

Entwicklung eines neuartigen *in vitro* Testsystems zur Überprüfung
der Wirkungen von Fungiziden auf Konidienkeimung sowie Bildung
von Appressorien und Penetrationshyphen bei *Venturia inaequalis*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Katja Schulze

aus

Hameln

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Lukas Schreiber
2. Referent: Prof. Dr. Jörg Schönherr

Tag der Promotion: 31.01.2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

1	Einleitung	1
1.1	<i>Venturia inaequalis</i>	3
1.1.1	Die Biologie des Erregers.....	3
1.1.2	Symptome.....	4
1.1.3	<i>In vitro</i> -Testsysteme für das Pathosystem <i>Malus/V. inaequalis</i>	6
1.2	Die Cuticularmembran.....	8
1.3	Zielsetzung der Arbeit	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Material.....	11
2.1.2	Geräte	11
2.1.3	Materialien	12
2.1.4	Chemikalien	12
2.2	Methoden	13
2.2.2	Inokulumproduktion.....	13
2.2.2.1	Isolierung von <i>Venturia inaequalis</i> Einzelsporisolaten	13
2.2.2.2	Erhaltungskultur von <i>Venturia inaequalis</i> Einzelsporisolaten.....	13
2.2.2.2.1	Herkunftsliste der Isolate	13
2.2.3	Etablierung des Testsystems.....	14
2.2.3.1	Gewinnung von Cuticularmembranen (CMs).....	14
2.2.3.2	Herkunft der Cuticularmembranen.....	15
2.2.3.3	Konidienproduktion aus <i>Venturia inaequalis</i> Einzelsporisolaten	16
2.2.3.4	Färbemethoden, Fluoreszenzmikroskopie	16
2.2.3.5	Färbungen der Cuticularmembranen	17
2.2.3.6	Rasterelektronenmikroskopie.....	18
2.2.3.7	Inokulation der Membranen	18
2.2.3.8	Wasseragarkontrolle	18
2.2.3.9	Zeitlicher Ablauf der Keimung und Appressorienbildung	19
2.2.3.10	Konidienkeimung und Penetration auf CMs verschiedener anfälliger und resistenter Apfelsorten sowie Nichtwirten für <i>Venturia inaequalis</i>	19
2.2.3.11	Konidienkeimung und Penetration auf CMs unterschiedlicher Dicke	20
2.2.4	Anwendung des Testsystems	20

2.2.4.1	Testung von Calciumhydroxid, Calciumcarbonat, Kaliumcarbonat und Alkylpolyglukosiden	20
2.2.4.2	Testung von Resveratrol und Piceid bei simultaner und präinfektiöser Applikation	21
2.2.4.3	Testung von Saccharoseoctanoat bei simultaner Applikation	23
2.2.5	Begleitende Untersuchungen	23
2.2.5.1	Effekt der Boraxbehandlung	23
2.2.5.2	Inokulation von der morphologischen Innenseite	24
2.2.5.3	Inokulation von Blattscheiben anfälliger und resistenter Apfelsorten	24
2.2.5.4	Wachsextraktion aus Cuticularmembranen	25
2.2.5.4.1	Wachsextraktion und Bestimmung der Wachsbestandteile mittels GC/MS	25
2.2.5.4.2	Untersuchung des Wachsgehalts verschiedener CMs	25
2.2.5.4.3	Vergleich der Penetration auf CMs und MXs	26
2.2.5.5	DNA-Isolierung aus Einzelsporisolaten	26
2.2.5.6	RAPD-PCR mit DNA aus Einzelsporisolaten	27
2.2.5.7	Erstellung eines Stammbaumes	28
3	Ergebnisse und Diskussionen	29
3.1	Abschnitt A: Entwicklung und Etablierung des Testsystems	29
3.1.1	Inokulumproduktion	29
3.1.2	Isolation von <i>Venturia inaequalis</i> Einzelsporisolaten	29
3.1.2.1	Konidienproduktion aus <i>Venturia inaequalis</i> Einzelsporisolaten	30
3.1.3	Entwicklung des Testsystems	30
3.1.3.1	Färbemethoden, Fluoreszenzmikroskopie	31
3.1.3.2	Färbungen der Cuticularmembranen	37
3.1.3.3	Rasterelektronenmikroskopie	38
3.1.3.4	Untersuchungen zur Konidienkeimung	41
3.1.3.5	Wasseragarkontrolle	42
3.1.3.6	Zeitlicher Ablauf der Keimung, Appressorienbildung und Penetration auf CMs	42
3.1.3.7	Konidienkeimung und Penetration auf CMs verschiedener anfälliger und resistenter Apfelsorten sowie Nichtwirten für <i>Venturia inaequalis</i>	43
3.1.3.8	Konidienkeimung und Penetration auf CMs unterschiedlicher Dicke	46
3.1.4	Diskussion des Abschnittes A: Entwicklung des Testsystems	48
3.2	Abschnitt B: Anwendung des Testsystems	55
3.2.1	Wirkung von Calciumhydroxid, Calciumcarbonat, Kaliumcarbonat und Alkylpolyglukosiden 55	
3.2.2	Wirkung von Resveratrol und Piceid	60

3.2.3	Wirkung von Saccharoseoctanoat (SO).....	64
3.2.4	Diskussion des Abschnittes B: Anwendung des Testsystems.....	65
3.3	Abschnitt C: Begleitende Untersuchungen	75
3.3.1	Effekt der Boraxbehandlung.....	75
3.3.2	Wachsextraktion aus Cuticularmembranen	76
3.3.2.1	Untersuchung des Wachsgehalts verschiedener CMs.....	76
3.3.2.2	Wachsextraktion und Bestimmung der Wachsbestandteile mittels GC und MS.....	77
3.3.2.3	Vergleich der Penetration auf CMs und MXs.....	77
3.3.3	Inokulation von der morphologischen Innenseite	79
3.3.4	Inokulation von Blattscheiben anfälliger und resistenter Apfelsorten	82
3.3.5	DNA-Isolierung aus Einzelsporisolaten.....	84
3.3.5.1	RAPD-PCR mit DNA aus Einzelsporisolaten.....	84
3.3.5.2	Erstellung eines Stammbaumes	87
3.3.6	Diskussion des Abschnittes C: Begleitende Untersuchungen	88
4	Zusammenfassung	98
5	Literatur	I

Abbildungen

Abbildung 1. Der Zyklus von <i>Venturia inaequalis</i> auf seinem Wirt <i>Malus</i>	4
Abbildung 2: Befallsbild des Apfelschorfs an Blättern und Frucht	4
Abbildung 3: Bestehende Testsysteme für <i>V. inaequalis</i>	7
Abbildung 4: Übersicht diverser <i>in vitro</i> -Systeme für die Untersuchung der Morphologie verschiedener phytopathogene Pilze.	7
Abbildung 5: Diagramm einer Blattcuticula.	8
Abbildung 6: Übersicht der Morphologie der Hyphen und des Stromas von <i>V. inaequalis</i> auf Cellophan, Agar, isolierten CMs und in Blättern mit natürlichen Infektionen	35
Abbildung 7: REM-Aufnahmen von gekeimten <i>V. inaequalis</i> -Konidien auf einer CM von ,Gloster'	38
Abbildung 8: REM-Aufnahmen der morphologischen Innenseiten von mit <i>V. inaequalis</i> infizierten CMs der Sorte ,Relinda'	40
Abbildung 9: Korrelation zwischen Sporenanzahl und Appressorienbildung auf isolierten CMs	41
Abbildung 10: Keimschlauchwachstum auf Wasseragar.	42
Abbildung 11: Verlauf der Konidienkeimung auf CMs.....	43
Abbildung 12: Appressorienbildung auf CMs verschiedener Apfelsorten und <i>M. baccata</i>	44
Abbildung 13: Keimraten auf CMs verschiedener Nichtwirte und <i>Malus x domestica</i> ,Golden Delicious'	45
Abbildung 14: Penetrationsraten auf CMs verschiedener Apfelsorten und <i>M. baccata</i> und <i>Pyrus communis</i> ,Conference'	46
Abbildung 15: Einfluss des Gewichts der CMs auf den Anteil von durchgewachsenen und in die CM gewachsenen Penetrationshyphen bei ,Alkmene' (linke Spalte) und ,James Grieve' (rechte Spalte).....	47
Abbildung 16: Kurative Wirkung von Plantacare 1200 UP und Ca(OH) ₂ auf <i>Venturia</i> <i>inaequalis</i> Sporen und Keimhyphen auf CMs von <i>S. floribunda</i>	56

Abbildung 17: Die kurative Wirkung von Plantacare 1200 UP und Glucopon 215 CSUP in verschiedenen Konzentrationen auf das Längenwachstum von <i>V. inaequalis</i> -Keimschläuchen auf CMs (<i>S. floribunda</i>).....	59
Abbildung 18: <i>Venturia inaequalis</i> Konidien auf Kontroll-CMs und mit Resveratrol angereicherten CMs 72 h nach der Sporenapplikation.....	61
Abbildung 19: Einfluss des Resveratrolglukosids, Piceid, auf die Konidienkeimung nach simultaner Applikation auf die CMs.	62
Abbildung 20: Wirkung des Piceids auf die Penetrationsrate der Sporen bei simultaner Applikation.	63
Abbildung 21: Die Wirkung von Saccharoseoctanoat auf Konidien des Isolats 15 (oben) und des Isolats Gl 03 F (unten).....	64
Abbildung 22: Einfluss einer Boraxbehandlung nach der enzymatischen Isolierung von CMs aus und jungen ‚Gloster‘-Blättern	75
Abbildung 23: Anteil des löslichen Wachses am Gesamtgewicht der CMs.	76
Abbildung 24: Bestandteile der extrahierten Wachsfraktionen.....	77
Abbildung 25: Vergleich der Keimung auf CMs und MXs.	78
Abbildung 26: Vergleich der Penetration auf CMs und MXs.....	79
Abbildung 27: Penetrationsraten nach Inokulation von der morphologischen Außen- und Innenseite.....	80
Abbildung 28: Vergleich der Penetration von der Außen- und Innenseite auf CMs von <i>P. communis</i> ‚Conference‘ (A-C) und Penetrationsstrukturen von Konidien auf Blattscheiben der Sorte ‚Topaz‘ (D und E).	81
Abbildung 29: Flächeninhalte der Infektionsstrukturen auf Blattscheiben alter und jüngerer Blätter der Sorte ‚Topaz‘	83
Abbildung 30: Amplifizierte DNA-Fragmente nach RAPD-PCR mit 7 verschiedenen Primern	84
Abbildung 31: Matrix nach RAPD-PCR mit 7 verschiedenen Primern / Auswertung des Agarosegel zur Erstellung eines Stammbaumes.....	86
Abbildung 32: Stammbaum, der aus der Matrix aus Abb. 31 erstellt wurde und Herkunftsliste der Isolate	87

Tabellen

Tabelle 1: Herkunft der <i>V. inaequalis</i> Isolate.....	14
Tabelle 2: Herkunft und Merkmale der verwendeten CMs.....	15
Tabelle 3: Reaktionsgemisch für die PCR-Ansätze	27
Tabelle 4: PCR-Bedingungen.....	28
Tabelle 5: Konidienproduktion der untersuchten Isolate	30
Tabelle 6: Färbung der CM mit verschiedenen Farbstoffen.....	37
Tabelle 7: Der Einfluss einer präinfektiösen Behandlung mit Ca(OH) ₂ , K ₂ CO ₃ und Plantacare 1200 UP auf die Vitalität der Sporen von <i>Venturia inaequalis</i>	57
Tabelle 8: Der Einfluss einer kurativen Behandlung mit Ca(OH) ₂ , CaCl ₂ und K ₂ CO ₃ in verschiedenen Konzentrationen auf die Vitalität der Keimhyphen von <i>Venturia inaequalis</i> auf CMs (<i>S. floribunda</i>)	58
Tabelle 9: Der Einfluss des pH-Wertes und der Konzentration von Plantacare 1200 UP bei kurativer Applikation auf die Vitalität der Keimhyphen von <i>Venturia inaequalis</i> auf CMs (<i>S. floribunda</i>).....	59
Tabelle 10: Prozentuale Hemmung der Keimung und Penetration bei Prä- und simultaner Applikation von Resveratrol und Piceid.....	63

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ap	Appressorium
APG	Alkylpolyglukosid
AS	Außenseite
bp	Basenpaare
BS	Blattscheiben
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope (Konfokales Laserscanningmikroskop)
CM(s)	Cuticular Membrane (-s)/Cuticularmembran (-en)
co	Conidia (Konidie)
cos	coralloide Strukturen
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	days (Tage)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Dinatriumsalz Dihydrat
EtOH	Ethanol
FDA	Fluoresceindiacetat
f. sp.	formae specialis
FT	Farbteiler
FW	fresh weight (Frischgewicht)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
gt	germ tube (Keimschlauch)
h	hours (Stunden)
HMC	Haustorial Mother Cell (Haustorienmutterzelle)
IS	Innenseite
iso	Isolat
IZMB	Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik der Universität Bonn
K _{CW}	Cuticula/Wasser-Verteilungskoeffizient
LP	Long Pass (Sperrfilter)
LM	Lichtmikroskop
M	Mol

min	Minute
mm	Millimeter
MS	Massenspektroskopie
MX(s)	Polymer Matrix Membran (-en)
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase Kettenreaktion)
PDA	Potatoe Dextrose Agar
PDB	Potatoe Dextrose Broth
PSM	Pflanzenschutzmittel
Ø	Durchmesser
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
se	Septum
SO	Saccharoseoctanoat
st	Stroma
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
UV	Ultraviolet
v/v	volume per volume (Volumenanteil pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewichtsanteil pro Volumen)

1 Einleitung

Apfelschorf, verursacht durch den Pilz *Venturia inaequalis* Cke. (Wint), ist die bedeutsamste Krankheit des Apfels (*Malus x domestica* Borkh.) weltweit (MACHARDY 1996). Auch wenn der Befall für die Pflanze selbst nicht lebensbedrohlich ist, wie beim Wirt/Pathogen-System *Malus/Venturia inaequalis*, ist doch für den Anbauer der Befall nur bis zu einer ökonomischen Schadschwelle vertretbar. Diese ist aufgrund der Nichtvermarktungsfähigkeit von schorfbefallenen Äpfeln bei *V. inaequalis* sehr niedrig anzusetzen. Alle wirtschaftlich relevanten Sorten von *Malus x domestica* sind schorfanfällig. Es wird zwar versucht, bereits bekannte Resistenzgene in wirtschaftlich bedeutende Sorten einzukreuzen, doch ist damit zu rechnen, dass auch diese Resistenzen durch Anpassung des Pilzes, der jährlich eine sexuelle Rekombination durchläuft, überwunden werden können (FISCHER UND FISCHER 2002). Die Resistenz durch V_f aus dem Wildapfel *Malus floribunda* Klon 821 ist derzeit die am weitesten verbreitete. Diese wurde jedoch bereits von *V. inaequalis* überwunden (PARISI ET AL. 1993, MACHARDY 1996, FISCHER ET AL. 1998). Daher bleibt der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln neben Kulturmaßnahmen zur Bekämpfung von Apfelschorf unersetzlich.

In Deutschland müssen bis zu 20 Spritzungen pro Saison gegen den Apfelschorferreger erfolgen (SCHNABEL UND PARISI 1997). Die eingesetzten Fungizide haben protektive oder kurative Wirkung. Es sind keine Resistenzen gegen die protektiven Fungizide wie Kupfer, Schwefel oder Carbamate bekannt, was auf deren vielseitigen Wirkmechanismen beruht. Der Nachteil dieser PSM ist die geringere Effizienz, fehlende Persistenz und fehlende systemische Wirkung. Die gegen *V. inaequalis* eingesetzten kurativen Fungizide führten in der Vergangenheit zu Resistenzproblemen (SCHNABEL UND PARISI 1997).

Als Beispiel dient die Resistenzentwicklung von *V. inaequalis* gegen das Benzimidazol Benomyl, einen Mitosehemmer, dessen Wirkung auf der Bindung an Tubulin beruht. Benomyl wurde in den 1970ern eingeführt und hat zunächst exzellente Kontrollen geboten, führte aber im dritten Jahr der intensiven Ausbringung in Michigan zum Versagen der Kontrollwirkung. Genetische Untersuchungen zeigten, dass die Resistenz durch ein einziges Gen in *V. inaequalis* (Punktmutation) hervorgerufen wurde (KÖLLER ET AL. 1982, KOENRAADT ET AL. 1992). Es handelte sich dabei um die Mutation eines einzigen Basenpaars des β -Tubulin-Gens (KOENRAADT ET AL. 1992).

Die DMI's (Sterolbiosynthesehemmer) zu denen die Pyridine, Pyrimidine, Triazole und Imidazole gehören, haben nur einen Wirkort Sie hemmen die C-14 Demethylierung des 24-Methylendihydrosterol während der pilzlichen Sterolbiosynthese, und können daher durch

Anpassung des Pilzes zu Resistenzen führen (SIEBELS UND MENDGEN 1994, KUNZ ET AL. 1997, OLAYA UND KÖLLER 1999, SCHNABEL UND JONES 2001). Die Resistenz zu den DMI's ist unter multigener Kontrolle und erhöht sich graduell durch die additive Wirkung der verschiedenen Resistenzgene. Daher nimmt die Anfälligkeit von *V. inaequalis* gegen DMI's stetig ab (KUNZ ET AL. 1997).

