. von zwei Gärtnereien aus einem Ort stammen. Der Grund für die ungleichmäßige Verteilung liegt nicht in einem nur regionalen Auftreten von *M. acerina* begründet, sondern ist auf eine punktuelle Sammlung zurückzuführen. So wurden z. B. keine erkrankten Pflanzen aus dem Bundesland Mecklenburg-Vorpommern gesammelt.

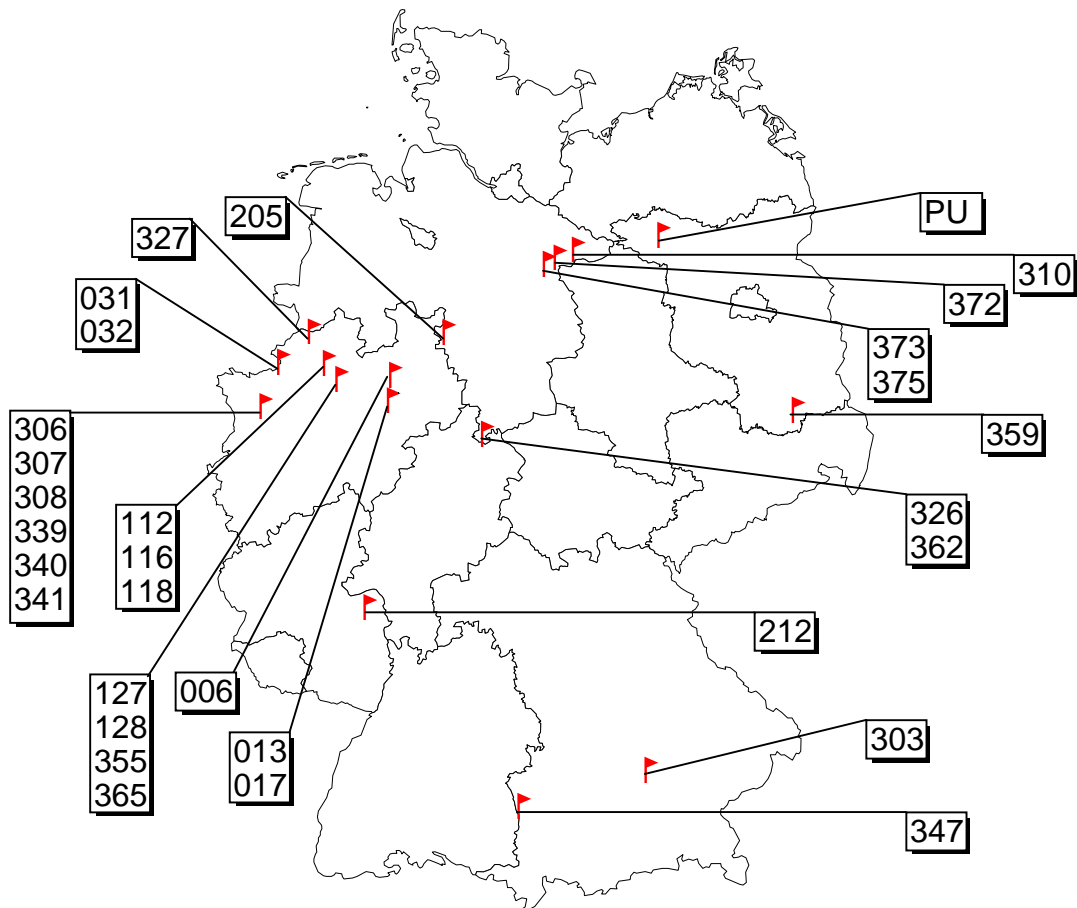


Abb. 16: Geografische Herkunft der gesammelten *Viola*-Pflanzen, von denen *Myco-centrospora acerina* isoliert werden konnte.

3.1.1.2 Krankheitssymptome und Bonitursystem



Nach der Infektion mit *M. acerina* entstehen zunächst auf den Blättern vereinzelt ein bis zwei mm große, braun-schwarze Flecken. Die Anfangssymptome traten ca. zwei Tage nach der Infektion auf. Neben den Laubblättern können auch die Neben- und Blütenblätter sowie der Stängel befallen sein. Die Anzahl der Flecken auf den Blättern variierte mit der Stärke der Infektion. Je stärker die Infektion, desto mehr Flecken waren auf den Blättern. Bei starkem Befall können neben den Laubblättern auch Kelch- und Blütenblätter sowie der Stängel betroffen sein. Die Form der Schädigungen am Stängel sind im Gegensatz zu den Blättern strichartig. Im fortgeschrittenen Symptomverlauf sind die Flecken von einem hellgrünen, später durchscheinendem Hof umgeben, der den Symptomen einer Bakteriose ähnelt. Der zentrale Fleck behält seine Farbe und Größe und das chlorotische Gewebe vergrößert sich stark.

Sobald sich das geschädigte Gewebe weiter vergrößert, geht die Chlorose bei den Endsymptomen in eine Nekrose über und das Gewebe färbt sich hellbraun, während der Rand eine dunkelbraun bis blauschwarz Zone behält. Meist bestehen die Flecken aus konzentrischen Ringen (Tab. 10, Boniturnote 6). Bei sehr starkem Befall können sich mehrere Flecken zu einer großflächigen Nekrose ausweiten, die dann ganze Blattareale betrifft (Tab. 10, Boniturnoten 7 bis 9). Die Größe der Blatflecken variiert mit der Stärke des Befalls. Stark erkrankte Blätter starben ab, die sich neu entwickelten Blätter zeigten dagegen keine Symptome. Bei sehr starkem Befall starb die ganze Pflanze ab.






Neben einer Blatfleckenkrankheit verursacht *M. acerina* auch Wurzel- und Wurzelhalsfäule an Stiefmütterchen. Betroffene Organe sind der Wurzelhals und die oberen Wurzelpartien. Dieser Bereich verfärbt sich zunächst strichweise braun, dann werden die befallenen Wurzelbereiche komplett braun. Dies führt zu einem Umfallen und damit Absterben der Pflanze.

Tab. 10 zeigt die Blattsymptome und den Verlauf der Infektion. Als Beispiel wird immer ein typisches Blatt der Pflanze abgebildet. In der Regel hatten alle Blätter einer Pflanze Krankheitssymptome. Bewertet wurde dann das am schwersten geschädigte Blatt (Ausnahme Boniturnote 9, hier war die ganze Pflanze abgestorben). Auf eine Abbildung der kompletten Pflanze wurde verzichtet, da die Schäden bis Boniturnote drei nur bei Durchlicht zu erkennen waren und an den Pflanzen sonst keine Unterschiede auftraten. Die Auswirkung eines schweren Befalls auf die ganze Pflanze ist in Abb. 17 zu sehen. Deutlich zu erkennen ist, dass neben den Blättern auch die Blüten befallen werden können.

Tab. 10: Bonitursystem für die *Mycocentrospora*-Blatfleckenkrankheit an *Viola Wittrockiana*-Hybriden.

Boniturnote	Beschreibung	Beispiel
0	Pflanze gesund, keine Flecken oder Verfärbungen auf den Blättern.	
1	Vereinzelte (max. drei), bis 1 mm große, schwarze Blatflecken.	

Fortsetzung Tab. 10:

Boniturnote	Beschreibung	Beispiel
2	In großer Zahl (vier oder mehr) sind auf den Blättern schwarze Flecken zu erkennen. Das Gewebe um die Flecken beginnt chlorotisch zu werden.	
3	Der am weitesten entwickelte Fleck ist noch nicht nekrotisch, dennoch ist das Gewebe um den Fleck geschädigt. Das geschädigte Gewebe ist deutlich chlorotisch.	
4	Vom Zentrum des am weitesten entwickelten Fleckens aus sind deutliche Gewebeschäden zu sehen. Schädigungen sind noch nicht nekrotisch, sondern noch fahl grün.	
5	Die Schädigungen sind nekrotisch.	
6	Auf dem Blatt sind konzentrische Nekrosen zu erkennen.	

Fortsetzung Tab. 10:




Boniturnote	Beschreibung	Beispiel
7	Auf mindestens zwei Blättern sind konzentrische Nekrosen zu sehen. Große Teile der Blattfläche sind betroffen.	
8	Auf allen oder fast allen Blättern sind konzentrische Nekrosen zu erkennen. Fast die komplette Blattfläche ist betroffen. Der Stängel besitzt braune gestrichelte Streifen.	
9	Pflanze ist abgestorben, Blätter sind vollständig nekrotisiert.	



Abb. 17: Stiefmütterchen nach Inokulation mit *M. acerina* (rechte Pflanze). Links: Pflanze unter den selben Kulturbedingungen ohne Inokulation.

3.1.1.3 Isolationsmethode

Für die Isolation von *M. acerina* wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen die Oberflächensterilisation, zum anderen das Auslegen des Pflanzenmaterials in der Feuchten Kammer. Beide Möglichkeiten waren in ihrer Zuverlässigkeit gleich gut, wenn die Symptome gut ausgeprägt waren und bereits nekrotisches Gewebe vorhanden war. War die Krankheit erst im Anfangsstadium (Chlorosen), konnte mit der Feuchten Kammer nicht isoliert werden, da kein Myzel auswuchs. Die Feuchte Kammer wurde trotzdem bei den Versuchen bevorzugt, weil der Erreger schneller und kostengünstiger isoliert werden konnte. Fehlten die für die Isolierung mit der Feuchten Kammer notwendigen Nekrosen, wurde die Pflanze im Gewächshaus weiterkultiviert, bis die Symptome auftraten, um das Pathogen mit dieser Methode zu isolieren.

Nach zwei Tagen bei Raumtemperatur in der Feuchten Kammer wuchs aus den Blattflecken Myzel. Dieses Myzel wurde mit einer Impfnadel unter semisterilen Bedingungen abgenommen und auf PDA überführt.

3.1.1.4 Inokulationsversuche

3.1.1.4.1 Inokulation mit Isolaten aller Herkünfte

Für den Virulenztest wurden insgesamt 6731 Stiefmütterchen angezogen und mit Chlamydosporen der Isolate von 23 Herkünften in dem Zuchtbetrieb der Fa. Nebelung inokuliert. Jede Herkunft wurde an vier Stiefmütterchen Genotypen mit einer Wiederholung geprüft. Es wurde der Mittelwert der Genotypen und der Wiederholungen für jedes Isolat aufgetragen (Abb. 18). Da es keinen präzisen Weg gibt die Virulenz zu quantifizieren (MITCHELL, 1984), wurde dies in der vorliegenden Arbeit über die Boniturnoten realisiert.

Es konnten deutliche Unterschiede in der Virulenz der einzelnen Isolate festgestellt werden. In Abb. 18 wurden die Isolate nach ihrer Virulenz geordnet. Der Bereich der Boniturnote reichte von 1,2 (M 306) bis 5,4 (M 013).

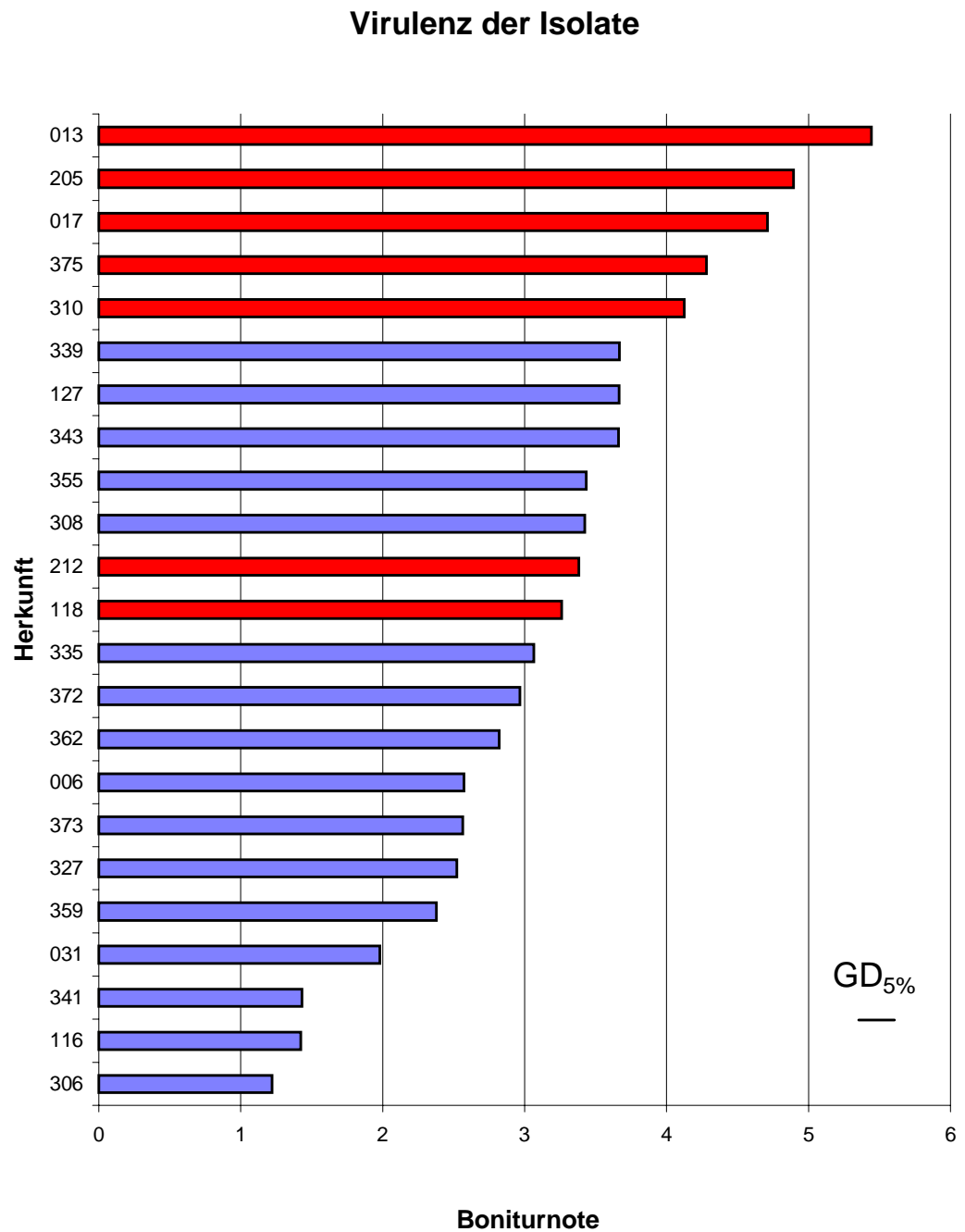


Abb. 18: Virulenzvergleich der *Mycocentrospora*-Herkünfte. Rot: hochvirulente Isolate (n=8, insgesamt 6731 Stiefmütterchen, $GD_{5\%} = 0,24$).

3.1.1.4.2 Inokulation mit Isolaten von *M. acerina* ausgewählter Herkünfte nach Lagerung

Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der Virulenzuntersuchung auch über einen längeren Zeitraum stabil sind, wurden fünf Herkünfte für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Als stark virulente Herkünfte wurden M 013 und M 375 ausgesucht und als schwach virulente Herkünfte M 341 und M 306. Zusätzlich wurde die Herkunft M 307 mit ausgewählt, die bei dem vergleichenden Virulenztest nicht untersucht wurde, aber aufgrund der Genomuntersuchung der Gruppe der stark virulenten Herkünfte zugeordnet wurde.

Abb. 19 zeigt, dass die Reihenfolge der Einstufung auch über einen Zeitraum von acht Monaten bei den ausgewählten Herkünften erhalten blieb. M 013 und M 375 zeigten mit den höchsten Boniturnoten die stärkste Virulenz. M 341 und M 306 dagegen riefen nur schwach Symptome hervor. Die bisher nicht getestete *Mycocentrospora*-Herkunft M 307 ist nach den Boniturnoten ebenfalls als stark virulent einzuordnen. Dieses Ergebnis stützt somit die Ergebnisse der Genomuntersuchung und die Einordnung von M 307 in die Gruppe der stark virulenten Herkünfte.

Bei dem Vergleich der Boniturnoten vor und nach Lagerung (Tab. 11) zeigt sich, dass die Lagerung über acht Monate eine Reduktion der Virulenz von ca. 20-30 % je nach Isolat zur Folge hat. Die Reduktion ist bei den stark virulenten Herkünften stärker als bei den beiden anderen.

Tab. 11: Vergleich ausgesuchter *M. acerina*-Isolate auf ihre Virulenz (Mittelwerte der Boniturnoten) vor und nach Lagerung (n=51).

Herkunft	Boniturnote vor Lagerung	Boniturnote nach Lagerung	Verlust Virulenz in %
M 013	5,44	3,69	32
M 375	4,28	2,94	31
M 307	-	2,69	-
M 341	1,43	1,16	19
M 306	1,22	0,88	27

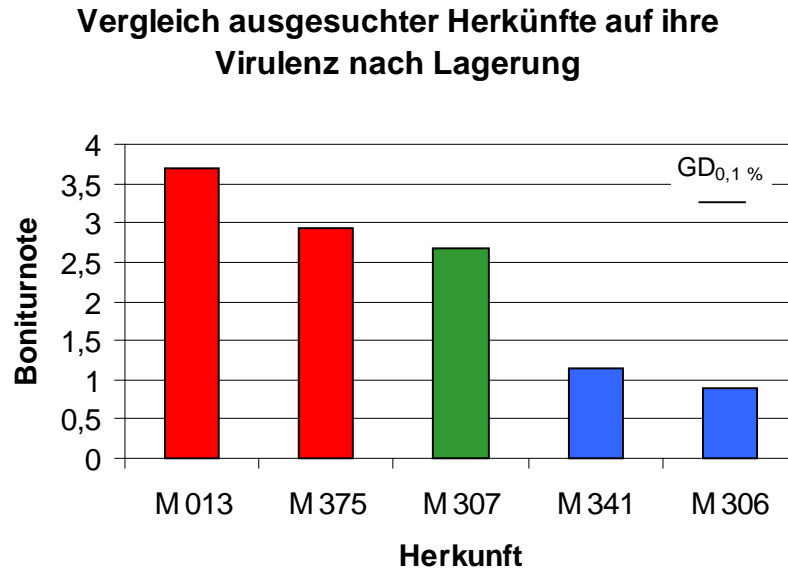


Abb. 19: Vergleich von fünf ausgesuchten *M. acerina*-Herkünfte auf ihre Virulenz nach einer Lagerung von acht Monaten bei 4 °C.

Rot markierte Säulen sind hochvirulente und blau markierte schwach virulente Isolate.

Von Herkunft M 307 (grün) war die Virulenz bisher unbekannt ($n=51$, $GD_{0,1} \% = 0,58$).

3.1.1.4.3 Auswirkung der Beleuchtung auf die Symptomentwicklung

Abb. 20 zeigt den Einfluß der Beleuchtung auf die Symptomentwicklung. Die Inokulation mit Licht zeigt einen stärkeren Befall, der sich in fast zwei Boniturnoten bei sonst gleichen Bedingungen widerspiegelt. In der Abb. 21 sind die unterschiedlichen Schädigungen gut zu sehen. Ohne Licht blieb die Symptomentausprägung auf der Stufe von Chlorosen stehen. Dies ist ein Zeichen dafür, dass zwar eine Infektion stattgefunden hat, aber der weitere Verlauf gestoppt bzw. stark verzögert ist. Mit Licht entwickelten sich die Chlorosen auch zu Nekrosen, die große Teile der Blattfläche absterben ließen.

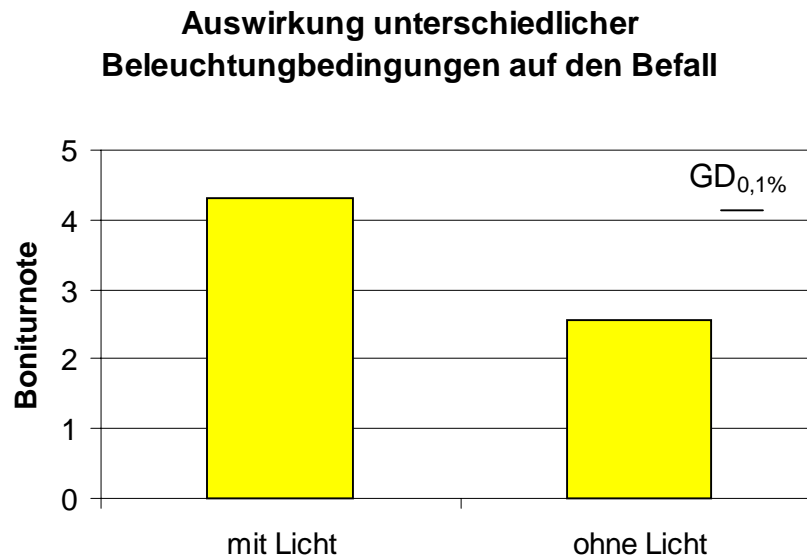


Abb. 20: Inokulation mit *Myocentrospora*-Isolaten der Herkunft M 013 und M 375. Kulturbedingungen: mit Licht (12 Std. Licht, Osram L58 W/31 Warmton Lumilux, in Bestandeshöhe 4000 Lux /12 Std. dunkel) und ohne Licht (vollständige Dunkelheit). Bonitur nach 12 Tagen (n=51, $GD_{0,1\%} = 0,60$).



Abb. 21: Vergleich der Symptome einer *Myocentrospora*-Inokulation mit Licht (obere Reihe) und ohne Licht (untere Reihe). Bonitur nach 12 Tagen. Durchlichtaufnahme.

3.1.1.5 Morphologische Merkmale der *M. acerina* Isolate

Die Virulenz eines Isolates kann sich in vielen Fällen bereits von seiner Morphologie herleiten lassen. Wichtig neben dem Wachstum des Isolates erschien die Bildung von Chlamydosporen, da mit ihnen inokuliert wurde. Von besonderem Interesse erschien die rote Färbung des Isolates, da das Toxin Cercosporin ein roter Farbstoff ist. Als weiterer Parameter wurde die Bildung von Luftmyzel betrachtet, da bei den Isolaten hier große Unterschiede vorhanden waren. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 zusammengefasst. Die Isolate sind in der Reihenfolge ihrer Virulenz geordnet.

Die Bewertung der Chlamydosporenbildung bei den hochvirulenten Isolaten erstreckte sich über den Bereich 2 bis 5 auf PMA und von 3 bis 5 auf PDA. Die schwach virulenten Isolate erreichten Werte von 1 bis 5 auf beiden Medien. Bei der Luftmyzelbildung erreichen die hochvirulenten Isolate Werte von 2 bis 5 (PMA) bzw. 3 bis 5 (PDA) gegenüber den schwach virulenten von 3 bis 5 (PMA) bzw. 2 bis 5 (PDA). Die stark virulenten Isolate zeigen sich sehr uneinheitlich im Wachstum. Hier gehen die Bewertungen über den Bereich 1 bis 5 (PMA) und 2 bis 5 (PDA). Alle anderen Isolate erzielten Werte von 2 (PDA) bzw. 3 (PMA) bis 5. Auch bei dem untersuchten Parameter Färbung sind keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Hoch virulente Isolate wurden mit 1 bis 3 (PMA) und 2 bis 4 (PDA) bewertet, alle anderen Isolate erreichten auf beiden Medien 1 bis 3.

Tab. 12: Beurteilung der *M. acerina* Isolate von zwei verschiedenen Nährböden anhand von morphologischen Merkmalen. Untersuchungsparameter: Chlamydosporenbildung, Luftmyzelbildung, Wachstum und Produktion von rotem Farbstoff.

Virulenz-rang	Herkunft	Pektinmedium (PMA)				PDA-Medium			
		Chlamydo-sporen	Luftmyzel	Wachstum	Rotfärbung	Chlamydo-sporen	Luftmyzel	Wachstum	Rotfärbung
1	M 013	2	4	2	2	4	4	4	3
2	M 205	3	4	3	2	4	5	5	3
3	M 017	3	4	1	1	4	4	4	2
4	M 375	5	2	5	2	4	3	4	2
5	M 310	4	4	3	2	4	4	2	4
6	M 339	4	3	3	2	1	5	2	1
7	M 127	2	5	4	2	3	5	2	2
8	M 343	4	4	4	2	5	2	5	2

Fortsetzung Tab. 12:

Virulenz- rang	Herkunft	Pektinmedium (PMA)				PDA-Medium			
		Chlamydo- sporen	Luftmyzel	Wachstum	Rotfärbung	Chlamydo- sporen	Luftmyzel	Wachstum	Rotfärbung
9	M 355	3	3	4	2	3	5	4	2
10	M 308	1	5	4	2	5	4	4	2
11	M 212	3	4	2	3	5	4	5	4
12	M 118	3	5	4	3	3	4	3	2
13	M 335	3	4	4	2	4	2	4	2
14	M 372	4	4	3	1	4	4	4	2
15	M 362	1	5	5	3	2	5	4	2
16	M 006	1	4	5	3	4	3	4	2
17	M 373	5	3	5	3	4	4	4	3
18	M 327	1	5	5	3	5	4	5	2
19	M 359	3	4	3	2	1	5	2	1
20	M 031	3	3	4	2	4	4	5	2
21	M 341	3	5	4	2	4	4	5	2
22	M 116	5	5	5	3	4	5	4	3
23	M 306	3	3	3	2	3	4	3	1
k. T.	M 128	3	5	4	4	3	5	3	3
k. T.	M 112	3	3	1	1	4	3	4	1
k. T.	M 340	1	5	5	1	1	5	4	1
k. T.	M 307	1	5	5	5	4	5	4	5
k. T.	M 347	4	3	4	1	-	-	-	-
k. T.	M 032	4	4	3	2	-	-	-	-
k. T.	M 303	-	-	-	-	4	4	4	3
k. T.	M 126	-	-	-	-	5	2	4	2
k. T.	M PUT	4	5	5	2	-	-	-	-
k. T.	M DSM	1	5	3	2	2	5	3	2

Skala: 5 = sehr starke Bildung/Wachstum, 4 = starke Bildung/Wachstum, 3 = schwache Bildung/Wachstum, 2 = sehr schwache Bildung/Wachstum, 1 = kein(e) Bildung/Wachstum. Rote Markierung: nach Genomuntersuchung virulente Gruppe. Abk.: k. T. = kein Test, Isolat wurde nicht auf seine Virulenzstärke getestet.

3.1.2 *Ramularia*

3.1.2.1 Isolation

Für die Isolation von *Ramularia* sp. wurden die gleichen Methoden wie bei *M. acerina* verwendet. Hier stellte sich aber heraus, dass die Isolation über eine Oberflächensterilisierung nicht praktikabel war, weil nur zwei Isolate auf diesem Weg gewonnen werden konnten. Grund ist vermutlich das langsame Wachstum von *Ramularia*. Meist wuchsen andere Pilze schneller, so dass *Ramularia* nicht erkannt wurde. Eine Isolation mit der Feuchten Kammer wurde deshalb bevorzugt. Auch hier mussten die Blattflecken bereits nekrotisch sein, um ein Auswachsen der Konidiophoren mit anschließender Konidienbildung zu erhalten. Die Pflanzen wurden aus diesem Grund noch einige Tage weiterkultiviert, bis Nekrosen auftraten. Nach zwei Tagen in der Feuchten Kammer war ein Konidienrasen auf den Blattflecken zu sehen. Mit einer Impfnadel wurden unter semisterilen Bedingungen Konidien abgenommen und auf PDA übertragen.

Von den untersuchten Pflanzen konnte *Ramularia* sp. bei den in Tab. 13 aufgelisteten Herkünften nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte durch mikroskopische Untersuchung der Konidien (Form, Septierung, Größe) und Vergleich mit Literaturwerten (APPEL, 1932 und ELLIS & ELLIS, 1985) sowie über die Krankheitssymptome nach der Inokulation. Für alle Herkünfte wurden die kochschen Postulate erfüllt. Zusätzlich wurde eine Kultur der Herkunft R 353 zur Bestimmung an das Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) geschickt. Sie wurde als *Ramularia agrestis* identifiziert.

Tab. 13: Herkünfte, bei denen *Ramularia* sp. nachgewiesen werden konnte. Die Herkünfte SO, MER, BAB, PUT und DAD erhielten keine Zahl, da sie nicht von der Fa. Nebelung gesammelt wurden.

300	304	312	317	318	318	319
320	322	325	328	329	330	331
334	337	353	357	360	364*	370
371	377*	SO	MER	BAB	PUT	DAD

* Herkunft konnte als *Ramularia* identifiziert werden, die Anlage einer Reinkultur gelang jedoch nicht.

3.1.2.2 Herkunft der mit *Ramularia* sp. infizierten *Viola*-Pflanzen

Abb. 22 zeigt die Geografische Verteilung der Isolate für *M. acerina*. Jedes Fähnchen symbolisiert einen Ort. Sind an den Markierungen mehrere Nummern, so stammen mehrere Isolate unabhängig vom gleichen Fundort. Diese Isolate können z. B. von zwei Gärtnereien aus einem Ort stammen.