Kresoxim-Methyl und Trifloxistrobin, die zur Klasse der Strobilurine gehören, funktionieren als Atmungshemmer durch Bindung an das Q_o-Zentrum (Ubiquinonoxidationszentrum) des mitochondrialen Cytochrom *b* (KÜNG FÄRBER ET AL. 2002). Auch wenn zunächst in Laborversuchen die Resistenzentwicklung von *V. inaequalis* gegen die Strobilurine noch nicht zu erkennen war (KUNZ ET AL. 1998), konnte anhand jüngerer Versuche gezeigt werden, dass sich auch gegen die Strobilurine Resistenzen entwickeln könnten (KÜNG FÄRBER ET AL. 2002). Dies ist auch ein großes Problem im Alten Land, Nordeuropas größtem, zusammenhängendem Apfelanbaugebiet. Hier traten nach häufiger Anwendung des Mittels Discus[®] mit dem Wirkstoff Kresoxim-Methyl ab 1997 Resistenzen gehäuft auf.

Im biologischen Anbau sind keine kurativen Mittel mit systemischer Wirkung zugelassen, was die Anbauer auf Kontaktfungizide beschränkt, die auch im integrierten und konventionellen Anbau noch Verwendung finden. Elementarer Schwefel ist das älteste Fungizid, er wurde schon 1000 v. C. von Homer erwähnt (WILLIAMS UND COOPER 2004). Daneben wird im Apfelanbau Kupfer eingesetzt (PALMER ET AL. 2003). Der Einsatz von Kupferpräparaten führt allerdings zur Akkumulation von Kupfers im Boden. Aufgrund der toxischen Auswirkung des Kupfers auf Mikroorganismen und Regenwürmern ist dies sehr problematisch (RAW 1962, KULA 1999, GOLBA 2002 als Zusammenfassung zur Situation im Alten Land).

Ein weiterer Ansatz ist die biologische Schorfbekämpfung mit Hilfe von Antagonisten, die direkt oder indirekt hemmend auf *V. inaequalis* wirken (BURR ET AL. 1996, PHILION ET AL. 1997, OUMET ET AL. 1997, FISS 2001). Die direkte Bekämpfung des parasitischen Stadiums ist im Gegensatz zur Bekämpfung des saprophytischen Stadiums im Falllaub noch nicht sehr Erfolg versprechend (FISS 2001, CARISSE UND DEWDNEY 2002). Die Bekämpfung des Pilzes mit Antagonisten ist kommerziell nur sinnvoll umzusetzen, wenn die Effizienz mit einer ökonomisch realen Dosis erreicht würde und ein Präparat davon ebenso einfach auszubringen wäre wie konventionelle Fungizide. Im Falle von *Athelia bombacina*, eines Basidiomyceten, der in verschiedenen Versuchen eine sehr gute Hemmung des Myzelwachstums und der Pseudothecienentwicklung von *V. inaequalis* erreichte, treten unter diesen Voraussetzung gravierende Probleme auf. Zur effizienten Reduktion der Pseudothecien ist eine bedeutende

Inokulmmenge nötig doch die industrielle mengenmäßige Produktion von Basidiomyceten ist sehr kostspielig (HEYE UND ANDREWS 1983, CARISSE UND DEWDNEY 2002). Da den natürlichen Antagonisten von *V. inaequalis* bei der Anwendung bislang noch Grenzen gesetzt sind, muss auch im biologischen Anbau weiterhin auf die chemische Bekämpfung gesetzt werden.

In dieser Arbeit sollte ein neues *in vitro*-System zur Testung von potentiellen schorfhemmenden Wirkstoffen auf die Keimung, Appressorienbildung und Penetration von Konidien von *V. inaequalis* entwickelt werden. Es sollte dazu dienen, den Erfolg von Behandlungen vor dem Freilandeinsatz abzuschätzen.

1.1 *Venturia inaequalis*

1.1.1 Die Biologie des Erregers

V. inaequalis Pilz wechselt in seinem Lebenszyklus zwischen der parasitischen und saprophytischen Lebensweise. Es handelt sich um einen heterothallischen, haploiden Ascomyceten, der sich sexuell und asexuell vermehrt. *V. inaequalis* ist hermaphroditisch und selbststeril und besitzt zwei Kompatibilitätsgruppen. Diese beiden Typen werden als Plus (+) und Minus (-) bezeichnet (BOONE 1971, TENZER UND GESSLER 1997). Nach Blattfall im Herbst in einer kurzen saprophytischen Phase und anschließendem vegetativen Wachstum bildet *V. inaequalis* seinen Fruchtkörper, das Pseudothecium aus. Der Erreger überwintert im Falllaub. Abbildung 1 zeigt den Zyklus von *V. inaequalis*. Die Pseudothecien setzen im Frühjahr bei Niederschlägen Ascosporen frei, welche für die Primärinfektionen von Blatt- und Blütenknospen, die von Ende März bis Mitte Mai stattfinden, verantwortlich sind. Die Freisetzung der Ascosporen wird durch Licht stimuliert, so dass sie tagsüber am größten ist. Die Sporen gelangen dabei vom Falllaub durch Regentropfen und Wind auf Blatt- und Blütenknospen (MACHARDY 1996). Tropfbares Wasser auf der zu infizierenden Blattfläche ist die wichtigste Voraussetzung für das Auskeimen von Ascosporen und Konidien, während die weitere Entwicklung des Pilzes hauptsächlich von der Temperatur abhängt. (AYLOR UND SANOGO 1997). Konidien bilden unter gleichen Voraussetzungen schneller Keimhyphen und Appressorien als Ascosporen (TURNER ET AL. 1986). Das Hyphenwachstum zwischen Cuticula und Epidermiszellen resultiert in der Ausbildung eines Stromas und führt schließlich zur Entstehung von Konidienträgern und Konidien, die die Cuticula durchbrechen. (WINTER ET AL. 1992, MACHARDY 1996).

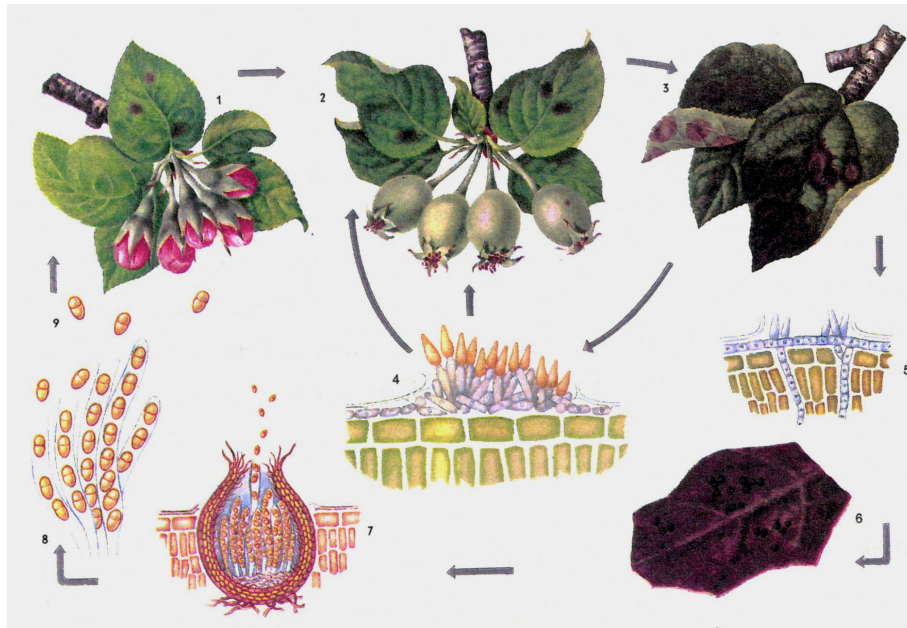


Abbildung 1. Der Zyklus von *Venturia inaequalis* auf seinem Wirt *Malus*.

1 = Anfangsstadium (Primärbefall), 2 = Befall an Blatt und Frucht (Sekundärbefall), 3 = starker Befall, 4 = Konidien, die von subcuticularem Myzel gebildet werden, 5 = Ins Blattinnere wachsendes Myzel nach Blattfall, 6 = Überwintertes abgestorbenes Blatt mit Perithezien, 7 = Reifes Perithecium mit Ascis, 8 = Ascis mit Ascosporen, 9 = Schwärmende Ascosporen, die Primärinfektionen auslösen. Nach PAUL (1981).

1.1.2 Symptome



Abbildung 2: Befallsbild des Apfelschorfs an Blättern und Frucht

Auf dem Blatt sind alte Läsionen zu erkennen. Der Konidienbelag auf der Oberfläche wurde bereits durch Regen abgewaschen. Die Frucht ist sehr stark befallen, durch die Schorfläsionen kam es zu Verkrustungen und Aufreißen der Schale.

Venturia inaequalis kann nur Arten von *Malus* erfolgreich befallen. Die Blätter und Früchte unterliegen der ontogenen Resistenz. Diese bewirkt, dass ältere Blätter und Früchte nicht

mehr befallen werden (KEITT UND JONES 1926, GESSLER UND STUMM 1984, MACHARDY 1986 zur Zusammenfassung). Die Natur dieser Resistenz ist noch nicht vollständig aufgeklärt, die morphologischen Prozesse ähneln denen der V_f - Resistenz (VALSANGIACOMO UND GESSLER 1988). Es gibt neuere Untersuchungen, die zeigen, dass sehr alte Blätter die ontogene Resistenz wieder verlieren bzw. eine sehr lange Latenzphase haben (KOLLAR 1996, LI UND XU 2002). Neue Infektionen auf gelagerten Früchten sind unwahrscheinlich. Die Triebe und Knospenschuppen sind anfällig, bis Borke gebildet wird.

Die Symptome einer Schorfinfektion erscheinen auf Blättern, Früchten, Kelchblättern, (Blütenblättern), jungen Trieben und Knospenschuppen. Der Befall tritt bei Blättern auf beiden Seiten auf (MACHARDY 1996). Auf der Blattoberseite zeigen sich demgegenüber sehr scharf definierte, annähernd kreisförmige, olivgrüne, samtartige Flecken mit diffusem Rand, die einen Durchmesser bis zu etwa einem cm erreichen (Abb. 2). Auf der Blattunterseite zeigt sich der Befall als diffuse Läsionen entlang der Mittelrippe mit unregelmäßigen, wenig abgegrenzten Rändern. Mit der Zeit trocknet das Befallszentrum aus oder es vernarbt. Stark befallene Blätter werden häufig vorzeitig abgeworfen. Junge Früchte sind am anfälligsten, und Infektionen auf jungen Äpfeln führen zu den größten Läsionen. Im Bereich einer Läsion platzt die Fruchtschale auf und die Äpfel verkorken, um den Wasserverlust zu verhindern (Abb. 2). Das Korkgewebe kann dem Wachstum der Früchte nicht folgen, so dass diese deformieren und schließlich aufreißen können (WINTER ET AL. 1992, MACHARDY 1996, SCHWABE ET AL. 1984). Die Läsionen entwickeln sich langsamer, wenn der Befall spät auftritt und können sich auch erst im Verlauf der Lagerung zeigen (Lagerschorf) (PAUL 1981, MOOSHERR UND KENNEL 1995, MACHARDY 1996).

Der Hauptverlust für den Obstbauer entsteht durch reduzierte Qualität infizierter Früchte, aber der Befall beeinträchtigt den gesamten Baum und die Ernte. Starke Infektionen können den Fruchtansatz verhindern. Infektionen während der Blüte oder kurz danach können zum Fruchtabwurf führen. Befallene Früchte im Lager bieten Eintrittspforten für Fäulniserreger. Ein starker Blattbefall führt zur Entlaubung und somit einer Schwächung des gesamten Wuchses, wodurch der Blüten-, Knospen- und Fruchtansatz für die folgende Vegetationsperiode eingeschränkt wird (MACHARDY 1996, KOLLAR 1997).

1.1.3 *In vitro*-Testsysteme für das Pathosystem *Malus/V. inaequalis*

Die meisten *in vitro*-Systeme für die Wirksamkeit von fungiziden Wirkstoffen beruhen derzeit auf Agartests. Dabei wird meist das Myzelwachstum und die Keimung der Konidien bonitiert (STEINFELD ET AL. 2001, KÜNG-FÄRBER ET AL. 2002). Ein wesentlicher Nachteil dieser Tests beruht auf der fehlenden Appressorienbildung auf Agar. Dies wurde auch an anderen appressorienbildenden Pathogenen wie *Magnaporthe grisea* und *Colletotrichum graminicola*, beobachtet (XIAO ET AL. 1994, HOWARD 1997, CHAKY ET AL. 2001).

Die Aussagefähigkeit von Agartests bezüglich der Einflüsse auf Appressorien und Infektionsstrukturen von *V. inaequalis* sind daher beschränkt. Jedoch sind dies die wesentlichen Targets bei der Apfelschorfbekämpfung. Eine erfolgreiche Infektion setzt die Appressorienbildung und Penetration voraus. Für weitergehende Aussagen eines Systems, d.h. über die Appressorienbildung und Penetration, muss die Pathogenentwicklung so nah wie möglich am natürlichen System bleiben. Für solche Untersuchungen bietet sich ein auf natürlichen Wirtsoberflächen basierendes System an.

Kompatibilitäts- und Resistenzuntersuchungen von *V. inaequalis* und seinem Wirt *Malus* wurden an verschiedenen *in vitro*-Testsysteme unternommen. Diese sind in der Abb. 3 zusammengefasst. NICHOLSON ET AL. (1972) begannen mit den Untersuchungen an etiolierten Apfelsämlingen. Der Vorteil dieser Methode lag an der durch fehlende Pigmenten im Spross vereinfachten Mikroskopie. Nachteilig war die abweichende Morphologie der Cuticula von etiolierten Sprossen und intakten Blättern. Apfelkallussysteme und Sprossspitzenkulturen produzierten Artefakte wie superfiziell wachsendes Myzel und abnorm lange Keimschläuche (BEECH UND GESSLER 1986, YEPES UND ALDWINCKLE 1993). Die Ergebnisse, die an ganzen Blättern und Blattscheiben zur differentiellen Resistenz gegenüber Rassen von *V. inaequalis* gewonnen wurden, stimmten mit denen von intakten Pflanzen überein (BÉNAOUF UND PARISI 1998).

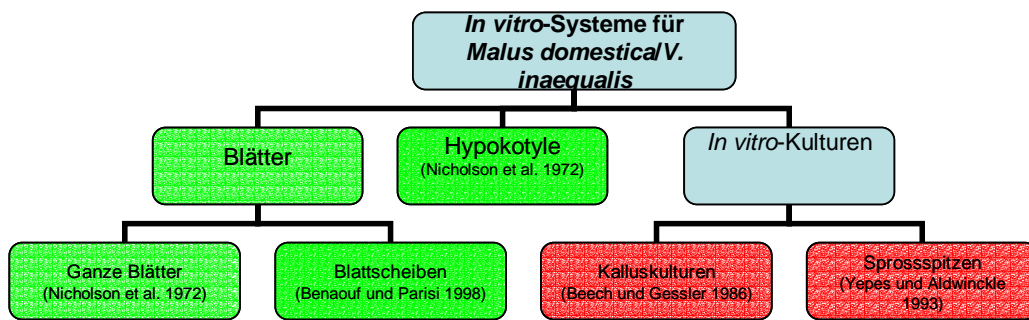


Abbildung 3: Bestehende Testsysteme für *V. inaequalis*.

Bei grün unterlegten Feldern konnten bei Kompatibilitätsuntersuchungen die gleichen Beobachtungen wie an intakten Blättern gemacht werden. Die rötlich unterlegten Felder bezeichnen Methoden, bei denen das System unterschiedliche Ergebnisse zu intakten Blättern geliefert hat.

Auf künstlichen Oberflächen beschränkten sich Untersuchungen phytopathogener Pilze meist auf morphologische Analysen der Keimung und Appressorienbildung. Abb. 4 gibt einen Überblick.

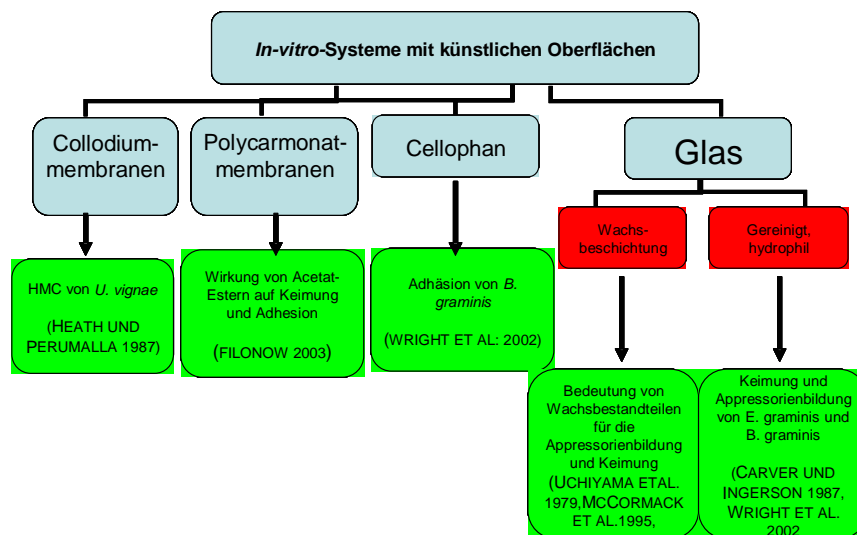


Abbildung 4: Übersicht diverser *in vitro*-Systeme für die Untersuchung der Morphologie verschiedener phytopathogene Pilze.

Hier dienen verschiedene Farbumterlegungen zur Unterscheidung der Systeme.

In dieser Arbeit sollten die Vorteile eines Systems, das auf naturidentischen Oberflächen beruht, mit denen reiner Labortests verbunden werden. Bei den hier verwendeten naturidentischen Oberflächen handelt es sich um Cuticularmembranen (CMs).

1.2 Die Cuticularmembran

Alle Oberflächen von höheren Landpflanzen sind, sofern sie nicht verkorkt sind, von einer Cuticula bedeckt. Die Hauptbarriere für die Diffusion von Wasser stellen die darin eingelagerten cuticulären Wachse dar (RIEDERER UND SCHÖNHERR 1986, RIEDERER UND SCHREIBER 1995, JENKS 2002 als Zusammenfassung). Bei *Malus domestica* sind Blätter, Blattstiele, Früchte und junge Zweige von einer Cuticula bedeckt.

Die Cuticula ist eine komplexe, chemisch heterogene Struktur aus drei verschiedenen Schichten. Die äußere besteht aus in organischen Lösungsmitteln löslichem epicuticularem Wachs. Darauf folgt die eigentliche Cuticula, auch ‚Cuticle Proper‘ genannt und die Cuticularschicht (HOLLOWAY 1982).

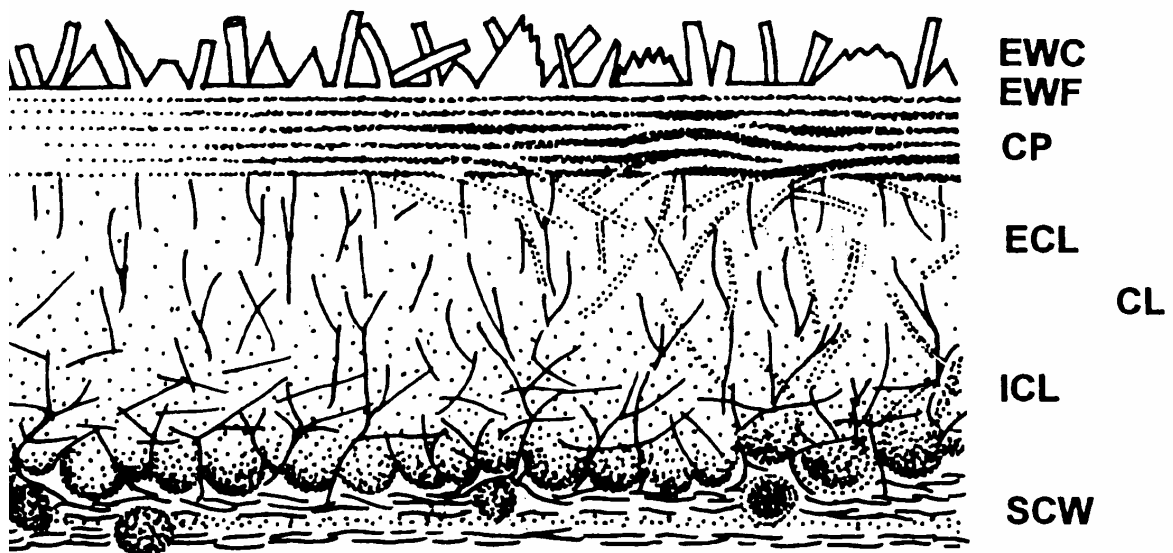


Abbildung 5: Diagramm einer Blattcuticula.

Nach JEFFREE (1996). EWC= Kristallines epicuticuläres Wachs, EWF= Epicuticulärer Wachsfilm, CP= Cuticle Proper, ECL= Externe Cuticularschicht, CL= Cuticularschicht, ICL= Innere Cuticularschicht, SCW= sekundäre Zellwand

Die unlösliche Cuticularmatrix (MX) stellt das Gerüst der Cuticula dar. Sie erscheint in TEM-Aufnahmen amorph oder lamelliert. In den meisten Pflanzen besteht die Matrix aus dem Biopolymer Cutin, einem hochmolekularem Polyester aus verschiedenen miteinander veresterten C_{16} und C_{18} Hydroxfettsäuren. Die Fettsäuren können untereinander noch mit Peroxyd- und Etherbrücken verbunden sein (VAN DEN ENDE UND LINSKENS 1974).

Die in und auf diese Matrix angelagerten Wachse setzen sich aus langkettigen und extrem hydrophoben Lipiden zusammen. Die häufigsten Wachsbestandteile sind unverzweigte Alkohole und Alkane mit einer Kettenlänge von C_{25} bis C_{35} . Das epicuticuläre Wachs ist bei ver-

schiedenen Pflanzenarten heterogen in Form und chemischer Zusammensetzung (BAKER 1982, HOLLOWAY 1982, HOWARD 1997). Langkettige Aldehyde, Ketone, n-Alkylester und freie Fettsäuren kommen ebenfalls vor. In Blattwachsen von *Malus* spp. konnten variierende Gehalte der Phenole Phloridzin, Phloretin, Quercetin und Quercetrin gefunden werden (TAIZ UND ZEIGER 2000, BAKER 1982).

Die innere Cuticularschicht besteht hauptsächlich aus Polysacchariden und cuticulären Lipiden. Sie stellt das HauptSorptionskompartiment für lipophile Stoffe, z. B. Phenole, dar (SCHÖNHERR UND RIEDERER 1989).

Die Fettsäurezusammensetzung der Cuticularmembran von Früchten ist ähnlich wie in Blättern, jedoch sind Fruchtcuticeln üblicherweise dicker und komplexer aufgebaut (VAN DEN ENDE UND LINSKENS 1974, VILLENA ET AL. 1999, TAIZ UND ZEIGER 2000).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der oben erwähnten Resistenzen des Erregers gegenüber bestehenden fungiziden Wirkstoffen, der Überwindung von ephemeren Resistenzen und einer fehlenden umfassenden Kontrolle durch Kulturmaßnahmen oder Antagonisten, wird es zukünftig weiterhin den Bedarf des Screenings von neuen Wirkstoffen gegen *V. inaequalis* geben.

Gewächshaus oder Freilandversuche zur Testung von Wirkstoffen sind sehr aufwändig. Neben dem erhöhten Arbeits- und Zeitaufwand gegenüber Laboruntersuchungen haben Feldversuche weitere Nachteile. Die Versuche sind von Umwelteinflüssen wie Temperatur und Niederschlag abhängig. Dies führt gleichzeitig zu Schwierigkeiten bei der Normierung von Wiederholungen. Die Rassenbildung lokaler Populationen kann ebenfalls zu Komplikationen führen. Laboruntersuchungen liefern einheitliche Bedingungen und sind platzsparend (CONNER 2002, MERZ ET AL. 2004).

Laborversuche ersetzen die Feldversuche nicht, sollten aber zur Analyse der Wirksamkeit fungizider Substanzen vorgeschaltet sein.

Der Autorin ist aus zugänglichen Quellen kein reines Labor-, d.h. *in vitro*-System für *V. inaequalis* unter Verwendung von isolierten CMs bekannt. Hier sollte ein System auf Basis von CMs entwickelt werden, welches die Vorteile eines *in vitro*-Systems mit denen eines *in vivo*-Systems (an lebenden Pflanzen durchgeführt) vereinen sollte. Isolierte CMs vereinen aufgrund ihrer naturidentischen Oberfläche und ihres inerten Charakters die Vorteile intakter

Blätter mit denen künstlicher Oberflächen. Die ist besonders bedeutsam in Hinsicht auf die Appressorienbildung und Penetration von *V. inaequalis*.

Die Übertragbarkeit *in planta* muss gegeben sein, um zu beweisen, dass es sich bei denen hier gefundenen Ergebnissen um echte Ergebnisse handelt.

Zunächst stand die Entwicklung des Systems im Vordergrund. Dazu sollten folgende Fragen geklärt werden: Wie lässt sich das System aufbauen? Wie soll die qualitative und quantitative Auswertung geschehen, und welche Boniturmöglichkeiten ergeben sich daraus? Ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das natürliche System *M. domestica/V. inaequalis* gegeben? Und schließlich: sind die Ergebnisse Indizien für eine potentielle praktische Anwendung des Systems? Nach Klärung dieser Fragen sollte die Anwendung des Systems getestet werden.

Die Arbeit gliedert sich in drei Teile, die den Verlauf der Untersuchungen widerspiegeln:

Abschnitt A befasst sich mit sämtlichen Versuchen, die zur Entwicklung des Systems durchgeführt wurden. Dies beinhaltet die Produktion eines sterilen Konidieninokulums, die Aufarbeitung der CMs für die Mikroskopie und Etablierung einer geeigneten Boniturmethode.

In Abschnitt B werden Versuche vorgestellt, die mit diesem Testsystem durchgeführt wurden. Verschiedene Substanzen wurden bezüglich ihrer suppressiven und fungiziden Wirkung auf Konidien, Keimschläuche, Appressorien und die Penetration und Stromaentwicklung von *V. inaequalis* untersucht. Die Stoffe hatten unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften, um die Möglichkeiten des Systems auszuloten.

Unter Abschnitt C sind begleitende Untersuchungen zusammengefasst, welche sich mit Fragen beschäftigen, die im Verlauf der Untersuchungen auftraten. Dazu gehörten die Analyse der Wachszusammensetzung von CMs, molekularbiologische Methoden und Untersuchungen an Blattscheiben zum Vergleich der Ergebnisse der CMs zu intaktem Blattgewebe.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.2 Geräte

Autoklav	Varioklav, H+P Labortechnik GmbH, D-Oberschleißheim
Agilent 6890N Capillary Gas Chromatograph	Agilent Technologies, D-Böblingen,
Brutschränke	Memmert, D-Schwabach
DB-1 Säulen	JW Scientific, Agilent Technologies, D-Böblingen
Digitalkamera	AxioCam, Zeiss, D- Göttingen
Flammenionisationsdetektor (FDI)	Agilent Technologies, D- Böblingen,
Gaschromatograph	Hewlett Packard, USA
Gelapparatur	BioRad, D-München
Geldokumentation	Protean IFP, Bio-RAD, München
HS-4 Rotor	Sorvall, Kendro, D-Langenselbold
Kugelmühle	Fritsch, D-Idar-Oberstein
Lichtmikroskop	AxioPlan, Zeiss, D- Göttingen
Ultra- Turrax	Janke+Kunkel, D-Staufen
Photometer DU-7500	Beckmann, D-München
Planktonzählkammer	Hydro-Bios, D-Kiel
Präzisionswaage	Sartorius, D- Göttingen
Rasterelektronenmikroskop	LEO 440i , Leica, D-Bensheim,
Schüttler	Heidolph, D-Schwabach
Stanzgerät	Berg&Schmidt Pressentechnik, D- Rem-seck

Sterilwerkbank	Kojair, F- Vilppula
Sputter Coater	SCD-040, Balzers, D-Wiesbaden
Thermocycler	MJ Research Gradient Cycler PTC-200
Vakuumpumpe	Büchi, Schweiz
Mikrowaage	Sartorius, D- Göttingen
Zentrifugen	Hermle, D-Wehingen

2.1.3 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien wurden im Wesentlichen von der Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Im Folgenden werden Materialien gesondert aufgeführt, die von anderen Herstellern erworben wurden.

Cellophanfolie	Pütz, D-Taunusstein
Glasflaschen	Schott, D-Mainz
Miraclloth	Calbiochem, (Merck, D-Darmstadt)
Petrischalen	Nerbe Plus, D- Winsen-Luhe

2.1.4 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden im Wesentlichen von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), und Fluka (CH- Buchs) bezogen. Im Folgenden werden Chemikalien gesondert aufgeführt, die von anderen Herstellern erworben wurden.

BSTFA	D- Macherey-Nagel
Fluorescein Diacetat	Riedel-de-Häen, D- Seelze
Glucopon 215 CSUP	Fluka, CH- Buchs
Glutaraldehyd	Agar Scientific Ltd., UK- Stansted
Immersionsöl	Carl Zeiss GmbH, D- Göttingen
Pektinase	Fruktozym P, Erbslöh, D- Geisenheim
Piceid	Apin Chemicals, UK- Oxfordshire
Potatoe Dextrose Agar/Broth	Difco USA- Sparks
Primer	INTERACTIVA Biotechnologie D- Ulm
Saccharoseoctanoat	AVA Chemical Ventures, USA- Portsmouth

2.2 Methoden

2.2.2 Inokulumproduktion

2.2.2.1 Isolierung von *Venturia inaequalis* Einzelsporisolaten

Von Läsionen, die von Blättern und Früchten stammten, welche einem natürlichen Schorfbefall unterlagen, wurden Einzelsporisolate gewonnen. Dazu wurden die in den Läsionen gebildeten Konidien durch Abschaben mit einer Pipettenspitze und 10 µL sterilem H₂O_{den.} vorsichtig abgelöst und nach mehrmaligem Aufnehmen und Ablassen in 5 mL H₂O_{den.} überführt. Aus dieser Stammlösung wurden zur Verdünnung 200 µL entnommen und in 5 mL H₂O_{den.} überführt, wobei dieser Schritt für eine weitere Verdünnung noch einmal wiederholt wurde. Die Lösungen wurden mit einem Glas-Drigalskispatel auf PDA-Platten ausgestrichen. Die nach fünf bis sieben Tagen erstmals sichtbaren Myzelien wurden auf PDA-Platten übertragen und diese Einzelsporisolate nach einem eigenen System durchnummeriert.

Potato Dextrose Agar (PDA)

PDA	39 g
H ₂ O _{dest}	1000 mL

2.2.2.2 Erhaltungskultur von *Venturia inaequalis* Einzelsporisolaten

Die Erhaltungskultur erfolgte durch regelmäßige Überimpfung der Einzelsporisolate auf PDA-Platten und -fläschchen durch Austanzen von Myzelscheibchen mit einem Korkbohrer wobei die Glasfläschchen mit einer Schrägagarschicht zur längeren Aufbewahrung bei 4°C im Dunkeln dienten.

2.2.2.2.1 Herkunftsliste der Isolate

Tabelle 1 gibt an, von welchen Sorten und Anbaugebieten die Isolate von *V. inaequalis* stammen. Einzelne Isolate gingen durch Verunreinigungen verloren und standen für weitere Versuche nicht mehr zur Verfügung.

Tabelle 1: Herkunft der *V. inaequalis* Isolate

Nr.	Quelle	Herkunft	Nr.	Quelle	Herkunft
V61	Cox Orange	Dossenheim, A. Koller	24	Elstar	Dossenheim
1	Elstar, Blatt1	Dossenheim	31	Golden Delicious	Bayer
2	Wildapfel*	Steinberg	32	Golden Delicious	Bayer
3	Elstar	Dossenheim	33	Apfel nr.3	Urania, HH
4	<i>Malus baccata</i>	Steinberg	34	Golden Delicious	Dossenheim
5	<i>Malus baccata</i>	Steinberg	35	Golden Delicious	Dossenheim
5 HC	Holsteiner Cox	Quellen Iso 15 / 36**	36	Gloster Delicious	Ruthe
6 HC	Holsteiner Cox	Quellen Iso 15 / 36	38	M9/ <i>M. baccata</i>	Steinberg
6	Elstar	Dossenheim	39	M9/Wildapfel	Steinberg/GWH
7	Elstar	Dossenheim	40	Golden Delicious	Bayer
9	M9/ <i>M. baccata</i> ***	Steinberg	41	Apfel nr.3	Urania, HH
10	M9/Wildapfel***	Steinberg/GWH	42	Golden Delicious	Bayer
11	Elstar	Dossenheim	43	Apfel nr.1	Urania, HH
13	Gloster ,99	Ruthe, -20°C****	44	Apfel nr.3	Urania, HH
14	unbekannt	unbekannt	45	Apfel nr.1	Urania, HH
15	Elstar	Dossenheim	46	Apfel nr.3	Urania, HH
16	M9/Wildapfel	Steinberg/GWH	49	Golden Delicious	Dossenheim
17	M9/ <i>M. baccata</i> .	Steinberg	50	Apfel nr.3	Urania, HH
18	<i>M. baccata</i>	Steinberg			
19	<i>M. baccata</i>	Steinberg			
22	M9/Wildapfel	Steinberg/GWH	GL 03 F	Gloster, eingefrorene Blätter aus 1999	Ruthe

* Dieser rotlaubige Wildapfel befindet sich auf dem Gelände des Instituts für Gemüse- und Obstbau in Sarstedt. Er ist jedes Jahr sehr stark schorfbefallen und früh entlaubt. Die Früchte sind auch rot und kirschgroß. Die genaue Sorte konnte nicht bestimmt werden.

** Eine ‚Holsteiner Cox‘ Pflanze wurde mit einer gemischten Konidiensuspension der Isolate 15 und 36 infiziert und von den daraus entstandenen sporulierenden Läsionen die beiden Einzelsporisolate HC₅ und HC₆ isoliert.

***Eine M9 Pflanze wurde mit einer Konidiensuspension von *M. baccata* bzw. des Wildapfels infiziert und von den daraus entstandenen sporulierenden Läsionen Einzelsporisolate isoliert.

**** eingefrorene Blätter wurden zu einem späteren Zeitpunkt zur Isolation von *V. inaequalis* herangezogen

2.2.3 Etablierung des Testsystems

2.2.3.1 Gewinnung von Cuticularmembranen (CMs)

Die Gewinnung von CMs erfolgte für die verschiedenen Apfelsorten und Nichtwirte analog. Zu Beginn der Arbeiten lagen einige CMs bereits vor, z. T. mussten sie isoliert werden. Dazu wurden Blattscheiben (BS) gemäß der Methode von SCHÖNHERR UND RIEDERER (1986) zunächst ausgetanzt, auf der Unterseite markiert und in einer 3%igen Pektinase-Lösung, die mit Citratpuffer (2 g·L⁻¹) und KOH_{ges.} auf pH 3 eingestellt wurde, vakuumfiltriert. Um Mikroorganismenbefall zu verhindern, versetzte man die Lösung mit 1 M·L⁻¹ Natriumazid (NaN₃) im Verhältnis 1/1000. Nach der Inkubation der BS bei Raumtemperatur für ein bis zwei Wochen wurde, bei sichtbar gelösten CMs, mit H₂O_{den.} gespült und die Unterseiten aussortiert. Die Extraktion freigesetzter und sorbierter Phenole erfolgte durch zweitägige

Extraktion freigesetzter und sorbierter Phenole erfolgte durch zweitägige Inkubation der CMs in 0,01 M·L⁻¹ Boraxpuffer. Anschließend wurde erneut gespült und die CMs zum Trocknen und Glätten auf Teflonblättchen gezogen. Die getrockneten und geglätteten CMs konnten bis zur weiteren Verwendung in Plastikdosen bei 4°C aufbewahrt werden.