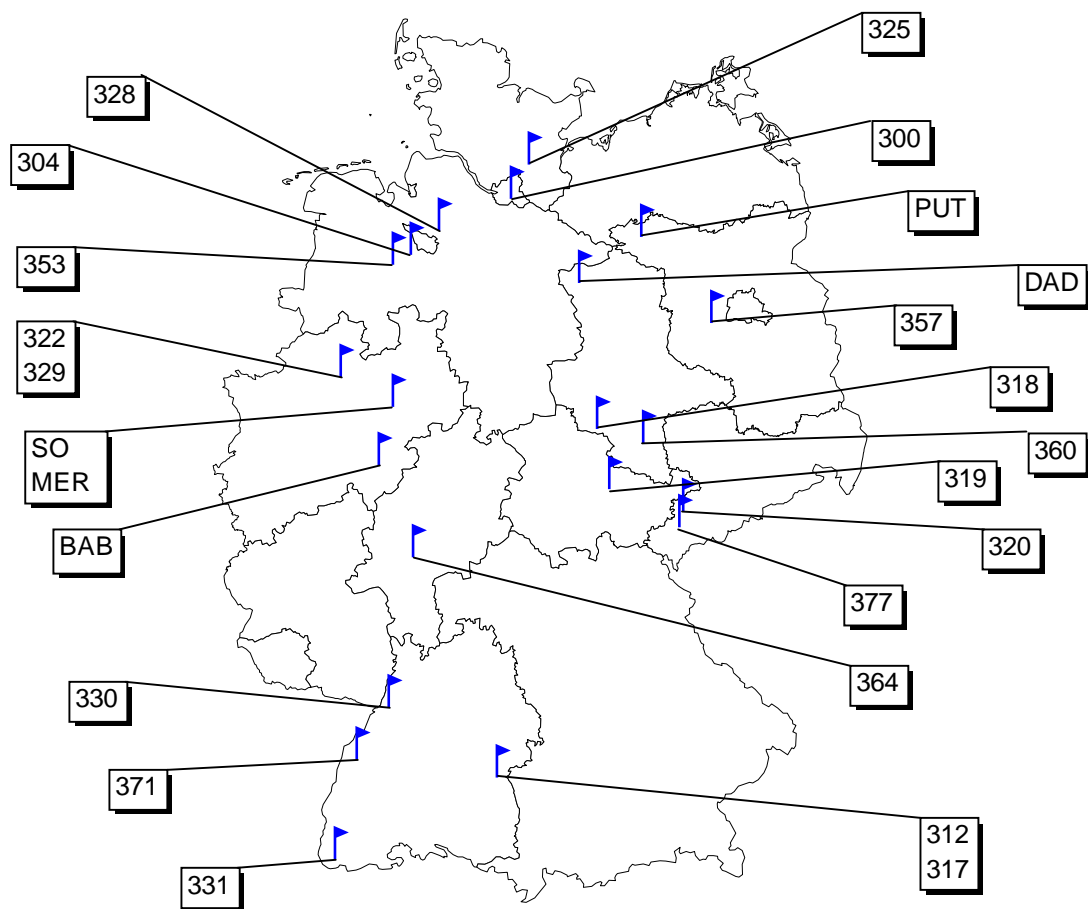


Abb. 22: Geografische Herkunft der gesammelten *Viola*-Pflanzen, von denen *Ramularia* sp. isoliert werden konnte.

3.1.2.3 Symptomverlauf

Der Krankheitsverlauf und die Symptombildung einer *Ramularia*-Infektion unterscheidet sich kaum von dem einer *Mycocentrospora*-Infektion. Auch hier zeigen sich die ersten Symptome auf den Blättern in Form von schwarzen Flecken nach zwei bis fünf Tagen (Abb. 16, A). Diese entsprechen in der Größe in etwa den ersten Flecken bei einer *Mycocentrospora*-Inokulation. Teilweise sind die Flecken größer. Zu vermuten ist, dass die unterschiedliche Inokulationsmethode (Chlamydosporen-Myzel) dafür verantwortlich ist.

Im weiteren Verlauf bilden sich Chlorosen um das schwarze Zentrum (B), die sich nach einigen Tagen in Nekrosen verwandeln können (C). Diese Nekrosen haben eine scharfe, dunkelbraun bis schwarze Begrenzung. Erst in diesem Stadium kann man ohne Laborhilfsmittel eine *Ramularia*- von einer *Mycocentrospora*-Infektion unterscheiden. Nur bei *Mycocentrospora* sind konzentrische Ringe bei den Nekrosen zu erkennen, die bei *Ramularia* nie beobachtet werden konnten. Zusätzlich kann zu diesem Zeitpunkt, bei ausreichend hoher Luftfeuchtigkeit, eine Sporulation einsetzen. Dieser Sporenrasen ist als weißer Belag auf den Blattflecken mit bloßem Auge zu erkennen. Diese Sporulation wurde nur auf der Blattunterseite beobachtet.

Im weiteren Verlauf können, bei starker Infektion, die Nekrosen ineinander übergehen (D) und so große Bereiche oder die ganze Fläche zum Absterben bringen.



Abb. 23: Entwicklung der Symptome nach Inokulation mit *Ramularia agrestis*. Aufnahmen mit Durchlicht.

3.2 Ergebnisse der Genomuntersuchung

Von allen *Mycocentrospora*-Isolaten wurde genomische DNA extrahiert und mit der RAPD-PCR untersucht. Als Kontrollorganismus wurde *Fusarium* sp. verwendet.

3.2.1 Ergebnisse der DNA Extraktion

Aus allen Isolaten konnte, nach Extraktion und Aufreinigung, genügend DNA in ausreichender Qualität (s. Kap. 8.3 , Tab. 19) gewonnen werden. Für die PCR-Reaktion wurde die Konzentration an DNA auf 40 ng/10 µl eingestellt.

3.2.2 PCR-Optimierung

Die Abb. 24 zeigt ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel zur Optimierung der Hybridisierungstemperatur. Der Temperaturbereich von 36,0 bis 37,2 °C erwies sich als ungeeignet, da hier zwar eine Reaktion stattfand, aber durch die geringe Effizienz nur wenig DNA synthetisiert wurde. Dies zeigte sich an den nur schwach zu erkennenden Banden. Kürzere DNA-Fragmente waren nicht zu erkennen.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Temperaturen über 39,1 °C. Auch hier waren nicht mehr alle Banden vorhanden. Die PCR-Reaktion förderte im höheren Temperaturbereich vor allem kürzere DNA-Fragmente.

Zwischen 38,7 und 39,1 °C waren alle Banden vorhanden. Bei den weiteren Untersuchungen wurde mit einer Hybridisierungstemperatur 38,7 °C gearbeitet, weil bei dieser Temperatur sowohl kurze als auch lange PCR-Produkte in ausgewogener Menge entstanden.

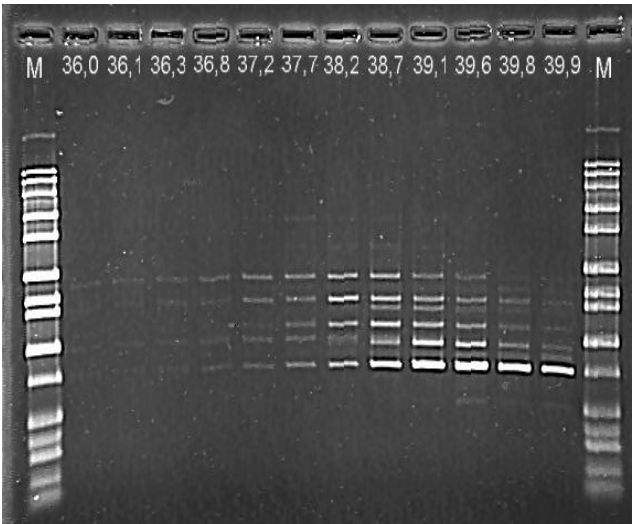


Abb. 24: Gelelektrophorese von Temperaturgradienten-PCR der Herkunft M 339 mit Primer ABA 20. Zahlen an den Taschen entsprechen der Annealing-Temperatur in °C während der PCR. M = Marker D-7058 (Abb. 15).

3.2.3 Untersuchte Herkünfte und verwendete Primer

Getestet wurden 20 Primer. Für die weitere Untersuchung wurden 10 Primer ausgewählt, die ein Bandenmuster ergaben, welches für die Auswertung geeignet war. D. h. nicht zu wenig (unter 10 Banden) und nicht zu viel (über 30 Banden) produzierten. Die Banden mussten klar voneinander abgrenzbar sein. Meist waren sehr kleine Banden (unter 100 bp) nicht klar und große Banden (über 3 bis 5 kbp) nur undeutlich als Schmier zu erkennen. Aus diesem Grund wurde für jeden Primer ein Auswertungsbereich festgelegt, in dem die Banden deutlich zu erkennen waren.

Tab. 14: Für die Auswertung der genomischen Untersuchung verwendete Primer mit ihrer Basensequenz.

ABA 01 CAGGCCCTTC	ABA 02 TGCCGAGCTG	ABA 03 AGTCAGCCAC	ABA 04 AATCGGGCTG	ABA 09 GGGTAACGCC
ABA 12 TCGGCGATAG	ABA 13 CAGCACCCAC	ABA 17 GACCGCTTGT	ABA 18 AGGTGACCGT	ABA 20 GTTGCGATCC

Zur Untersuchung kamen insgesamt 30 *Mycocentrospora acerina* Herkünfte und ein *Fusarium* sp. als Kontrollorganismus.

3.2.4 Ergebnisse der einzelnen Primer

Jedes Gel besaß 15 Taschen. In die erste und die letzte Tasche wurde der Längenstandard (D-7058, Sigma) aufgetragen, so dass 13 Proben aufgetragen werden konnten. Für jeden Primer mussten drei Gele gefahren werden, um alle Proben aufzutrennen. Abb. 25 zeigt, exemplarisch für alle Primer, die drei Gele der untersuchten Isolate des Primers ABA 20. Am Anfang und Ende von jedem Gel ist der Längenstandard zu sehen. Die drittletzte Spur enthält die Kontrolle ohne DNA (NTC). In der vorletzten Spur ist das Bandenmuster des Kontrollorganismus *Fusarium* sp. zu sehen. Es zeigt, wie erwartet, deutliche Unterschiede zu den Mustern von *Mycocentrospora*.

Deutlich ist zu erkennen, dass mit diesem Primer die Herkünfte in Gruppen geteilt werden können. Einige zeigen identische Bandenmuster, andere dagegen unterscheiden sich deutlich.



Abb. 25: PCR von *Mycocentrospora*-Isolaten und Kontrollen mit Primer ABA 20. Fotomontage aus drei Gelen.

Zur Übersichtlichkeit wird in der weiteren Darstellung der Ergebnisse der einzelnen PCR Läufe nur noch die mit Hilfe der Datenbank kreierten und schematisierten Gele verwendet. Hierbei wird jede Bande, ob aus wenig oder viel DNA bestehend, als ein Strich symbolisiert und gleich behandelt (Abbildungen 26 und 51 bis 59).

3.2.4.1 Primer ABA 20

Exemplarisch werden hier nur die Ergebnisse des Primers ABA 20 gezeigt (Ergebnisse der Primer ABA 01, 02, 03, 04, 09, 12, 13, 17 und 18 s. Anhang Kap. 8.4.1 bis 8.4.9).

Die Ergebnisse der PCR mit Primer ABA 20 sind in Abb. 26 und Tab. 15 zusammengefasst. Insgesamt konnten 29 unterschiedliche Merkmale gefunden werden. Ausgewertet wurde der Bereich von 355 bis 3816 Basenpaaren.

Mit Hilfe von Primer ABA 20 lassen sich nicht alle Isolate eindeutig differenzieren. Es sind zwei Gruppen zu erkennen, die auf Grund der 0/1-Matrix identisch sind. Diese Gruppen sind in Tab. 15 mit gleicher Farbe (gelb bzw. grün) markiert. Alle nicht farbig markierten Isolate lassen sich durch ihr Bandenmuster eindeutig unterscheiden.

Ein typischen DNA-Fragmentbereich, in dem alle Isolate der Gattung *Mycocentrospora* eine Bande aufweisen, existiert bei diesem Primer nicht. Zwar alle untersuchten Isolate in den Bereichen 936 bis 1061, 1105 bis 1498 und 1525 bis 1863 eine Bande, aber auch der Kontrollorganismus (*Fusarium*) hat in diesen Bereichen ein Amplifikat, so dass diese Banden nicht gattungstypisch sind.

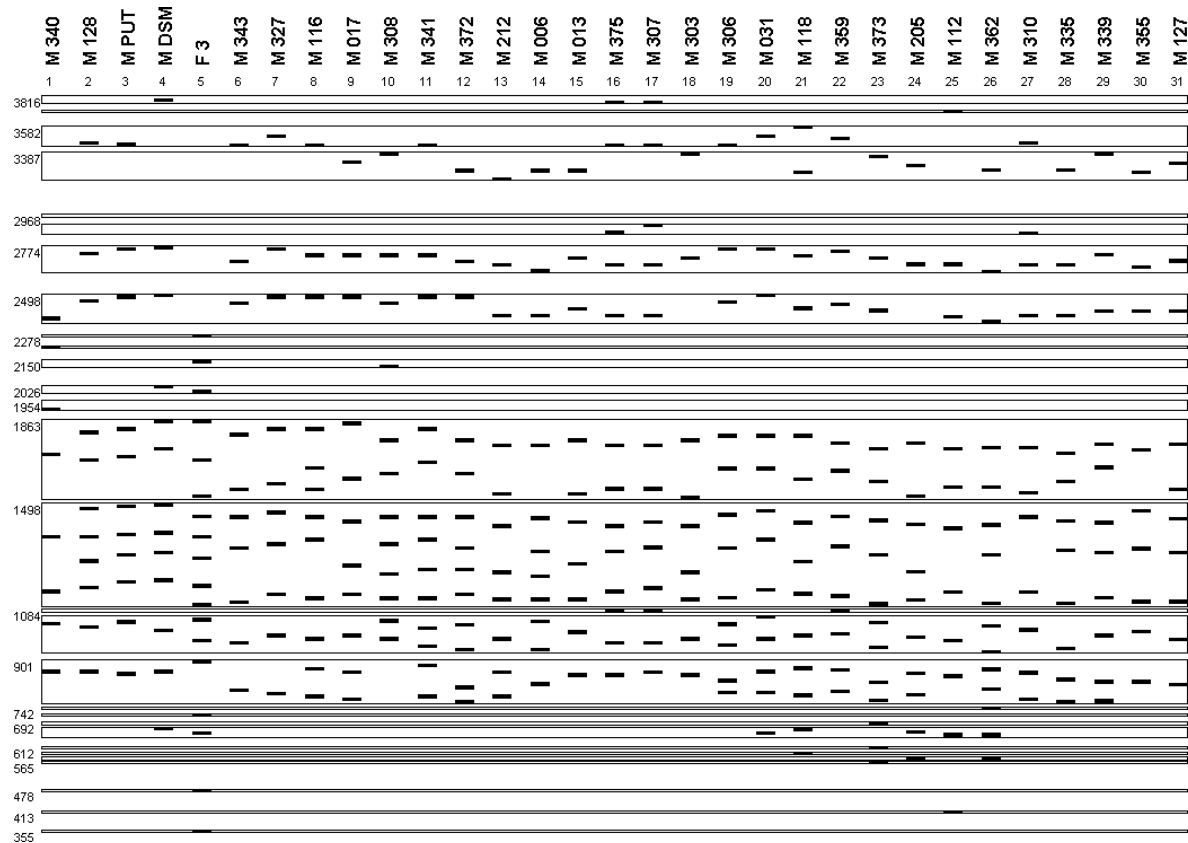


Abb. 26: Schematisiertes Gel des Primers ABA 20. Aufgetragen sind die Positionen der einzelnen Banden in den dazugehörigen Bins.

Tab. 15: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 20.

			M 340	M 128	M PUT	M DSM	F 3	M 343	M 327	M 116	M 017	M 308	M 341	M 372	M 212	M 006	M 013	M 375	M 307	M 303	M 306	M 031	M 118	M 359	M 373	M 205	M 112	M 362	M 310	M 335	M 339	M 355	M 127
Bin	bp Range	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1	3816-3775	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	3705-3705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	3582-3448	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4	3387-3209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
5	2968-2968	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
6	2906-2859	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
7	2774-2631	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	2498-2354	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
9	2278-2278	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	2221-2221	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	2150-2125	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	2026-2000	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	1954-1917	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1863-1525	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	1498-1105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	1084-1081	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tab. 15:

Bin	bp Range	M 340	M 128	M PUT	M DSM	F 3	M 343	M 327	M 116	M 017	M 308	M 341	M 372	M 212	M 006	M 013	M 375	M 307	M 303	M 306	M 031	M 118	M 359	M 373	M 205	M 112	M 362	M 310	M 335	M 339	M 355	M 127
17	1061-936	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	901-763	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	742-742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
20	719-719	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	692-692	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	675-649	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
23	612-612	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	594-594	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	580-578	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
26	565-565	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
27	478-478	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	413-413	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
29	355-355	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Mit gleicher Farbe (gelb bzw. grün) markierte Isolate haben ein ähnliches Bandenmuster.

3.2.5 Dendrogramm aus den RAPD-Untersuchungen

Für die Berechnung des Dendrogrammes (Abb. 27) wurden alle Merkmale, insgesamt 206, der zehn ausgewerteten Primer verwendet. In Treecon wurde die Formel von KING et al, 1995, sowie die Clustermethode (UPGMA) angewendet.

Wie die Abb. 27 zeigt, lässt sich jede einzelne *M. acerina* Herkunft mit der RAPD-PCR Methode und den gewählten Primern eindeutig charakterisieren. Keine Herkunft gleicht einer anderen in allen untersuchten Merkmalen. Je dichter die untersuchten Herkünfte im Dendrogramm zusammenstehen, desto ähnlicher sind sie sich in den untersuchten genetischen Merkmalen. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass die Äste des Baumes an den Knoten frei drehbar sind und die Reihenfolge der Auflistung zufällig ist.

Deutlich zu sehen ist, dass sich die für Kontrollzwecke mit untersuchte *Fusarium* Art stark in ihren Merkmalen von *Mycocentrospora* unterscheidet und im Dendrogramm deutlich isoliert ist. Auffällig ist der große Unterschied zwischen M 340 und den anderen Herkünften. Dies lässt sich durch eine Verschmutzung mit Hefen in der Kultur erklären. Neben der DNA von M 340 wurde offensichtlich auch DNA der Hefe isoliert und in der PCR amplifiziert. Alle anderen zeigen untereinander größere Übereinstimmungen.

Früh teilt sich der Baum in zwei große Gruppen, die mit blau und rot gekennzeichnet sind. Bei einem Vergleich dieser Herkunft mit den Boniturnoten (s. Kap. 3.1.1.4.1) zeigt sich, dass alle hochvirulenten Herkunft im roten Bereich des Dendrogrammes zu finden sind. In der blau markierten Gruppe sind die Herkunft mit mittlerer oder schwacher Virulenz. Interessant ist auch die Sonderstellung von M DSM, die als Referenzkultur diente. Sie ist zwar in den Baum integriert, steht aber zwischen den beiden Gruppen. Eine Zuordnung zu der schwach virulenten Gruppe wurde nicht aufgrund von Inokulationsversuchen vorgenommen, da der Stamm nur als Referenz zur Identifikation verwendet wurde. Was die genetische Ähnlichkeit betrifft, muß er aber zu der blauen Gruppe gerechnet werden.

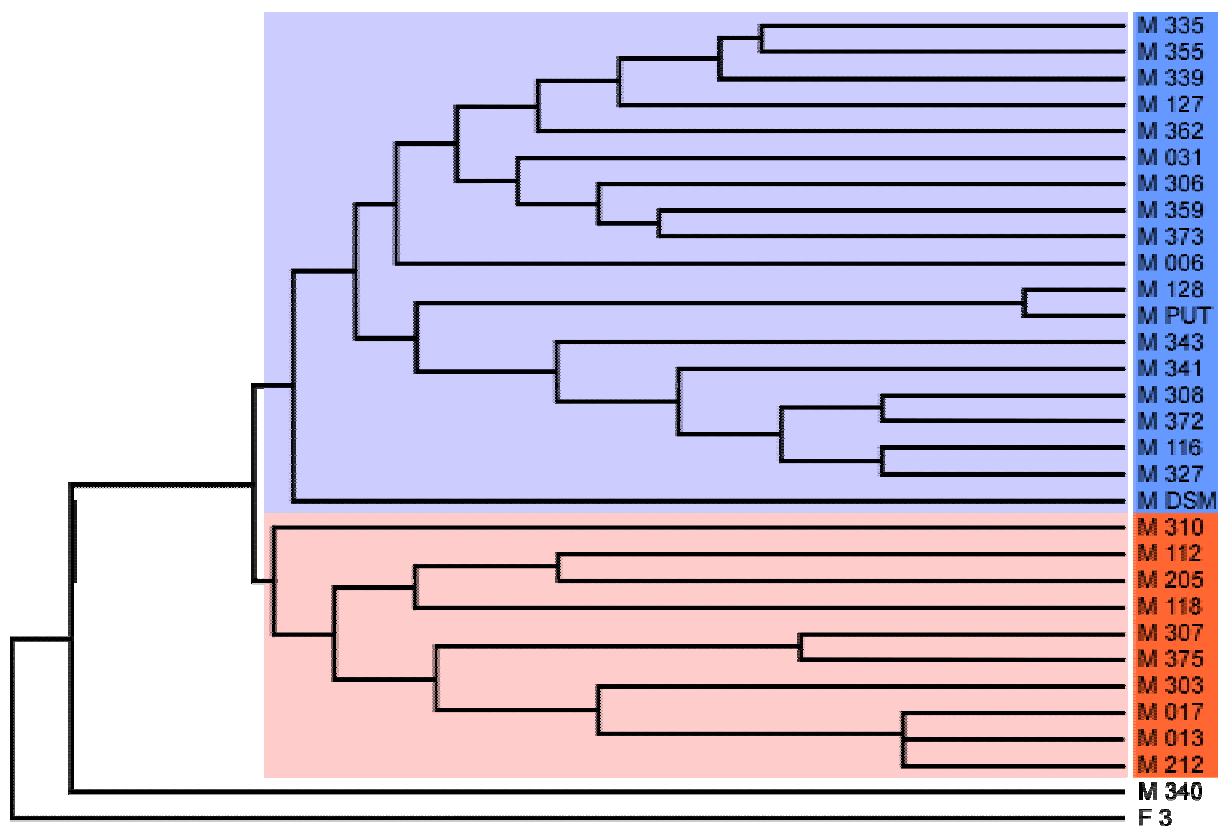


Abb. 27: Dendrogramm der RAPD-Untersuchungen von 30 *M. acerina* Herkunft mit 10 Primern und 206 Merkmalen.

Mit M sind die *Mycocentrospora*-Herkunft gekennzeichnet, F = *Fusarium* sp. Rot unterlegt sind die hochvirulenten Herkunft, blau die restlichen. Zur Berechnung wurde Treecon 1.2 verwendet (Clusteranalyse, UPGMA).

3.3 Ergebnisse der Proteomuntersuchung

3.3.1 Biotest mit pektinolytischen Enzymen

Der Biotest mit der Pektinase (PG) und dem Proteinextrakt aus einer infizierten Pflanze zeigte deutliche Symptome auf den Blättern (Abb. 28 A-E). Bei Betrachtung der Konzentrationen der Pektinase (PG) fällt auf, dass diese offensichtlich in keinem Zusammenhang zu der Größe der Schädigung des Blattes stehen. Bei einer Konzentration von 50 mg/ml (D) ist ein im Verhältnis zu 5 mg/ml (A und B) nur kleiner Fleck zu sehen. Die für eine typische Infektion mit *Mycocentrospora* sprechenden Symptome der Anfangsphase sind bei den Untersuchungen nur einmal (Ausschnittsvergrößerung D) zu beobachten gewesen. Hierbei ist ein kleiner dunkler Fleck im Zentrum, umgeben von einem chlorotischen Hof.

Die markantesten Schädigungen entstanden durch die Proteinextrakte von bereits infizierten Pflanzen (E). Diese Extrakte wurden nicht aufkonzentriert, sondern direkt nach dem Abzentrifugieren der Zellbestandteile appliziert. Die Schädigung betrifft große Areale der Blattfläche die schnell nekrotisieren. Diese werden umgeben von einem dunklen Randbereich.

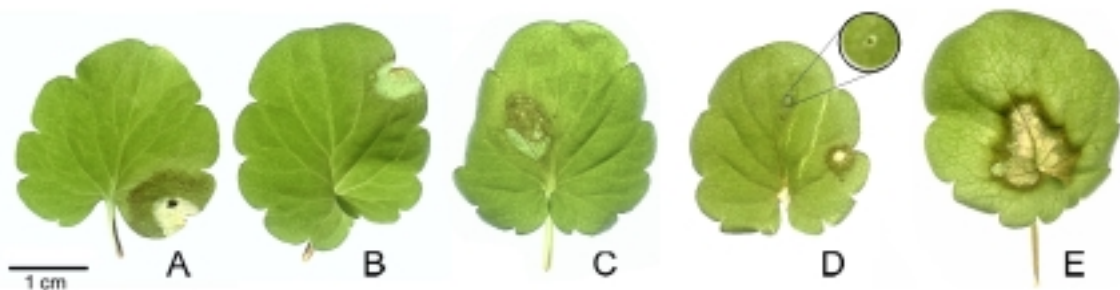


Abb. 28: Biotest mit Pektinase, PG (A und B: 5 mg/ml, C: 10 mg/ml, D: 50 mg/ml) und mit Proteinextrakt aus einer infizierten *Viola*-Pflanze (E). Aufgetragen wurde je ein Tropfen mit 20 μ l. D zeigt zusätzlich eine Ausschnittsvergrößerung eines Blattflecks. Aufnahme nach 8 Tagen.

3.3.2 Pektinaseaktivität (PG und PME)

3.3.2.1 Optimierung des pH-Wertes für Polygalakturonase

Abb. 29 zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Optimierung des pH-Wertes. Für die Polygalakturonase liegt der optimale pH-Wert bei ca. 4. Bei pH 9 funktionierte die Rutheniumrotfärbung nicht mehr. Der Farbstoff bildete einen Niederschlag und drang nicht ins Gel ein.

Für die weiteren Versuche wurde ein pH-Wert von 5 gewählt, da das Gel im Bereich 4 und saurer nicht mehr ausreichend fest wurde. Für die Färbung und weitere Auswertung war es aber unabdingbar, dass das Gel eine gewisse Festigkeit haben musste.

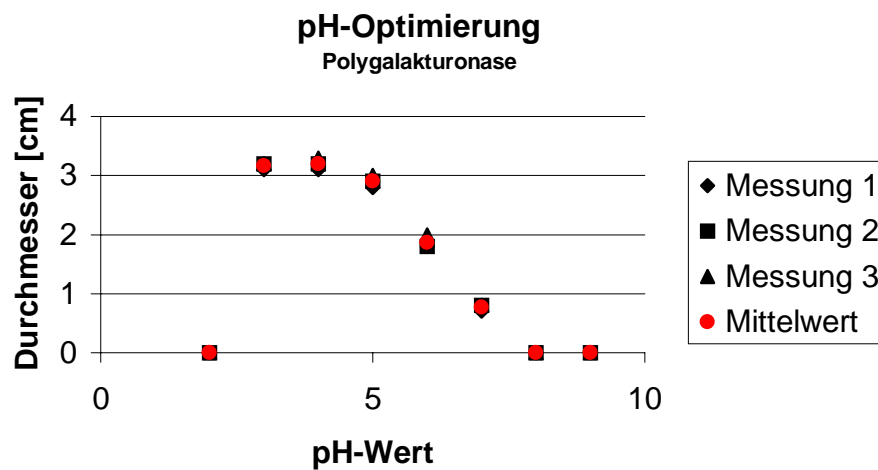


Abb. 29: Optimierung des pH-Wertes der Polygalakturonase. Größe des Durchmessers des nicht gefärbten Bereiches, entstanden durch Pektinabbau, in Abhängigkeit vom pH-Wert (n=3).

3.3.2.2 Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) aus dem lyophilisierten Material

Die Abbildungen 30 und 31 zeigen die Ergebnisse der Pektinaseaktivität aus dem lyophilisiertem Material, bei gleicher Gesamtproteinkonzentration. Es konnte nur Polygalakturonaseaktivität festgestellt werden.

Anhand des Geles (Abb. 30) kann man gut den Unterschied der Herkünfte in ihrer Pektinabaurate erkennen. Je größer der Hof, desto mehr Pektin wurde abgebaut. Bei jedem Erregerisolat ist eine Aktivität zu erkennen. Auch die einzige *Ramularia* Probe (R 331) zeigte eine Aktivität. Da die Konzentration an Polygalakturonase sehr gering ist, ist auch die Schwankung der Ergebnisse sehr groß. Aus diesem Grund sind in Abb. 31 drei Analysen mit ihren Mittelwerten verrechnet.

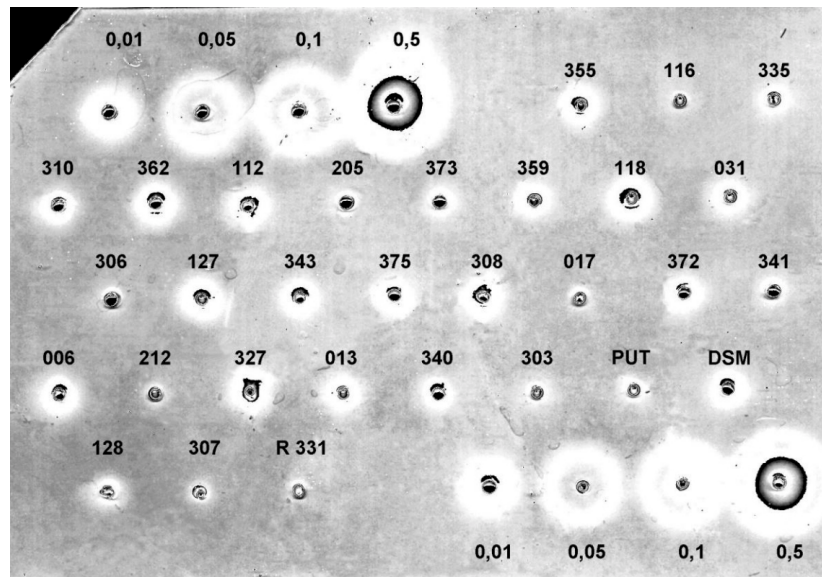


Abb. 30: Vergleich der lyophilisierten *Mycocentrospora*- und *Ramularia* (R 331) Herkünfte auf ihre Pektinaseaktivität (PG und PME).

Die ersten und letzten vier Taschen beinhalten den Standard (mg/ml Pektinase, PG). Aufgetragen wurden jeweils 10 µl. Die Abbildung zeigt nur den Sättigungskanal des HSB-Farbraumes.

Abb. 31 zeigt die Mittelwerte der Polygalakturonaseaktivität der untersuchten Isolate. Rot gekennzeichnet sind die nach der Genomuntersuchung hochvirulenten Erreger-Isolate verschiedener Herkünfte. Grün markiert ist das Isolat M 307, das als Kontrolle für die Aussagekraft der Genomuntersuchung diente.

M 375, M 013 und M 118 liegen im Vergleich der Enzymaktivität im vorderen Drittel. Die ebenfalls als hochvirulent eingestuften Isolate der Herkunft M 310, M 205, M 017 und M 307 liegen allerdings im letzten Drittel, wobei M 205 und M 017 zu den virulentesten Isolaten zählen (Platz 2 und 3 von 23 getesteten). Umgekehrt zeigt M 327 die höchste Polygalakturonaseaktivität, im Vergleich der Boniturnoten liegt sie allerdings nur auf Platz 18 (vergl. Abb. 18).