2.2.3.2 Herkunft der Cuticularmembranen

Tabelle 2: Herkunft und Merkmale der verwendeten CMs

<i>Malus x domestica:</i>		
Quelle	Eigenschaften	Schorfresistenzgen
Alkmene	anfällig	-
Bramley's Seedling	anfällig	-
Gloster	anfällig	-
Golden Delicious	anfällig	Vg
Holsteiner Cox	anfällig	-
James Grieve	anfällig	polygen
Jonagold	anfällig	-
Reglindis	resistent	polygen
Reka	resistent	V _r
Relinda	resistent	V _f
Remo	resistent	V _f
Topaz	resistent	V _f
<i>Malus baccata</i>	resistent	Vb
<i>Nichtwirte</i>		
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch		
<i>Pyrus communis</i>		
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.		
<i>Hedera helix</i> L.		
<i>Ilex paraguariensis</i> St.-Hil.		
<i>Schefflera actinophylla</i> (Endl.) Harms		
<i>Stephanotis floribunda</i> Brongn.		

SILBEREISEN 1996, BENAOUF und PARISI 1998, FISCHER und FISCHER 2002

2.2.3.3 Konidienproduktion aus *Venturia inaequalis* Einzelsporisolate

Gemäß der Methode von PARKER ET AL. (1995) wurde Cellophanfolie in Scheiben von 8 cm Durchmesser über Nacht in $\text{H}_2\text{O}_{\text{den.}}$ eingeweicht und anschließend in mit Alufolie umwickelten Glaspetrischalen mit Filterpapier zur Trennung der einzelnen Scheiben autoklaviert. Mit dem Korkbohrer ausgestanzte Myzelscheibchen der Einzelsporisolate (jeweils zwei Scheiben von etwa 1,5 cm Ø) wurden zur Gewinnung der Inokulumlösung in 20 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{den.}}$ mit dem Ultra Turrax zerkleinert. Die sterilen Cellophanscheiben wurden dann mit einer Pinzette auf PDA-Platten gelegt und mit 750 µL gleichmäßig verteilter Inokulumlösung beimpft. Die Lagerung der mit Parafilm[®] verschlossenen Platten erfolgte bei 18°C in Dunkeln. Zur Gewinnung der Konidien in Form einer Sporensuspension wurden nach fünf bis zehn Tagen die Cellophanfolien abgezogen und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{den.}}$ in einem sterilem Zentrifugationsröhrchen per Hand kräftig geschüttelt. Der Sporentiter konnte nach Filtern durch dreilagiges Miracloth mit der Kolkwitz-Planktonzählkammer nach der Methode von KOLLAR (1998) bestimmt werden (siehe Formel 1) und durch Verdünnen oder Aufzentrifugieren (5 min, 12000 rpm) auf den gewünschten Titer eingestellt werden.

Mittlere Anzahl Konidien/ Zählfeld · 762,9 = Konidientiter [$\text{Konidien} \cdot \text{mL}^{-1}$]	(1)
---	-----

2.2.3.4 Färbemethoden, Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung der Keimraten auf CMs wurden die Konidien nach 24 h Inkubationsdauer im bis dahin nicht verdunsteten Suspensionstropfen mit Methylblau (0,01%) gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die CMs auf Objektträger gezogen, mit einem Deckglas abgedeckt und mit 200 bis 800facher Vergrößerung im LM betrachtet. Die Auswertung der Keimraten bezog immer sämtliche Konidien auf der jeweiligen CM mit ein. Die Keimung wurde in drei Klassen unterschieden: ungekeimt, gekeimt ohne Appressorium und gekeimt mit Appressorium.

Die Auswertung der Penetration erfolgte nach 72h Stunden. Die Sporen auf der Außenseite wurden wie oben beschrieben mit Methylblau gefärbt, die Penetrationshyphen dagegen wurden von der morphologischen Innenseite der CMs gefärbt. Dazu wurden 40 µL Fluoresceindiacetat (FDA) in Tris-Puffer (1/30 v/w) seitlich an die auf dem Objektträger gezogenen CMs pipettiert, so dass der Farbstoff unter die CM gesogen wurde. Das in den Zellen akkumulierte Fluorescein fluoresziert unter UV-Anregung bei Verwendung eines blauen Anregungsfilters (450-490 nm), eines Farbteilers (FT 510) und eines Sperrfilters (LP 520). Da

gungsfilters (450-490 nm), eines Farbteilers (FT 510) und eines Sperrfilters (LP 520). Da die CMs durchsichtig sind, ist es möglich, unter Fluoreszenzanregung mit zusätzlichem Durchlicht die durch Methylenblau gefärbten Konidien mit Keimschläuchen und Appressorien auf der Außenseite und die fluoreszierenden Penetrationsstrukturen gleichzeitig zu betrachten. Zur Auswertung der Penetrationsraten wurden die Penetrationsstrukturen gezählt. Dabei wurde das Stroma in zwei Boniturklassen unterteilt:

- i) in die CM hineingewachsen bzw. in der CM lokalisiert (kurz wird im Folgenden in der CM verwendet) und
- ii) durch die CM gewachsen, (kurz wird im Folgenden durchgewachsen verwendet).

Die Penetrationshyphen wurden zu Konidien mit Appressorien in Relation gesetzt. Falls eine Spore mehr als eine Penetrationshyphne gebildet hatte, wurde nur ein Penetrationsereignis gewertet.

<u>Fluoresceindiaceat</u>		<u>Tris-Puffer (pH 7,4)</u>	
FDA	5 mg	Tris-HCl	1,58 g
Aceton	1 mL	H ₂ O _{den.}	100 mL

2.2.3.5 Färbungen der Cuticularmembranen

Es bestand das Interesse, die CMs selbst anzufärben, um bei der Fluoreszenzmikroskopie einen erhöhten Kontrast zwischen fluoreszierenden Hyphen und den Membranen zu erhalten. Dies könnte u. U. bei der CLSM genauere Aufschlüsse darüber geben, wo das Stroma genau lokalisiert ist. Nach Literaturrecherche (LILLIE ET AL. 1990, COX UND THOMAS 1999, APOGA UND JANSSON 2000) wurden folgende Farbstoffe ausgewählt: Acridinorange, Rhodamin B, Safranin und Ruthenium Rot. Die Farbstoffe wurden in H₂O_{den.} (1% w/v, Rhodamin B 0,78% w/v) gelöst. Die Färbungen erfolgten durch Inkubation der CMs in verdünnten Färbelösungen (1:10) für 30 min bei Zimmertemperatur und anschließendem Spülen mit H₂O_{den.}. Folgende Fragen sollten geklärt werden: Ist die Färbung dauerhaft und von ungefärbten CMs verschieden? Zeigt die gefärbte CM unter der Anregung für Fluoresceindiaceat eine farblich vom FDA abweichende Fluoreszenz? Dazu wurden die CMs nach dem ersten Trocknen erneut gewaschen und makroskopisch beobachtet ob die Färbung beständig war. Zur Klärung der zweiten Frage wurden die CMs zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen (blau:450-490 nm, grün: 546 nm) ausgesetzt.

2.2.3.6 Rasterelektronenmikroskopie

Die zu untersuchenden Pilzstrukturen auf den CMs wurden nach der gewünschten Inkubationsdauer zunächst in Glutaraldehyd (2,5% in Na-Cacodylatpuffer, 0,1 M, pH 7,2) fixiert und die CMs dann auf Untersuchungstischchen aus Aluminium mit Spezialkleber oder Colloidgraphit fixiert und mit Gold (25 nm) beschichtet. Die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte bei 15 kV mit einem REM der Firma Leica.

2.2.3.7 Inokulation der Membranen

Wenn nicht anders erwähnt, verlief die Inokulation der CMs nach folgendem Schema: Zunächst wurden die CMs mit der morphologischen Innen- oder Außenseite auf die Oberfläche von mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{den.}}$ gefüllten Petrischalen gelegt. Ein 5 μL Tropfen einer wie oben beschriebenen Sporensuspension der gewünschten Konzentration wurde in die Mitte jeder CM pipettiert. Nach dem Verschließen der Petrischalen mit Parafilm wurde bei 20°C im Dunkeln inokuliert. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Petrischalen keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis haben. Dazu wurden zehn CMs gleichmäßig auf einer, zwei oder zehn Petrischalen verteilt und die Keimraten nach Inokulation mit einer Konidien suspension untersucht. Da sich daraus keine signifikanten Unterschiede ergaben, konnten zehn CMs in einer Petrischale als Versuch mit zehn Wiederholungen gewertet werden.

Verschiedene Sporenkonzentrationen wurden zur Bestimmung der optimalen Sporendichte verglichen.

Die oben beschriebene Methode zur Inokulation der Membranen erwies sich am praktikabelsten, um Substanzen, die eine Kontaktwirkung auf die Konidien haben, zu untersuchen. Substanzen mit systemischer Wirkung bzw. geringer Wasserlöslichkeit müssen abweichend davon appliziert werden. Die Methodik hierzu wurde beispielhaft für das Phytoalexin Resveratrol entwickelt (siehe unten).

2.2.3.8 Wasseragarkontrolle

Zur internen Kontrolle der Sporenkeimraten auf CMs wurden Keimtests auf Wasseragar durchgeführt. Dazu wurden Objektträger mit 1 mL Wasseragar (2%ig), überschichtet und in eine Petrischale gelegt. 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{den.}}$ auf einem Filterpapierstückchen diente zur Gewährleistung einer ausreichenden Luftfeuchte. Der Agar wurde mit vier Tropfen (5 μL) einer Sporensuspension inokuliert und in der mit Parafilm verschlossenen Petrischale 24h bei 20°C inku-

biert. Danach konnten die Objektträger direkt mikroskopisch ausgewertet werden. Alle Konidien pro Tropfen wurden bezüglich ihres Keimverhaltens untersucht, wobei eine Konidie bei sichtbarem Keimschlauch als gekeimt gewertet wurde, ungeachtet der Keimschlauchlänge. Bei manchen Versuchen wurde auch die Länge der Keimschläuche bonitiert. Hierzu wurden mit der AxioVision Software 3.0 von ZEISS Digitalfotos bei einer Vergrößerung von 200 aufgenommen, gespeichert und im Anschluss mit derselben Software die Länge der Keimschläuche ausgemessen.

Wasseragar

Agar	20 g
H ₂ O _{den.}	1000 mL

2.2.3.9 Zeitlicher Ablauf der Keimung und Appressorienbildung

In zweistündigen Abständen wurden die Konidien auf CMs mikroskopisch auf Keimung und Appressorienbildung untersucht. Eine Konidie wurde bei Sichtbarwerden eines Keimschlauches als gekeimt gewertet, als Appressorium wurde eine deutliche Anschwellung am apikalen Ende eines Keimschlauches gewertet. Ebenfalls als Appressorium wurde eine apikale, globuläre, mit einem Septum abgetrennte, Schwellung der Konidie gewertet. Die Inokulation erfolgte bei 20°C im Dunkeln.

2.2.3.10 Konidienkeimung und Penetration auf CMs verschiedener anfälliger und resistenter Apfelsorten sowie Nichtwirten für *Venturia inaequalis*

Die von den in Tab. 2 aufgeführten Pflanzensorten und -arten gewonnenen CMs wurden bezüglich der auf ihnen erreichten Konidienkeimung und -Penetration untersucht. Dabei sollte geprüft werden, ob der Schorfresistenzstatus auf Basis der CMs einen Einfluss hat. Zur Untersuchung der Konidienkeimung und -penetration wurden, wenn nicht gesondert erwähnt, je zehn CMs herangezogen, die Inokulation, Inkubation und Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Die Versuche wurden an aufeinander folgenden Terminen jeweils mit einer frischen Konidiensuspension durchgeführt.

2.2.3.11 Konidienkeimung und Penetration auf CMs unterschiedlicher Dicke

CMs der Apfelsorten ‚Alkmene‘ und ‚James Grieve‘ wurden einzeln mit einer elektronischen Mikrowaage (Sartorius, Genauigkeit 1 µg) gewogen. Dann wurden die CMs einzeln in kleinen Petrischalen auf Wasser schwimmend wie o. g. inkubiert und nach 72h die Penetrationsrate getrennt nach in die CM- und durchgewachsen, bonitiert. Zur Auswertung wurden die Daten in beide Penetrationsklassen (in die CM hineingewachsen und durchgewachsen) getrennt und als Summe gegen das Gewicht der CMs aufgetragen.

2.2.4 Anwendung des Testsystems

2.2.4.1 Testung von Calciumhydroxid, Calciumcarbonat, Kaliumcarbonat und Alkylpolyglukosiden

Die untersuchten Chemikalien waren $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Glucocon 215 CSUP, Plantacare 1200 UP und K_2CO_3 . Die Tenside Glucocon 215 CSUP und Plantacare 1200 UP sind oligomere Alkylpolyglukoside (APG) mit Alkyl-Kettenlängen von $\text{C}_{8/10}$ und $\text{C}_{12/16}$. Die Suspensionen wurden durch Lösen der Chemikalien in $\text{H}_2\text{O}_{\text{den}}$ hergestellt. Die Endkonzentrationen können den Tabellen (7 und 8) und Bildlegenden entnommen werden. Die Löslichkeit von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in Wasser liegt bei nur $1,6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Bei höheren Konzentrationen haben Lösungen, die gesättigtes $\text{Ca}(\text{OH})_2$ enthalten, einen pH von 12,44 (JOHANNSEN UND RADEMACHER 1999). Die Vitalität der Sporen und Keimschläuche wurde mit FDA überprüft. Es wurden drei verschiedene Versuchsansätze getestet, simultane, kurative und präinfektiöse Applikation der Testsubstanzen zu den Sporen.

Simultane Applikation: Diese Methode wird verwendet, um die Hemmung der Sporenkeimung auf den CMs zu überprüfen. Die wässrige Sporensuspension (5 µL) wird zentral auf eine auf Wasser in Petrischalen schwimmende CMs pipettiert und sofort 5 µL der Elektrolyt- bzw. Tensidlösung zugegeben.

Bei der kurativen Applikation wurden die Wirkungen auf die Vitalität der Keimschläuche und die Zeitdauer bis zum Absterben untersucht. Die Sporen wurden wie oben beschrieben auf die CMs gebracht und 24h bei 20°C in verschlossenen Petrischalen inkubiert, bevor die Testsubstanzen wie oben beschrieben zugegeben wurden.

Zusätzlich wurden in zwei Versuchen auf *Stephanotis*-CMs mit Glucocon 215 CSUP und Plantacare 1200 UP die Keimschläuche aller Konidien gemessen, die kein Appressorium gebildet hatten. Nach Zugabe der Tensidlösungen in unterschiedlicher Konzentration wurden

nach weiteren 24 h die Längen der Keimschläuche mittels der AxioVision 3.0 Software von ZEISS gemessen.

Bei der präinfektiösen Applikation wurden zunächst wässrige Lösungen der Testsubstanzen (s. o.) auf die CMs pipettiert und das Wasser unterm Luftstrom verdunstet, so dass trockene Rückstände auf den CMs verblieben. Die CMs wurden unter Raumluft inkubiert und nach 24 h die Sporensuspension zu den Salz- und Tensidrückständen pipettiert. Nach weiteren 24h wurden die Sporen und Keimschlauchvitalität wie oben ermittelt.

2.2.4.2 Testung von Resveratrol und Piceid bei simultaner und präinfektiöser Applikation

Das Phytoalexin Resveratrol und sein Glukosid Piceid wurden auf die CMs appliziert und die Keimung und Penetration von *V. inaequalis*-Konidien bonitiert (s. o.). Die Testsubstanzen wurden entweder gleichzeitig (simultan) mit den Konidien auf die CMs gebracht, oder die CMs wurden vor der Inokulation mit den Konidien (präinfektiös) in ein Gleichgewicht mit den Testsubstanzen gebracht.

Zur Einstellung eines Gleichgewichts mit Resveratrol und Piceid wurden die CMs in wässrigen gesättigten Lösungen (50mL) der beiden Substanzen ($0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ für Resveratrol und $0,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ für Piceid) in Schottflaschen auf einer Rollbank im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation der CMs in $\text{H}_2\text{O}_{\text{den.}}$ diente als Kontrolle. Für jeden Versuch wurden 30 CMs von *Malus* oder *Pyrus* verwendet. Der Flaschenverschluss wurde innen mit Aluminiumfolie ausgekleidet, um ein Sorbieren der Substanzen zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die CMs zum Glätten auf Teflonblättchen gezogen. Die CMs wurden dann derart in Glaspetrischalen auf 20 mL der gesättigten Lösungen von Resveratrol oder Piceid und $\text{H}_2\text{O}_{\text{den.}}$ bei den Kontrollen gelegt, dass die morphologische Innenseite mit den Lösungen in Kontakt war. Die Inokulation und Inkubation wurde w. o. durchgeführt. Nach 24 Stunden wurde auf der Hälfte der CMs die Sporenkeimung bonitiert und nach 72 h der Rest der CMs zur Bonitur der Penetration herangezogen.

Für Experimente mit simultaner Applikation wurden die *V. inaequalis*-Sporen zentrifugiert (5 min, 12000 U), das Wasser dekantiert und die Sporen in gesättigter Resveratrol- oder Piceidlösung, bzw. für die Kontrollen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{den.}}$ aufgenommen. Für das Piceid wurden zusätzlich noch folgende Konzentrationen getestet: 50, 100, 200, 400, 500 und $1000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Die Inkubation der CMs und weitere Auswertung wurde durchgeführt wie oben beschrieben.

Experimente, in denen die Kontroll-CMs zu unter 60% penetriert wurden, kamen nicht zur Auswertung. Aus eigenen unveröffentlichten Ergebnissen ist bekannt, dass eine geringe Penetrationsrate in den Kontrollen auf Eigenschaften der CMs oder Sporen zurückzuführen ist und daher für den Vergleich zwischen Behandlungen ungeeignet ist.

Neben der Keimung und Penetration wurde bei der präinfektiösen Anreicherung mit Resveratrol auch die flächige Ausprägung des in den CMs nach der Penetration gebildeten Stromas gemessen. Dazu wurden von den Infektionsstrukturen Digitalaufnahmen gemacht die dann mit der AxioVision Software von ZEISS gemessen wurden.

Bestimmung der Wasserlöslichkeit:

Stammlösungen von Resveratrol (1 mM) und Piceid (10 mM) wurden durch Lösen der Chemikalien in Wasser bei 60°C hergestellt. Nach Lagerung über Nacht bei 25°C hatten sich gesättigte Lösungen über Rückständen von Resveratrol und Piceid eingestellt. Aliquote des gesättigten Überstandes wurden 2-, 4-, 5- und 10-fach verdünnt und das Wasser unter Zufluss von Stickstoff verdunstet. 5 µg Tetracosan wurde als interner Standard jeder Probe zugegeben. Die Proben wurden 40 min bei 70°C unter Verwendung von 20 µL Pyridin und 20 µL BSTFA derivatisiert. Dadurch werden freie Alkoholgruppen des Resveratrols zu ihren entsprechenden Methylethern umgewandelt. Die Proben wurden erneut mit 150 mL Chloroform verdünnt und 1 µL jeder Probe wurde gaschromatographisch untersucht. Das Temperaturprogramm für die Analyse war: Injektion bei 50°C, 2 min bei 50°C, 10°C·min⁻¹ bis 200°C, 2 min bei 200°C, 3°C·min⁻¹ bis 320°C, dann 16 min bei 320°C. Das Druckprogramm mit H₂ als Trägergas war: Injektion bei 50 kPa, 41 min bei 50 kPa, 10 kPa·min⁻¹ bis 150 kPa und 24 min bei 150 kPa. Die Resveratrolpeaks wurden durch Gaschromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie identifiziert. Die mittels GC/FID bestimmte Substanzmenge [Mol] wurde gegen die Menge an Lösungsmittel [L, Menge an verdunstetem Wasser] aufgetragen und die Wasserlöslichkeit [Mol L⁻¹] beider Substanzen in den gesättigten Stammlösungen mittels Regressionsgeraden ($r^2 = 0,99$) berechnet.

Bestimmung des Cuticula/Wasser Verteilungskoeffizienten K_{CW} : Gesättigte Resveratrolösungen wurden 2-, 4-, 5- und 10fach verdünnt, so dass sich ein Endvolumen von 25 mL ergab. In jeder Lösung wurde eine isolierte und extrahierte (entwachste) Polymermatrix Membran (MXs) von *Stephanotis floribunda* Brongn. inkubiert. Die Lösungen rotierten auf einer Rollbank bei 60 rpm über Nacht bei 25°C im Dunkeln.

Nach 24 h wurden die MXs in deionisiertem Wasser gewaschen (3 sec) und vorsichtig mit Filterpapier getrocknet. Sorbiertes Resveratrol wurde dann wieder in 1 mL Versuchsfläsch-

chen für 5 min bei 60°C und zusätzlichen 25 min bei 25°C mit Chloroform extrahiert. Wie oben beschrieben, wurde 3 µg Tetracosan als interner Standard jeder Probe zugefügt. Nachdem das Lösungsmittel unter einem leichtem Stickstoffzuström verdampfte, wurden die Proben wie oben beschrieben derivatisiert, erneut mit 150 mL Chloroform verdünnt und 1 µL jeder Probe wurde gaschromatographisch analysiert. Mit parallelen Aliquoten der externen Resveratrollösungen wurden genauso verfahren. Der Cuticula/Wasser-Verteilungskoeffizient K_{CW} wurde nach der unten stehenden Formel 2 berechnet.

$$K_{CW} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g}_{\text{resveratrol}}}{\mu\text{g}_{\text{mx}}}\right)}{\left(\frac{\mu\text{g}_{\text{resveratrol}}}{\mu\text{g}_{\text{water}}}\right)} \quad (2)$$

Datenanalyse:

Für die Analyse der Konidienkeimung und Penetration wurde Student's *t*-Test verwendet ($P < 0,05$), wobei die SigmaPlot Software 8.0 von SPSS[®] Science verwendet wurde.

2.2.4.3 Testung von Saccharoseoctanoat bei simultaner Applikation

Saccharoseoctanoat (SO) mit einer Wirkstoffkonzentration von 40% in wässriger Lösung wurde auf folgende Endkonzentrationen verdünnt: 2,0, 1,0, 0,5, 0,25 und 0,125 g·L⁻¹. Die Lösungen wurden mit einer doppelt konzentrierten Sporensuspension zu gleichen Volumenverhältnissen gemischt, und je 5 µL auf ‚Gloster‘-CMs pipettiert wie oben beschrieben, inkubiert und nach 24 h die Keimraten bestimmt. Neben einer Wasserkontrolle wurde eine Butanolkontrolle einbezogen, da in der SO-Suspension 5% Butanol enthalten sind.

2.2.5 Begleitende Untersuchungen

2.2.5.1 Effekt der Boraxbehandlung

Alte und junge Blätter der Sorte ‚Gloster‘ (bestimmt durch die Positionen 1 und 5 der voll entfalteten Blätter an einem Langtrieb) wurden gesammelt und die CMs wie o. beschrieben enzymatisch isoliert. Nach der Isolierung wurden bei einem Teil der CMs nach der Spülen und Sortieren die beim enzymatischen Abbau entstandenen Phenole mit der üblichen Boraxbehandlung (zwei Tage, 0,01 M·L⁻¹ Natriumtetraborat) und anschließendem Spülen mit Wasser entfernt und der Rest wurde ohne Entfernung der Phenole, d. h. nach einer Aufbewahrung in destilliertem Wasser, getrocknet.

Nach Inokulation (s. o.) wurde die Penetrationsrate von *V. inaequalis* getrennt nach in der CM wachsendem Stroma oder durchgewachsenen Hyphen bonitiert. Zur Vereinfachung wird im Folgenden von ‚in der CM‘ und ‚durchgewachsen‘ gesprochen.

2.2.5.2 Inokulation von der morphologischen Innenseite

Die Innen- und Außenseiten von CMs der Apfelsorten ‚Alkmene‘ und ‚Gloster‘ und der Nichtwirte *P. communis* var. ‚Conference‘ und *S. floribunda* wurden wie oben mit einer Sporensuspension inokuliert und die Keimung und Penetration analog ausgewertet.

2.2.5.3 Inokulation von Blattscheiben anfälliger und resistenter Apfelsorten

Blätter in verschiedenen Entwicklungsstadien wurden von schorfanfälligen und resistenten Apfelsorten entnommen und durch Schütteln in Natriumhypochloridlösung (0,5%, 90 s) desinfiziert. Nach mehrmaligen Abspülen der Blätter in sterilem H₂O_{den.} und Trocknen auf Krepppapier wurden mit einem Korkbohrer BS von 8 mm Ø ausgestanzt. Diese wurden auf Petrischalen mit Wasseragar (1%) gelegt und mit der Sporensuspension ($2 \cdot 10^5$ Konidien·mL⁻¹, 10 µL) beimpft. Die Schalen wurden mit Parafilm verschlossen und in einer Klimakammer (16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei 18°C; Leuchtstoffröhre TDL 58W von Philips, Abstand 30cm) für die gewünschte Dauer inkubiert.

Färbemethode mit Anilinblau/ Laktophenol:

Nach drei, vier oder fünf Tagen wurden aus den BS kleinere Scheiben ausgestanzt und sofort in Probenfläschchen in eine Mischung aus einem Teil Essigsäure und drei Teilen Ethanol gebracht. Nach 24h wurden die Scheibchen gefärbt. Dazu wurde zunächst 5 min in 5%iger Milchsäure inkubiert, gespült und mit einer Mischung aus gleichen Teilen Anilinblau und Laktophenol für 5 min gefärbt. Nach Abspülen wurden die Proben in reinem Laktophenol fixiert und zum mikroskopieren auf Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt (JONES UND MOLLISON 1948, PREECE 1962, NICHOLSON ET AL. 1977, JØRGENSEN ET AL. 1993, HOWDEN AT AL. 1998). Die Proben konnten derart fixiert wochenlang gelagert werden.

Färbemethode nach LI UND XU (2002):

Eine Blattscheibe von ca. 1,5 cm Ø wurde aus einem schorfinfizierten Blatt ausgestanzt und sofort für 24 h in eine Mischung aus Essigsäure und Ethanol im Verhältnis 1:3 gebracht. Die mit H₂O_{den.} gespülten Scheiben wurden dann in 5%iger NaOH bei 80°C im Wasserbad für 50

min erhitzt und dann für 60 min in $H_2O_{den.}$ inkubiert. Dann wurde die Cuticula abgezogen und die Scheiben mit 0,1%igem Trypanblau für 30 min gefärbt. Zur Bestimmung der Penetration auf BS wurden je 100 Konidien mit Appressorium von mehreren Blattscheibchen ausgezählt und so die Penetrationsrate bestimmt. Nur Konidien, welche blau gefärbte Strukturen an ihren Appressorien hatten, die morphologisch von Keimschläuchen zu unterscheiden waren, (siehe Strukturen bei ORTEGA ET AL. 1998) wurden gewertet.

<u>Laktophenol</u>		<u>Anilinblau</u>	
$H_2O_{den.}$	10 mL	gesättigte Anilinblaulösung:	10mL
Glycerin	20 g	Glycerin	10 mL
Milchsäure	10 g	Milchsäure	10 g
Phenol	20 g	$H_2O_{den.}$	80 mL

2.2.5.4 Wachsextraktion aus Cuticularmembranen

2.2.5.4.1 Wachsextraktion und Bestimmung der Wachsbestandteile mittels GC/MS

Aus je drei CMs der Sorten ‚Bramley’s Seedling’, ‚Gloster’, ‚James Grieve’ sowie der resistenten Sorten ‚Reka’, ‚Relinda’ und von *Malus baccata* wurden die Wachse extrahiert und mittels GC/FID die einzelnen Bestandteile der Wachse analysiert.

Je drei CMs wurden für 10 s in 10 mL Chloroform ($CHCl_3$) bei Raumtemperatur getaucht. Der daraus resultierende Extrakt wurde mit 5 μ g Tetracosan als interner Standard zur Quantifizierung der individuellen Wachsgehalte versetzt. Nach der Verdunstung des Chloroforms bei 55°C unter Stickstoff wurden die Proben mittels BSTAF und Pyridin (40 min, 70°C) wie oben für Resveratrol beschrieben derivatisiert. Dabei bilden die freien Hydroxyl- und Carboxylgruppen die entsprechenden TMS-Ether und –Ester. Vor der Analyse wurde das Reaktionsgemisch mit 100 μ L Chloroform verdünnt. Je 1 μ L der Wachsproben wurde durch Gaschromatographie sowie oben beschrieben analysiert. Die Proben wurden mittels GC/FID quantifiziert und mittels GC/MS identifiziert.

2.2.5.4.2 Untersuchung des Wachsgehalts verschiedener CMs

Aus je drei CMs der schorfanfälligen Apfelsorten ‚Bramley’s Seedling’, ‚Gloster’, ‚James Grieve’ und ‚Jonagold’, sowie der resistenten Sorten ‚Reka’, ‚Relinda’ und ‚Remo’, sowie von *Malus baccata*, *Pyrus communis* und *Stephanotis floribunda* wurden durch Inkubation in einer Mischung von Chloroform/Methanol (v/v 50/50) die Wachse extrahiert. Die CMs wur-

den vor und nach der Behandlung mit einer Präzisionswaage (Genauigkeit 1 µg) gewogen und so das Gewicht der löslichen Bestandteile ermittelt.

2.2.5.4.3 Vergleich der Penetration auf CMs und MXs

Die Wachse aus je 10 CMs von ‚Gloster‘, ‚Holsteiner Cox‘, *P. communis*, ‚Conference‘ und *S. floribunda* wurden w. o. extrahiert. Die CMs wurden w. o. mit Sporensuspension inokuliert und inkubiert. Die Keimung (getrennt in die drei Keimungsklassen) wurde nach 24h bonitiert. Die Penetration derselben CMs wurde nach 72h (getrennt nach in der CM- oder durchgewachsen, s. o.) ausgewertet. Als Kontrolle wurden je zehn unbehandelte CMs entsprechend bonitiert.

2.2.5.5 DNA-Isolierung aus Einzelsporisolaten

Die in Abb. 28 oben angegebenen Isolate von *V. inaequalis* wurden zur Anzucht für die Isolation genomischer DNA herangezogen. Für die Gewinnung von genomischer DNA wurde pro Isolat ein Stück Myzel (Ø 1cm) von der jeweiligen PDA-Erhaltungskultur mit einem Korkbohrer steril ausgestanzt und in einem 100 mL Erlenmeyerkolben mit 50 mL Potatoe Dextrose Broth (PDB) inokuliert. Die Flüssigkultur wurde bei 19°C für drei Wochen unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Ernte der Kultur erfolgte durch Abzentrifugieren der Nährlösung (30 min, 10000·g), wobei die Nährlösung für jedes Isolat aufbewahrt und bei -20°C eingefroren wurde. Das Pellet wurde in Flüssigstickstoff eingefroren. Um die genomische DNA zu isolieren, wurde das gefrorene Pellet in einer Kugelmühle für 5 min bei 300 rpm gemahlen. Daraufhin wurde 3 g des entstandenen gefrorenen Pulvers sofort in 10 mL CTAB Puffer mit 10 µL frisch zugegebenen Mercaptoethanol aufgenommen. Nach einer Inkubation dieser Suspension für 1h bei 65°C wurde 20 min bei 4000·g zentrifugiert und der Überstand mit demselben Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und 30 min bei 4000·g zentrifugiert. Die Fällung der genomischen DNA erfolgte durch Zugabe des gleichen Volumens von 2- Propanol über Nacht bei 4°C. Die Lösung wurde anschließend 30 min bei 10000·g zentrifugiert und das Pellet einmal mit 70% Ethanol (RT) gewaschen. Schließlich wurde die DNA durch Zentrifugation von 10 min bei 10000·g sedimentiert. Nach Trocknung des Pellets unter Vakuum wurde es in 100 µL sterilem H₂O_{den.} wieder aufgenommen und gegebenenfalls bei -20°C gelagert. Der Gehalt der DNA wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) anhand der photometrischen Extinktion bei 280 nm photometrisch bestimmt. Dazu wurden je zwei

Proben der DNA (2 μL) auf 200 μL verdünnt, gemessen und auf den Sollwert von 10 ng eingestellt.

Potato Dextrose Broth (PDB)

PDB	19 g
H ₂ O _{den.}	1000 mL

CTAB Puffer

CTAB	20 g·L ⁻¹
Tris pH 8,0	100 mM·L ⁻¹
EDTA	20 mM·L ⁻¹
NaCl	1,4 M·L ⁻¹
PVP 40	20 g·L ⁻¹
H ₂ O _{den.}	1000 mL

2.2.5.6 RAPD-PCR mit DNA aus Einzelsporisolen

Für die Analyse der phylogenetischen Relation zwischen den verschiedenen *V. inaequalis*-Isolaten wurden sieben Primer mit je zehn Basen der Firma Interactiva verwendet. Diese hatten folgende Gensequenzen: D07 (5' TTT GCA CGG G 3'), E15 (5' ACG CAC AAC C 3'), F01 (5' ACG GAT CCT G 3'), F04 (5' GGT GAT CAG G 3'), U10 (5' ACC TCG GCA C 3'), U19 (5' GTC AGT GCG G 3') und E07 (5' AGA TGC AGC C 3') (SIEROTZKI ET AL. 1994, TENZER und GESSLER, 1999). Jeweils 1 μL (10 ng) genomischer DNA wurden in einem 25 μL PCR-Ansatz verwendet. Die Menge der eingesetzten Substanzen sowie die Amplifikationsbedingungen sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 3: Reaktionsgemisch für die PCR-Ansätze

Konzentration	Volumen pro Ansatz [μL]
H ₂ O _{den.}	18
Puffer 10x	2,5
10 μM dNTP	0,5
Primer (10 pmol· μL^{-1})	2
DNA Template (10ng)	1
Red Taq	1
Gesamtvolumen	25

Tabelle 4: PCR-Bedingungen

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung vor dem ersten Zyklus	94	120	1
Denaturierung	94	30	36
Annealing	46	60	
Elongation	72	60	
Elongation nach dem letzten Zyklus	72	180	1
Endtemperatur	4	∞	1

Die Amplifikationsprodukte wurden in einem 1,2% Agarosegel (w/v in 1x TAE Puffer) durch eine Horizontal-Elektrophorese aufgetrennt. DNA-Stücke können durch Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden, wobei sich kleinere Stücke schneller von der Kathode zur Anode bewegen als größere Stücke. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen in einem Mikrowellengerät gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde die Agarose mit 0,5 µg·mL⁻¹ Ethidium-Bromid versetzt, in einem Gelträger gegossen und ein Probenaschenkamm in die noch flüssige Agarose gesteckt. Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden unter TAE-Puffer in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für 30 min durchgeführt.