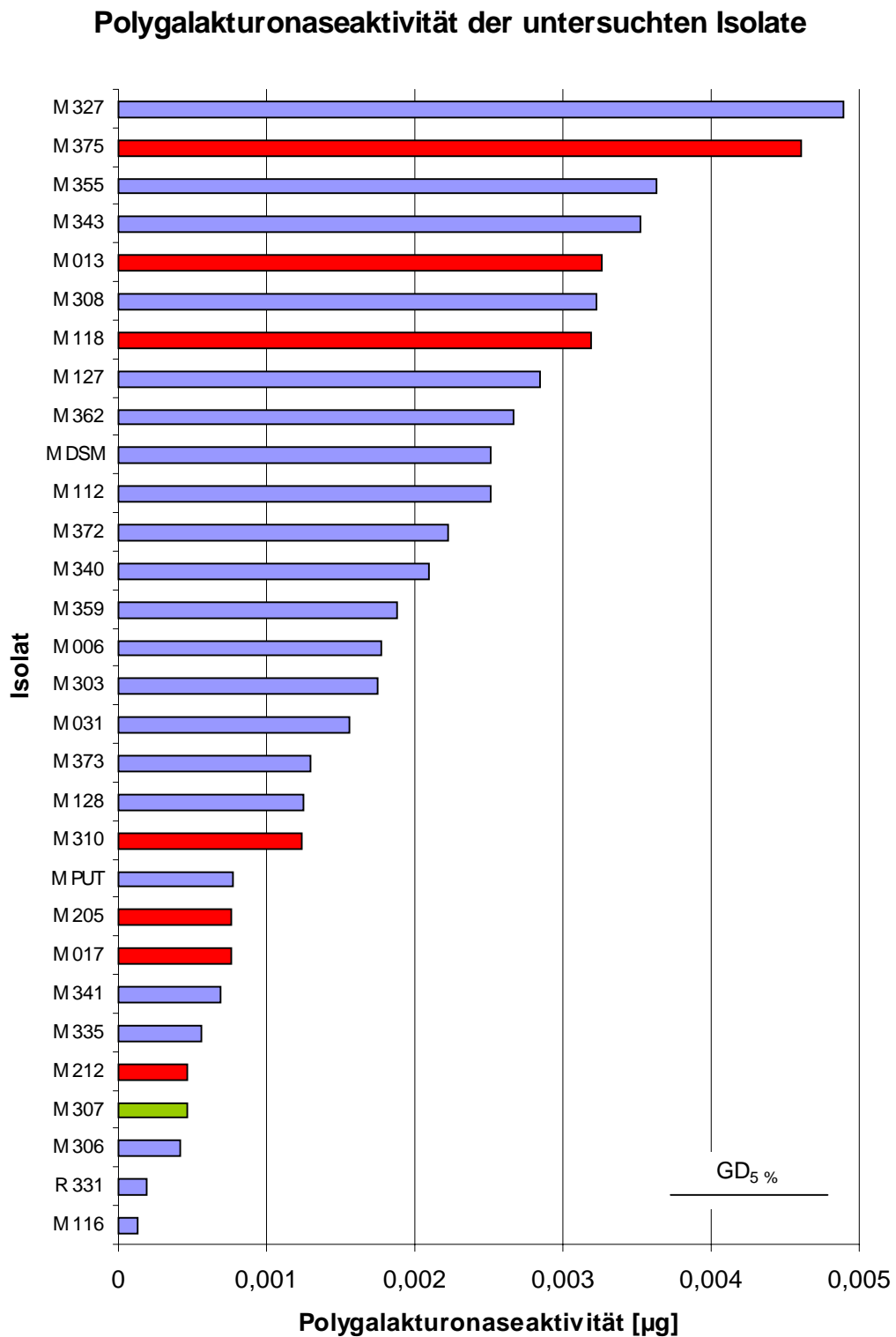


Abb. 31: Polygalakturonaseaktivität aus lyophilisiertem Material und standardisiertem Gesamt Proteingehalt aller untersuchten Herkünfte. Aufgetragen wurden die Mittelwerte aus drei Messungen. Die virulenten Isolate sind rot markiert. Grün ist M 307, der nicht auf seine Virulenz überprüft wurde (GD₅ % = 0,0011).

3.3.2.3 Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) ausgesuchter Isolate auf Pektinmedium

In den weiteren Versuchen wurde die Anzahl der untersuchten Isolate auf fünf reduziert. Die Abbildungen 32 und 33 zeigen die Pektinaseaktivität (PG und PME) über eine Kulturdauer von 27 Tagen. Das Kulturmedium enthielt als einzige Kohlenstoffquelle Pektin.

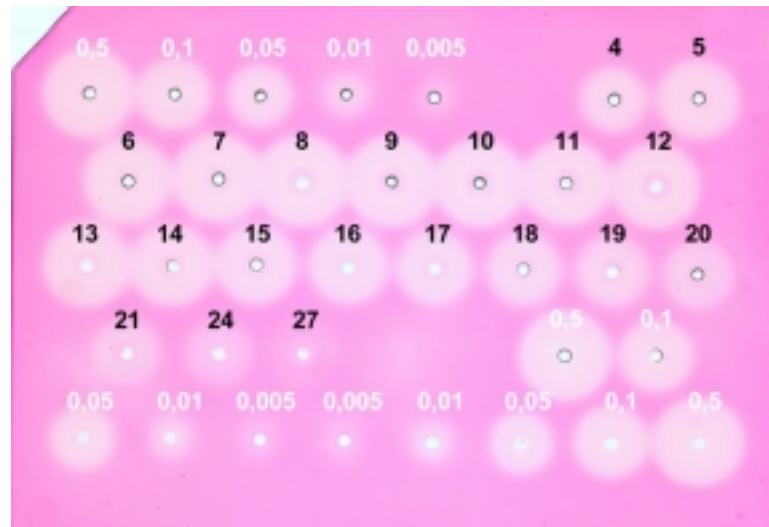


Abb. 32: Gel der Pektinaseaktivität (PG und PME) des Isolates M 307 kultiviert auf Pektinmedium (PMA) im Kulturverlauf von 27 Tagen.

In weißen Zahlen ist die Konzentration von Pektinase, PG (Merck) in mg/ml angegeben. Schwarzen Zahlen geben den Kulturtag an, an dem die Probe gezogen wurde.

Aufgetragen wurden jeweils 10 µl.

Die Grafik (Abb. 33) zeigt für alle untersuchten Isolate einen starken Anstieg des Pektinabbaus bis zum fünften bzw. sechsten Tag. Nach dem Erreichen des Maximums fallen die Kurven wieder stark ab. M 307 erreicht das Maximum erst am achten Tag und der Abfall dauert auch deutlich länger als bei den anderen untersuchten Proben. Interessant ist hierbei, dass die Reduktion der Polygalakturonaseaktivität in Schüben erfolgt, d. h. die Polygalakturonaseaktivität fällt stark ab und bleibt dann einen Zeitraum (zwei bis vier Tage) auf dem gleichen Niveau, und fällt dann wieder ab. Dieser Zeitraum wird im Kulturverlauf kürzer. Dieses Verhalten ist auch bei M 375 und M 341 andeutungsweise zu erkennen, allerdings nicht über einen längeren Zeitraum.

Die hochvirulenten Isolate erreichen alle eine höhere Polygalakturonaseaktivität als die bei der Untersuchung ausgesuchten Herkünfte mit geringer Virulenz. Bei der Betrachtung von M 375 und M 341 fällt auf, dass der Unterschied nur sehr gering ist.

Polygalakturonaseaktivität im Verlauf der Kulturdauer (PMB)

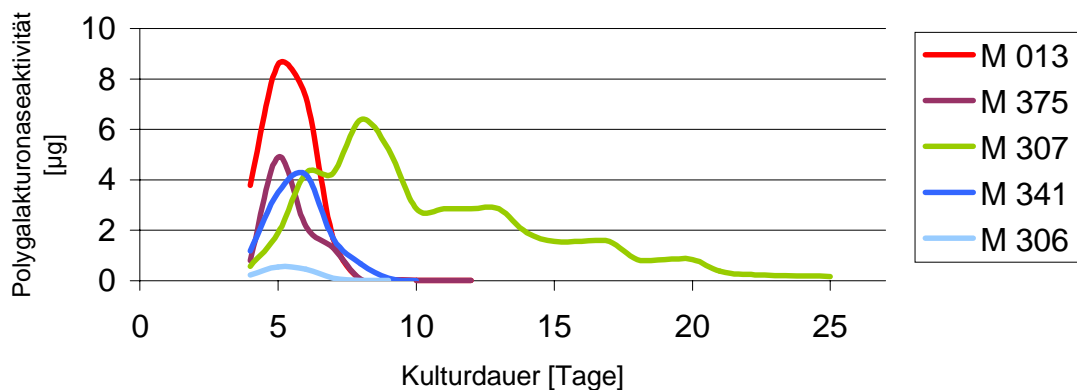


Abb. 33: Polygalakturonaseaktivität ausgesuchten *M. acerina*-Isolate (M 013, M 375, M 307, M 341 und M 306) über einen Kulturzeitraum von 25 Tagen.

Kulturbedingungen: PMB-Medium, Raumtemperatur, Orbitalschüttler (120 rpm).

Neben der Polygalakturonaseaktivität konnte auch die Pektinmethylesteraseaktivität auf demselben Gel festgestellt werden. Wie in Abb. 34 zu sehen, ist am Anfang des Kulturverlaufes eine hohe Aktivität der Polygalakturonase festzustellen (rote Pfeile). Dies ist an den ungefärbten Stellen im Gel zu erkennen. Nach acht Tagen Kulturdauer fällt die Aktivität stark ab und es ist ein stärker gefärbter Hof um die Auftragsstelle zu sehen (weiße Pfeile). Diese Färbung wird durch die Pektinmethylesterase verursacht. Die Aktivität dieses Enzymes fällt im Verlauf der Kulturdauer ab und ist am 27sten Tag nur noch schwach an einem pinkfarbenen Ring um die Auftragsstelle zu erkennen.

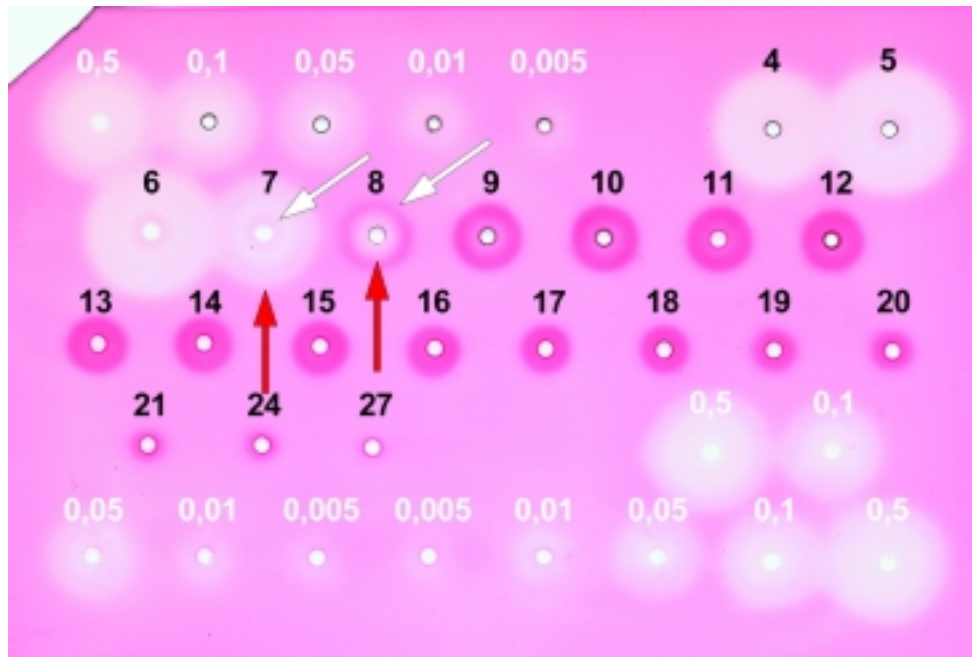


Abb. 34: Pektinase Gel-Assay mit Isolat M 013 kultiviert auf PMA.

Weiß Zahlen entsprechen der Konzentration des Standards (Pektinase, PG) in mg/ml.

Schwarze Zahlen entsprechen dem Kulturtag. Aufgetragen wurden je 10 µl.

Die Abb. 35 zeigt den Verlauf der Pektinmethylesteraseaktivität bei den fünf ausgewählten Isolaten während der Kulturdauer (PMB) von 27 Tagen. Die Aktivität wurde im Vergleich zur Polygalakturonase angegeben.

Die Herkünfte M 341 und M 307 zeigten kaum eine Aktivität. Die anderen drei, M 306, M 013 und M 375 zeigen nach sieben bis neun Tagen einen starken Anstieg und erreichen innerhalb von ein bis drei Tagen ein Maximum. Die größte Aktivität aller untersuchten Isolate erreicht das schwach virulente Isolat M 306. Das als stark virulent eingestufte Isolat M 307 zeigt dagegen kaum eine PME-Aktivität. Bei den drei Isolaten mit starker Aktivität kommt es nach dem Maximum zu einem Abfall der Aktivität mit einem anschließenden Wiederanstieg. M 375 erreicht erst nach elf Tagen das Maximum. Im weiteren Kulturverlauf fällt die Aktivität bei den drei Isolaten stufenweise ab.

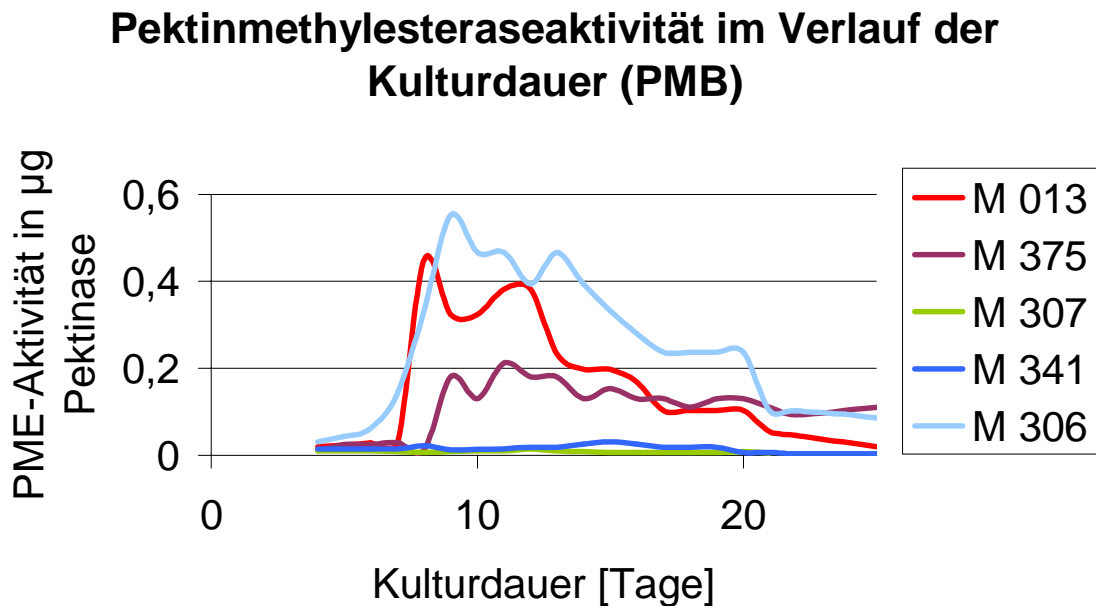


Abb. 35: Pektinmethylesteraseaktivität der ausgesuchten Isolate M 013, M 375, M 307, M 341 und M 306 über einen Kulturzeitraum von 25 Tagen.

Kulturbedingungen: PMB-Medium, Raumtemperatur, Orbitalschüttler (120 rpm).

3.3.2.4 Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) ausgesuchter Herkünfte von PDB-Medium

Den Verlauf der Polygalakturonaseaktivität im Kulturverlauf auf PDB zeigt Abb. 36 (PME-Aktivität wurde nicht festgestellt). Von den fünf ausgewählten Herkünften sind M 375, M 013 und M 307 in der Grafik aufgetragen. Bei den anderen beiden Herkünften M 341 und M 306 konnte keine Aktivität im Untersuchungszeitraum festgestellt werden.

Der Beginn des Anstiegs ist nicht einheitlich. M 307 erreicht bereits am fünften Tag das Maximum, während die anderen beiden Isolate erst am sechzehnten (M 375) bzw. achtzehnten (M 013) Kulturtag den Höhepunkt erreichten. Nach dem Erreichen des Maximums fallen bei allen Herkünften die Polygalakturonaseaktivitäten wieder stark ab.

Polygalakturonaseaktivität im Verlauf der Kulturdauer (PDB)

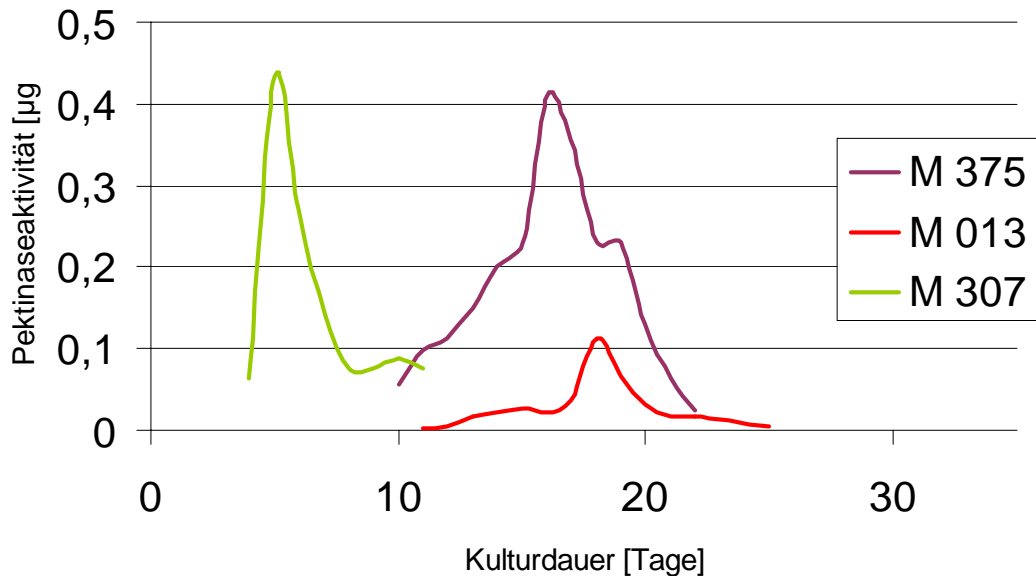


Abb. 36: Vergleich der ausgesuchten *M. acerina*-Isolaten auf ihre Polygalakturonaseaktivität über den Zeitraum der Kulturdauer von 35 Tagen.

Kultivierung erfolgte in PDB bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler (120 rpm).

3.4 Ergebnisse der Toxinuntersuchungen

3.4.1 Biotest mit Cercosporin

Das Ergebnis des Biotests mit Cercosporin (Sigma, C-6696) ist in Abb. 37 zu sehen. Zwei Tropfen (10 µl) wurden an unterschiedlichen Stellen auf ein Stiefmütterchenblatt gegeben. Die Bonitur erfolgte nach 10 Tagen.

Der weiße Pfeil bezeichnet die Stelle, an der Kutikula und Epidermis bei Versuchsbeginn zusätzlich durch eine Pasteurpipette mechanisch beschädigt wurden, um ein Eindringen des Cercosporins zu beschleunigen. Deutlich ist eine starke Schädigung des Gewebes zu erken-

nen. Im Bereich der Läsion ist es zur vollständigen Nekrotisierung gekommen. Die Abgrenzung zum gesunden Gewebe ist sehr scharf.

Im Bereich des roten Pfeiles wurde ebenfalls ein 10 µl Tropfen Cercosporin aufgetragen, hier allerdings ohne das Blattgewebe zu schädigen. Insgesamt kam es an dieser Stelle zu drei typischen Symptomen, wie sie auch bei einer Inokulation mit *Mycocentrospora* zu erwarten sind. Im Zentrum ist ein schwarzer Fleck, der im Durchmesser noch nicht einen Millimeter erreicht, zu erkennen. Um ihn herum ist das Gewebe chlorotisch.

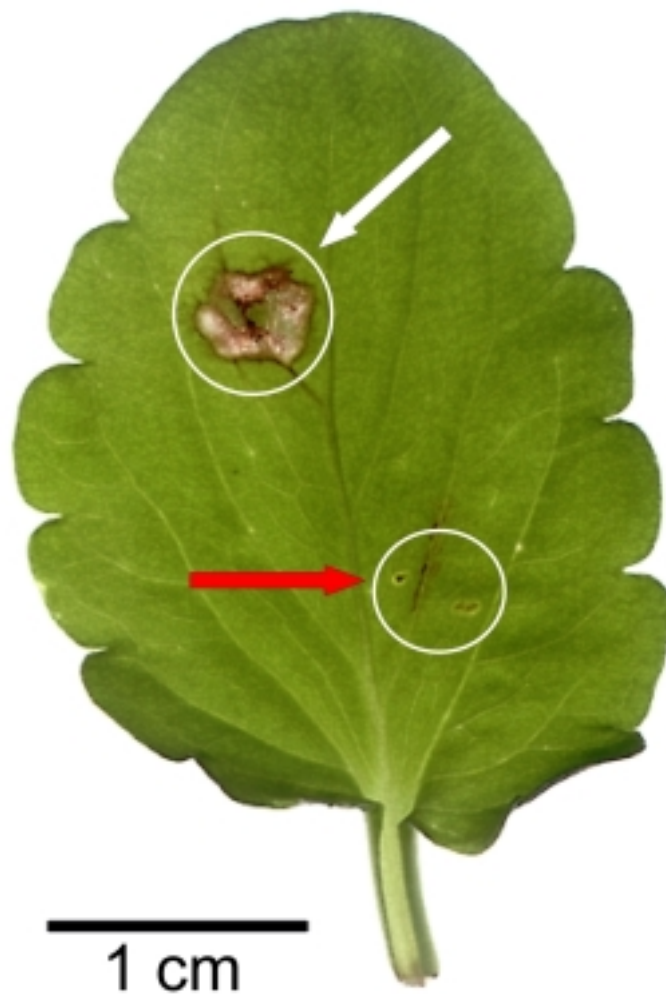


Abb. 37: Reaktion eines *Viola*-Blattes nach Behandlung mit Cercosporin (2 mal 10 µl einer 1,5 mg/ml Lösung, weißer Ring). Weißer Pfeil mit Läsion, roter Pfeil ohne Läsion.

3.4.2 Biotest mit extrahiertem roten Farbstoff

Mit dem roten Farbstoff, der aus den drei hochvirulenten Isolaten extrahiert wurde, erfolgte der Biotest. Trotz mehrfacher Wiederholung und Anwendung in unterschiedlichen Konzentrationen sowie mit und ohne Schädigung der Kutikula konnte keine Toxizität in dem Blatttest festgestellt werden.

3.4.3 DC-Untersuchungen

Da es sich bei Cercosporin und den Beticolinen um Farbstoffe handelt, die durch ihre rote und gelbe Färbung auffallen, wurden von den Extrakten zunächst Dünnschichtchromatogramme angefertigt. Tab. 16 zeigt die zusammenfassenden Ergebnisse. Als Referenz wurde Cercosporin (Sigma, C-6696) verwendet.

Bei keinem der drei untersuchten Isolate konnte ein gelber Farbstoff nachgewiesen werden. Eine rote Bande war bei allen Proben vorhanden ($R_f = 0,80$). Durch den direkten Vergleich auf der DC-Platte konnte aber Cercosporin ($R_f = 0,73$) ausgeschlossen werden.

Auffällig war, dass bei den Isolaten M 013 und M 375 mehr Stoffe aufgetrennt wurden, als bei M 307. M 013 und M 375 unterschieden sich nur in einem Fleck ($R_f = 0,58$), der nicht bei M 375 vorhanden war.

Tab. 16: R_f -Werte der DC-Untersuchungen des Extraktes von M 013, M 307, M 375 und als Referenz Cercosporin. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Läufen.

Bande	M 013	M 307	M 375	Cercosporin
1	0,80	0,80	0,80	-
2	-	-	-	0,73
3	0,70	0,69	0,71	-
4	0,63	-	0,65	-
5	0,58	-	-	-
6	0,53	-	0,51	-
7	0,43	0,42	0,41	-

3.4.4 Charakterisierung des roten Extraktes mit GC-MS

Mit dem Gaschromatograf wurden die Extrakte der virulenten Herkünfte M 013 (A), M 375 (B) und M 307 (C) untersucht. Zusätzlich wurde die Chloroformfraktion des Kulturfiltrates von M 307 (D) überprüft.

Die Chromatogramme in Abb. 38 zeigen alle bei einer Retentionszeit von 30,5 min einen charakteristischen Peak, der bei allen untersuchten Proben zu finden ist. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um den extrahierten roten Farbstoff handelt. Abb. 39 zeigt das Massenspektrum der Substanz. Der Molekülpeak liegt bei 286. Weitere Fragmentmassen sind 271, 257, 240, 230 und 212. Die Fragmentierung der Massenspektren der Peaks bei 30,5 min ist bei allen vier Proben weitgehend identisch, so dass davon ausgegangen werden kann, dass bei allen Proben die gleiche Substanz vorhanden ist.. Von dem Extrakt des Isolates M 307 (Abb. 38, C) wurde (im Fachbereich Chemie und Chemietechnik, Uni-GH Paderborn) ein H-NMR aufgenommen. Das Ergebnis deutete auf ein Anthrachinon hin. Aus den Ergebnissen von Lösungsmittelverhalten, Farbe, Massenspektrum, H-NMR und Literatur (ASSANTE et al., 1977, konnten bei *Mycocentrospora acerina* Cynodontin isolieren.) ist davon auszugehen, dass es sich bei der Substanz mit der Retentionszeit von 30,5 min um Cynodontin handelt.

Die Chromatogramme von B, C und D haben einen deutlichen Peak bei einer Retentionszeit von 28,1 min. Nur bei Chromatogramm A ist diese Substanz nicht zu finden. Abb. 40 zeigt das Massenspektrum dieser Substanz. Der Molekülpeak ist bei einer Masse von 270 zu finden. Weitere Fragmente haben die Massen 253, 242, 224 und 213.

Bei keiner der untersuchten Proben konnte Cercosporin (Massenspektrum Abb. 41) nachgewiesen werden.



Abb. 38: GC-Chromatogramme von den Chloroform-Extrakten der virulenten Isolate. A: M 013, B: M 375, C: M 307, D: M 307 (Kulturfiltrat).

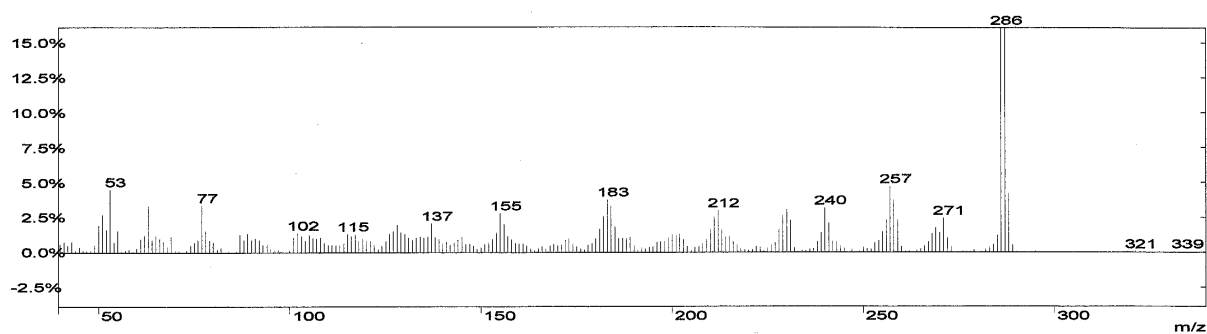


Abb. 39: Massenspektrum der Substanz mit der Retentionszeit von 30,5 min.

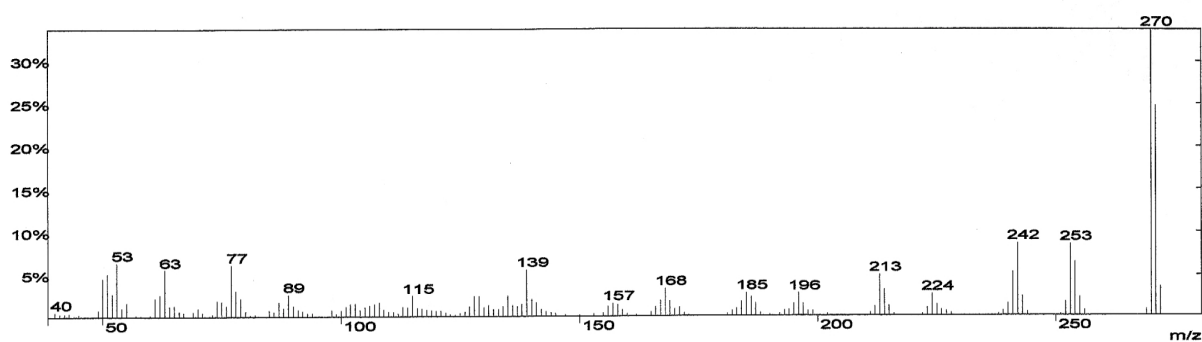


Abb. 40: Massenspektrum der Substanz mit der Retentionszeit von 28,1 min.

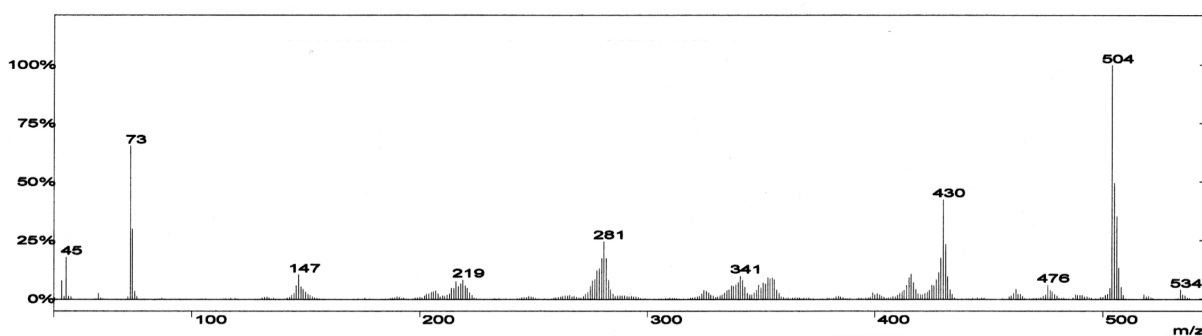


Abb. 41: Massenspektrum von Cercosporin (Sigma C-6696).