Zur Ermittlung der Fragmentgrößen wurden 8 µL eines 100 bp Längenmarkers (GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus von MBI Fermentas) eingesetzt. Die PCR-Amplifikationsfragmente wurden durch UV-Anregung bei einer Wellenlänge von 312 nm und der dadurch entstehenden Fluoreszenz des in die DNA eingebauten EtBr als Banden im Gel sichtbar gemacht und als Digitalfoto bzw. mit Hilfe eines Videoprinters dokumentiert. Zur Digitalisierung und Aufnahme der Banden diente die PC Version 1.1 von Bio-Rad Multi-Analyst™.

TAE Puffer (50x)

Tris-Ac pH 7,5	40 mM·L ⁻¹
Eisessig	20 mM·L ⁻¹
EDTA	1 mM·L ⁻¹
H ₂ O _{den.}	1000 mL

2.2.5.7 Erstellung eines Stammbaumes

Die verschiedenen Primer aus 2.2.5.6 führten bei den eingesetzten Isolaten von *V. inaequalis* zu unterschiedlichen Bandenmustern durch verschiedene Fragmentgrößen im Agarosegel. Das Vorhandensein der Banden konnte in eine +/- Matrix übertragen werden, die in einen Stammbaum konvertiert wurde (Tree Preview von Phylip).

Ergebnisse und Diskussionen

3.1 Abschnitt A: Entwicklung und Etablierung des Testsystems

3.1.1 Inokulumproduktion

Um in einem *in vitro*-System, welches der Untersuchung eines Pathogens dienen soll, bestimmten Fragestellungen nachzugehen, ist es nötig, dieses Pathogen in Reinform, d.h. steril, zu erhalten. In dieser Arbeit lag der erste Schwerpunkt darauf, Isolate von *V. inaequalis* aus dem Freiland zu isolieren und zur Sporulation zu bringen. Aus der Literatur war bekannt, dass die Gewinnung von Ascosporen aus *V. inaequalis in vitro*-Kulturen sich sehr schwierig gestaltet (MACHARDY 1996), daher wurde hier der Schwerpunkt auf die Produktion der haploiden Konidiosporen, zur Vereinfachung im folgenden Konidien genannt, gelegt. Auf kommerziell erhältlichen Nährböden ist die Konidienproduktion von *V. inaequalis* gering (PARKER ET AL. 1995) und die am meisten verbreitete Dochtmethode von NUSBAUM UND KEITT (1938, verändert bei PUTTOO UND CHAUDHARY 1988) ist arbeitsaufwändig und liefert nicht ausreichend Konidien. ROBERTS UND CRUTE (1994) entwickelten eine *in vivo*-Methode zur Konidienproduktion auf Apfelsämlingen, die verhindern sollte, dass die Pathogenität der Kulturen nach zu langer Zucht auf axenischen Medien verloren geht, und eine *in vitro*-Methode als abgewandelte Dochtmethode.

Die Konidienanzucht auf Cellophanmembranen nach PARKER ET AL. (1996) in Verwendung des PDA der Firma Difco erwies sich in dieser Arbeit als optimal geeignet zur schnellen massenhaften Produktion von Konidien.

Die Isolate 15 und 36 wurden jährlich auf Apfelpflanzen übertragen und Infektionen hervorgerufen, aus denen Re-Isolate gewonnen wurden, um keinen Verlust der Pathogenität zu riskieren. Das Isolat 36 verlor nach zwei Jahren seine infektiösen Eigenschaften, daher wurde mit Isolat 15 weitergearbeitet.

3.1.2 Isolation von *Venturia inaequalis* Einzelsporisolaten

Von verschiedenem Material (Blätter, Früchte) aus verschiedenen Anbaugebieten mit sichtbaren Schorfläsionen konnten die aus Tab. 1 zu entnehmenden Einzelsporisolate gewonnen werden. Damit stand zu Beginn der Arbeiten genügend steriles Ausgangsmaterial für die Konidienproduktion zur Verfügung.

3.1.2.1 Konidienproduktion aus *Venturia inaequalis* Einzelsporisolaten

Wie aus Tab. 5 ersichtlich, waren nicht alle gewonnenen Einzelsporisolaten in der Lage, mit der Methode von PARKER ET AL. (1996) auf Cellophan Sporen zu produzieren.

Tabelle 5: Konidienproduktion der untersuchten Isolate

Nr.	Quelle	Herkunft	*	Nr.	Quelle	Herkunft	*
1	Elstar, Blatt1	Dossenheim	-	14	unbekannt	unbekannt	-
2	Wildapfel	Steinberg	+	15	Elstar	Dossenheim	+
3	Elstar	Dossenheim	-	16	M9/Wildapfel	Steinberg/GWH	+
4	<i>M. baccata</i>	Steinberg	-	17	M9/ <i>M. baccata</i>	Steinberg	+
5	<i>M. baccata</i>	Steinberg	-	19	<i>M. baccata</i>	Steinberg	-
HC ₅	Holsteiner Cox	Quellen Iso 15 / 36	+	22	M9/Wildapfel	Steinberg/GWH	+
HC ₆	Holsteiner Cox	Quellen Iso 15 / 36	+	36	Gloster	Ruthe	+
7	Elstar	Dossenheim	-	38	M9/ <i>M. baccata</i>	Steinberg	+
9	M9/ <i>M. baccata</i>	Steinberg	+	41	Apfel nr.3	Urania, HH	-
10	M9/Wildapfel	Steinberg/GWH	-	42	Golden	Bayer	-
				11a	unbekannt	unbekannt	+

*
+ Konidien wurden gebildet,
- es wurden keine Konidien gebildet

Für die nachfolgenden Versuche wurden anfangs Konidien des Isolats 36 (von der Sorte ‚Gloster‘ aus Ruthe) und später von Isolat 15 (von der Sorte ‚Elstar‘ aus Dossenheim) verwendet. Diese beiden Isolate zeichneten sich durch eine konstante Konidienproduktion mit hohen Keimraten der Sporen über einen langen Zeitraum aus. Abb. 6 A (s. u.) zeigt das charakteristische Aussehen von Hyphen auf einer Cellophanmembran und daran gebildete Konidien.

3.1.3 Entwicklung des Testsystems

Nachdem die Produktion steriler Konidien hoher Vitalität gesichert war, konnten gezielte Untersuchungen zur Konidienkeimung auf isolierten CMs durchgeführt werden. Dazu musste zunächst die Handhabung der Membranen optimiert werden. Erste Versuche mit Membranen, die mit Silikon auf PVC-Ringen befestigt wurden, schlugen fehl. Es kristallisierte sich heraus, dass auf Wasser in Petrischalen schwimmende CMs am vorteilhaftesten waren. Zum einen gewährleistete das Wasser in der geschlossenen Petrischale eine ausreichend hohe Luftfeuchtigkeit, um den Inokulationstropfen nicht austrocknen zu lassen. Zum zweiten konnten bei umfangreichen Versuchen genügend CMs Platz sparend inokuliert werden. Außerdem war

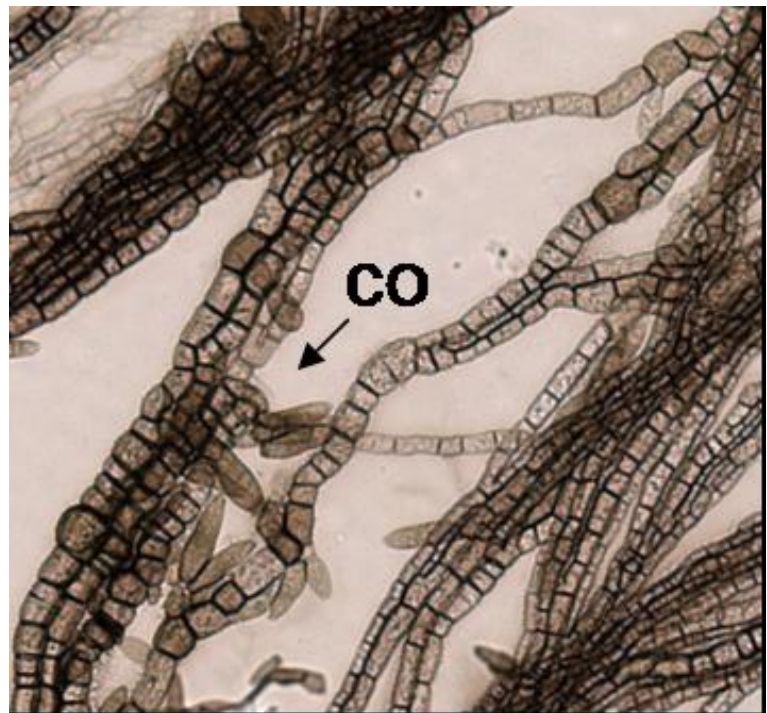
diese Methode auch im Hinblick auf die weitere Handhabung bei der Mikroskopie sehr vorteilhaft. Ein Nachteil war, dass die Wassermasse unterhalb der CMs relativ zu den Inokulationstropfen ein großes Sorptionsdepot darstellte, so dass bei kleinen Löchern in der CM Substanzen aus den Inkubationstropfen in die Wasserphase darunter diffundieren konnten. Dies Problem wird im Abschnitt 3.2 bei den Versuchen mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und den Alkylpolyglukosiden diskutiert.

3.1.3.1 Färbemethoden, Fluoreszenzmikroskopie

Auf den folgenden Seiten (Abb. 6 I bis K) sind Ergebnisse der lichtmikroskopischen Studien zusammengefasst.

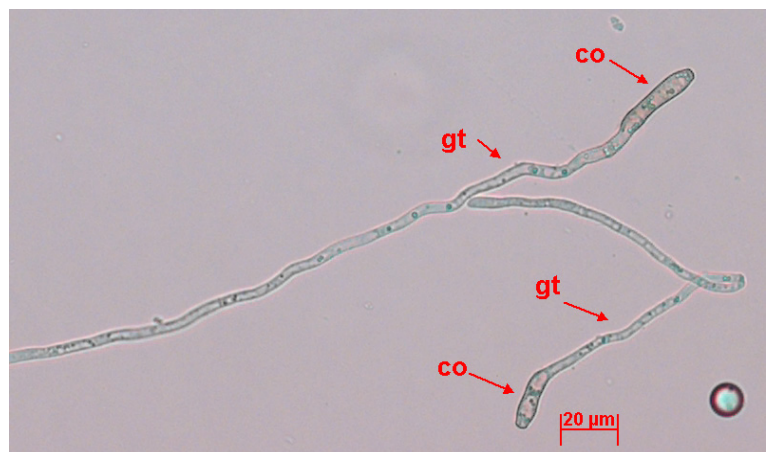
A

Myzelium auf einer Cellophanmembran nach 7d Inkubationsdauer auf PDA. Neben für das Wachstum auf Cellophan charakteristischen dicken, stark septierten Myzelsträngen sind Konidien (co) zu erkennen.



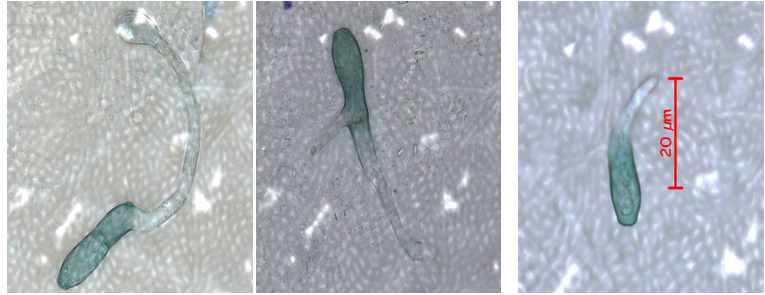
B

Gekeimte Konidien auf Agar nach 24h Inkubationsdauer. Im Gegensatz zur Inkubation auf CMs bildeten die Sporen statt der Appressorien lange Keimschläuche aus.



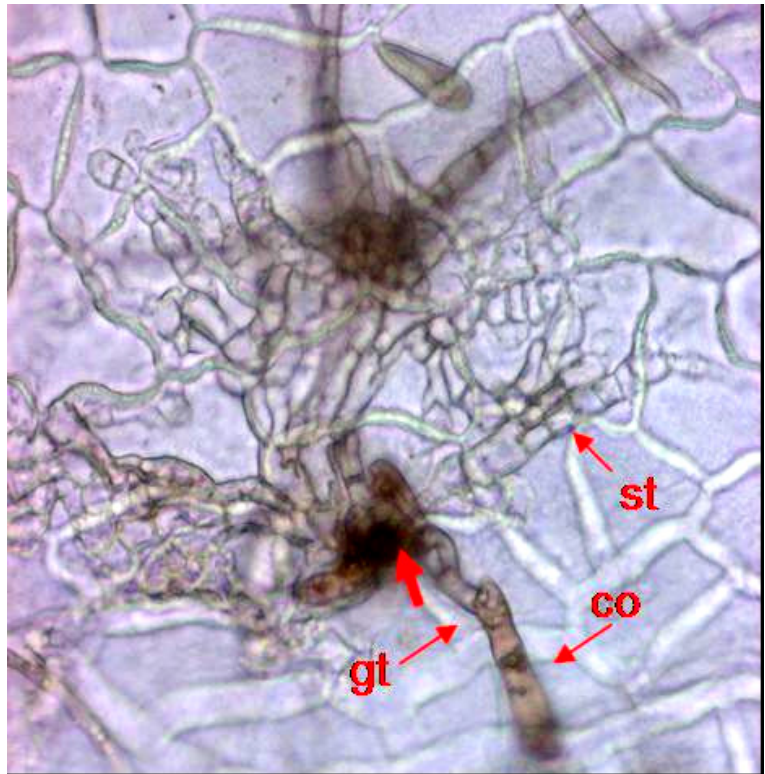
C

Konidien auf CMs, gefärbt mit Methylblau. Links normal entwickeltes Appressorium, rechts und Mitte Behandlungen mit Tensiden. Die Appressorien sind in ihrer Entwicklung gehemmt.



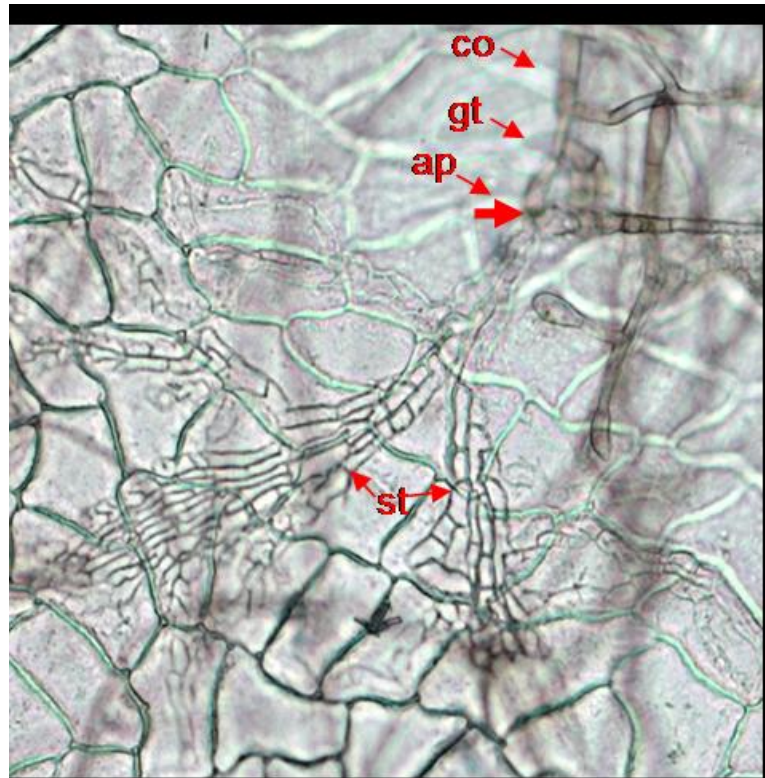
D

Stromaentwicklung auf Pyrus-CM nach einer Inkubationsdauer von 8d. Ein im Hellfeld deutlich erkennbares Stroma hat sich ausgebildet.



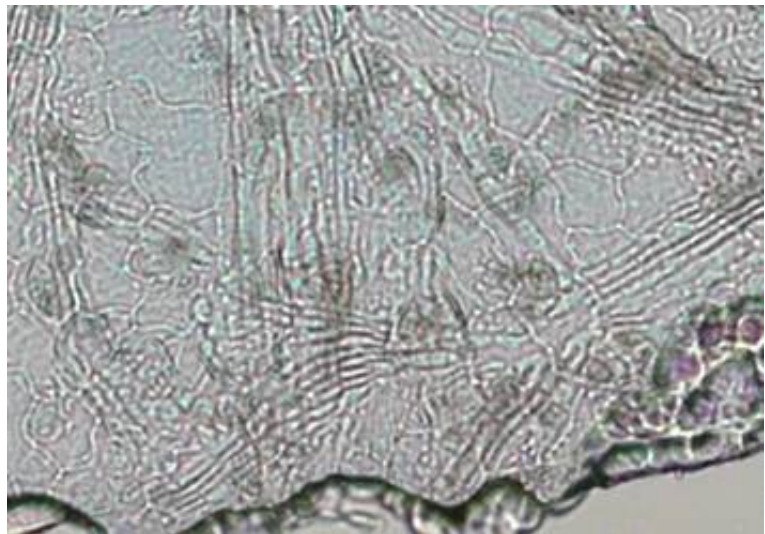
E

Stromaentwicklung auf *Pyrus-CM* nach einer Inkubationsdauer von 8 d. Ein im Hellfeld deutlich erkennbares Stroma hat sich ausgebildet. Die Verzweigung des Stromas mit seinen fingerartigen Ausläufen ist vergleichbar zu dem, welches von natürlichen Infektionen auf Apfelblättern der anfälligen Sorte ‚James Grieve‘ hervorgebracht wurde (siehe die nächsten beiden Aufnahmen F und G).



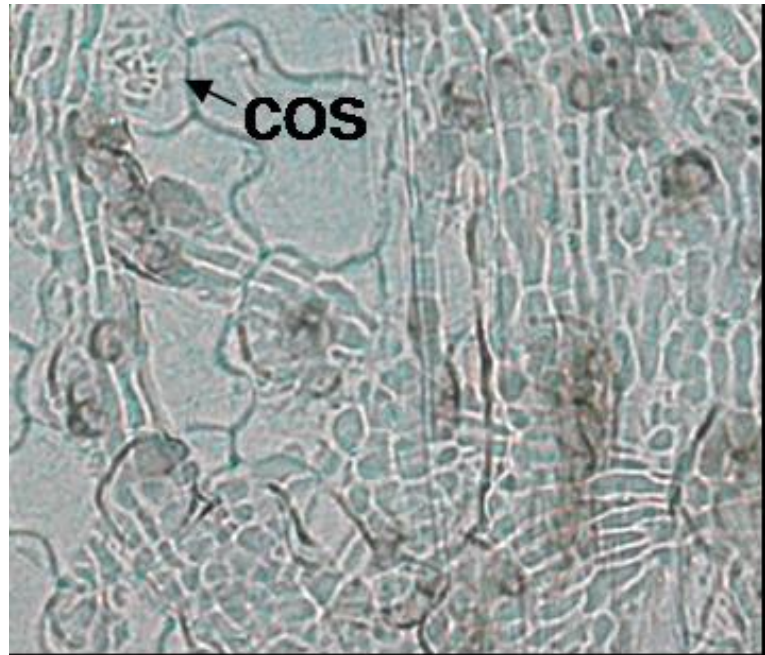
F

Stroma von *V. inaequalis* nach der Isolation eines natürlich infizierten Apfelblattes (‚James Grieve‘) gemäß der Methode von LI UND XU (2002). Vergrößerung: 100fach



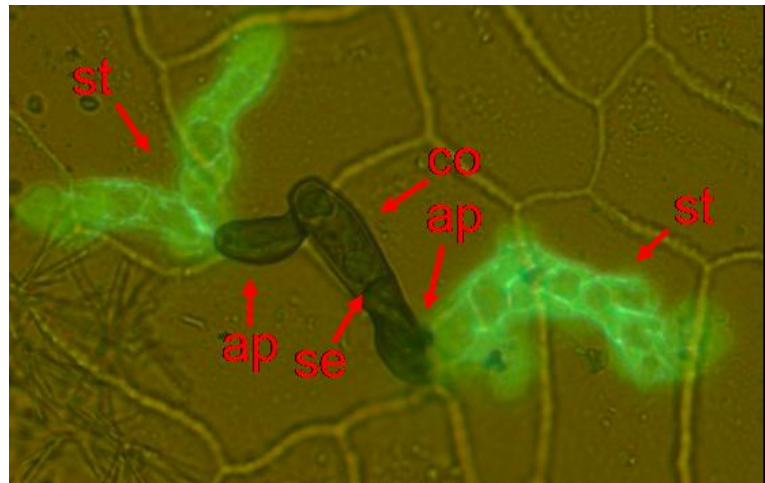
G

Stroma von *V. inaequalis* nach der Isolation eines natürlich infizierten Apfelblattes („James Grieve“) gemäß der Methode von LI UND XU (2002). Das typisch verzweigte Stroma ist gut zu erkennen, daneben auch ‚coralloide‘ Strukturen (cos) wie sie bei ORTEGA ET AL. beschrieben wurden (1998). Vergrößerung 400fach.



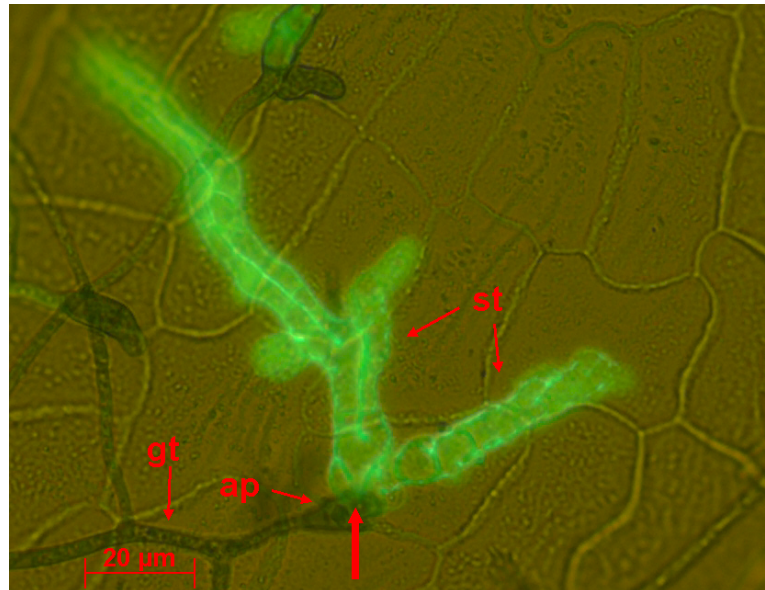
H

Gekeimte Konidie mit zwei Penetrationsstrukturen in der CM nach einer Inkubationsdauer von 3 d. FDA Färbung und gleichzeitige Hellfeld- und Fluoreszenzbeleuchtung. Die Konidie hat zwei Appressorien mit je einem Stroma entwickelt. Die Appressorien sind durch Septen von der Konidie getrennt. Links von der Spore sind FDA-Kristalle zu erkennen.



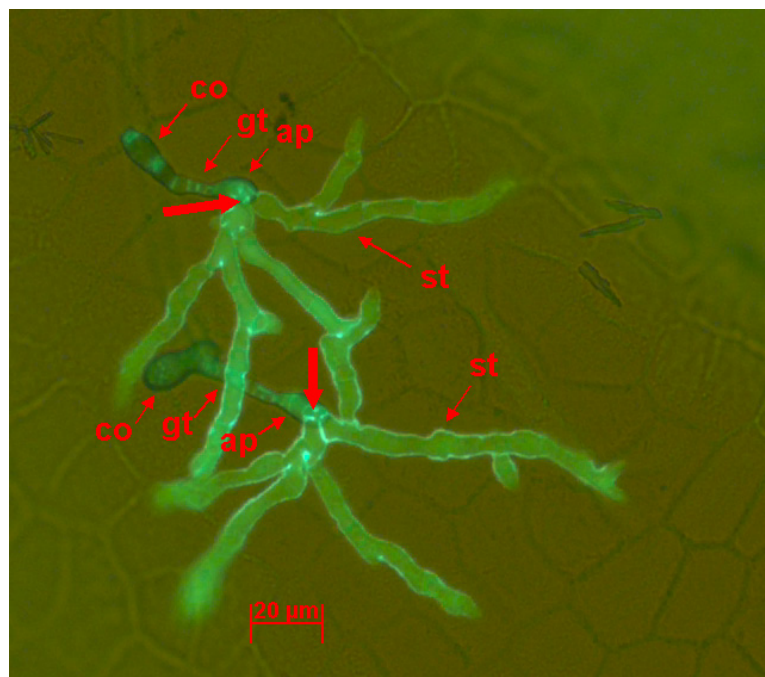
I

Gekeimte Konidien mit Penetrationsstrukturen in der CM nach einer Inkubationsdauer von 3 d. FDA Färbung und gleichzeitige Hellfeld- und Fluoreszenzbeleuchtung. Im Gegensatz zu den auf der Oberfläche befindlichen Pilzstrukturen wie Keimschlauch und Appressorium ist das Stroma breit, fingerartig verzweigt, gedungen und septiert.



J

Gekeimte Konidien mit Penetrationsstrukturen in der CM nach einer Inkubationsdauer von 3 d. FDA Färbung und gleichzeitige Hellfeld- und Fluoreszenzbeleuchtung. Wie oben ist das Stroma morphologisch verschieden zu Keimschläuchen, Konidien und Appressorien.



K

Durchgewachsene, mit FDA gefärbte Hyphen. Das Stroma unterscheidet sich morphologisch sowohl von denen auf der Oberfläche als auch von den in der CM wachsenden Hyphen. Diese Hyphen wachsen im destillierten Wasser, auf dem die CMs schwimmen und stellen höchstwahrscheinlich Artefakte dar.

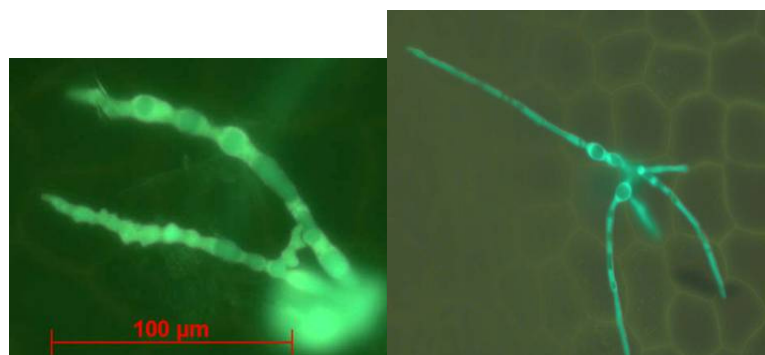


Abbildung 6: Übersicht der Morphologie der Hyphen und des Stromas von *V. inaequalis* auf Cellophan, Agar, isolierten CMs und in Blättern mit natürlichen Infektionen

In den Fällen, in denen kein Größenmaßstab angegeben ist, Als Größenmaßstab kann dienen, dass eine Konidie ca. 10 – 15µm misst.

ap= Appressorium, co = Konidie, cos = coralloide Strukturen, gt = Keimschlauch (germ tube), se = Septum, st = Stroma, die dicken Pfeile markieren die Penetrationsstelle

Die pilzlichen Strukturen die die *V. inaequalis*-Konidien nach der Inokulation auf der Oberfläche der CMs ausbildeten, d.h. Keimschläuche und Appressorien, ließen sich zur lichtmikroskopischen Untersuchung mit Methylenblau färben. Die Färbung mit Methylenblau führte auch auf Wasseragar zu guten Ergebnissen (Abb. 6 B, C).

Der Pilz war in der Lage, auf CMs Appressorien zu bilden, zu penetrieren und ein Stroma zu entwickeln.

Die Auswertungen zur Penetration der CMs wurden nach zwei bis drei Tagen durchgeführt, wenn das von den Appressorien ausgehende Stroma bereits gut sichtbar war. Das Stroma, welches innerhalb der CM wuchs, wurde nicht durch Methylenblau gefärbt. Ohne Färbung war es im Lichtmikroskop nach drei Tagen nur sehr schwer zu erkennen. Nach einer längeren Inkubationsdauer entwickelte sich ein weit verzweigtes Stroma, das auch ohne Färbung gut zu erkennen war (Abb. 6 D, E). Um das junge Stroma sichtbar zu machen, wurde ein Vitalfarbstoff verwendet, das Fluoresceindiacetat (FDA). FDA ist ein metabolischer Farbstoff, der durch in lebenden Zellen vorhandene Esterasen zu Fluorescein abgebaut wird. Das in den Zellen akkumulierte Fluorescein fluoresziert unter UV-Anregung (ROTMAN UND PAPERMASTER 1966, HAMEL ET AL. 1990, SLAVIC 1994).

Aufgrund der geringen Durchlässigkeit der Cuticula für FDA lassen sich nur die Hyphen auf der Innenseite der CMs färben. Strukturen auf der Außenseite, wie Sporen, Keimschläuche und Appressorien hingegen wurden bei Zugabe des FDA von der Innenseite der CMs nicht gefärbt. Da die CMs durchsichtig sind, war es möglich, unter Fluoreszenzanregung mit zusätzlichem Durchlicht die durch Methylenblau gefärbten Strukturen auf der Außenseite und die fluoreszierenden Penetrationsstrukturen gleichzeitig zu betrachten (Abb. 6 H, I, J).

Bei der LM der Penetration von *V. inaequalis* auf CMs wurde zwischen Penetrationsstrukturen unterschieden, die sich in der CM befinden, d.h. in einer mikroskopischen Ebene liegen und zwischen Hyphen, die durch die CMs durchgewachsen sind und mehr räumliche Tiefe besitzen. Beide Hyphenarten erschienen morphologisch verschieden, die Strukturen in der CM waren eher breit verzweigt und schwammartig mit großen Vakuolen (Abb. 6 H, I, J), während die durchgewachsenen Hyphen teils lang und fädig, z. T. aber auch gedrunken, blasig und stark septiert erschienen (Abb. 6 K). Es wurde beobachtet, dass das Auftreten durchgewachsener Hyphen mit der Dicke und Herkunft der CMs schwanken kann, wobei dünnere

CMs zu einem größeren Prozentsatz durchgewachsene Hyphen aufwiesen (Abschnitt 3.1.3.8). Bei manchen CMs, wie z. B. von *Pyrus communis*, wurden ausschließlich in der CM wachsende Hyphen gefunden. Das Hyphenwachstum auf Cellophanmembranen ähnelt dem des Stromas, in beiden Fällen sind die Hyphen in relativ kurzen Abständen septiert und recht breit, was zu einem gedrungenen Aussehen führt (Abb. 6 A).

3.1.3.2 Färbungen der Cuticularmembranen

Eine Gegenfärbung zu FDA sollte gefunden werden, d.h. ein Farbstoff, der unter UV-Anregung Licht einer anderen Wellenlänge abstrahlt als FDA, um bei der CLSM eine Kontrastierung zu bieten.

Rhodamin B erwies sich als am besten geeignet, denn die Färbung war beständig und unter der blauen Anregung, die auch für FDA verwendet wird, war die gesamte CM deutlich grünlich-orange gefärbt, wobei die Färbung im Gegensatz zu Acridin-Orange und Safranin auch den Bereich zwischen den Cuticularleisten, d.h. über den periklinen Zellwänden, umfasste.

Tabelle 6: Färbung der CM mit verschiedenen Farbstoffen

Farbstoff	Konzentration in H ₂ O (Stammlösung)	sichtbare Färbung (1:10 verdünnt)	Fluoreszenz bei blauem Anregungslicht	Fluoreszenz bei grünem Anregungslicht
Acridin-Orange	1%	Orange	Grün-gelb, Reste von Zellwänden orange	Rötlich, kaum Unterschied zur Kontrolle, schwächer als Safranin
Safranin	1%	Rot	Gelb-grün, nicht sehr intensiv, überwiegend Abdrücke antikliner Zellwände	Rötlich, nicht sehr intensiv aber stärker als bei der Kontrolle, überwiegend Abdrücke antikliner Zellwände
Rhodamin B	0,78%	Violett	Grünlich-orange, diffus	Kräftig orange-rot, diffus
Ruthenium-Rot	1%	-	-	-
Kontrolle	-	-	Grün-gelb, nur Abdrücke antikliner Zellwände und Haarabbruchstellen	Rötlich, nur Abdrücke antikliner Zellwände und Haarabbruchstellen

3.1.3.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Keimung und Appressorienbildung von *Venturia inaequalis* auf der Oberfläche isolierter CMs wurde rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Es sollte auch eruiert werden, wo genau sich das Stroma befindet. Daher wurden auch die Rückseiten der infizierten CMs mit einbezogen. In Abb. 7 sind mit Keimschläuchen und Appressorien ausgekeimte Konidien auf einer CM von ‚Gloster‘ zu erkennen. Die Konidien wirken z. T. eingefallen, während die Appressorien turgeszent und prall erschienen. Auf Abb. 7 D ist eine extrazelluläre Matrix zu erkennen.

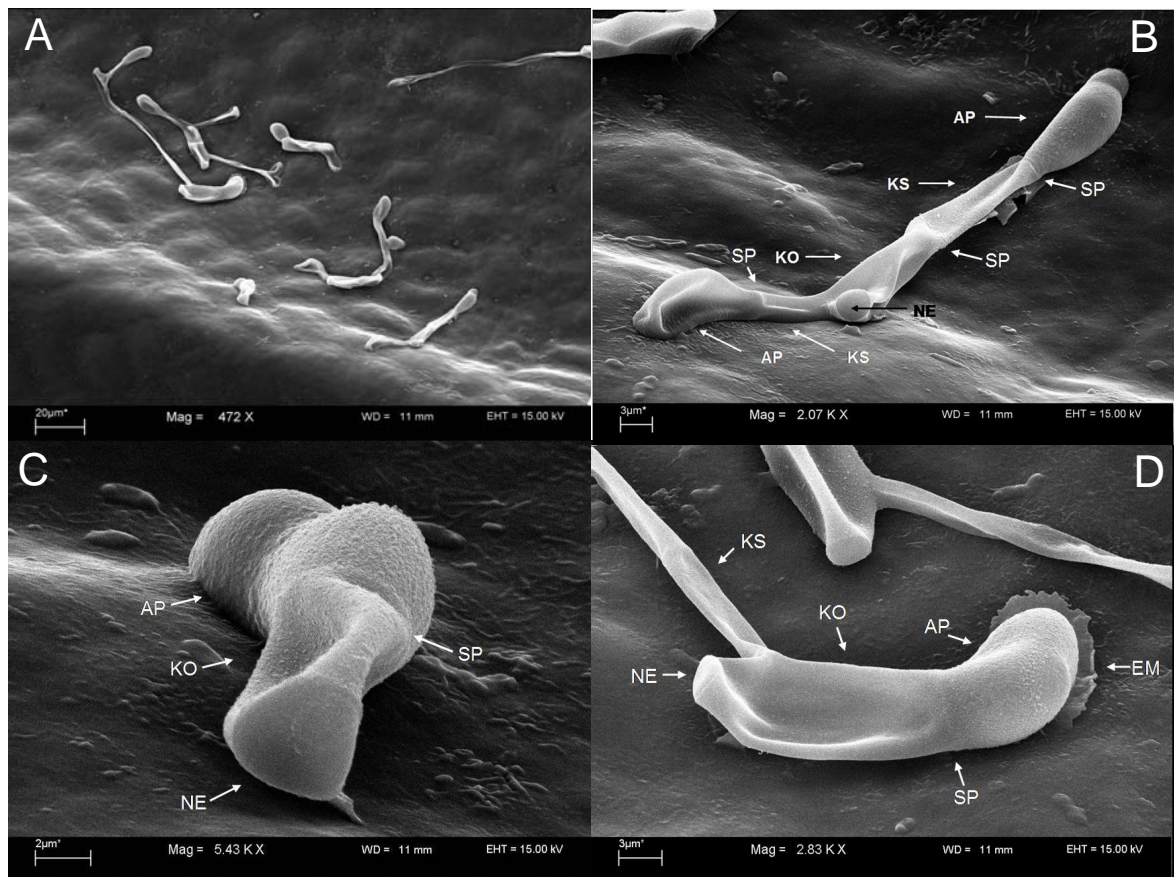


Abbildung 7: REM-Aufnahmen von gekeimten *V. inaequalis*-Konidien auf einer CM von ‚Gloster‘.