4 Diskussion

Mycocentrospora und *Ramularia* gehören zu den wichtigsten pilzlichen Pathogenen von Blattfleckenkrankheiten Stiefmütterchen in Deutschland. Dies zeigt die Sammlung erkrankter Pflanzen über einen Zeitraum von drei Jahren. Welche der beiden Gattungen den größeren wirtschaftlichen Schaden verursacht ist, aufgrund der erhobenen Daten, schwer zu beurteilen. Beide sind in der Lage komplette Flächen zu vernichten. Folglich ist das Auftreten, gleich welcher der beiden Gattungen, von großer ökonomischer Relevanz.

4.1 Phytopathologische Untersuchungen

4.1.1 Blattsymptome und Pathogene

Die Blattfleckenkrankheiten bei Stiefmütterchen können durch drei pilzliche Errenergattungen hervorgerufen werden. Dies sind *Mycocentrospora*, *Ramularia* und *Alternaria*. Alle drei verursachen Blattflecken, die im Anfangsstadium ein identisches Aussehen haben. Das erste erkennbare Symptom ist ein kleiner schwarzer Fleck auf dem Blatt, der im weiteren Infektionsverlauf einen durchscheinenden, dann chlorotischen Hof bekommt. Erst mit dem Erscheinen von Nekrosen sind visuelle Differenzierungen zwischen den einzelnen Gattungen möglich.

Genauer auf das Krankheitsbild untersucht wurden die pathogenen Gattungen *Mycocentrospora* und *Ramularia*. Pathogene aus der Gattung *Alternaria* konnten im Untersuchungszeitraum nicht nachgewiesen werden. Bei *Mycocentrospora* gibt es nur eine Art, die die entsprechenden Symptome hervorrufen kann, während bei *Ramularia* zwei Arten (*R. agrestis* SACC. und *R. lactea* (DESM.) SACC.) hierfür bekannt sind.

Beide untersuchten Gattungen lassen sich erst symptomatisch an ihren Nekrosen unterscheiden. *Mycocentrospora* verursacht die größeren Flecken, deren Nekrosen, im fortgeschrittenen Krankheitsstadium, für diesen Erreger typisch konzentrisch sind. Durch dieses Aussehen ist zu vermuten, dass der Pilz auch schubweise in der Pflanze wächst. Bei *Ramularia* ist dagegen der Rand des Blattflecks hart begrenzt. Das umliegende Gewebe hat eine dunkle (lila) Färbung. Eindeutig ist der Erreger aber erst an den, bei hoher Luftfeuchtigkeit, entstehenden Ko-

nidiophoren mit den dazugehörigen Konidien zu bestimmen. Diese werden zur Identifizierung benötigt. Die Krankheit muß also bereits fortgeschritten sein, um sicher zwischen einem *Mycocentrospora* und einem *Ramularia*-Befall differenzieren zu können.

In der Literatur finden sich Symptombeschreibungen eines Erregers zu einem bestimmten Zeitpunkt des Krankheitsverlaufes. Um dem Praktiker eine möglichst frühe Identifikation zu ermöglichen, werden die Symptome zu Beginn der Infektion beschrieben. In vielen Fällen fehlt dadurch eine eindeutige Diagnose, da sich keine aufwendigen Laboruntersuchungen nach den Grundsätzen der kochschen Postulate anschließen. Bei der Entnahme aus einer kultivierten Fläche kommt noch erschwerend hinzu, dass mit einer Mischinfektion der unterschiedlichen Blattfleckenerreger gerechnet werden muss, auch wenn dies nach den gemachten Beobachtungen eher unwahrscheinlich ist.

Während der drei Jahre, in denen die Stiefmütterchenpflanzen gesammelt und phytopathologisch untersucht wurden, konnte neben *Alternaria* auch kein *Cercospora violae* SACC. nachgewiesen werden. Dieser Erreger verursacht gelblichbraune, grünlich umrandete Blattflecken vor allem an Veilchen aber in seltenen Fällen auch an Stiefmütterchen (STAHL et al., 1993). *Cercospora violae* ist laut ASSANTE et al. (1977) ein Produzent von Cercosporin. Diese beiden Pathogene stellen zur Zeit kein Problem für den Erwerbsgartenbau in Deutschland dar.

Über den Untersuchungszeitraum konnten von 35 *Mycocentrospora* und 28 *Ramularia* Isolate aus verschiedenen geografischen Gebieten isoliert werden. Aus diesen Zahlen lassen sich allerdings keine weiterführende Aussagen treffen, was die wirtschaftliche Bedeutung oder das Auftreten der Pathogene in bestimmten Jahren betrifft. *Mycocentrospora* konnte sicher mit beiden Isolationsmethoden isoliert werden. Bei *Ramularia* war dies nicht der Fall. Die Methode der Oberflächensterilisierung erwies sich als nicht zuverlässig, weil der Pilz auf den verwendeten Medien nur sehr langsam wuchs. Da im ersten Jahr der Untersuchungen nur die Methode der Oberflächensterilisation angewendet wurde, konnte nicht von allen befallenen Pflanzen ein Erreger isoliert werden. Dadurch ist zu vermuten, dass die Anzahl der *Ramularia*-Isolate größer sein könnte.

Bemerkenswert war, dass bei keiner erkrankten Pflanze eine Mischinfektion der beiden Pathogene festgestellt werden konnte. Bei einem Vergleich der geografischen Verteilung der Isolate erkennt man, dass in bestimmten Bereichen immer nur ein Blattpathogen gefunden wurde. Nur an zwei Standorten (Kaldenhof bei Münster und SO/MER, Soest) konnten beide Pilze an unterschiedlichen Pflanzen diagnostiziert werden. Eine Mischinfektion mit anderen

Pathogenen wie z. B. *Botrytis* oder *Peronospora* war dagegen möglich. Ein Grund, warum dieses Phänomen nur an dem Standort Kaldenhof auftrat, könnte in der Sammelmethode liegen. Hier wurden alle kranken Stiefmütterchen angeliefert und vorerst zusammen gelagert, bis sie ins Labor transportiert wurden. Eine mögliche Ausbreitung der Pilze ist bei diesem Infektionspotential natürlich gegeben.

4.1.2 Virulenz

Nach MITCHELL, 1984, gibt es keinen präzisen Weg die Virulenz zu quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Quantifizierung über die Vergabe von Boniturnoten.

Die *Mycocentrospora*-Isolate wurden nicht nur auf ihre unterschiedliche Virulenz überprüft, sondern diese Unterschiede wurden wiederum auf ihre Stabilität über einen Zeitraum von acht Monaten getestet. Bisher wurde in der Literatur immer nur die Existenz von Isolaten mit unterschiedlicher Virulenz zu einem bestimmten Zeitpunkt bestätigt. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, wie wesentlich eine Überprüfung der Virulenz nach einem Zeitraum der Lagerung, bzw. wenn das zu untersuchende Material über einen längeren Zeitraum gesammelt wird, ist. Bei beiden Möglichkeiten ist die Virulenz nicht vergleichbar, sondern sie verringert sich ab dem Zeitpunkt der Isolation. Besonders deutlich wird dies bei dem Vergleich der Inokulationsversuche vor und nach Lagerung (s. Kap. 3.1.1.4.2). Das Isolat M 375, das vor der Lagerung als stark virulent eingestuft wurde (Boniturnote 4,3), erreichte nach acht Monaten Lagerung eine Boniturnote unter drei. Dies entspricht einer Note, die mittel bis schwach virulente Isolate erreichen. Das gleiche trifft für die anderen Isolate zu. Es ist zu vermuten, dass bei weiterer Lagerungsdauer die Virulenz noch stärker absinkt. Unter Umständen ist das Isolat dann zwar noch vermehrungsfähig, aber nicht mehr in der Lage eine Pflanze zu infizieren (Verlust der Pathogenität).

Die Vergleichbarkeit ist ohne Wirtspassage oder andere virulenzerhaltende Methoden, nicht möglich. Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Untersuchungen (Genom-, Proteom- und Toxinuntersuchungen) alle Isolate vermehrt und anschließend damit Inokulationen durchgeführt. Alle Parameter (Pflanzenalter, Inokulationsdichte, Temperaturen, Beleuchtung usw.) wurden gleich gehalten. In der Literatur sind nur sehr wenig Hinweise über die wichtige Vorbehandlung der Pathogene zu finden. Nur LECAM et al. (1994) gibt an, dass die Pilzkulturen auf Agar mit Möhren gehalten wurden, um keinen Verlust in der Virulenzstärke zu haben.

Dies kann darauf hinweisen, dass es sich bei dem Virulenzfaktor um ein Enzym oder Enzymkomplex handeln kann, denn isolierte Pflanzenzellwände können als Kohlenstoffquelle dienen und auch die Produktion von polysaccharidabbauenden Enzymen bei Pathogenen stimulieren (BATEMAN, 1976).

4.2 Genomuntersuchungen

Mit Hilfe von DNA-Fingerprints lassen sich genetische Variationen erkennen. Für die Untersuchungen an *Mycocentrospora* eignete sich die RAPD-Technik, da keinerlei Sequenzdaten zur Verfügung stehen. Mit den erhaltenen Bandenmustern können Aussagen über Gemeinsamkeiten oder Unterschiede im Genom getroffen und daraufhin eine Gruppierung vorgenommen werden. Die RAPD Methode wird vielfach als nicht reproduzierbare Methode angesehen. Ein Ringversuch mit der Beteiligung von 9 Laboratorien scheint dies zu belegen (JONES et al., 1998). Allerdings konnte als mögliche Ursache für die schwere Reproduzierbarkeit die unterschiedlichen Thermalcycler ausgemacht werden (PENNER, 1993). Aus diesem Grund wurde nicht nur für alle Untersuchungen ein Thermalcycler verwendet, sondern auch alle Untersuchungen mit dem gleichen Primer in einem PCR-Lauf durchgeführt. So konnte sichergestellt werden, dass die Bedingungen für alle Proben gleich waren. Das mit Hilfe dieser Technik eine Differenzierung von Stämmen innerhalb einer Spezies möglich ist, wurde von WILLIAMS et al. (1990) bei Pflanzen, Bakterien, Tieren und Pilzen sowie von REGNER & MESSNER (1993) und MULCAHY et al. (1995) an Rebsorten gezeigt. Bei *Rhizoctonia* ist nicht nur eine Zuordnung zu den einzelnen Anastomose-Gruppen durch diese Methode möglich, sondern auch eine Gruppierung innerhalb dieser Gruppe in Pektin-Zymogramm-Gruppen (DUNCAN et al. 1993). Ähnliches gilt auch für die Identifikation von Pilzen auf Ebene der Rassen (*Fusarium*, *Drechslera*), bzw. Pathovaren bei *Xanthomonas campestris* (KRÄMER, 1994).

Generell sind aber auch die Grenzen der RAPD-Analyse bei Pilzen zu beachten. Diese liegen in der genetischen Variabilität der Pilze begründet. So können z. B. Isolate aus anderen geografischen Regionen ein anderes Bandenmuster als das arttypische aufweisen (HERING et al., 1994).

Aus den getesteten 20 Primern wurden 10 für die Charakterisierung der Isolate von *M. acerina* verwendet. Mit diesen Primern (10 Basen) konnte jedes einzelne Isolat unterschieden wer-

den. Alle Isolate hatten ein individuelles Bandenmuster. Die RAPD-Technik gilt als eine Technik, die, im selben Labor unter gleichen Bedingungen durchgeführt, als reproduzierbar angesehen wird, aber in anderen Laboren kann es unter Umständen zu Unterschieden in den amplifizierten Banden kommen. Um solche Unstimmigkeiten zu vermeiden wurden folgende Vorkehrungen getroffen:

- Ausgewertet wurden nur Banden, die deutlich als solche zu erkennen waren und keinen ausgedehnten DNA-Bereich (Schmier) im Gel zeigten. Häufig entstanden solche nicht klaren Banden im kurzen Fragmentbereich, seltener bei einer Fragmentlänge von über 3000 bp. Aus diesem Grund wurde für jeden Primer ein eigener Auswertebereich festgelegt.
- Fragmente außerhalb dieser Kernzone wurden nicht bewertet.
- Da insgesamt drei Gele für die Auswertung eines Primers herangezogen werden mußten und geringfügige Unterschiede in den einzelnen Gelläufen trotz der Verwendung eines Längenstandards nicht ausgeschlossen werden können, wurden geringe Unterschiede zwischen den Banden nicht bewertet. Als Toleranzwert zwischen gleichen Banden wurde ein Wert von 2 % angenommen.

Die so errechneten Marker können daher als gesicherte Unterschiede angesehen werden. Insgesamt konnten aus den 10 verwendeten Primern, 206 Merkmale für die Erstellung des Dendrogramms verwendet werden.

Das Dendrogramm (Abb. 27) aus den genetischen Merkmalen zeigt eine deutliche Trennung in zwei Gruppen und eine große genetische Distanz für M 340 und dem Kontrollorganismus (*Fusarium*). Die isolierte Stellung von M 340 wurde auf eine verunreinigte Kultur zurückgeführt und zeigt die Empfindlichkeit der Untersuchungsmethode. Zu erwarten war auch die entfernte Position von *Fusarium* im Dendrogramm, da es sich hier um eine andere Pilzgattung handelt.

Die Vermutung liegt nahe, dass Isolate, die aus einer Region gesammelt wurden, sich auch genetisch relativ ähnlich sind. Eine Vermischung des Erbgutes findet hier eher statt, als bei Isolaten, die aus weit entfernten Regionen stammen. Unter Umständen ist auch noch eine genetisch fixierte Anpassung auf regionale Besonderheiten möglich. Ein Vergleich der Genomuntersuchungen mit der geografischen Verteilung der Isolate (s. Kap. 3.1.1.1) zeigt jedoch, dass diese Vermutung, basierend auf den gemachten Untersuchungen, nicht zutrifft. Die größte Ähnlichkeit des Genoms haben die Isolate M 128 und M PUT aus Nordrhein-Westfalen

bzw. Brandenburg. Betrachtet man dagegen die Isolate M 306, M 307 und M 308 (alle aus Wesel), würde die Vermutung nahe liegen, dass diese Isolate auch im Dendrogramm zusammen stehen. Statt dessen ist kein Zusammenhang erkennbar. Ähnliches trifft auch für die anderen untersuchten Isolate zu. Dies führt zu dem Schluß, dass es keinen Zusammenhang zwischen der geografischen Herkunft der Isolate und der Ähnlichkeit des Genoms gibt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Genomuntersuchung mit dem Grad der Virulenz der einzelnen Isolate, kann eine Korrelation festgestellt werden. Im Dendrogramm ist *M. acerina* in zwei Gruppen unterteilt. Vergleicht man den Grad der Virulenz mit dieser Gruppenzugehörigkeit zeigt sich, dass die stark virulenten Isolate in einer Gruppe zusammenstehen (im Dendrogramm rot markiert). Die fünf Isolate mit der größten Virulenz (M 013, M 205, M 017, M 375 und M 310) gehören dieser Gruppe an. Die anderen beiden untersuchten Mitglieder (M 212 und M 116) befinden sich zwar im Mittelfeld des Virulenzvergleiches, rufen aber dennoch Krankheitssymptome hervor, die auf der Boniturnotenskala über drei einzuordnen sind. Alle Isolate die eine Boniturnote unter drei im Test erhielten, befinden sich in der blau markierten Gruppe. Eine Einordnung der Virulenz eines Isolates ist anhand der Genomuntersuchung und des darauf basierenden Dendrogramms möglich. Um diese Aussage zu untermauern wurde ein weiter Virulenztest durchgeführt, bei dem zwei stark und zwei schwach virulente Stämme nach einem Zeitraum von acht Monaten Lagerung untersucht wurden. Neben der Kontrolle der Stabilität der Virulenz wurde auch das bisher nicht auf seine Virulenz überprüfte Isolat M 307 in die Untersuchungen mit einbezogen. M 307 sollte nach der genetischen Untersuchung zu den stark virulenten Stämmen gehören. Aus den Ergebnissen lassen sich drei Schlußfolgerungen ziehen:

- Erstens ist die Rangfolge des Isolates bei dem Virulenztest über einen längeren Zeitraum der Lagerung bei gleicher Behandlung der Isolate stabil. D. h. stark virulente Isolate sind auch nach längerer Lagerung noch virulenter als gleichbehandelte schwach virulente Isolate, obwohl bei beiden der Grad der Virulenz absinkt.
- Zweitens ist klar ersichtlich, dass die Virulenz bei Lagerung abnimmt, was weitreichende Folgen für die Methodik der Virulenzuntersuchungen von pilzlichen Pathogenen hat. Werden pathogene Mikroorganismen über einen längeren Zeitraum gesammelt oder gelagert, müssen vor den Virulenzuntersuchungen Wirtspassagen durchgeführt werden. Erst solche, durch Reisolation gewonnenen Isolate sind untereinander vergleichbar. In wieweit solche Maßnahmen durch spezielle Medien (LECAM et al., 1994) und Lagerungsbedingungen kompensiert werden können, bleibt zu untersuchen.

- Als dritte Schlußfolgerung zeigte es sich, dass mit der RAPD-PCR-Methode eine Aussage über den Grad der Virulenz möglich ist. Auch unbekannte Isolate lassen sich so vor einem Inokulationsversuch bereits einordnen, ohne vorher aufwendige Wirtspassagen durchzuführen.

4.3 Enzymuntersuchungen

Enzyme spielen bei einer großen Anzahl von Pflanzenpathogenen eine bedeutende Rolle im Krankheitsverlauf. Entscheidenden Anteil haben die Pektinasen, da sie nicht nur Zellen mazerisieren, sondern auch durch ihre Tätigkeit das Umfeld für weitere Enzyme vorbereiten (COOPER, 1983 und COLLMER & KEEN, 1986). Aufgrund dieser Tatsache wurden die Untersuchungen in dieser Arbeit auf die pektinabbauenden Enzyme konzentriert.

LE CAM et al. (1993) untersuchten zellwandabbauende Enzyme von *Mycocentrospora* isoliert von der Karotte. Sie verwendeten Medien mit folgenden Kohlenstoffquellen: Polygalakturonsäure, Karottenzellwände, Carboxymethylcellulose, und Glukose. Auf allen Medien mit Ausnahme des glukosehaltigem Mediums, konnten sie die Sekretion folgender Enzyme eruieren: Endoglucanase, Cellobiohydrolase, Pektinlyase, Pektatlyase, PG, PME, Xylanase und Enzymaktivität gegen Arabinogalaktane I. Sie konnten eine Korrelation zwischen zellwandabbauenden Enzymen und Intensität der Krankheit beobachten. Wichtiger Unterschied zwischen hoch virulenten und nur schwach virulenten Isolaten war die Produktion von PME und PG. Die Untersuchung der Hydrolyseprodukte der unterschiedlich virulenten Stämme zeigte, dass die Freisetzungsrates von Oligosacchariden bei den schwach virulenten Isolaten langsamer oder verzögert war.

Die Größe der Nekrosen bei Karotten korrelierte stark (Korrelationskoeffizienten von 0,93 und 0,99) mit der Produktion von PME und PG. Eine Pektinlyaseaktivität konnte nicht festgestellt werden. Bei Wachstum des Pilzes auf Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle konnte keine Aktivität von PG nachgewiesen werden.

Die Fähigkeit der schwach virulenten Stämme Oligosaccharide mit einer Länge zwischen vier bis 12 aus dem Polymer zu hydrolysieren ist gering oder verzögert. Diese Oligosaccharide wirken als Elicitoren bei der Phytoalexinproduktion (z. B. 6-Methoxymellein) der Karotten. Die Charakterisierung der PG der untersuchten Isolate zeigte, dass alle Isolate ein qualitativ ähnliches Isoenzymmuster haben (LE CAM et al., 1994).

Das verwendete Gel-Assay ist eine schnelle Methode, um die Aktivität beider Enzyme (PG und PME) auf einem Gel zu überprüfen. BEN-HOD et al. (1992) benutzten diese Methode in abgewandelter Form, um die Enzyme in Kalli und Keimlingen nachzuweisen. Für ihre Untersuchungen verwendeten sie Agar-Platten. Bei der Verwendung von Agar-Platten besteht aber die Gefahr, dass keine gleichmäßig dicke Schicht des Mediums gegossen werden kann. Da bei den Versuchen in dieser Arbeit die Ergebnisse von mehreren Gelen vergleichbar sein mussten, wurde das Pektinmedium zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Konzentration des Pektins und die Dicke des Geles waren somit an allen Stellen gleich. Dies wurde bereits von MANN (1962) bei der Untersuchung von PG und PME so durchgeführt.

Das Gel-Assay hat den weiteren Vorteil, dass zeitgleich zwei Enzyme auf einem Gel untersucht werden können. Zum einen PME, die nach der Rutheniumrotfärbung an einer intensiven Rotfärbung zu erkennen ist, zum anderen PG, die durch farblose Bereiche zu identifizieren ist. Die Farbreaktion erfolgt dadurch, dass die freie Säuregruppe des Pektinpolymers an das Rutheniumrot bindet und einen roten Farbkomplex bildet, Monomere und Oligomere hingegen binden den Farbstoff nicht. Durch die Aktivität der Pektinmethylesterase erhöht sich die Anzahl der freien Säuregruppen in dem Polymer. Dies fördert eine Bindung des Farbstoffes. Sind keine pektinabbauenden Enzyme vorhanden, färbt sich das Gel einheitlich hellrot. Wird das Polymer dagegen hydrolytisch gespalten, entfärbt sich dieser Bereich im Gel. Diese Transparenz entsteht durch die Spaltung der Pektinketten (Abb. 42) und die damit nicht mehr mögliche Bildung des roten Farbkomplexes. Der umgekehrte Fall tritt bei der Aktivität von PME ein. Es stehen mehr Carboxyl-Gruppen für die Bindung des Farbstoffes zur Verfügung und das Gel färbt sich stärker rot (CRUICKSHANK & WADE, 1980 und HAGERMAN et al., 1985).

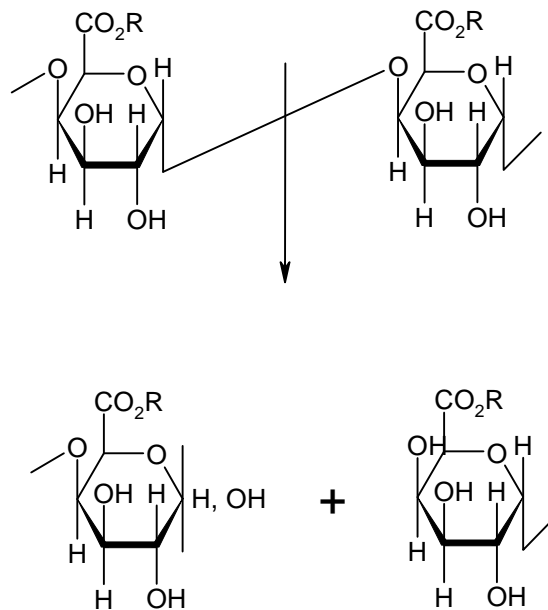


Abb. 42: Hydrolyse der 1,4-D-galakturonosidischen Bindung durch Polygalakturonase (ASPINALL, 1970).

4.3.1 Biotest mit pektinolytischen Enzymen und Proteinextrakt aus infizierter Pflanze

Die Untersuchung der Pektinase (PG) im Biotest zeigte deutlich, dass das Enzym alleine in der Lage war, Schäden an Blättern hervorzurufen (s. Kap. 3.3.1). Diese waren denen, die *M. acerina* verursacht, sehr ähnlich. Allerdings waren die Symptome, die in der Anfangsphase der Krankheit zu beobachten sind (kleine schwarze Flecken mit chlorotischem Hof), nur sehr selten zu beobachten. Grund könnte zum einen die Konzentration des Enzyms oder aber auch die Applikationsfläche sein. Zwischen den untersuchten Konzentrationen, 5 bis 50 µg/ml, konnte kein Unterschied in der Stärke der Schädigung festgestellt werden. Schon bei 5 µg/ml war ein ausgeprägter Schaden festzustellen. Die mit Abstand größten Blattflecken wurden vom Proteinextrakt einer infizierten Pflanze (Abb. 28, E) hervorgerufen. Offensichtlich war hier die Enzymkonzentration wesentlich höher als die der eingesetzten Pektinase (PG) oder die Zusammensetzung des Proteinextraktes und das Zusammenspiel von unterschiedlichen Enzymen waren hierfür ausschlaggebend. Symptome der Anfangsphase der Krankheit konnten beim Proteinextrakt nie beobachtet werden. Für das Ausbleiben dieser Symptome lassen sich mehrere Gründe benennen. Eine natürliche Infektion beginnt immer auf einem sehr be-

grenzten Raum (Fläche unter einer auswachsenden Spore oder Konidie). Bei dem Biotest wurden 10 µl appliziert, die sich als Tropfen auf der Blattoberfläche verteilten. Somit griff das Enzym das Blatt auf einer größeren Fläche an. Weiter ist es denkbar, dass die Konzentration der Enzyme eine entscheidende Rolle spielt. Zu Beginn der Infektion ist die Konzentration an zellwandabbauenden Enzymen gering und steigt erst im Krankheitsverlauf an. Bei der Verwendung eines Proteinextraktes einer stark infizierten Pflanze ist die Konzentration dieser Enzyme vermutlich so hoch, dass im Biotest sofort starke Schäden zu beobachten sind.

4.3.2 Bestimmung der Pektinaseaktivität (PG und PME) aus lyophilisiertem Material

Unterschiedliche Virulenz der Pathogene kann auf unterschiedliche Mengen oder stärkerer bzw. schwächerer Aktivität von produzierten Pektinasen zurückgeführt werden. Untersucht wurden in der vorliegenden Arbeit die Polygalakturonase und die Pektinmethylesterase, weil sie größte Bedeutung am Infektionsverlauf und an der Virulenz haben. LE CAM et al. (1997) untersuchten verschiedene zellwandabbauende Enzyme (PG, PME, PL, PNL und Endoglucanase) bei Möhren, die mit *M. acerina* infiziert waren. Sie stellten fest, dass PL und PNL erst sehr spät in der Infektion von *M. acerina* gebildet werden, was die große Bedeutung von PG und PME herausstellt. Auch bei der Endoglucanase (beteiligt am Abbau der Zellulose) ist die Bildung im Vergleich zu PG und PME verzögert, was darauf hindeutet, dass erst durch den Pektinabbau die anderen Zellwandbestandteile zugänglich sind.

Zur Überprüfung, ob PG und PME bei der Virulenz von *M. acerina* involviert sind, wurde das Gel-Assay mit standardisierten Proben (Gleichbehandlung nach Wirtspassage und Einstellen der gleichen Enzymkonzentration nach Extraktion) durchgeführt. In den Lyophilisaten konnte nur PG-Aktivität und keine PME nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der PG-Aktivitäten zeigten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten (Abb. 31). Beim Vergleich der Aktivität ist festzustellen, dass zwar drei stark virulente Isolate M 375, M 013 und M 118 im vorderen Bereich der Rangfolge sind, sich aber alle anderen fünf stark virulenten Isolate im letzten Drittel befinden. Dies würde zu dem Schluß führen, dass ein stark virulentes Isolat nicht unbedingt auch eine große Aktivität von PG benötigt, um die Pflanze stark zu schädigen. Umgekehrt können auch schwach virulente Isolate, wie z. B. M 327, eine starke Aktivität von PG zeigen. Bei dieser Untersuchung ist zu berücksichtigen, dass die Isolate nach der

Wirtspassage vier Wochen auf PDA bzw. in PDB wuchsen, bevor das Pilzmaterial geerntet wurde. Da in beiden Medien ausreichend Glukose vorhanden war, bestand für den Pilz keine Notwendigkeit pektinolytische Enzyme zu synthetisieren. Trotzdem war noch PG im Pilz vorhanden, was darauf schließen lässt, dass zur Regulation der Proteinbiosynthese von pektinabbauenden Enzymen geringe Mengen von PG oder von den aus der Aktivität resultierenden Pektinfragmenten notwendig ist. Unter Umständen ist vorstellbar, dass über PG die Synthese aller anderen pektinolytischen Enzyme reguliert wird.

4.3.3 Pektinaseaktivität (PG und PME) ausgesuchter Isolate (Pektinmedium)

4.3.3.1 Polygalakturonaseaktivität

Um die Pektinaseaktivität zu fördern, wurden Untersuchungen auf Pektinmedium durchgeführt. Pektin dient als Substrat der Pektinasen. Untersucht wurden PG und PME. Die Zahl der zu untersuchenden Isolate wurde auf fünf beschränkt. Ausgewählt wurden drei stark (M 013, M 375 und M 307) und zwei schwach virulente (M 306 und M 341) Isolate.

Zwischen den Isolaten gab es große Unterschiede in ihren Enzymaktivitäten, und zwar sowohl in der Aktivität, als auch im zeitlichen Auftreten der Enzyme. Alle Isolate zeigten einen Anstieg von PG nach dem Umsetzen von PDA auf Pektinflüssigmedium (PMB). In PDA liegt als Kohlenstoffquelle Glukose vor, im Pektinflüssigmedium dagegen nur Pektin, so dass die Pektinasen zum Abbau des Pektins erst synthetisiert werden müssen. Ein Unterschied der PG-Aktivität bei den stark bzw. schwach virulenten Isolaten ist nicht festzustellen (Abb. 33). Zwar haben alle stark virulenten Isolate eine höhere PG-Aktivität, allerdings ist der Unterschied zwischen M 375 und M 341 nur sehr gering. Interessant bei dieser Untersuchung war der große Unterschied zwischen M 307 und den anderen untersuchten Isolaten. M 307 zeigt eine PG-Aktivität über einen Zeitraum von 25 Tagen (Abb. 33), wohingegen bei den anderen nur über ca. fünf Tage eine Aktivität nachweisbar war. Diese lange Aktivität sinkt stufenweise ab. Dieses schrittweise Absenken der Aktivität könnte durch eine Anpassung der Enzymmenge an ein vermindertes Substratangebot erklärt werden. Durch den sinkenden Pektingehalt

während der Kulturdauer ist es auch nicht mehr erforderlich, große Mengen von Pektinasen zu synthetisieren.

4.3.3.2 Pektinmethylesteraseaktivität (PME)

Eine PME-Aktivität ist bei allen untersuchten Isolaten nachgewiesen worden. Im zeitlichen Verlauf der Kultivierung auf Pektinmedium tritt sie erst nach der PG auf. Die Isolate der Herkünfte M 307 und M 341 zeigen nur eine schwache Aktivität. Der Kurvenverlauf ist bei allen anderen Isolaten ähnlich und charakterisiert durch einen sprunghaften Anstieg mit einem stufenweisen Abfallen der Aktivität über einen Zeitraum von mehr als 10 Tagen. Vergleicht man die Aktivität mit der Virulenz fällt auf, dass die stark virulenten Isolate M 013 und M 375 zwar eine deutliche PME-Aktivität zeigten, aber der höchste Wert bei dem schwach virulenten Isolat M 306 gefunden wurde. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die PME-Aktivität, wenn Pektin als Substrat in ausreichender Menge zur Verfügung steht, keinen Einfluß auf die Virulenz unterschiedlicher *M. acerina*-Isolate hat.

4.3.4 Pektinaseaktivität (PG und PME) ausgesuchter Isolate (PDB)

Die in Kap. 3.3.2.3 gemachten in vitro Versuche zeigen die Pektinaseaktivität unter optimalen Bedingungen für die Enzyme PG und PME. Unter natürlichen Infektionsbedingungen ist dies nicht der Fall, da Pektin weder in dieser Menge, noch in dieser leicht zugänglichen Form vorliegt. Es ist zu erwarten, dass die Synthese erst mit dem Vorhandensein von Substrat beginnt, d. h. wenn er sich im Pflanzengewebe etabliert hat. Um diese Bedingungen in vitro zu simulieren, wurde PDB-Medium verwendet. PDB besitzt als Kohlenstoffquelle Glukose. Der Pilz wird in der ersten Zeit des Kulturverlaufes seinen Energiebedarf vollständig aus der Glukose decken und erst bei Verbrauch dieser Kohlenstoffquelle andere Enzymsysteme zur Verwendung anderer Energiequellen aktivieren.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind eindeutig. Bei keinem Isolat konnte eine PME-Aktivität über den Kulturzeitraum festgestellt werden. Bei der PG lassen sich große Unterschiede zwischen den stark und den schwach virulenten Isolaten feststellen. Eine PG-Aktivität bei den schwach virulenten Isolaten war nicht feststellbar. Dagegen war sie bei den stark viru-

lenten Isolaten (M 013, M 375 und M 307) eindeutig messbar, obwohl die PG-Aktivität deutlich unter dem gemessenen Wert der Kultur auf Pektinmedium lag.

4.3.5 Einfluss der Enzymaktivität auf Pathogenität und Virulenz

Eine Überprüfung, welchen Beitrag die Enzyme in der Pathogenese erbringen, ist aus verschiedenen Gründen kompliziert.

- Pektinabbauende Enzyme werden von einer Reihe von Mikroorganismen produziert, von denen nicht alle pathogen sind.
- Die Produktion kann bei einigen Pathogenen wichtig für ihre saprophytische oder commensalistische Lebensphase sein.
- Sie können Komponente eines Komplexes von Krankheitsfaktoren sein (obgleich sie der dominierende Faktor bei einigen Krankheiten sein können).
- Sie haben multiple Effekte auf das Wirtsgewebe, und nicht alle nützen dem Pathogen (speziell bei biotrophen Pathogenen).

(COLLMER & KEEN, 1986).

Weiter ist das Zusammenspiel und die Regulation der verschiedenen zellwandabbauenden Enzyme, nicht nur der unterschiedlichen Pektinasen, zu beachten. GÜNDEL (1976) geht davon aus, dass bei pflanzenpathogenen Pilzen und Bakterien ein direkter Zusammenhang zwischen ihrer Virulenz und der Fähigkeit, bestimmte zellwandauflösende Enzyme zu bilden, besteht. Nach seinen Untersuchungen an *Mycocentrospora acerina* und *Phoma apiicola* zeigte *Phoma* im Vergleich eine stärkere Virulenz, die er, im Vergleich der beiden Pathogene, auf eine höhere Zellulaseaktivität bei *Phoma* zurückführt. Dies würde bedeuten, dass das Gewebe der Pflanzen von den Pektinasen mazerisiert wird und die Zellulasen für den eigentlichen Grad der Virulenz verantwortlich sind.

Der in dieser Arbeit durchgeführte Biotest mit Polygalakturonase und Enzymextrakt aus einer infizierten Pflanze könnte ebenfalls für diese These sprechen, da unterschiedliche Polygalakturonasekonzentrationen keine unterschiedlich starken Schädigungen am Blatt verursachten. Ein nicht weiter charakterisierter Enzymextrakt aus einer infizierten Pflanze aber wesentlich stärker schädigte.

Trotz dieser Ergebnisse dürfen die Enzyme nicht isoliert betrachtet werden. Für die Infektionsfähigkeit und –kraft eines phytopathogenen Pilzes ist nicht nur das Ausmaß seiner Enzymproduktion, sondern auch die zeitliche Reihenfolge, in welcher verschiedene Enzyme hintereinander gebildet werden können, entscheidend (SPRECHER, E. & URBASCH, I., 1984). Aber nicht nur die Reihenfolge ist von Bedeutung, sondern auch ob überhaupt Enzyme gebildet werden können. Hierbei fällt der Enzymregulation eine entscheidende Rolle zu. So werden pektinabbauende Enzyme inhibiert durch phenolische Komponenten, Indoleessigsäure (IES), Fettsäuren und Endprodukten von der Endopolygalakturonase (BATEMAN & MILLAR, 1966). Aber auch das Vorhandensein von Glukose unterdrückt die Expression der pektinabbauenden Enzyme.

Neben den inhibitorischen Effekten sind aber auch fördernde Faktoren von großer Wichtigkeit. An erster Stelle ist hier sicherlich eine mögliche Säureproduktion der pathogenen Pilze zu erwähnen. Säure hat einen multifaktoriellen Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Sie senkt zum einen den pH-Wert des Mediums ab, was die Aktivität der Hydrolasen fördert. Dies beweisen die durchgeführten pH-Wert Optimierungen für die Polygalakturonaseaktivität (s. Kap. 3.3.2.1). Selbst bei einem pH-Wert von drei liegt die Aktivität nur wenig unter dem ermittelten Maximum. Aber nicht nur die Absenkung des pH-Wertes ist ein wichtiger Faktor, sondern der Einfluß der Säure selbst kann entscheidend sein. So kann das im Protopektin gebundene Kalzium durch Oxalsäure cheliert und damit aus der Zellwand entnommen werden. Manche Pathogene sind in der Lage, Oxalsäure zu produzieren, die Ca^{2+} -Ionen bindet und den pH-Wert absenkt. Dadurch werden die Zellwände destabilisiert und leichter zugänglich für die Polygalakturonase (HOFFMANN, 1994).

GODOY et al. (1990) untersuchten die Rolle der Oxalsäure auf die Pathogenität von *Sclerotinia sclerotiorum* bei *Phaseolus vulgaris* und fanden, dass Mutanten, die nicht in der Lage waren Oxalsäure zu produzieren auch nicht in der Lage waren Symptome auszulösen. Trotzdem produzierten sie degradative Enzyme, wie Pektinasen und Zellulasen in größeren Mengen, als Isolate, die in der Lage waren Symptome auszubilden.

Ca^{2+} -Ionen beeinflussen die Zellwandbildung, indem sie die Zellwandpolysaccharide (z. B. Pektinsäure) miteinander vernetzen. Durch diese Vernetzung werden Zellwand und Mittellamelle miteinander verfestigt. Aus diesem Grund kann ein ausgeprägter Ca^{2+} -Ionenmangel das Wachstum völlig hemmen. Besonders stark ist dieser Effekt in den Meristemen sichtbar, da hier ein besonders hoher Pektinanteil vorhanden ist. Nach Zugabe von Ca^{2+} -Ionen wird das Wachstum wieder fortgesetzt (FELLENBERG, 1978). Die Bindung von Kalziumionen an die

Polygalakturonsäure ist abhängig vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Distanz zwischen den nicht veresterten Galakturonsäureresten. Hohe Kalziumkonzentration und ein hoher Anteil an nicht verestertem Pektin steigert die Bildung von Kalzium-Pektat (nach PAGE & HEITFUSS, 1989).

Durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit und den Untersuchungen von LECAM et al. (1993, 1994 und 1997) an *M. acerina* bei Möhren konnte gezeigt werden, dass die von phytopathogenen Pilzen gebildeten pektinabbauenden Enzyme einen großen Einfluß auf die Symptomausbildung haben. Ob sie allerdings allein für das Krankheitsbild verantwortlich sind, ist sehr fraglich. Reaktionen die ausschließlich von Enzymen abhängig sind, werden nicht von Licht beeinflusst. Bei Durchführung der Inokulationsversuche ohne Licht, bei sonst gleichen Bedingungen, war aber eine deutlich schwächere Symptomausbildung festzustellen. Die ersten Symptome tauchten zwar zeitgleich auf, dann entwickelten sich die Flecken aber nur sehr langsam weiter. Beim Stadium der Chlorosen musste der Versuch abgebrochen werden, da der Lichtmangel zu starke Schädigungen bei den Pflanzen hervorrief. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass noch weitere Stoffe neben den Enzymen an der Ausbildung der Blattflecken beteiligt sind. Entweder die Biosynthese oder die Aktivität dieses Stoffes muß lichtabhängig sein. Ohne Licht wird er entweder nicht gebildet oder er kann seine phytotoxische Aktivität nicht ausführen.

4.4 Toxinuntersuchungen

Das Pflanzenpathogene Substanzen produzieren können, die toxisch für ihre Wirtspflanzen sind, ist seit dem späten 19ten Jahrhundert bekannt. Seit dieser Zeit wurden zahlreiche Komponenten isoliert und ihre Phytotoxizität nachgewiesen (STROBEL, 1976).

4.4.1 Cercosporin

Aufgrund der gemachten Beobachtungen lag es nahe, dass *M. acerina* in der Lage ist, ein oder mehrere Toxine und im speziellen Falle Cercosporin zu bilden.

Gründe für die Annahme sind:

- *M. acerina* bildet einen roten Farbstoff.
- Wie bei *Cercospora* zeigt auch bei *M. acerina* nicht jedes Isolat eine Rotfärbung.
- Die nahe Verwandtschaft zu *Cercospora* (früher selbst in diese Gattung eingeordnet) könnte auch ähnliche Metabolite in *Mycocentrospora* hervorbringen.
- Die Symptome (Chlorosen) sprechen für das Vorhandensein eines Toxins.
- Der Biotest mit Cercosporin schädigt *Viola*-Blätter wie der Erreger selbst (Abb. 37).
- Die Beobachtung, dass für ausgeprägte Symptomausbildung Licht unabdingbar ist, lässt auf einen photoaktiven Mechanismus, der auch bei Cercosporin vorhanden ist, schließen.
- Die Lösungseigenschaften des roten Farbstoffes sind ähnlich denen des Cercosporins (gut löslich in Chloroform, Acetonitril, Aceton).

Cercosporin ließ sich jedoch weder in den untersuchten Pilzen, noch in stark infizierten Pflanzen mit Hilfe des GC-MS nachweisen. Als Referenz diente Cercosporin aus *Cercospora hayii* (Sigma C-6696, CAS: 35082-49-6). Das aufgenommene Spektrum (Abb. 41) deckt sich mit den Literaturwerten. Der Molekülpeak von Cercosporin liegt bei m/z 534. Alle Hauptionen entstehen durch Abspaltung von Alkyl- ($-C_2H_4O$ oder $-C_3H_7O$), Methoxygruppen ($-OMe$) oder Dehydratation ($-H_2O$). m/z 516 = P- H_2O , 503 = P- OMe , 490 = P- C_2H_4O , 475 = P- C_3H_7O , 459 = P- $OMe-C_2H_4O$, 445 = P- $C_2H_4O-C_2H_5O$ und 431 (Basispeak) = P- $C_2H_4O-C_3H_7O$ (MUMMA et al., 1973).

Trotzdem wäre es denkbar, dass dieses Toxin im Laufe der Infektion vom Pilz synthetisiert wird, da das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung auf Pflanzen mit stark ausgeprägten Krankheitssymptomen lag. Möglich wäre eine Kombination in der Funktion von Toxin und zellwandabbauenden Enzymen während des Infektionsprozesses, wenn das Toxin seine Hauptaufgabe zu Beginn der Infektion wahrnimmt und den Zugang des Pathogens in die Pflanze ermöglicht. Ein Nachweis zu einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium wäre dann unter Umständen nicht möglich, da die Konzentration entweder zu gering ist oder das Toxin vom Pilz nicht mehr synthetisiert wird.

Gegen diese Theorie sprechen allerdings die Ergebnisse der Inokulationen mit und ohne Licht (s. Kap. 3.1.1.4.3). Ohne Licht fand die Infektion zwar statt, stoppte dann aber nach wenigen Tagen. Während die Inokulation unter dem Einfluss von Licht die normale Stärke erreichte. Unter der Annahme, dass ein photoaktives Toxin vorkommt und dies seine Aktivität in der ersten Phase der Infektion entfaltet, dürfte es im Dunkeln nicht zur Ausbildung von Symptomen kommen. Die gemachten Beobachtungen sprechen eher für den umgekehrten Fall, dass

der Befall zunächst durch den Einsatz von lichtunabhängigen Proteinen ermöglicht wird und erst im Verlauf der Krankheit vom pathogenen Pilz Toxine gebildet werden. Unter diesen Umständen wären die Proteine als Pathogenitätsfaktoren und die eventuell vorhandenen Toxine als Virulenzfaktoren anzusehen.

4.4.2 Identifikation des roten Farbstoffes

Mit Hilfe des Gaschromatografen konnten aus den Extrakten der untersuchten, stark virulenten Isolate der Herkünfte M 013 Myzel, M 375 Myzel, M 307 Myzel und M 307 Kulturfiltrat, mehrere Stoffe getrennt werden. Bei der Myzelfraktion von M 307 sind dagegen nur zwei Peaks (Retentionszeiten: 28,15 min und 30,48 min) vorhanden. Dies zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie. Auch hier wurden im Extrakt von Isolat M 307 weniger Substanzen gefunden als in den beiden anderen Extrakten von M 013 und M 375. Da die analysierte Lösung rot war, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei einem oder bei beiden Stoffen um den roten Farbstoff handelt. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass alle anderen untersuchten Proben ebenfalls zu diesen Retentionszeiten entsprechende Peaks aufweisen. Ausnahme ist hierbei M 013, wo kein Peak bei 28,15 min detektiert werden konnte. Da aber auch hier ein roter Farbstoff extrahiert wurde, ist davon auszugehen, dass die rote Substanz, unter den gewählten Bedingungen, eine Retentionszeit von 30,48 min hat.

Zur weiteren Identifikation wurde von der Probe M 307 (Myzel) ein H-NMR Spektrum aufgenommen. Eine weitere Trennung der beiden Substanzen wurde nicht vorgenommen. Das H-NMR Spektrum (Messung durchgeführt von K. Steingröver, Fachbereich Chemie und Chemietechnik, Universität Paderborn) lieferte keine eindeutigen Ergebnisse, deutete aber auf Antrachinone hin. Da ASSANTE et al. (1977) aus *M. acerina* den roten Farbstoff Cynodontin (1,4,5,8-Tetrahydroxy-2-methylantrachinon) isolieren konnten, lag die Vermutung nahe, dass die Substanz mit der Retentionszeit 30,48 min (Masse 286) Cynodontin ist (Abb. 43). Neben dem Cynodontin wird in der Literatur noch ein anderes Anthrachinon mit der Masse 286 beschrieben, welches aus Pilzen der Gattung *Drechslera* (*D. teres*, *D. graminea*, *D. tritici-repentis*, *D. phlei*, und *D. dictyoides*) isoliert werden konnte (ENGSTRÖM et al. 1993). Bei diesem Anthrachinon handelt es sich um das Catenarin (1,4,6,8-Tetrahydroxy-3-methylantrachinon, Abb. 44). Der Unterschied der beiden Stoffe ist die unterschiedliche Po-

sition einer OH-Gruppe. Da keine Massenspektren der Stoffe vorlagen und auch zu vermuten ist, dass sich diese kaum unterscheiden, konnte anhand der Massenspektren keine Unterscheidung getroffen werden. ENGSTRÖM et al. (1993) gaben aber in ihrer Arbeit UV-Spektren an, die sich deutlich unterschieden.

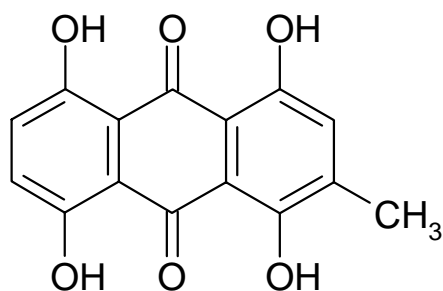


Abb. 43: Strukturformel von Cynodontin. Masse 286.

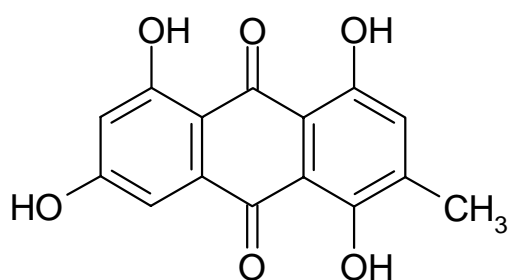


Abb. 44: Strukturformel von Catenarin. Masse 286.

- Catenarin: UV λ max, EtOH, nm: 223, 256, 298, 316, 490, 510, 524.
- Cynodontin: UV λ max, CHCl₃, nm: 245, 296, 490, 512, 522, 548, 561.

Die Maxima des Gemisches aus den beiden unbekannten Stoffen waren: UV λ max, CHCl₃, nm: ca. 270, 490, 521, 547, 560 (Messung durchgeführt von K. Steingröver, Fachbereich Chemie und Chemietechnik, Universität Paderborn). Im langwelligen Bereich über 490 nm sind die Absorptionsmaxima identisch zu den Literaturwerten von Cynodontin, nicht aber zu Catenarin, so dass Catenarin ausgeschlossen werden kann. Dass die Werte im unteren Bereich nicht identisch sind, ist vermutlich auf die Anwesenheit des zweiten Stoffes zurückzuführen. Somit konnten die Ergebnisse von ASSANTE et al. (1977), dass *M. acerina* Cynodontin produziert, bestätigt werden. Der Farbstoff Cynodontin ist weit verbreitet und konnte bereits in *Curvularia geniculata* (CBS 220.52), *C. ramosa* (CBS 179.36), *C. trifolii* (CBS 187.49), *C. lunata* (CBS 294.61), *Drechslera specifera* (CBS 274.52), *D. sorokiniana* (CBS 139.29 und CBS 140.31), *D. dematioidea* (CBS 303.50) und *D. setariae* (CBS 143.29) nachgewiesen werden (EIJK & ROEMANS, 1977).

Cercosporin konnte in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden, was ebenfalls mit den Untersuchungen von ASSANTE et al. (1977) übereinstimmt. Dasselbe trifft für die Beticoline zu. Weder in den Dünnschichtchromatogrammen (Identifikation anhand ihrer gelben

Farbe möglich), noch in den GC-MS Untersuchungen (Identifikation anhand ihrer Molekülmasse) konnten sie nachgewiesen werden.

Nachdem der rote Farbstoff bei *M. acerina* identifiziert war, stellte sich die Frage, welche Substanz, die bei M 013 nicht im Chromatogramm zu sehen ist, noch extrahiert wurde. Sie musste ähnliche Eigenschaften wie Cynodontin haben und nach den H-NMR Untersuchungen auch ein Anthrachinon sein. Das Massenspektrum gibt eine Molekülmasse von 270 an. Mit dieser Masse kommen mehrere Anthrachinone in Frage, unter anderem Helminthosporin, Islandicin und Emodin (Abbildungen 45, 46 und 47).

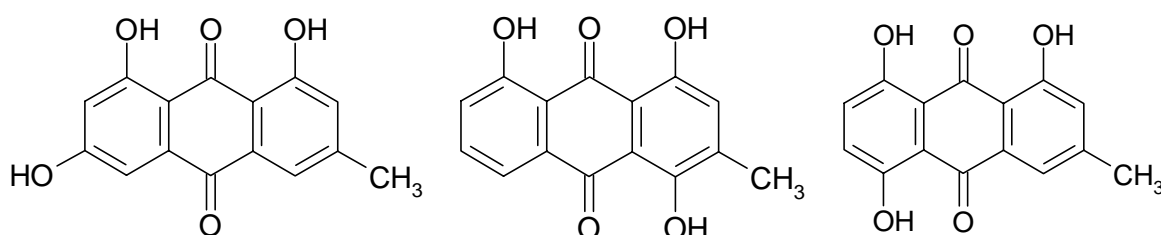


Abb. 45: Strukturformel von Emodin. **Abb. 46:** Strukturformel von Islandicin. **Abb. 47:** Strukturformel von Helminthosporin.

KRIVOSHCHEKOVA et al. (1983) geben für das orange-rote Anthrachinon-Pigment Islandicin aus *Parmelia birulae* ELENK., nach massenspektrometrischer Untersuchung, die Massen der fünf größten Fragmente mit 270, 253, 242, 224 und 213 an, was identisch mit den eigenen Untersuchungen für die unbekannte Substanz ist. Abb. 48 zeigt das Massenspektrum von Emodin aus der SDBS-Datenbank. Auch hier sind die Massen der größten fünf Fragmente identisch mit den Literaturwerten für Islandicin. Alle angegebenen Fragmente von Emodin sind im Massenspektrum der unbekannten Substanz wiederzufinden. Nur bei der Masse 69 gibt es eine leichte Abweichung. Hier wurde lediglich eine Masse von 63 gemessen. Um eine bessere Aussage zu bekommen, wurde das Spektrum von Emodin in die eigene Datenbank übernommen und mit der unbekannten Substanz verglichen. Bei dem Vergleich der beiden Spektren wurde ein Purity-Wert von 743 angegeben. Ein Wert von 700 oder größer ist akzeptabel für identische Substanzen, obwohl man einen Wert von über 800 erwarten würde. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Spektren auf unterschiedlichen Geräten gemessen wurden und für die manuelle Eingabe der Werte in die Datenbank nur die Prozentwerte der relativen Intensitäten zur Verfügung standen. Die so entstandenen Fehler durch Rundungen wirken sich auf den Purity-Wert aus.

Dünnschichtchromatografische Untersuchungen, mit Emodin als Referenzsubstanz, in unterschiedlichen Laufmitteln bei mehrfacher Entwicklung zeigten, dass Emodin im Extrakt vorhanden ist. Das Vorkommen von Islandicin konnte nicht nachgewiesen werden.

Für Helminthosporin liegt kein Massenspektrum in der Literatur vor, es ist aber davon auszugehen, dass diese sich bei den drei genannten Anthrachinonen nicht soweit unterscheiden, dass eine Zuordnung getroffen werden kann.

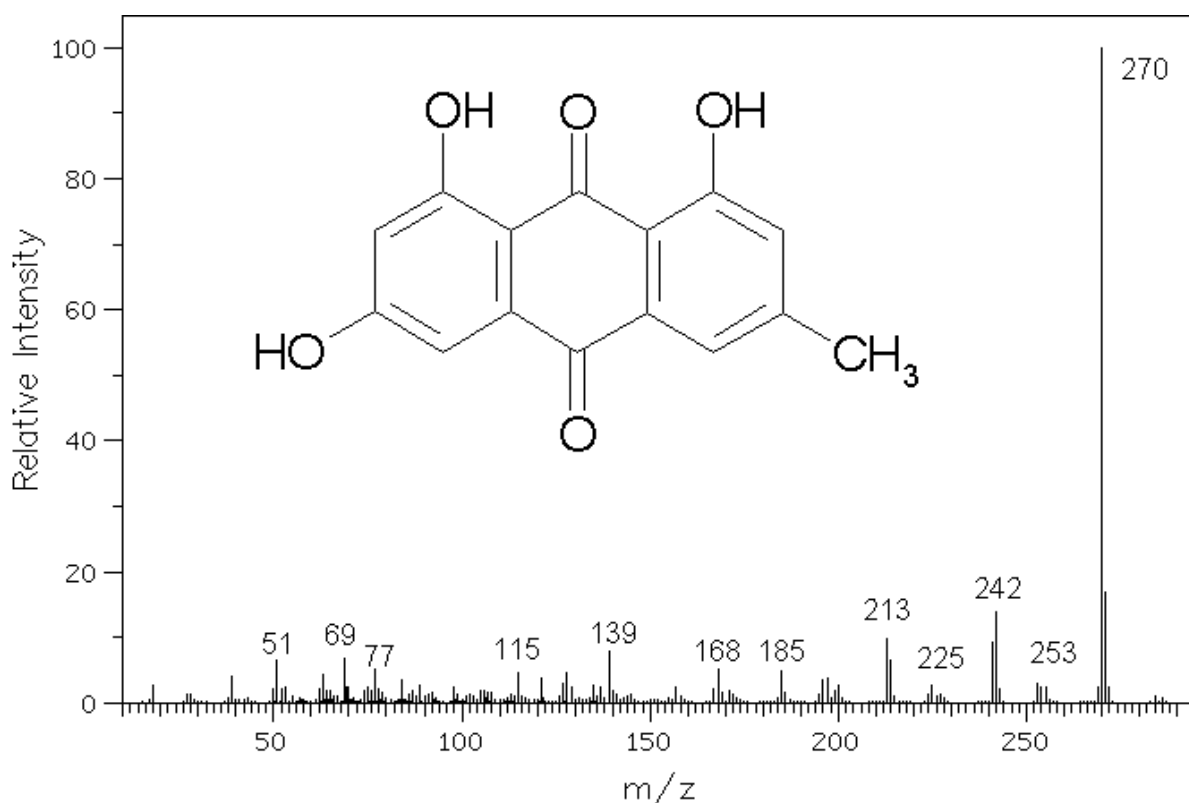


Abb. 48: Massenspektrum und Strukturformel von Emodin (bearbeitet nach: SDBS-Datenbank, <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/> (17.08.01)).

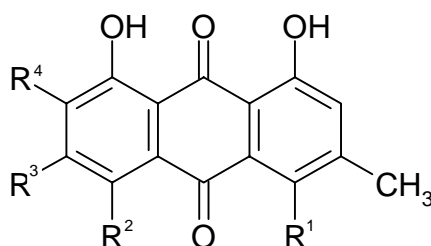
Weiter hilft hier das aufgenommene UV-Spektrum. Für Helminthosporin werden in der Literatur folgende Werte angegeben: UV λ max, CHCl_3 , nm: 252, 256, 287, 475, 490, 512, 526 (ENGSTRÖM et al., 1993). Die Lösung aus dem Gemisch von Cynodontin und der unbekannten Substanz stimmte nur bei 490 nm überein. Bei allen anderen Peaks sind größere Abweichungen vorhanden. Die Möglichkeit, dass *M. acerina* Helminthosporin produziert, wurde somit verworfen.

Fest steht jedoch, dass *M. acerina* neben Cynodontin noch einen weiteren Farbstoff bildet, bei dem es sich vermutlich um Emodin handelt.

Diese Anthrachinone sind keine Naturstoffe, die nur im Reich der Pilze zu finden sind. Auch Pflanzen bilden diese Stoffwechselprodukte (CUMMING & THOMSON, 1970). Aber auch bei Flechten sind Cynodontin, Emodin und Islandicin nachgewiesen worden (KRIVOSHCHKOVA et al., 1983, Tab. 17).

Tab. 17: Strukturen von Pigmenten aus der Flechtenfamilie Parmeliaceae. Aus: KRIVOSHCHKOVA et al. 1983.

Name	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Farbe der Pigmentlösung
Chrysophanol	H	H	H	H	Gelb
Islandicin	OH	H	H	H	Orange
Cynodontin	OH	OH	H	H	Purpur
Emodin	H	H	OH	H	Gelb
5-Hydroxy-emodin	H	OH	OH	H	Orange



4.4.3 Biowirksamkeit der Farbstoffe

Eine Lösung aus den beiden Farbstoffen Cynodontin und Emodin, die aus den Erregern isoliert wurden, wurde im Biotest auf ihre pflanzenschädigenden Eigenschaften hin überprüft. Unter allen getesteten Bedingungen konnten keine Blattsymptome an *Viola* beobachtet werden. Aber nicht nur bei Pflanzen ist keine Wirkung festzustellen, sondern auch den Pilzen scheinen diese Anthrachinone nicht zu schaden. Die aus *Cercospora* extrahierten roten und gelben Pigmente wurden gegen *Cercospora* und andere Pilzarten getestet (FRANDSEN, 1955). Die Kulturen wuchsen ungestört über die Pigmente hinweg. Eine fungizide oder fungistatische Wirkung ist demnach nicht erkennbar. Über die Bedeutung der Farbstoffe liegen noch keine gesicherten Erkenntnisse vor. Es ist aber unwahrscheinlich, dass sie nur physiologisch unbedeutende Endprodukte des pilzlichen Stoffwechsels darstellen (FRANDSEN, 1955). So weisen sie z. B. Auswirkungen auf den menschlichen Organismus auf. Emodin zeigt, neben

seiner Wirkung als Laxans (ROTH et al., 1990), im in vitro Test signifikante Zytotoxizität gegen fünf Tumorzelllinien (Calu-1, HeLa, Raji, Vero und Wish). Bei einer Konzentration von über 100 μM hat auch Islandicin eine 50 %ige Antitumorwirkung (IC_{50} : Konzentration die benötigt wird, um eine Inhibierung des Tumors von 50 % zu erreichen) gegen die untersuchten Zelllinien. Bei diesen hohen Konzentrationen haben beide Stoffe auch eine Wirkung gegen die sechste Zelllinie (K562, $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Generell spielt der 1,3,8-Trihydroxy-Anthrachinon Grundkörper die entscheidende Rolle bei der Antitumorwirkung (LIN et al., 2001).

Pilzliche Anthrachinone, die mit dem Emodin verwandt sind (z. B. Catenarin, Purpurin), haben eine inhibitorische Wirkung gegen verschiedene Enzyme. Nachgewiesen wurde eine Wirkung gegen Proteinkinase C (PKC) und Protein-Tyrosin-Kinase (PTK). Die IC_{50} -Werte lagen in einem Bereich von 1,6 μM (Emodin und PTK) bis über 100 μM (Catenarin, Emodin und PKC) in den durchgeführten Enzym Assays (FRENDENHAGEN et al., 1995).

Geht man davon aus, dass die Anthrachinone keine Endprodukte des Stoffwechsels sind, ist es denkbar, dass neben diesen direkten Wirkungen, sie als Edukte für weitere Synthesen dienen könnten. Auffällig ist hierbei die strukturelle Ähnlichkeit von Emodinanthrolen mit dem Toxin Hypericin.

Die Biosynthese des Hypericins in der Pflanze geht nach BROCKMANN & SANNE (1953) vom Emodinanthrol (2) aus (Abb. 49). Dies ließ sich in Emodin (1) umwandeln. Das Dianthrondderivat (3) ist hypothetisch, weil es bisher nicht isoliert werden konnte. Aus ihm entsteht das Dehydro-dianthrondderivat (4). Dieses kann durch Belichten über Protohypericin (5) in Hypericin (6) übergehen. Nach BANKS et al. (1976) dauert dieser Schritt ohne die Anwesenheit von Enzymen nur 120 s (95 % Umwandlung bei einer $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ Lösung) im hellen Sonnenlicht GRUSZECKA-KOWALIK & ZALKOW (2000) zeigten (Abb. 50), dass eine Synthese von Hypericin, ausgehend von Emodin ebenfalls möglich ist. Für die Untersuchungen an *M. acerina* bedeutet dies, dass sie durchaus das Potential haben könnten, Toxine mit einem Perylenchinon-Grundgerüst zu synthetisieren. Da aber kein Cercosporin oder ein Molekül mit ähnlicher Masse nachgewiesen werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass dieses Toxin in der Anfangsphase der Infektion gebildet wird und bei fortschreitender Krankheit die Enzyme den Verlauf bestimmen.

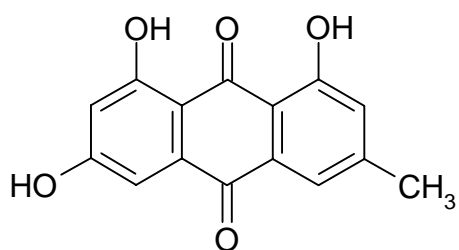
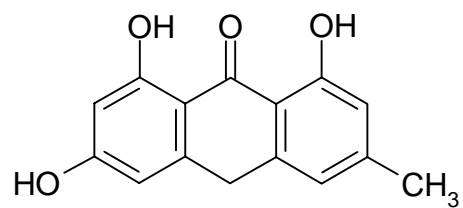
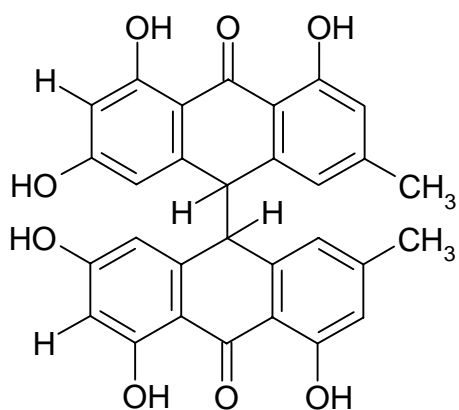
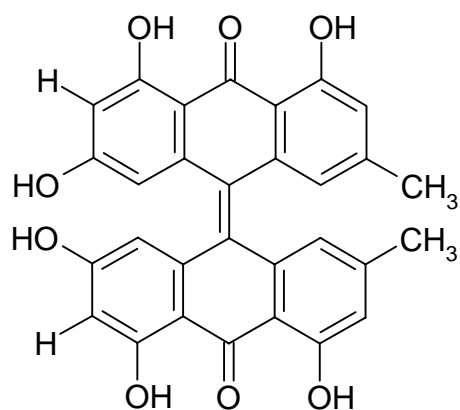
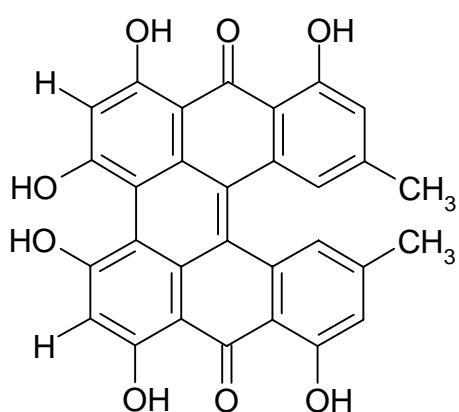
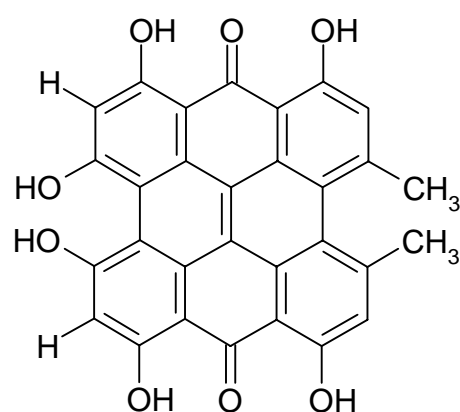
**1****2****3****4****5****6**

Abb. 49: Vorgeschlagene Biosynthese des Hypericins nach BROCKMANN & SANNE (1953) bei *Hypericum perforatum*.

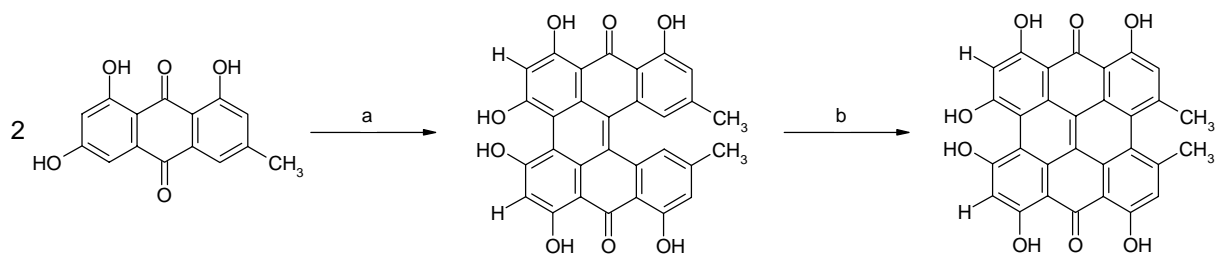


Abb. 50: Synthese von Hypericin ausgehend vom Emodin über Protohypericin. Bedingungen:

a) 1. KOH/H₂O, N₂, Hydrochinon, 155 °C, sechs Tage, 2. aq. HCl; b) Sonnenlicht, Aceton, 20 min (GRUSZECKA-KOWALIK & ZALKOW, 2000).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit über den Blattfleckenerregerkomplex bei Viola-Wittrockiana-Hybriden und die Virulenz von *Mycocentrospora acerina* unterteilt sich in vier Teile. Einem phytopathologischen -, zwei biochemische Teile und einem chemisch-analytischen Teil.

Im phytopathologischen Teil wurden Blattflecken an Viola-Wittrockiana-Hybriden untersucht. Die Blattfleckenkrankheiten bei Stiefmütterchen werden durch mehrere Pflanzenpathogenen verursacht, die große ökonomische Einbußen verursachen und nur schwer bekämpfbar sind. In dieser Arbeit wurden die wichtigsten pilzlichen Pathogene *Mycocentrospora acerina* und *Ramularia* sp. auf ihre Symptomausbildung näher untersucht. Für *M. acerina* wurde nach einer Erklärung der Virulenz gesucht.

Über einen Zeitraum von drei Jahren wurden an Blattflecken erkrankte Stiefmütterchenpflanzen aus dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland gesammelt und die pilzlichen Erreger isoliert. In Kultur konnten 35 Isolate von *Mycocentrospora acerina* sowie 28 Isolate von *Ramularia* sp. genommen werden. 27 Isolate wurden als *R. agrestis* und ein Isolat als *R. lactea* identifiziert.

Die Untersuchungen des Symptomverlaufes zeigten sehr große Ähnlichkeiten in der Symptomausprägung. Eine Differenzierung anhand der makroskopischen Symptome zwischen den beiden Gattungen ist im Anfangsstadium nicht möglich. Erst bei Auftreten der Nekrosen ist *M. acerina* durch konzentrische Nekrosen von *Ramularia* zu unterscheiden.

Bei dem Vergleich der Virulenz der *M. acerina*-Isolate konnten große Unterschiede festgestellt werden. Da es noch keine Methode gibt die Virulenz zu quantifizieren, wurde der Grad der Virulenz anhand der Boniturnote ermittelt. Der Bereich erstreckte sich von 1,2 bis 5,4. Um Ungenauigkeiten durch Kulturparameter zu vermeiden, wurden die Virulenzuntersuchungen, die Genomuntersuchungen und Teile der Enzymuntersuchungen mit dem gleichen frischen bzw. lyophilisiertem Material durchgeführt. Wie entscheidend diese Maßnahme war, zeigten die Inokulationsversuche nach einer Lagerungsdauer der Erreger-Isolate von acht Monaten bei einer Temperatur von 4 °C. Hier war ein Verlust der Virulenz von bis zu 32 % feststellbar. Es zeigte sich aber auch, dass die stark virulenten Isolate gegenüber den schwach

virulenten immer noch stärkere Symptome hervorbrachten, sie also in ihrer Einstufung stabil waren.

Im ersten biochemischen Teil wurden Genomuntersuchungen an *M. acerina*-Isolaten mit Hilfe der RAPD-PCR Technik durchgeführt. Mit dem Bandenmuster der zehn verwendeten Primer konnten alle Isolate unterschieden werden. Aus den gewonnenen 206 Merkmalen wurde ein Dendrogramm errechnet. In diesem ist eine Teilung der *M. acerina* Isolate in zwei Gruppen zu erkennen. Die Zugehörigkeit zu einer Gruppen korrespondiert nicht mit der regionalen Herkunft der Isolate, sondern mit ihrer Virulenz. Dies ließ sich mit einem Isolat bestätigen, dass nach den DNA-Fingerprints als stark virulent eingestuft wurde, vorher aber noch nicht auf seine Virulenz überprüft wurde. In einem vergleichenden Inokulationsversuch mit zwei stark und zwei schwach virulenten Isolaten erwies es sich als stark virulent.

Da die Grundlagen der Virulenz sehr komplex sind, wurden zu ihrer Aufklärung unterschiedliche Ansätze verfolgt. Im zweiten biochemischen Teil der Arbeit wurden zwei pektinabbauende Enzyme (PG und PME aus stark und schwach virulenten Isolaten) untersucht.

Bei den Enzymen wurde sich auf die pektinabbauenden Enzyme konzentriert, weil ihnen eine zentrale Rolle in der Gewebedesintegration zufällt. Der Biotest mit PG zeigte, dass die entsprechenden Blattsymptome allein durch das Enzym hervorgerufen werden konnten. Der Effekt erhöhte sich, wenn extrahierte Enzyme einer stark erkrankten Pflanze verwendet wurden. Nachgewiesen werden konnte die Aktivität von PG und PME bei stark, als auch bei schwach virulenten Isolaten.

Bei dem Proteinextrakt aus lyophilisiertem Pilzmaterial von *M. acerina* konnte nur PG-Aktivität gefunden werden. Dabei korrelierte der Grad der Aktivität nicht mit dem Grad der Virulenz. Ebenso konnten keine Unterschiede, in der PG- und PME-Aktivität der stark und schwach virulenten Isolate, im Kulturverlauf auf Pektinmedium, festgestellt werden. Unterschiede zeigten sich erst im Kulturverlauf auf PDB-Medium. Hier zeigte sich eine deutliche PG-Aktivität nach einer Kulturzeit von fünf bis 18 Tagen. Diese Aktivität hatten nur die stark virulenten Isolate. Die schwach virulenten waren nicht in der Lage ihre Enzymsynthese nach dem Verbrauch der Glukose im Medium umzustellen.

Taxonomisch wurde *M. acerina* bis 1942 der nah verwandten Gattung *Cercospora* zugeordnet. Diese Gattung produziert die Toxine Cercosporin und Beticoline. Beide Toxine sind Farbstoffe. Cercosporin besitzt eine rote Farbe, die Beticoline sind gelb. Da auch einige Isola-

te von *M. acerina* rot gefärbt sind, liegt die Vermutung nahe, dass diese Toxine an der Virulenz beteiligt sind. Cercosporin löst erst durch Lichtinduktion eine toxische Reaktion aus. Durch Inokulationsversuche mit und ohne Licht konnte gezeigt werden, dass auch bei *M. acerina* die Symptombildung durch Licht gefördert wurde. Im Biotest vermochte Cercosporin entsprechende Symptome an den Blättern von Stiefmütterchen hervorzurufen. Im chemisch-analytischen Teil der Arbeit konnten mit dem GC-MS allerdings weder Cercosporin noch Beticoline nachgewiesen werden. Als Farbstoffe, die die Rotfärbung hervorrufen, wurden zwei Stoffe identifiziert. Bei einem Stoff handelt es sich um Cynodontin. Der zweite konnte durch Dünnschichtchromatographie als Emodin identifiziert werden. Alle Farbstoffe gehören in die Gruppe der Anthrachinone.

Ob nun *M. acerina* in der Lage ist das Toxin Cercosporin zu synthetisieren konnte nicht abschließend geklärt werden. Es ist aber davon auszugehen, dass eine Biosynthese ausgehend vom Emodin möglich ist. Um Klarheit zu erlangen, müssen Untersuchungen auf das Vorhandensein von Cercosporin während des Krankheitsverlaufs durchgeführt werden.

6 Ausblick

Die Grundlagen der Virulenz bei phytopathogenen Pilzen sind sehr komplex und hängen von vielen Faktoren ab. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass bereits die Lagerung des gesammelten Pilzmaterials einen starken Einfluss auf die Virulenz hat. Untersucht wurden die beiden pektinabbauenden Enzyme PG und PME. Um genauere Aussagen über den Einfluss der beiden Enzyme machen zu können, müssen Untersuchungen an PG- und PME- Mutanten durchgeführt werden. Eine absolute Aussage über die Auswirkung der Enzyme während der Infektion ist dennoch schwer zu treffen. Dies zeigt die Untersuchung an *Verticillium dahliae* von HOWELL (1976). Er konnte zeigen, dass Mutanten ohne die Fähigkeit endo-PME, PG, PMTE und PGTE bilden zu können, trotzdem in der Lage waren normale Welke-Symptome zu bilden. Zu einem ähnlichen Schluss kommt auch McDONNELL (1958), der *Fusarium oxysporum* Mutanten, die keine pektolytischen Enzyme bilden, auf ihre Pathogenität untersuchte. Auch er kam zu dem Schluss, dass die Etablierung des Pilzes und die Ausbildung der Symptome auch ohne diese Enzyme in moderat erkrankten Pflanzen möglich ist.

Da PG und PME nur ein Teil der pektinabbauenden Enzyme sind, müssen weiterführende Untersuchungen auch PMTE und PGTE sowie alle anderen Enzymsysteme, die für die Mazeration von pflanzlichem Gewebe verantwortlich sind, ausgeweitet werden. Wie die Arbeit gezeigt hat ist hierbei auch eine zeitliche Entwicklung und Abfolge der einzelnen Enzyme von großer Wichtigkeit.

Bei *Mycocentrospora acerina* konnten die Toxine Cercosporin und Beticolin nicht nachgewiesen werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass in einem nicht untersuchten Krankheitsstadium ein Toxin vom Pilz gebildet wird. Um eine gesicherte Aussage machen zu können sind hier weitere Untersuchungen zu allen Stadien der Krankheit nötig.

Welche Rolle die nicht-wirtsspezifischen Toxine im Krankheitsverlauf spielen ist nicht immer eindeutig. So ist z. B. die Korrelation von Toxinproduktion und Virulenz fraglich. Zwar konnte Alternariasäure (Toxin von *Alternaria solani*) in beschädigten Kartoffelblättern nachgewiesen werden, aber Stämme von *A. solani*, die in vitro große Mengen des Toxins produzieren sind nicht notwendigerweise auch hochvirulent (DICKINSON & LUCAS, 1982). D. h., dass eine Untersuchung der Toxine nicht isoliert durchgeführt werden darf, wenn Aussagen über die Virulenz getroffen werden sollen. Wie bei den Enzymen gilt es auch hier unterschiedliche Parameter (Entwicklungsstadium, Umweltparameter usw.) mit zu beachten.

Weitere wichtige Ursachen, die in dieser Arbeit nur diskutiert und nicht bearbeitet wurden sind zu untersuchen. So ist z. B. die Produktion von Oxalsäure ein entscheidender Parameter in der Virulenz, der bei *M. acerina* bisher nicht überprüft wurde.

Viele Pathogene verfügen über Virulenzfaktoren, die die Virulenz und das Überleben im Wirt steigern. Diese Faktoren werden auch von Umwelteinflüssen gesteuert. Viele dieser Faktoren bleiben unentdeckt, weil bei den in vitro Untersuchungen nicht alle Umweltparameter bedacht und bei den Versuchen umgesetzt werden (KUEHN, 2000) oder auch nicht umgesetzt werden können. Folglich muss man sich zur Klärung der Virulenzfaktoren vollständig von in vitro Versuchen lösen. Das auftretende Problem ist dann die Kontrollierbarkeit und Reproduzierbarkeit von Versuchen in Lebenden Systemen.

7 Literatur

- Agrios, G. N. (1978): Plant Pathology. 2nd Ed. Academic Press; New York, San Francisco, London.
- Alphey, L. (1997): DNA Sequencing. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- ALSCHER, G. (1995): *Viola* - Entwicklungen und Trends. *Gemüse* **5**: 324-326.
- ANDRIVON, D. (1993): Nomenclature for Pathogenicity and Virulence: The Need for Precision. *Phytopathology* **83**: 889-890.
- ANDRIVON, D. (1995): Nomenclature for Pathogenicity and Virulence: Precision vs. Tradition. *Phytopathology* **85**: 518-519.
- ANONYMUS (2000): Geschäftsbericht 1999. NBV + UGA Handels-GmbH.
- APPEL, O. (1932): Handbuch der Pflanzenkrankheiten. III. Bd. Die pflanzlichen Parasiten. Parey, Berlin.
- ARNONE, A., MERLINI, L., MONDELLI, R., NASINI, G., RAGG, E. & SCAGLIONI, L. (1993): Structure, conformational analysis and absolute configuration of the Perylenequinone Pigments Elsinochromes B1, B2, C1 and C2. *Gazetta Chimica Italiana* **123** (3): 131-136.
- ASPINALL, G. O. (1970): Pectins, Plant Gums, and other Plant Polysaccharides. In: PIGMAN, W., HORTON, D. & HERP, A.: The Carbohydrates. Chemistry and Biochemistry. Acad. Press; New York, London.
- ASSANTE, G., LOCCI, R., CAMARDA, L., MERLINI, L. & NASINI, G. (1977): Screening of the Genus *Cercospora* for Secondary Metabolites. *Phytochemistry* **16**: 243-247.

- AUST, H.-J., BUCHOW, H., BUCHENAUER, H., KLINGAUF, F., NIEMANN, P., PETZOLD, R., PÖHLING, H. M., SCHEINPFLUG, H. & SCHÖNBECK, F. (1993): Glossar Phytomedizinischer Begriffe. 2. ergänzte Aufl. Ulmer, Stuttgart.
- BAHNMÜLLER, H. (1995): Markt und Wirtschaftlichkeit von Stiefmütterchen in *Viola - Wittrockiana* – Hybriden. In: JENNERICH, L. & SAUER, H.: *Viola-Wittrockiana-Hybriden*. Thalacker Verlag, Braunschweig.
- BANKS, H. J., CAMERON, D. W. & RAVERTY, W. D. (1976): Chemistry of the Coccoidea. II Condensed Polycyclic Pigments from two Australian Pseudococcids (Hemiptera). *Aust. J. Chem.* **29**: 1509-1521.
- BATEMAN, D. F. (1976): Plant Cell Wall Hydrolysis by Pathogens. In: FRIEND, J. & THRELFALL, D. R.: *Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships*. Acad. Press; London, New York, San Francisco.
- BATEMAN, D. F. & MILLAR, R. L. (1966): Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathol.* **4**: 119-146.
- BEN-HOD, G., LOSNER, D., JOEL, D. M. & MAYER, A. M. (1993): Pectin Methylesterase in Calli and Germinating Seeds of *Orobanche aegyptica*. *Phytochemistry* **32**: 1399-1402.
- BÖHMER, B. (1989): Anzucht gesunder Stiefmütterchen. *Gb + Gw* **89** (24): 1149-1151.
- BÖHMER, B. & WOHANKA, W. (1999): *Farbatlas Krankheiten und Schädlinge an Zierpflanzen, Obst und Gemüse*. Ulmer, Stuttgart.
- BONGARTZ, W. (1989): Gestern Stiefmütterchen - heute eine der erstklassigen Beetpflanzen. *Gartenbörse + Gartenwelt* **24**: 1142-1145.
- BRADFORD, M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254

- BRIELMAIER-LIEBETANZ, U., KÖHN, S. & WIEDEMANN, W. (1996): *Pseudomonas viridiflava* als Krankheitserreger an *Viola x wittrockiana*-Hybriden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz. **48** (5): 96-98.
- BROCKMANN, H. & SANNE, W. (1953): Zur Biosynthese des Hypericins. Naturwissenschaften **40**: 509-510.
- BROWN, T. A. (1996): Gentechnologie für Einsteiger. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford.
- CFR Description of Pathogenic Fungi and Bacteria (1977): No. 537 *Mycocentrospora acerina*. Cambrian News Ltd.
- COLLMER, A. & KEEN, N. T. (1986): The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathol. **24**: 383-409.
- COOPER, R. M., RANKIN, B. & WOOD, R. K. S. (1978): Cell wall-degrading enzymes of vascular wilt fungi. II. Properties and modes of action of polysaccharides of *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Plant Pathol. **13**: 101-134.
- COOPER, R. M. (1983): The Mechanism and Significance of Enzymic Degradation of Host Cell Walls by Parasites. In: CALLOW, J. A. (ed.): Biochemical Plant Pathology. Wiley & Sons. Chichester; New York; Brisbane; Toronto; Singapore.
- CRUICKSHANK, R. H. & WADE, G. C. (1980): Detection of Pectic Enzymes in Pectin-Acrylamide Gels. Analytical Biochemistry **107**: 177-181.
- CUMMING, A. M. & THOMSON, R. H. (1970): Anthraquinones in *Maesopsis eminii*. Phytochemistry **9**: 2399-2400.
- DALCHOW, J. (1995): Pflanzenschutz. In: JENNERICH, L. & SAUER, H.: *Viola-Wittrockiana*-Hybriden. Thalacker, Braunschweig.

- DAUB, M. E. (1982): Cercosporin, a Photosensitizing Toxin from *Cercospora* species. *Phytopathology* **72**: 370-374.
- DAUB, M. E. (1987): The Fungal Photosensitizer Cercosporin and Its Role in Plant Disease. In: HEITZ, J. R. & DOWNUM, K. R.: *Light-Activated Pesticides*. Am. Chem. Soc., Washington D. C.
- DAY, J. R., LEWIS, B. G. & MARTIN, S. (1972): Infection of stored celery plants by *Centrospora acerina*. *Annals of Applied Biology* **71**: 201-213.
- DEIGHTON, F. C. (1971): Studies on *Cercospora* and allied genera. III. *Centrospora*. *Mycol. Pap.* **124**: 1-13.
- DEIGHTON, F. C. (1972): *Mycocentrospora*, a new name for *Centrospora* NEERG. *Taxon* **21**: 716.
- DEIGHTON, F. C. & MULDER, J. L. (1977): *Mycocentrospora acerina* as a human pathogen. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **69**: 326-327.
- DENFFER, D. VON, ZIEGLER, H., EHRENDORFER, F. & BRESINSKY, A. (1983): *Lehrbuch der Botanik* (Strasburger). 32. Aufl. Fischer; Stuttgart, New York.
- DICKINSON, C. H. & LUCAS, J. A. (1982): *Plant Pathology & Plant Pathogens*. 2nd Edition. Blackwell; Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne.
- DINGLE, J., REID, W. W. & SOLOMONS, G. L. (1953): The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the "Cup-Plate" assay to the estimation of enzymes. *J. Sci. Fd. Agric.* **4**: 149-155.
- DOBROWOLSKI, D. C. & FOOTE, C. S. (1983): Cercosporin, a singlet oxygen generator. *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **22**: 720-721.
- DUCROT, P. H., LALLEMAND, J.-Y., MILAT, M.-L., & BLEIN, J. P. (1994): The Yellow Toxins Produced by *Cercospora beticola*. Part VIII.: The Chemical Equilibrium Between Beti-

- colins; Structures of Minor Compounds: Beticolin 6 and Beticolin 8. *Tetrahedron Lett.* **35** (47): 8797-8800.
- DUCROT, P. H., EINHORN, J., KERHOAS, L., LALLEMAND, J. Y., MILAT, M.-L., BLEIN, J. P., NEUMAN, A. & PRANGE, T. (1996): *Cercospora beticola* Toxins. XI. Isolation and structure of beticolin 0. *Tetrahedron Lett.* **37**: 3121-3124.
- DUNCAN, S., BARTON, J. E. & O'BRIEN, P. A. (1993): Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. *Mycol. Res.* **97**: 1075-1082.
- DURBIN, R. D. (1981): *Toxins in Plant Disease*. Academic Press; New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.
- DURBIN, R. D. (1983): *The Biochemistry of Fungal and Bacterial Toxins and Their Modes of Action*. In: CALLOW, J. A.(ed.): *Biochemical Plant Pathology*. Wiley & Sons. Chichester; New York; Brisbane; Toronto; Singapore.
- EIJK, G. W. VAN & ROEYMANS, H. J. (1977): Cynodontin, the tetrahydroxyanthraquinone of *Curvularia* and *Drechslera* species. *Experientia* **33**: 1283-1284.
- ELGNER, N. (1993): Stiefmütterchen - Vom Beiartikel zum Marktrenner. *Gemüse* **5**: 268-270.
- ELLIS, M. B. & ELLIS, J. P. (1985): *Microfungi on Land Plants. An Identification Handbook*. Croom Helm; London, Sydney.
- EMMONS, C. W., LIE-KIAN-JOE, ENG, N.-I. T., POHAN, A., KERTOPATI, S. & VAN DER MEULEN, A. (1957): *Basidiobolus* and *Cercospora* from human infections. *Mycologia* **49**: 1-10.
- ENCKE, F., BUCHHEIM, G. & SEYBOLD, S. (1984): *Zander – Handwörterbuch der Pflanzennamen*. Ulmer, Stuttgart.

- ENGSTRÖM, K., BRISHAMMAR, S., SVENSSON, C., BENGTSSON, M. & ANDERSSON, R. (1993): Anthrachinones from some *Drechslera* species and *Bipolaris sorokiniana*. Mycol. Res. **97** (3): 381-384.
- FAJOLA, A. O. (1978): Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. Physiol. Plant Pathol. **13**: 157-164
- FELLENBERG, G. (1978): Entwicklungsphysiologie der Pflanzen. Thieme, Stuttgart.
- FLACHS, K. (1927): Blattfleckenkrankheiten an Stiefmütterchen. Blumen- und Pflanzenbau **73**: 162-163.
- FRANDSEN, N. O. (1955): Untersuchungen über *Cercospora beticola*. II. Pigmentbildung. Zucker **8**: 469-472.
- FREY, H.-P. & ZIELOFF, K. (1992): Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie. Grundlagen und Praxis. VCH; Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- FRENDENHAGEN, A., METT, H., MEYER, T., BUCHDUNGER, E., REGENASS, U., ROGGO, B. E. & PETERSEN, F. (1995): Protein Tyrosin Kinase and Protein Kinase C Inhibition by Fungal Anthraquinones Related to Emodin. Journal of Antibiotics **48** (11): 1355-1358.
- GIEFFERS, W., PAUL, V. H. & RITTER, E. (1989): Der Einfluß von Sauerstoff und UV-Licht auf die Konidienproduktion von *Pseudocercospora herpotrichoides* (FRON) DEIGHTON, Merkmale zur Morphologie des Erregers und dessen Nachweis an Dikotyledonen. J. Phytopathology **126**: 115-132.
- GILL, D. L. (1971): *Centrpora acerina* carried by pansy seed. Pl. Dis. Reporter **55**: 731-732.
- GODOY, G., STEADMAN, J. R., DICKMAN, M. B. & DAM, R. (1990): Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. Physiological and Molecular Plant Pathology **37**: 179-191.

- GOUDET, C., BENITAH, J.-P., MILAT, M.-L. , SENTENAC , H. & THIBAUD, J.-B. (1999): Cluster Organization and Pore Struktüre of Ion Channels Formed by Beticolin 3, a Nonpeptidic Fungal Toxin. *Biophysical Journal* **77**: 3052-3059.
- GOUDET, C., MILAT, M.-L. , SENTENAC , H. & THIBAUD, J.-B. (2000): Beticolins, Nonpeptidic, Polycyclic Molecules Produced by the Phytopathogenic Fungus *Cercospora beticola*, as a New Family of Ion Channel-Forming Toxins. *Molecular plant-microbe interactions* **13** (2): 203-209.
- GRANITI, A. (1991): Phytotoxins and their involvement in plant diseases. *Experientia* **47**: 751-755.
- GRUSZECKA-KOWALIK, E. & ZALKOW, L. H. (2000): An Improved Synthesis of Hypericin and Related Compounds. *Organic Preparations and Procedures Int.* **32** (1): 57-61.
- GÜNDEL, L. (1976): Untersuchungen zur Biologie von *Mycocentrospora acerina* (HARTIG) DEIGHTON im Zusammenhang mit der Aufklärung schorfartiger Erkrankungen an Knollensellerie. *Journal of Plant Diseases and Protection* **83** (10): 591-605.
- HAGERMAN, A. E., BLAU, D. M. & MCCLURE, A. L. (1985): Plate Assay for Determining the Time of Production of Protease, Cellulase, and Pectinases by Germinating Fungal Spores. *Analytical Biochemistry* **151**: 334-342.
- HARBORNE, J. B. (1983): Toxins of Plant-Fungal Interactions. In: KEELER, R. F. & TU, A. T.: *Plant and Fungal Toxins. Handbook of Natural toxins Vol. 1.* Marcel Dekker, Inc.; New York and Basel.
- HARTIG, R. (1880): Der Ahornkeimlingspilz *Cercospora acerina*. *Untersuch. forstbotanisch. Institut München* **1**: 58-62.
- HAWKSWORTH, D. L., KIRK, P. M., SUTTON, B. C. & PEGLER, D. N. (Eds.) (1995): *AINSWORTH & BISBY'S Dictionary of the Fungi.* University Press, Cambridge.

- HEDDERGOTT, H. & KOCK, T. (1986): Gärtners Pflanzenarzt. Blumen-Zierpflanzen-Landschaft. Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup
- HERING, O., NIRENBERG, H. I. & DEML, G. (1994): Grenzen und Möglichkeiten der RAPD-Analysen zur Charakterisierung von Pilzen. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. H. 301. S. 160.
- HERMANSEN, A. (1992): Weeds as hosts of *Mycocentrospora acerina*. Annals of Applied Biology **121** (3) 679-686.
- HEß, D. (1981): Pflanzenphysiologie. 7 Aufl. Ulmer, Stuttgart.
- HOCK, B & ELSTNER, E. F. (1988): Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie. BI-Wissenschaftsverlag; Mannheim, Wien, Zürich.
- HOFFMANN, G. M., NIENHAUS, F., POEHLING, H.-M., SCHÖNBECK, F., WELTZIEN, H. C. & WILBERT, H. (1994): Lehrbuch der Phytomedizin. 3. Aufl. Blackwell Verlag, Berlin.
- HOWELL, C. R. (1976): Use of enzyme-deficient mutants of *Verticillium dahliae* to assess the important of pectolytic enzymes in symptom expression of *Verticillium* wilt of cotton. Physiological Plant Pathology **9**: 279-283.
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J. & WHITE, T. J.: (1990): PCR Protocols. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- IQBAL, S. H. & WEBSTER, J. (1969): Pathogenicity of aquatic isolates of *Centrospora acerina* to carrots and parsnips. Trans. Brit. Mycol. Soc. **53**: 486-490.
- JENSEN, W. A. (1962): Botanical Histochemistry - Principles and Practice. Freeman and Company; San Francisco and London.
- JOHNSON, A. E. (1983): Photosensitizing Toxins from Plants and their Biological Effects. In: KEELER, R. F. & TU, A. T.: Plant and Fungal Toxins. Handbook of Natural toxins Vol. 1. Marcel Dekker, Inc.; New York and Basel.

- JONES, C. J., EDWARDS, K. J., CASTIGLIONE, S., WINFIELD, M. O., SALA, F., VAN DER WIEL, C., VOSMAN, B. L., MATTHES, M., DALY, A., BRETTSCHEIDER, R., BETTINI, P., BULATTI, M., MAESTRI, E., MARMIROLI, N., AERT, R. L., VOLCKAERT, G., RUEDA, J., VAZQUEZ, A. & KARP, A. (1998): Reproducibility testing of RAPDs by Network of European Laboratories. In: KARP, A., ISAAC, P. G. & INGRAM, D. S.: Molecular Tools for Screening Biodiversity. Chapman & Hall; London. Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- KARP, A., ISAAC, P. G. & INGRAM, D. S. (1998): Molecular Tools for Screening Biodiversity - Plants and Animals. Chapman & Hall; London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- KLEINERT, T. (1990): Elektrophoretische Methoden in der Proteinanalytik. Thieme; Stuttgart, New York.
- KRÄMER, I. (1994): Charakterisierung und Differenzierung von *Xanthomonas campestris*-Pathovaren mittels PCR. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. H. 301. S. 158.
- KUEHN, M. (2000): Lighting the path of virulence. Trends in Microbiology **16** (1): 8.
- KUMMER, B. (2000): Pflanzenschutz an Viola. Gärtnerbörse **10**: 29-31.
- LAVIE, G., KAPLINSKY, C., AIZMAN, I., MAZUR, Y. & MANDEL, M. (1998): Multifunktional, Second Generation Photodynamic Agents: Cercosporin, Tetrahydroxyhelianthrone and Hypericin. Mode of Action and Potential Role in Tumor Phototherapy. Am. Soc. Clinical Oncology: 2185.
- LE CAM, B., LEBRETON, L., MASSIOT, P. & ROUXEL, F. (1997): Production of cell-wall polysaccharide degrading enzymes in carrot root tissues infected by *Mycocentrospora acerina*. Plant Pathology **46**: 276-281.
- LE CAM, B., MASSIOT, P. & ROUXEL, F. (1993): Production of Cell-Wall Polysaccharide-Degrading Enzymes by *Mycocentrospora acerina*, a Post-Harvest Pathogen of Carrot. In: LE CAM, B., MASSIOT, P., ROUXEL, F. & LEGRAND: Developments in Plant Pathology, No. 2. Mechanisms of Plant Defense Responses. Kluwer, Dordrecht.

- LE CAM, B., MASSIOT, P. & ROUXEL, F. (1994): Cell wall polysaccharide-degrading enzymes produced by isolates of *Mycocentrospora acerina* differing in aggressiveness on carrot. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **44**: 187-198.
- LEE, S. B., MILGROOM, M. G. & TAYLOR, J. W. (1988): A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Gen. Newsl.* **35**: 23-24.
- LIN, L.-C., CHOU, C.-J. & KUO, Y.-C. (2001): Cytotoxic Principles from *Ventilago leiocarpa*. *J. Nat. Prod.* **64**: 674-676.
- MACRI, F. & VIANELLO, A. (1979): Photodynamic activity of cercosporin on plant tissues. *Plant Cell Environ.* **2**: 267-271.
- MANCINI, G., CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F. (1965): Immunochemical Quantitation of Antigens by single radial Immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**: 235-254.
- MANN, B. (1962): Role of pectic enzymes in the Fusarium wilt syndrome of tomato. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **45** (2): 169-178.
- MARCIANO, P., LENNA, P. & MAGRO, P. (1983): Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiological Plant Pathology* **22**: 339-345.
- MCDONELL, K. (1958): Absence of Pectolytic Enzymes in a Pathogenic Strain of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. *Nature* **182**: 1025-1026.
- MCFEETERS, R. F., HANKIN, L. & LACY, G. H. (1975): Pectinolytic and Pectolytic Microorganisms. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. (Eds.): *Compendium of microbiological methods for the examination of foods*. Amer. Pub. Health Assoc., Washington D. C.
- MEGGELEN-LAAGLAND, I. VAN (1997): Ansprüche an Viola - Ein Klassiker mit Zukunft. *Deutscher Gartenbau* **18**: 1076-1077.

- MERZ, F. (1997): Pflanzenschutz bei Stiefmütterchen. *Gemüse* **5**: 304-305
- MILAT, M.-L., BLEIN, J.-P., EINHORN, J., TABET, J.-C., DUCROT, P.-H. & LALLEMAND, J.-Y. (1993): The Yellow Toxins Produced by *Cercospora beticola*. Part II. Isolation and Structure of Beticolins 3 and 4. *Tetrahedron Letters* **34** (9): 1483-1486.
- MITCHELL, R. E. (1984): The relevance of non-host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **22**: 215-245.
- MULCAHY, D. L. CRESTI, M., LINSKENS, H. F., INTRIERI, C., SILVESTRONI, O., VIGNANI, R. & PANCALDI, M. (1995): DNA fingerprinting of italian grape varieties: a test of reliability in RAPDs. *Adv. Hort. Sci.* **9**: 185-187.
- MUMMA, R. O., LUKEZIC, F. L. & KELLY, M. G. (1973): Cercosporin from *Cercospora hayii*. *Phytochemistry* **12**: 917-922.
- NEERGAARD, P. & NEWHALL, A. G. (1951): Notes on the physiology and pathogenicity of *Centrospora acerina* (HARTIG) NEWHALL. *Phytopathology* **41**: 1021-1033.
- NENNEMANN, H. (1996a): Drei gegen *Viola* – Anbauprobleme durch Pilzkrankheiten. *Gärtnerbörse* **29**: 1377-1378.
- NENNEMANN, H. (1996b): Fungizide bei *Viola* – Verkrüppelte Blüten durch falsche Mittel. *Gärtnerbörse* **29**: 1379.
- NEUBAUER, C. (1994): *Mycocentrospora acerina* - Eine gefährliche Pilzerkrankung an Stiefmütterchen. Az.: P3-226-Dr.Nb/Br. Landwirtschaftskammer Weser-Ems. Pflanzenschutzamt Oldenburg.
- NEWTON, C. R. & GRAHAM, A. (1994): PCR. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford.

- NICKIG, M. & RADZIEWSKY, E. VON (1999): Stiefmütterchen und Veilchen. Ellert und Richter, Hamburg.
- OSTERWALDER, A. (1924): Ueber die durch *Cercospora macrospora* OSTERWALDER verursachte Blattkrankheit bei den Pensées. Mitteil. der Thurganischen Naturf. Gesells. **25**: 59-80.
- PAGEL, W. & HEITEFUSS, R. (1989): Calcium content and cell wall polygalacturonans in potato tubers of cultivars with different susceptibilities to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Physiological and Molecular Plant Pathology **35**: 11-21.
- PENNER, G. A., BUSH, A., WISE, R., KIM, W., DOMIER, L., KASHA, K., LAROCHE, A., SCOLES, G., MOLNAR, S. J. & FEDAK, G. (1993): Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Methods Appl. **2**: 341-345.
- PLENK, A. (1995): Krankheiten an Veilchen und Stiefmütterchen. Pflanzenschutz (Wien)/Supplement, Austria S. 6-7.
- PRELL, H. H. (1996): Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Gustav Fischer Verlag. Jena, Stuttgart.
- RAEDER, U. & BRODA, P. (1985): Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. **1**: 17-20.
- REGNER, F. & MESSNER, R. (1993): Molekulare Differenzierung von Rebsorten mittels RAPD-Analyse. Mitt.Klosterneuburg **43**: 160-164.
- ROTH, L., DAUNDERER, M. & KORMANN, K. (1994): Giftpflanzen - Pflanzengifte. 4. Aufl. Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG, Landsberg.
- ROTHER, H.-W. (1988): Welche Kultur bei Stiefmütterchen? Deutscher Gartenbau **23**: 1444-1447.

- RUPPRECHT, H. & MIEßNER, E. (1989): Zierpflanzenbau - Zierpflanzen von A bis Z. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag; Berlin.
- SAMBROOK, J., FRITSSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- SAUER, P., MÜLLER, M. & KANG, J. (1998): Quantitation of DNA. Quiagen News **2**: 23-26.
- SCHICKEDANZ, F. (1987): Sieben Pilze, ein Virus und noch ein paar Raupen. Gb + Gw **21**: 779-780.
- SCHLÖSSER, E. (1962): Über eine biologisch aktive Substanz aus *Cercospora beticola*. Phytopathol. Z. **44**: 295-312.
- SCHLÖSSER, E. (1964): Beziehung zwischen der Produktion an gelber *Cercospora* Substanz und der Aggressivität verschiedener *Cercospora beticola* Einsporlinien. Phytopathol. Z. **50**: 386-389.
- SPRECHER, E. & URBASCH, I. (1984): Wechselwirkung zwischen Pflanzen und pathogenen Pilzen. Naturwissenschaftliche Rundschau **37** (10): 401-407.
- STATISTISCHES BUNDESAMT (Ed.) (2001): Land- und Forstwirtschaft, Fischerei. Reihe 3.1.6 Bodennutzung – Anbau von Zierpflanzen. Metzler-Poeschel, Stuttgart.
- Strobel, G. A. (1976): Toxins of Plant Pathogenic Bacteria und Fungi. In: FRIEND, J. & THRELFALL, D. R.: Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships. Acad. Press; London, New York, San Francisco.
- RINTELEN, J. & KLEWITZ, R. (1976): Zur Blattfleckenkrankheit an Stiefmütterchen durch *Mycocentrospora acerina* (HARTIG) DEIGHTON. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz **83** (11): 657-664.
- ROTH, L., FRANK, H. & KORMANN, K. (1990): Giftpilze - Pilzgifte. Schimmelpilze, Mycotoxine. Ecomed, Landsberg/Lech.

- RUPPRECHT, H. & MIEßNER, E. (1989): Zierpflanzenbau – Zierpflanzen von A bis Z. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.
- SCHICKEDANZ, F. (1987): Sieben Pilze, ein Virus und noch ein paar Raupen. Gb + Gw **21**: 779-780.
- STAHL, M., UMGELTER, H., JÖRG, G., MERZ, F. & RICHTER, J. (1993): Pflanzenschutz im Zierpflanzenbau - Handbuch des Erwerbsgärtners. Ulmer, Stuttgart.
- TOMPKINS, C. M. & HANSEN, H. N. (1950): Pansy leafspot caused by *Centrospora acerina*, host range and control. Hilgardia **19**: 383-398.
- VAN DE PEER, Y. & DE WACHTER, R. (1994): TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comput. Applic. Biosci. **10**: 569-570.
- VIENNOT-BOURGIN, G. (1945): A propos de deux genre nouveaux: *Centrospora* et *Ansatospora*. Rev. Mycol. **10**: 128-131.
- WAGNER, H. (1988): Pharmazeutische Biologie - Drogen und ihre Inhaltsstoffe. Fischer; Stuttgart, New York.
- WAGNER, K. (1989): Eine Pflanze mit Vergangenheit. Gb+Gw **24**: 1118-1121.
- WALL, C. J. & LEWIS, B. G. (1980): Infection of carrot leaves by *Mycocentrospora acerina*. Trans. Brit. Mycol. Soc. **75**: 163-165.
- WEISS, F. et al. (1960): Index of Plant Diseases in the United States. U.S. Dept. Agric. Handbook. No. 165. Washington, D.C. 531 p.
- WIEDEMANN, W., MÜNSTER, V., BRIELMAIER, U. & SCHNEE, H. (1995): *Pseudomonas* an Stiefmütterchen. Gärtnerbörse **15**: 671-672.

- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. (1991): Genetic Analysis with RAPD Markers. In: Bennett, J. W. & Lasure, L. L.: More Gene Manipulations in Fungi. Academic Press, Inc.; San Diego, New York, Boston.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. **18**: 6531-6535.
- WITSKEN, M. (1997): Entwicklung einer biotechnologischen Methode für die Selektion auf Krankheitsresistenz gegen den Erreger *Mycocentrospora acerina* (HARTIG) DEIGHTON an Viola-Wittrockiana-Hybriden. Diplomarbeit, Universität-GH Paderborn. 135 S.
- YAMAZAKI, S., OKUBO, A., AKIYAMA, Y. & FUWA, K. (1975): Cercosporin, a novel photodynamic pigment isolated from *Cercospora kikuchii*. Agric. Biol. Chem. **39**: 267-288.
- YOSHIHARA, T., SHIMANUKI, T., ARAKI, T. & SAKAMURA, S. (1975): Phleichrome; A New Phytotoxic Compound Produced by *Cladosporium phlei*. Agr. Biol. Chem. **39**: 1683-1684.
- YOUNGMAN, R. J., SCHIEBERLE, P., SCHNABL, H., GROSCH, W. & ELSTNER, E. F. (1983): The photodynamic generation of singlet molecular oxygen by the fungal phytotoxin, cercosporin. Photobiochem. Photobiophys. **6**: 109-119.

8 Anhang

8.1 Liste der Herkünfte

Tab. 18: Herkünfte der gesammelten Pflanzen.

Nr.:	Ort	PLZ	Nr.:	Ort	PLZ	Nr.:	Ort	PLZ
1	Everswinkel	48351	42	Vreden	48691	83	Vreden	48691
2	Everswinkel	48351	43	Vreden	48691	84	Vreden	48691
3	Everswinkel	48351	44	Vreden	48691	85	Vreden	48691
4	Everswinkel	48351	45	Vreden	48691	86	Vreden	48691
5	Langenberg	33449	46	Vreden	48691	87	Vreden	48691
6	Langenberg	33449	47	Vreden	48691	88	Vreden	48691
7	Langenberg	33449	48	Vreden	48691	89	Vreden	48691
8	Langenberg	33449	49	Vreden	48691	90	Vreden	48691
9	Langenberg	33449	50	Vreden	48691	91	Vreden	48691
10	Langenberg	33449	51	Vreden	48691	92	Vreden	48691
11	Harsewinkel	33428	52	Vreden	48691	93	Vreden	48691
12	Harsewinkel	33428	53	Vreden	48691	94	Vreden	48691
13	Harsewinkel	33428	54	Vreden	48691	95	Vreden	48691
14	Harsewinkel	33428	55	Vreden	48691	96	Vreden	48691
15	Harsewinkel	33428	56	Vreden	48691	97	Vreden	48691
16	Harsewinkel	33428	57	Vreden	48691	98	Vreden	48691
17	Harsewinkel	33428	58	Vreden	48691	99	Vreden	48691
18	Harsewinkel	33428	59	Vreden	48691	100	Vreden	48691
19	Harsewinkel	33428	60	Vreden	48691	101	Vreden	48691
20	Bocholt	46395	61	Vreden	48691	102	Vreden	48691
21	Bocholt	46395	62	Vreden	48691	103	Vreden	48691
22	Bocholt	46395	63	Vreden	48691	104	Vreden	48691
23	Bocholt	46395	64	Vreden	48691	105	Vreden	48691
24	Bocholt	46395	65	Vreden	48691	106	Vreden	48691
25	Bocholt	46395	66	Vreden	48691	107	Vreden	48691
26	Bocholt	46395	67	Vreden	48691	108	Vreden	48691
27	Bocholt	46395	68	Vreden	48691	109	Vreden	48691
28	Bocholt	46395	69	Vreden	48691	110	Vreden	48691
29	Bocholt	46395	70	Vreden	48691	111	Münster	48143
30	Bocholt	46395	71	Vreden	48691	112	Münster	48143
31	Vreden	48691	72	Vreden	48691	113	Münster	48143
32	Vreden	48691	73	Vreden	48691	114	Münster	48143
33	Vreden	48691	74	Vreden	48691	115	Münster	48143
34	Vreden	48691	75	Vreden	48691	116	Münster	48143
35	Vreden	48691	76	Vreden	48691	117	Münster	48143
36	Vreden	48691	77	Vreden	48691	118	Münster	48143
37	Vreden	48691	78	Vreden	48691	119	Münster	48143
38	Vreden	48691	79	Vreden	48691	120	Ohrdruf	99885
39	Vreden	48691	80	Vreden	48691	121	Ohrdruf	99885
40	Vreden	48691	81	Vreden	48691	122	Ohrdruf	99885
41	Vreden	48691	82	Vreden	48691	123	Ohrdruf	99885

Fortsetzung Tab. 18:

Nr.:	Ort	PLZ	Nr.:	Ort	PLZ	Nr.:	Ort	PLZ
124	Ohrdruf	99885	223	Kaldenhof	48155	321	Crimmitschau	08451
125	Ohrdruf	99885	226	Kaldenhof	48155	322	Kaldenhof	48155
126	Kaldenhof	48155	227	Mühlhausen	99974	323	Nürnberg	90402
127	Kaldenhof	48155	228	Münster	48155	324	Fürth	90763
128	Kaldenhof	48155	229	Schüttorf	48465	325	Rethwisch/Lübeck	23847
129	Kaldenhof	48155	230	Wesel	46483	326	Hann.-Münden	34346
130	Kaldenhof	48155	231	Wesel	46483	327	Schüttorf	48465
131	Kaldenhof	48155	232	Alfter	53347	328	Seehausen	28879
132	Kaldenhof	48155	233	Gronau	31028	329	Kaldenhof	48155
133	Kaldenhof	48155	234	Schellerten	31174	330	Karlsruhe	76131
134	Wesel	46483	235	Saarlouis-Lisdorf	66740	331	Kandern	79400
135	Wesel	46483	236	Saarlouis-Lisdorf	66740	332	Wageningen (NL)	
136	Essen	45127	237	Mering	86415	333	Daiven (NL)	
137	Essen	45127	238	Mering	86415	334	Oosterbeek (NL)	
138	Mühlheim	45481	239	Wallerfangen	66798	335	Den Haag (NL)	
139	Hamminkeln	46499	240	Leipzig	04103	336	Rijn (NL)	
140	Hamminkeln	46499	241	Gundelfingen/Frbg.	79194	337	Utrecht (NL)	
141	Hamminkeln	46499	242	Neu Vehlefanz	16727	338	Wesel	46483
142	Eninger	59320	243	Eching b. Moosburg	84174	339	Wesel	46483
143	Eninger	59320	244	Passau	94032	340	Wesel	46483
144	Eninger	59320	245	Neu-Ulm	89231	341	Wesel	46483
145	Senden	48308	246	Haslach/Frbg	77716	342	Wesel	46483
146	Senden	48308	247	Stetten/Konstanz	88719	343	Nordwalde	48356
147	Senden	48308	248	Heidelberg	69115	344	Lohmar	53797
148	Senden	48308	249	Gießen	35390	345	Bornheim	53332
149	Havixbeck	48329	250	Lehmen	56332	346	Bornheim	53332
200	Hamburg	20095	251	Lehmen	56332	347	Osterberg	89296
201	Hamburg	20095	252	Fürth	90762	348	Passau/Fürstenzell (Jägerwirt)	94081
202	Sevenam (NL) Höhe Geldern		300	Hamburg	20095	349	Laufen	83410
203	Eslohe	59889	301	Röhrnbach	94133	350	München	80xxx
204	Petershagen	32469	302	Anger	83454	351	Saalfeld	07318
205	Meerbeck	31715	303	Haag	85410	352	Crimmitschau	08451
206	Hille-Rothenuffeln	32479	304	Stuhr	28816	353	Großenkneten	26197
207	Schönkirchen	24232	305	Konstanz	78462	354	Ubstadt-Weiher	76698
208	Kiel	24103	306	Wesel	46483	355	Kaldenhof	48155
209	Landau	94405	307	Wesel	46483	356	Rieschweiler	66509
210	Traunstein	83278	308	Wesel	46483	357	Potsdam	14469
211	Kleinblittersdorf	66271	309	Bad Bevensen	29549	358	Meuro	01994
212	Heidesheim	55262	310	Himbergen	29584	359	Meuro	01994
213	Abtsgmünd-Hohenstadt	73453	311	Thomasburg	21401	360	Halle/Reideburg	06116
214	Fürstenzell	94081	312	Ulm	89073	361	Wendisch-Rietz	15864
215	Bizen	79589	313	Mainz	55124	362	Hann. Münden/Hedemünden	34346
216	Kandern	79400	314	Wallerfangen	66798	363	Gießen	35394
217	Bingen	55411	315	Schöffengrund	35641	364	Gießen	35394
218	Kitzingen	97318	316	Stuttgart	70173	365	Kaldenhof	48155
219	Magdala	99441	317	Ulm	89073	366	Wesel	46483
220	Wutha-Farnroda	99848	318	Riestedt	06528	367	Wesel/Voerde	46483
221	Großenkneten	26197	319	Magdala	99441	368	Saarbrücken	661xx
222	Wettenberg	35435	320	Crimmitschau	08451	369	Neuburg	94127

Fortsetzung Tab. 18:

Nr.:	Ort	PLZ	Nr.:	Ort	PLZ	Nr.:	Ort	PLZ
370	Kandern	79400	375	Uelzen	29525	DAD	Dahrendorf	29413
371	Rheinmünster	77836	376	Tangstedt	22889	BAB	Bad Berleburg	57319
372	Bad Bevensen	29549	377	Werdau	08412	MER	Merklingsen	59514
373	Uelzen	29525	378	Hamburg	2xxxx	SO	Soest	59494
374	Uelzen	29525	PUT	Putlitz	16949	DSM	Dt. Sammlung Mikroorganismen	

8.2 Verwendete Kulturmedien

PDA

Potato-Dextrose-Agar

Fertigmedium (Fa. MERCK, 1.10130)

39 g pro Liter demin. Wasser.

PDB

Potato-Dextrose-Broth

Fertigmedium (Fa. DIFCO, 254920)

24 g pro Liter demin. Wasser.

PMA

Pektinmedium-Agar

KH_2PO_4 1 g

KNO_3 1 g

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,5 g

KCl 0,5 g

Agar 15 g

Pektin 10 g

(Zugabe nach Autoklavierung)

Pro Liter demin. Wasser.

PMB

Pektinmedium-Broth

KH_2PO_4 1 g

KNO_3 1 g

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,5 g

KCl 0,5 g

Pektin 10 g

(Zugabe nach Autoklavierung)

Pro Liter demin. Wasser.

Czapek-Dox-Agar

Fertigmedium

48 g pro Liter demin. Wasser.

Wasser-Agar

20 g Agar pro Liter demin. Wasser.

Alle Medien wurden 15 min. bei 121 °C autoklaviert.

8.3 Ergebnisse der Photometrischen DNA-Messung

Tab. 19: Ergebnisse der photometrische Messungen der extrahierten DNA.

Herkunft	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	DNA [µg/ml]
306	0,807	1,801	0,861	2,09	2,23	901
031	0,242	0,495	0,247	2,00	2,05	495
118	0,421	0,890	0,445	2,00	2,11	890
359	0,265	0,531	0,265	2,00	2,00	531
373	0,215	0,449	0,224	2,00	2,09	449
205	0,334	0,655	0,334	1,96	1,96	655
112	0,238	0,445	0,227	1,96	1,87	445
362	0,259	0,516	0,259	1,99	1,99	516
310	0,299	0,644	0,321	2,01	2,15	644
335	0,235	0,470	0,237	1,98	2,00	470
339	0,113	0,223	0,113	1,97	1,97	223
355	0,347	0,667	0,338	1,97	1,92	667
127	0,413	0,892	0,439	2,03	2,16	892
343	0,438	0,877	0,434	2,02	2,00	877
327	0,496	0,723	0,493	1,47	1,46	723
116	0,245	0,495	0,251	1,97	2,02	495
017	0,275	0,507	0,251	2,02	1,84	507
308	0,248	0,477	0,243	1,96	1,92	477
341	0,190	0,382	0,196	1,95	2,01	382
372	0,273	0,513	0,263	1,95	1,88	513
212	0,251	0,485	0,246	1,97	1,93	485
006	0,427	0,840	0,427	1,97	1,97	840
013	0,297	0,509	0,267	1,91	1,71	509
375	0,268	0,521	0,264	1,97	1,94	521
303	0,231	0,413	0,216	1,91	1,79	413
340	0,091	0,187	0,095	1,97	2,05	187
128	0,119	0,247	0,123	2,01	2,08	247
PUT	0,211	0,405	0,207	1,96	1,92	405
DSM	0,25	0,478	0,243	1,97	1,91	478
307	0,246	0,466	0,24	1,94	1,89	466
F3	0,273	0,494	0,244	2,02	1,81	494

Fortsetzung Tab. 20:

Bin	bp Range	M 340	M 128	M PUT	M DSM	F 3	M 343	M 327	M 116	M 017	M 308	M 341	M 372	M 212	M 006	M 013	M 375	M 307	M 303	M 306	M 031	M 118	M 359	M 373	M 205	M 112	M 362	M 310	M 335	M 339	M 355	M 127	
6	2769-2644	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	
7	2596-1706	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8	1665-1245	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9	1217-1140	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
10	1119-967	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	948-870	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12	854-739	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
13	716-670	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
14	645-577	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
15	558-497	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	439-431	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	369-369	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8.4.2 Primer ABA 02

Die Ergebnisse der PCR mit Primer ABA 02 sind in Abb. 52 und Tab. 21 zusammengefasst. Insgesamt konnten 11 unterschiedliche Merkmale gefunden werden. Ausgewertet wurde der Bereich von 369 bis 2258 Basenpaaren.

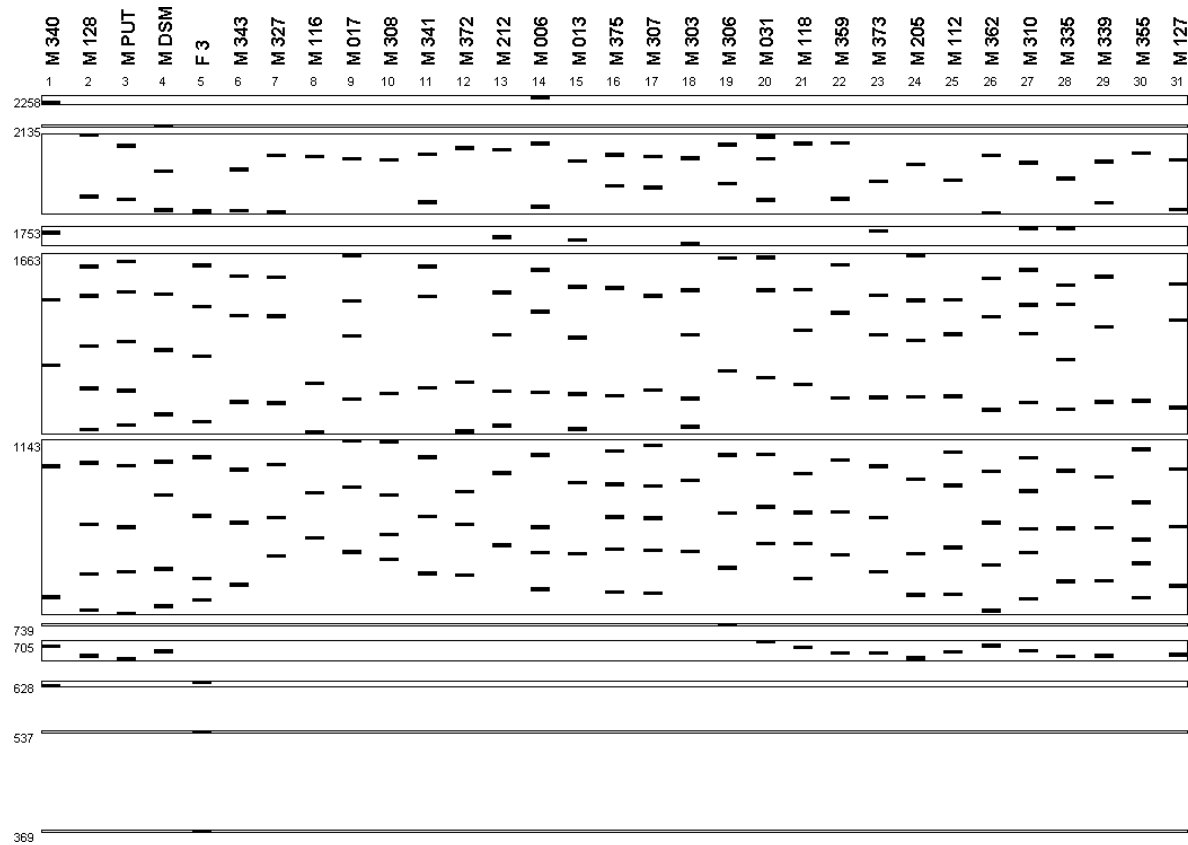


Abb. 52: Schematisiertes Gel des Primers ABA 02. Aufgetragen sind die Positionen der einzelnen Banden in den dazugehörigen Bins.

Tab. 21: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 02.

[illegible]

8.4.3 Primer ABA 03

Die Ergebnisse der PCR mit Primer ABA 03 sind in Abb. 53 und Tab. 22 zusammengefasst. Insgesamt konnten 14 unterschiedliche Merkmale gefunden werden. Ausgewertet wurde der Bereich von 371 bis 1552 Basenpaaren.

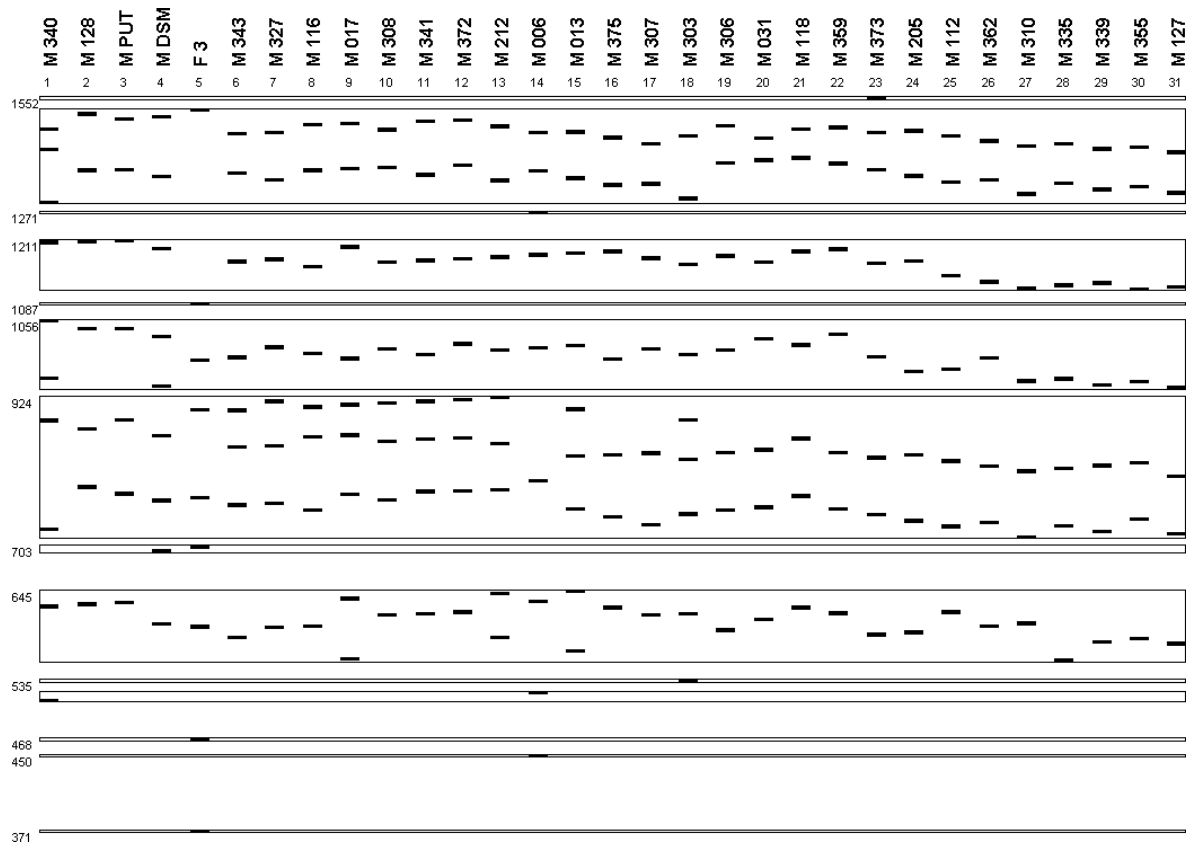


Abb. 53: Schematisiertes Gel des Primers ABA 03. Aufgetragen sind die Positionen der einzelnen Banden in den dazugehörigen Bins.

Tab. 22: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 03.

[illegible]

Fortsetzung Tab. 22:

Bin	bp Range	M 340	M 128	M PUT	M DSM	F 3	M 343	M 327	M 116	M 017	M 308	M 341	M 372	M 212	M 006	M 013	M 375	M 307	M 303	M 306	M 031	M 118	M 359	M 373	M 205	M 112	M 362	M 310	M 335	M 339	M 355	M 127
8	703-697	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	645-559	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	535-535	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	521-512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	468-468	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	450-450	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	371-371	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8.4.4 Primer ABA 04

Die Ergebnisse der PCR mit Primer ABA 04 sind in Abb. 54 und Tab. 23 zusammengefasst. Insgesamt konnten 14 unterschiedliche Merkmale gefunden werden. Ausgewertet wurde der Bereich von 547 bis 2864 Basenpaaren.

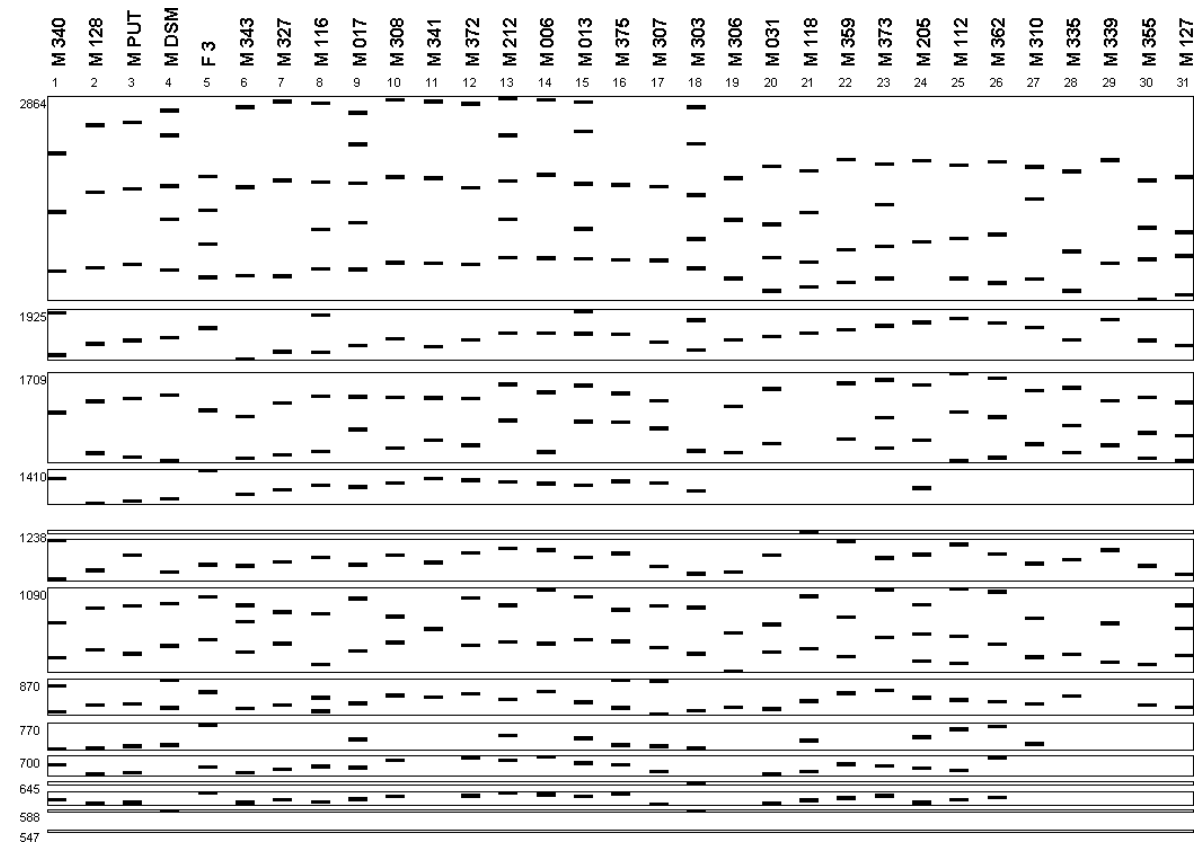


Abb. 54: Schematisiertes Gel des Primers ABA 04. Aufgetragen sind die Positionen der einzelnen Banden in den dazugehörigen Bins.

Tab. 23: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 04.

Bin	bp Range	M 340	M 128	M PUT	M DSM	F 3	M 343	M 327	M 116	M 017	M 308	M 341	M 372	M 212	M 006	M 013	M 375	M 307	M 303	M 306	M 031	M 118	M 359	M 373	M 205	M 112	M 362	M 310	M 335	M 339	M 355	M 127	
1	2864-1969	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	1925-1759	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3	1709-1437	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
4	1410-1316	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	1238-1238	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	1216-1114	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
7	1090-891	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8	870-794	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
9	770-717	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
10	700-663	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11	645-643	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	625-601	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
13	588-588	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
14	547-547	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

8.4.5 Primer ABA 09

Die Ergebnisse der PCR mit Primer ABA 09 sind in Abb. 55 und Tab. 24 zusammengefasst. Insgesamt konnten 15 unterschiedliche Merkmale gefunden werden. Ausgewertet wurde der Bereich von 516 bis 3377 Basenpaaren.

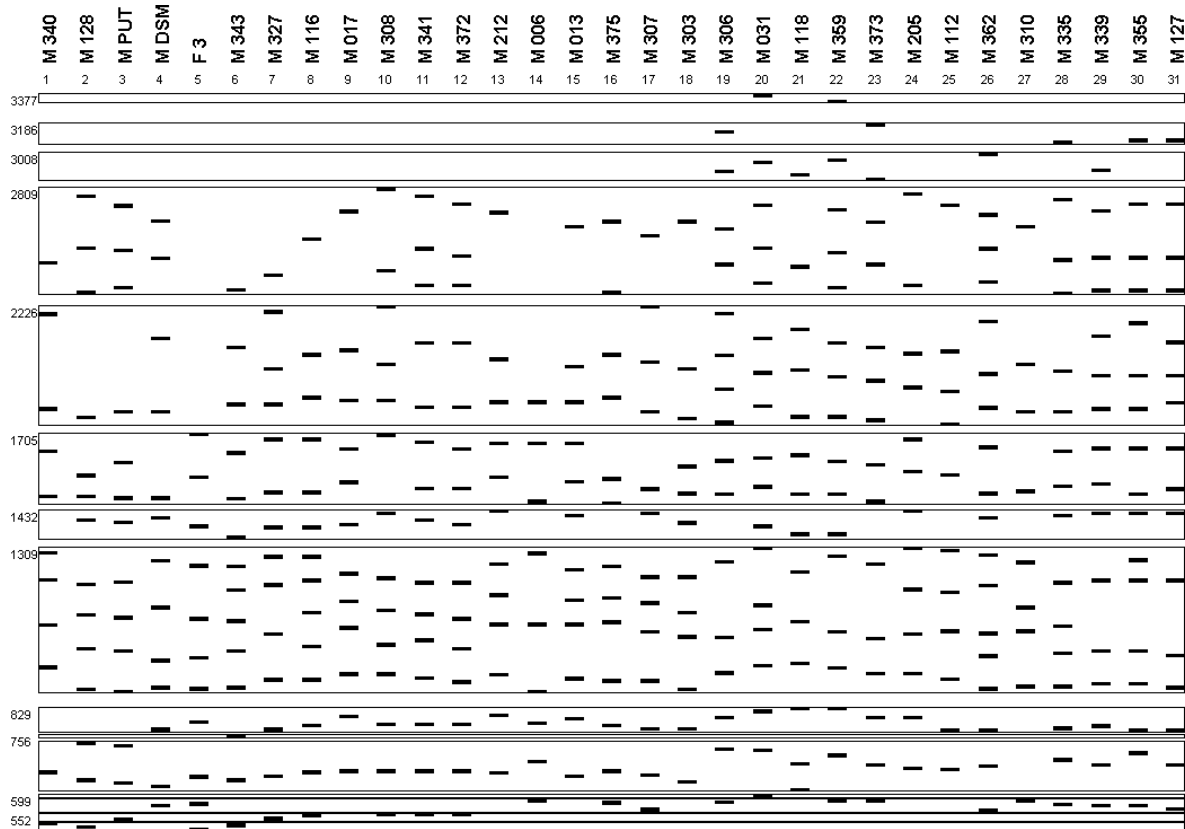


Abb. 55: Schematisiertes Gel des Primers ABA 09. Aufgetragen sind die Positionen der einzelnen Banden in den dazugehörigen Bins.

Tab. 24: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 09.

[illegible]

8.4.6 Primer ABA 12

Die Ergebnisse der PCR mit Primer ABA 12 sind in Abb. 56 und Tab. 25 zusammengefasst. Insgesamt konnten 31 unterschiedliche Merkmale gefunden werden. Ausgewertet wurde der Bereich von 412 bis 3374 Basenpaaren.

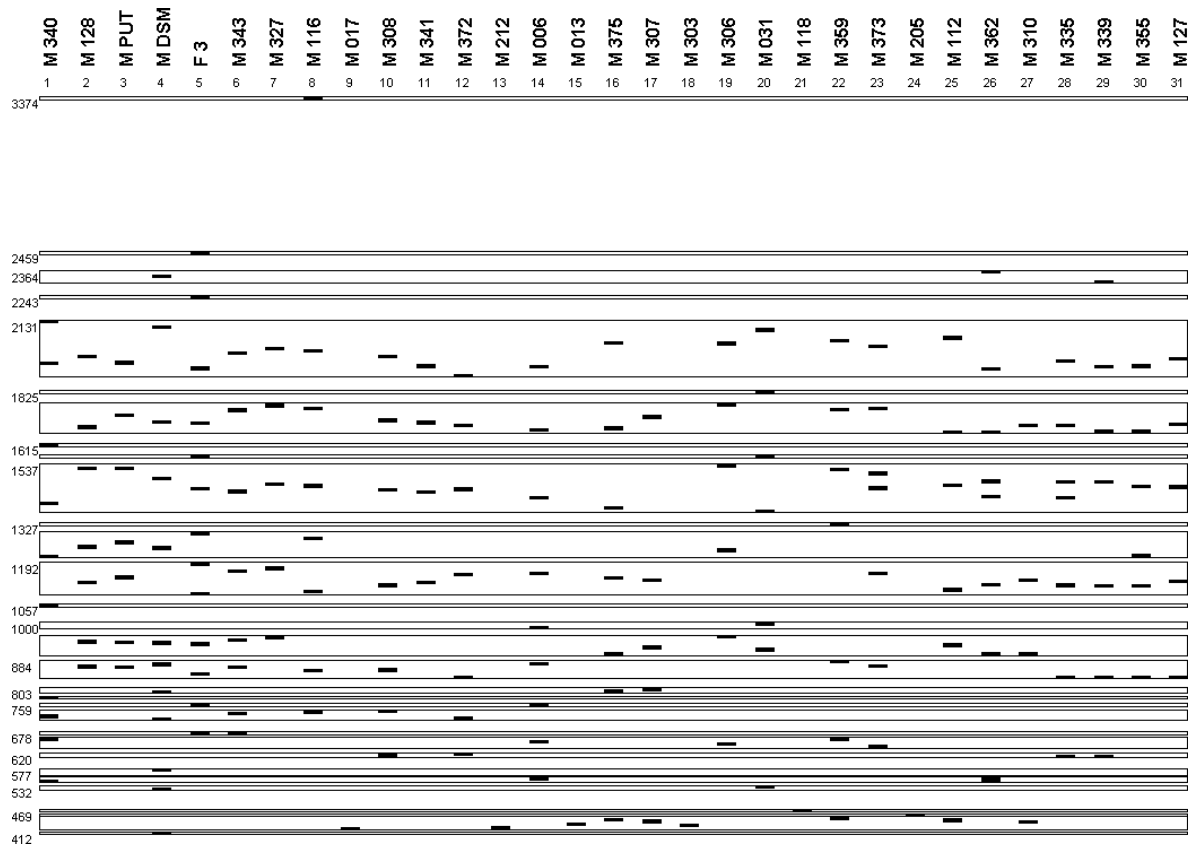


Abb. 56: Schematisiertes Gel des Primers ABA 12. Aufgetragen sind die Positionen der einzelnen Banden in den dazugehörigen Bins.

Tab. 25: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 12.

[illegible]

Fortsetzung Tab. 25:

Bin	bp Range	M 340	M 128	M PUT	M DSM	F 3	M 343	M 327	M 116	M 017	M 308	M 341	M 372	M 212	M 006	M 013	M 375	M 307	M 303	M 306	M 031	M 118	M 359	M 373	M 205	M 112	M 362	M 310	M 335	M 339	M 355	M 127
7	1774-1664	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
8	1615-1615	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1574-1571	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1537-1373	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
11	1327-1327	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	1296-1216	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
13	1192-1095	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
14	1057-1057	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	1000-988	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	960-907	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
17	884-837	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
18	803-795	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	779-779	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	759-755	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	740-717	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	678-676	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	662-640	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	620-613	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
25	577-566	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	554-547	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
27	532-525	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	469-469	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	458-458	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
30	450-423	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
31	412-412	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8.4.7 Primer ABA 13

Die Ergebnisse der PCR mit Primer ABA 13 sind in Abb. 57 und Tab. 26 zusammengefasst. Insgesamt konnten 23 unterschiedliche Merkmale gefunden werden. Ausgewertet wurde der Bereich von 260 bis 2494 Basenpaaren.

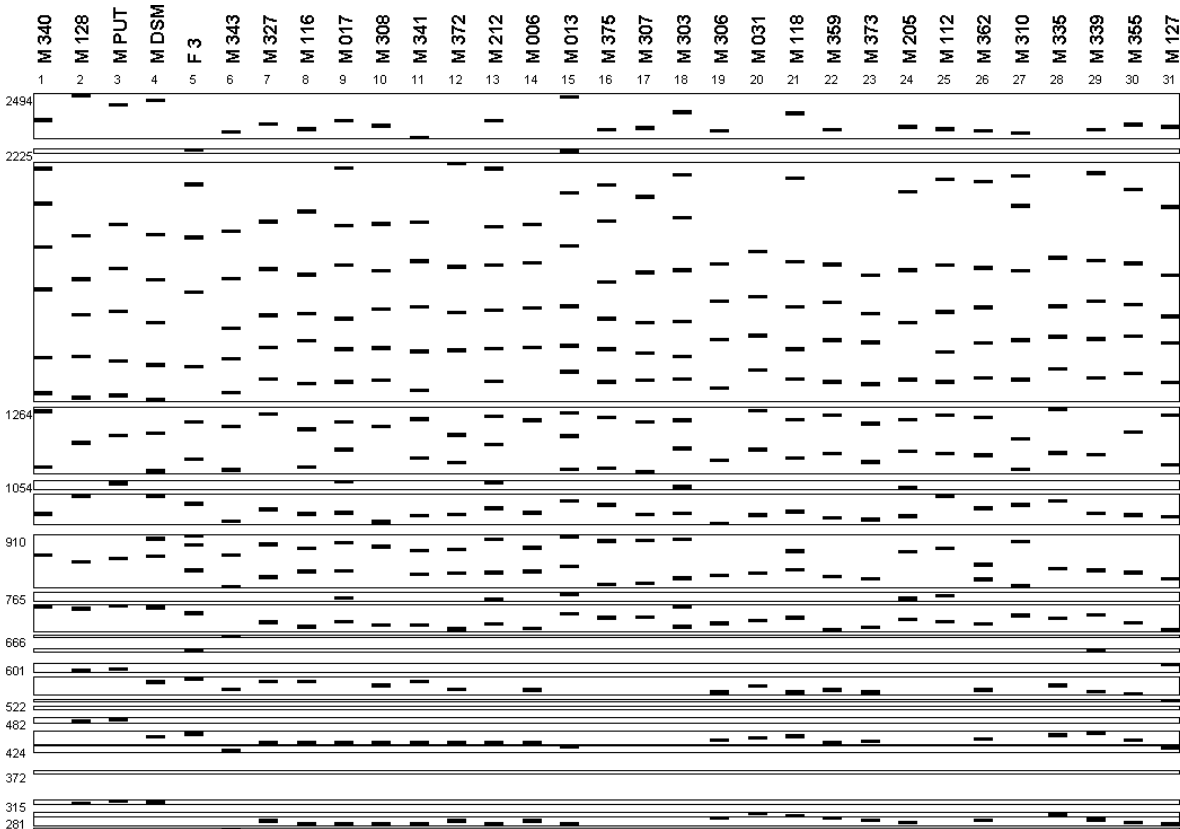


Abb. 57: Schematisiertes Gel des Primers ABA 13. Aufgetragen sind die Positionen der einzelnen Banden in den dazugehörigen Bins.

Tab. 26: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 13.

[illegible]

Fortsetzung Tab. 26:

Bin	bp Range	M 340	M 128	M PUT	M DSM	F 3	M 343	M 327	M 116	M 017	M 308	M 341	M 372	M 212	M 006	M 013	M 375	M 307	M 303	M 306	M 031	M 118	M 359	M 373	M 205	M 112	M 362	M 310	M 335	M 339	M 355	M 127
17	453-432	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
18	424-416	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
19	372-372	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	315-310	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	290-286	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
22	281-269	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
23	260-260	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8.4.8 Primer ABA 17

Die Ergebnisse der PCR mit Primer ABA 17 sind in Abb. 58 und Tab. 27 zusammengefasst. Insgesamt konnten 30 unterschiedliche Merkmale gefunden werden. Ausgewertet wurde der Bereich von 359 bis 5210 Basenpaaren.

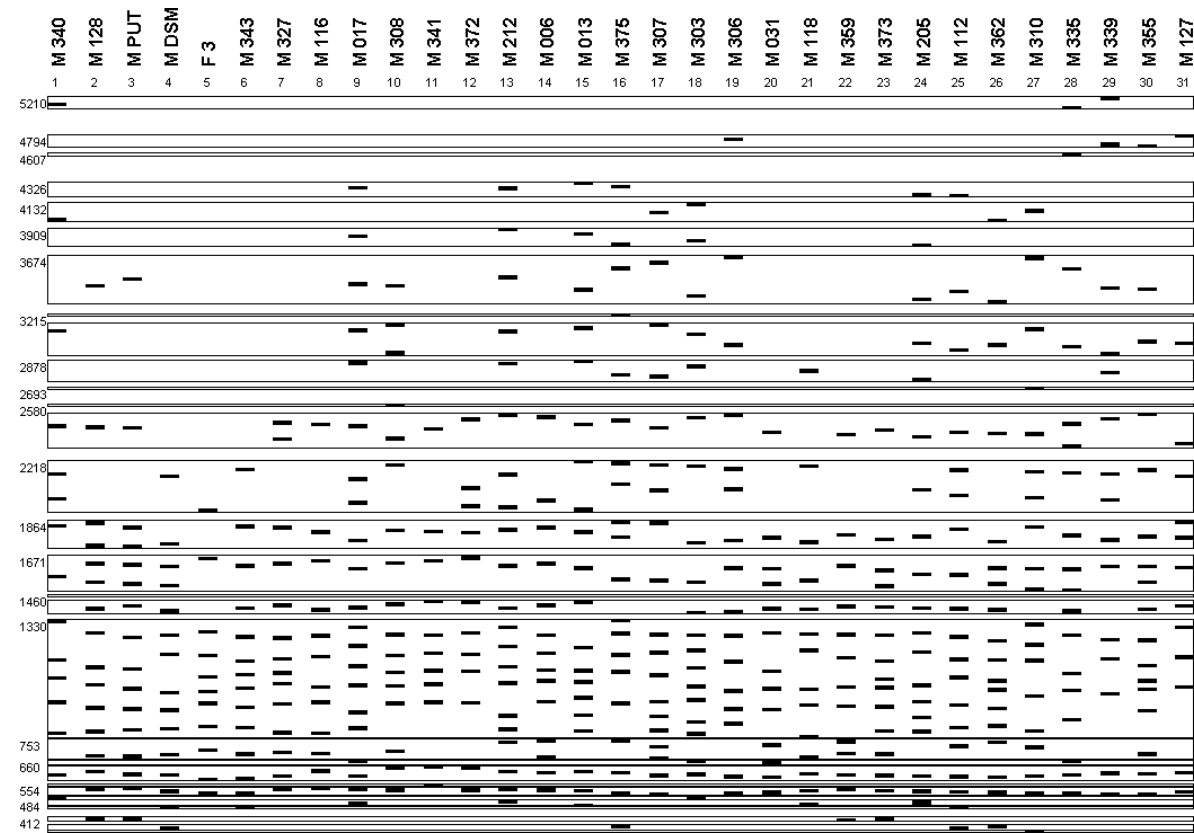


Abb. 58: Schematisiertes Gel des Primers ABA 17. Aufgetragen sind die Positionen der einzelnen Banden in den dazugehörigen Bins.

Tab. 27: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 17.

Bin	bp Range	M 340	M 128	M PUT	M DSM	F 3	M 343	M 327	M 116	M 017	M 308	M 341	M 372	M 212	M 006	M 013	M 375	M 307	M 303	M 306	M 031	M 118	M 359	M 373	M 205	M 112	M 362	M 310	M 335	M 339	M 355	M 127
1	5210-5098	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2	4794-4691	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3	4607-4607	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4	4326-4208	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
5	4132-3988	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
6	3909-3772	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
7	3674-3315	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
8	3215-3215	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	3142-2931	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
10	2878-2746	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
11	2693-2693	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
12	2580-2580	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	2518-2315	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	2218-1929	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
15	1864-1724	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	1671-1490	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	1460-1460	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1431-1370	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
19	1330-772	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	753-674	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
21	660-652	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
22	633-581	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	554-554	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	542-513	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	504-496	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	484-469	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
27	460-457	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
28	412-404	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
29	380-367	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
30	359-359	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

8.4.9 Primer ABA 18

Die Ergebnisse der PCR mit Primer ABA 18 sind in Abb. 59 und Tab. 28 zusammengefasst. Insgesamt konnten 22 unterschiedliche Merkmale gefunden werden. Ausgewertet wurde der Bereich von 404 bis 3577 Basenpaaren.

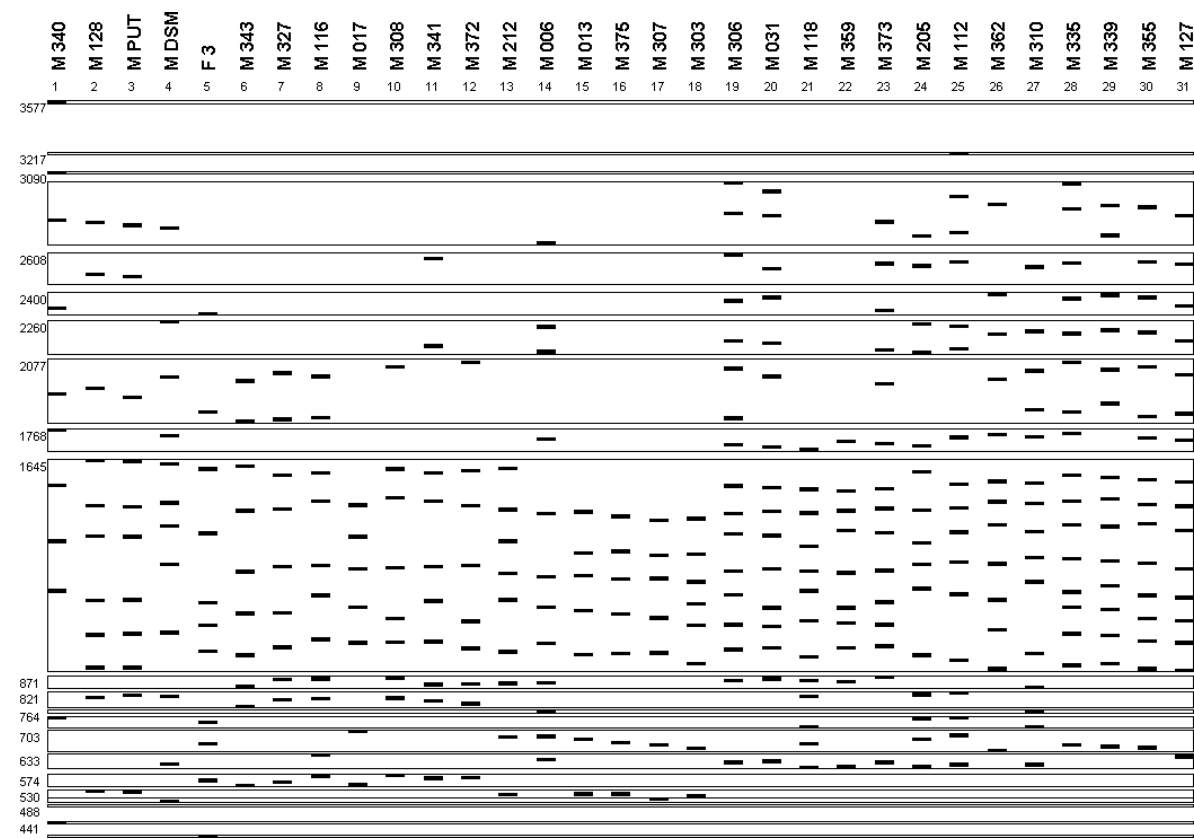


Abb. 59: Schematisiertes Gel des Primers ABA 18. Aufgetragen sind die Positionen der einzelnen Banden in den dazugehörigen Bins.

Tab. 28: Auflistung der Bins und ihrer Größe mit den darin enthaltenen Banden aus der PCR mit Primer ABA 18.

Bin	bp Range	M 340	M 128	M PUT	M DSM	F 3	M 343	M 327	M 116	M 017	M 308	M 341	M 372	M 212	M 006	M 013	M 375	M 307	M 303	M 306	M 031	M 118	M 359	M 373	M 205	M 112	M 362	M 310	M 335	M 339	M 355	M 127	
1	3577-3577	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	3217-3217	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
3	3090-3090	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	3029-2671	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5	2608-2454	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
6	2400-2300	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
7	2260-2113	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	2077-1805	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
9	1768-1688	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
10	1645-892	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	871-840	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
12	821-780	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
13	764-762	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
14	745-718	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
15	703-647	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
16	633-598	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+

Fortsetzung Tab. 28:

[illegible]

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Krohn danke ich für die Möglichkeit, im Fachbereich Chemie und Chemietechnik, der Universität-Gesamthochschule Paderborn, promovieren zu können.

Herrn Prof. Dr. Paul danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit im Labor für Biotechnologie und Qualitätssicherung sowie für die kritischen und konstruktiven Diskussionen über meine Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Masuch danke ich für die freundliche Übernahme der Aufgabe des dritten Prüfers und Herrn Prof. Dr. Grote für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Firma Nebelung GmbH, besonders bei Herrn DeDoes, für die gute Zusammenarbeit bei der Sammlung des Pflanzenmaterials, den durchgeführten Inokulationen sowie der Überlassung von Saatgut.

Den Mitarbeitern des Labores für Biotechnologie und Qualitätssicherung danke ich für die gute Zusammenarbeit, Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie – Marlene, Merlin und Josefine – die mir während dieser Zeit verständnisvoll zur Seite stand.