Die Inkubationsdauer betrug bei allen folgenden Proben 3 Tage bei 20°C, die CMs wurden mit Glutaraldehyd fixiert und dann auf Untersuchungstischchen aus Aluminium mit Spezialkleber oder Colloidgraphit fixiert und mit Gold (25 nm) beschichtet. Die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte bei 15 kV mit einem Rasterelektronenmikroskop der Firma Leica. AP: Appressorium, EM: Extrazelluläre Matrix, KS: Keimschlauch, KO: Konidie, NE: Narbe, SP: Septum

A zeigt eine Übersicht, B-D sind Detailaufnahmen. B: gekeimte Konidie mit zwei Keimschläuchen und Appressorien. C: Basale Ansicht der Spore mit der Narbe im Bildvordergrund und daran anschließender Konidie und dem Appressorium. Die Konidie erscheint deutlich eingesunken, der daran über ein Septum ansetzende kurze Keimschlauch mit folgendem Appressorium wirkt deutlich turgeszenter. D: Eine

direkt mit Appressorium gekeimte Konidie, die seitlich einen zweiten Keimschlauch ausgebildet hat. Am Appressorium ist eine extrazelluläre Matrix zu erkennen.

Für REM-Untersuchungen der morphologischen Innenseite wurden CMs der Sorte ‚Relinda‘ verwendet, die in präinfektiösen Untersuchungen den höchsten Anteil von durchgewachsenen Hyphen aufwiesen. Bei der Betrachtung der morphologischen Innenseite der CMs von ‚Relinda‘ (Abb. 8) sind Pilzhypen zu erkennen, die eindeutig ihren Ursprung in der CM-Oberfläche haben. Die Textur dieser Hyphen ist z. T. unterschiedlich. In Abb. 8 B sind raue und glatte Hyphen zu erkennen. Abb. 8 A, E und H sind Detailaufnahmen der Hyphe-nursprünge. Anhand eines drehbaren Probentisches wurde versucht, die Außenseite der CMs mit der Innenseite zu vergleichen. Dies sollte zeigen, ob die innen gefundenen Hyphen tatsächlich den Appressorien entspringen, jedoch die Wiederfindung war mit Problemen verbunden und führte zu keinen befriedigenden Ergebnissen.

Auf den Innenseiten von ebenfalls untersuchten *Pyrus*-CMs wurden keine Hyphen entdeckt, obwohl vorher im LM viele Konidien gefunden wurden, die ein Stroma entwickelt hatten.

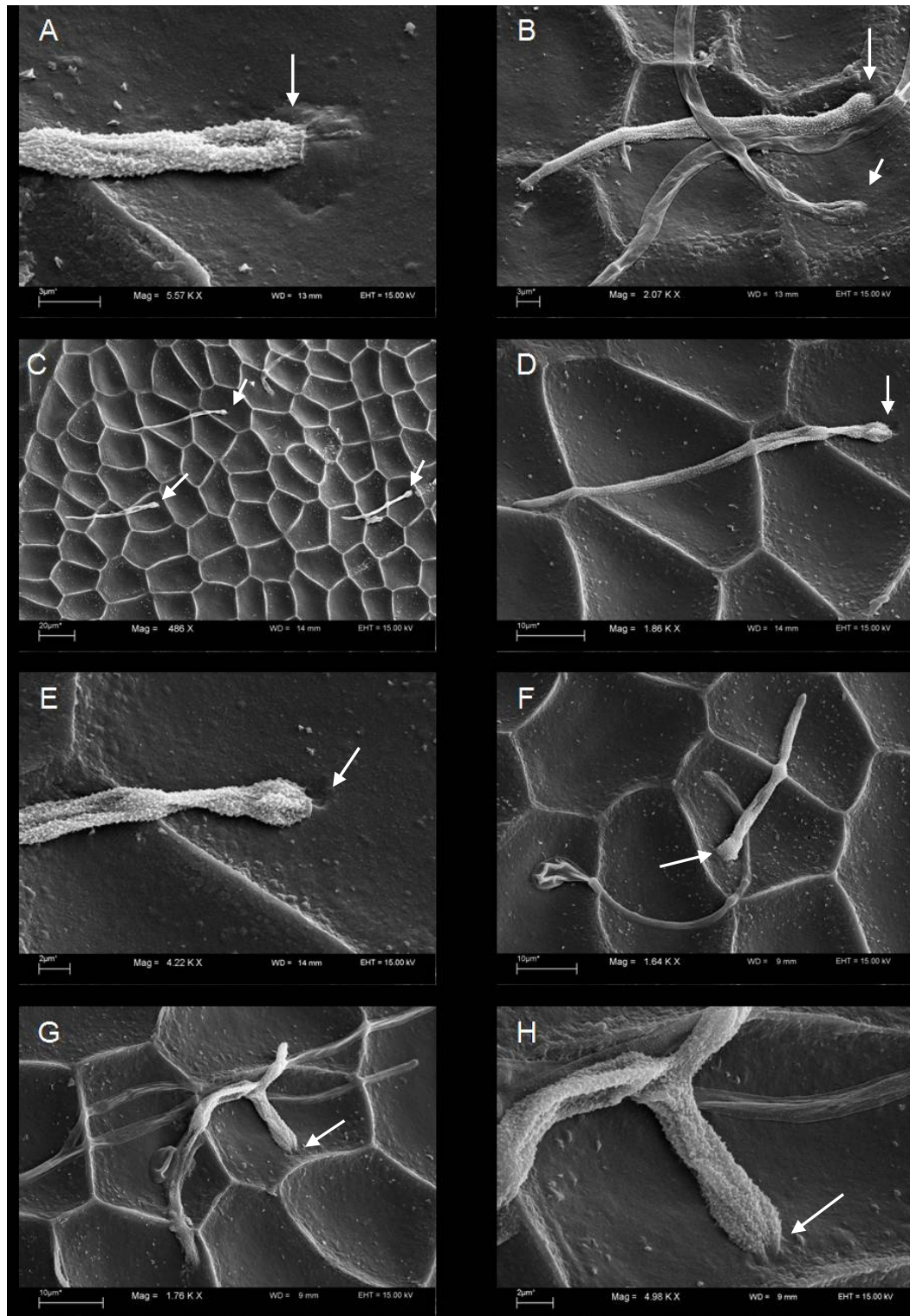


Abbildung 8: REM-Aufnahmen der morphologischen Innenseiten von mit *V. inaequalis* infizierten CMs der Sorte ‚Relinda‘

Die Inkubationsdauer betrug drei Tage, die Probenaufbereitung erfolgte wie oben beschrieben.

Bei Bild A kann man den Ursprung der Hyphe in der CM erkennen. C, D und E zeigen den gleichen Ausschnitt in steigender Vergrößerung. B und F zeigen Hyphen unterschiedlicher Textur. H ist ein Detail von G und zeigt den Ursprung der Hyphe in der CM. Die Pfeile markieren jeweils den Ursprung der Hyphen.

3.1.3.4 Untersuchungen zur Konidienkeimung

Die Konidienkeimung auf isolierten CMs verlief auf allen untersuchten CMs nach dem gleichen Schema: eine Konidie keimte zunächst mit einem Keimschlauch aus, meist am distalen, der Abschnürungsstelle der Spore gegenüberliegenden Ende. An diesem Keimschlauch wurde dann das Appressorium gebildet, wobei meist zwei Septen zwischen Konidien und Keimschlauch und Keimschlauch und Appressorium entstanden. Manchmal bildete eine Spore nur einen sehr kurzen Keimschlauch oder das Appressorium entstand als distale Verdickung, erkennbar durch ein Septum. Im weiteren Verlauf der Inkubation bildeten manche Sporen zusätzliche Keimschläuche mit Appressorien aus, so dass es durch eine Konidie zu mehreren Infektionen kommen konnte (s. Abb. 6 H).

Die optimale Sporenkonzentration auf den CMs musste mehreren Kriterien entsprechen: i) natürlich vorkommende Konzentrationen simulieren, ii) handhabbar in der Auswertung sein. Die natürlich vorkommenden Inokulumdosen für Konidien in Apfelanlagen liegen maximal bei vermutlich $0,1 \cdot 10^5$ Konidien·mL⁻¹ (HARTMANN ET AL. 1999). Für die Auswertung sind maximal 50-60 Konidien in einem 5 µL Tropfen handhabbar. Dies entspricht $1,1 \cdot 10^4$ Konidien·mL⁻¹ und liegt daher im Bereich der natürlich vorkommenden Konzentration. Da die Appressorienbildung über einen weiten Bereich der Sporenkonzentration konstant verlief (Abb. 9), konnten für weitere Versuche Sporensuspensionen mit Konidientitern von $0,2$ bis $1,0 \cdot 10^4$ Konidien·mL⁻¹ verwendet werden.

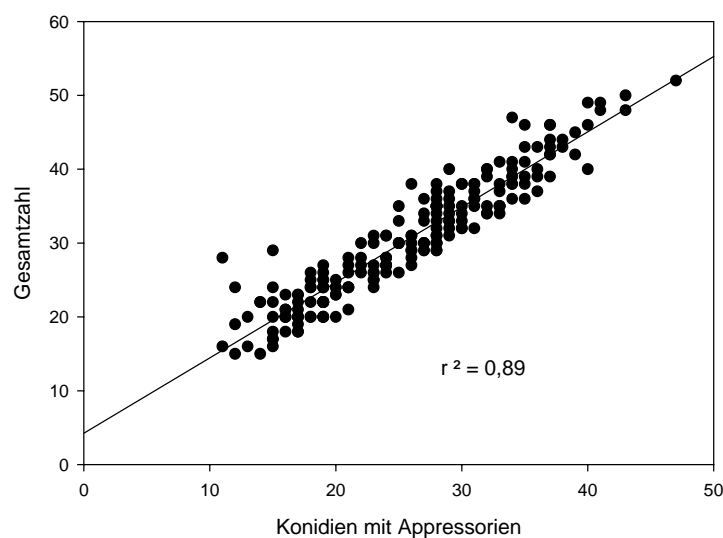


Abbildung 9: Korrelation zwischen Sporenanzahl und Appressorienbildung auf isolierten CMs

Auf ‚Gloster‘-CMs wurden Sporensuspensionen (5 µL) mit verschiedenen Konidientitern pipettiert und die Appressorienbildung erfasst. Eine Gesamtzahl von zehn Sporen entspricht $0,2 \cdot 10^4$ Konidien·mL⁻¹.

3.1.3.5 Wasseragarkontrolle

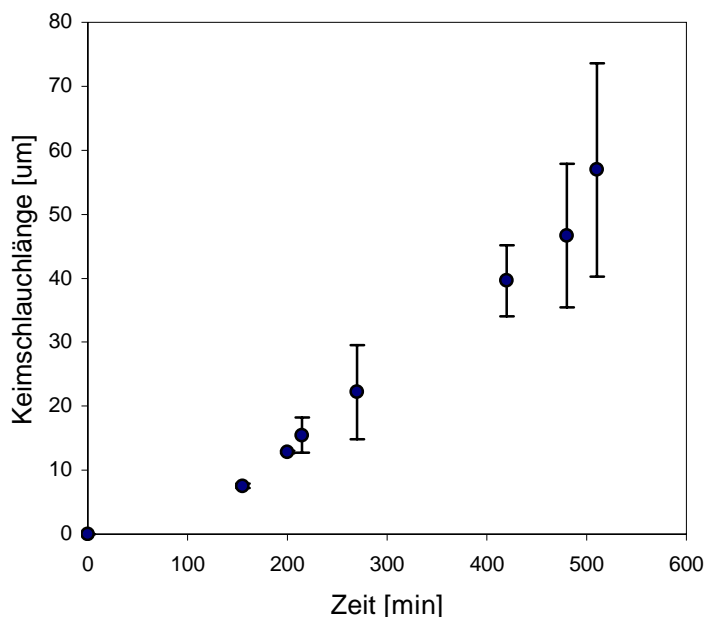


Abbildung 10: Keimschlauchwachstum auf Wasseragar.

Zu den frühen Messterminen standen weniger Werte zur Verfügung, da die Keimung nicht synchron verlief und nur wenig gekeimte Sporen gefunden wurden. Die Balken geben die Standardabweichung an (N= 2 bis 7).

Die Wasseragarkontrolle diente zur Bestimmung der Sporenvitalität. Dies war notwendig, um eventuelle hemmende Einflüsse der CMs auf die Sporenkeimung erkennen zu können. Das Längenwachstum der Sporen auf Wasseragar war deutlich zu dem auf CMs verschieden. Hier bildeten die Sporen nur einen langen Keimschlauch, aber keine Appressorien aus. In Abb. 10 ist das Wachstum der Keimschläuche zeitabhängig dargestellt.

3.1.3.6 Zeitlicher Ablauf der Keimung, Appressorienbildung und Penetration auf CMs

Bei 20°C begannen die Konidien nach ca. fünf Stunden auszukeimen, erste Appressorien wurden bereits nach sechs Stunden gebildet (Abb. 11). Nach acht Stunden gab es fast nur noch gekeimte Konidien, nach zehn Stunden hatten die meisten gekeimten Sporen Appressorien gebildet.

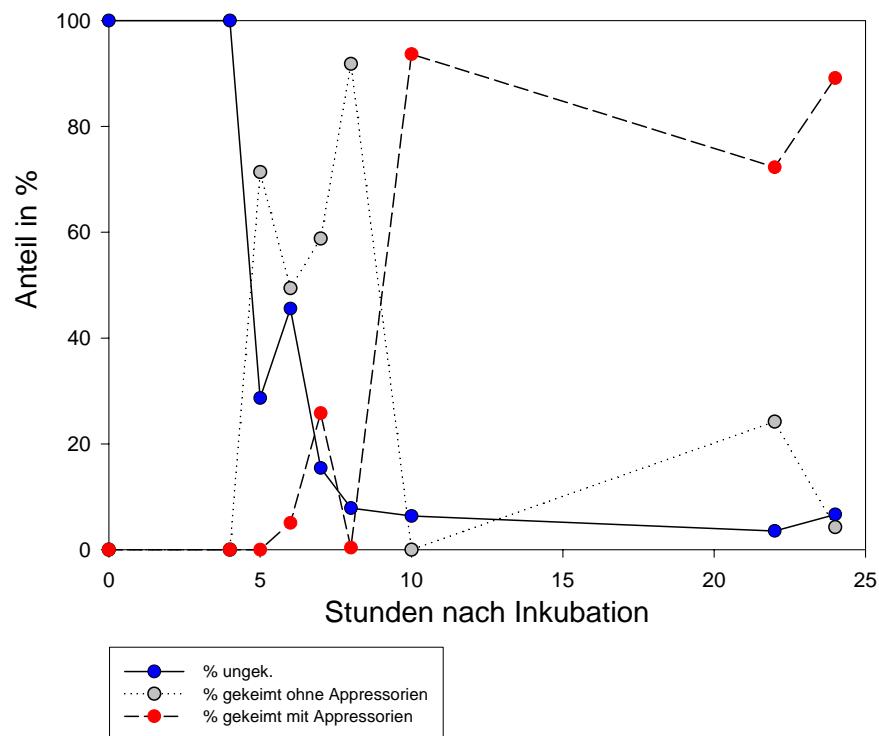


Abbildung 11: Verlauf der Konidienkeimung auf CMs.

Neun CMs der Sorte ‚Gloster‘ wurden mit einer Sporensuspension inokuliert und bei 20°C inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde der Anteil Sporen, die gekeimt und Appressorien gebildet hatten, bonitiert. Jeder Punkt gibt den pro CM gefundenen Wert wieder.

3.1.3.7 Konidienkeimung und Penetration auf CMs verschiedener anfälliger und resistenter Apfelsorten sowie Nichtwirten für *Venturia inaequalis*

Eine Fragestellung bei der Entwicklung eines Systems basierend auf isolierten CMs war ob das Ausgangsmaterial, in diesem Fall die Membranen, auf die Konidienkeimung und Appressorienbildung einen Einfluss hat. Bei der Auswertung der Keimraten treten drei Klassen auf: ungekeimte Konidien, gekeimte Konidien ohne Appressorien und gekeimte Konidien mit Appressorien. Der Anteil der Konidien, die ohne Appressorien auskeimten, war meist sehr niedrig (< 5%), so dass die Keimrate sehr gut mit der Appressorienbildung gleichgesetzt werden konnte.

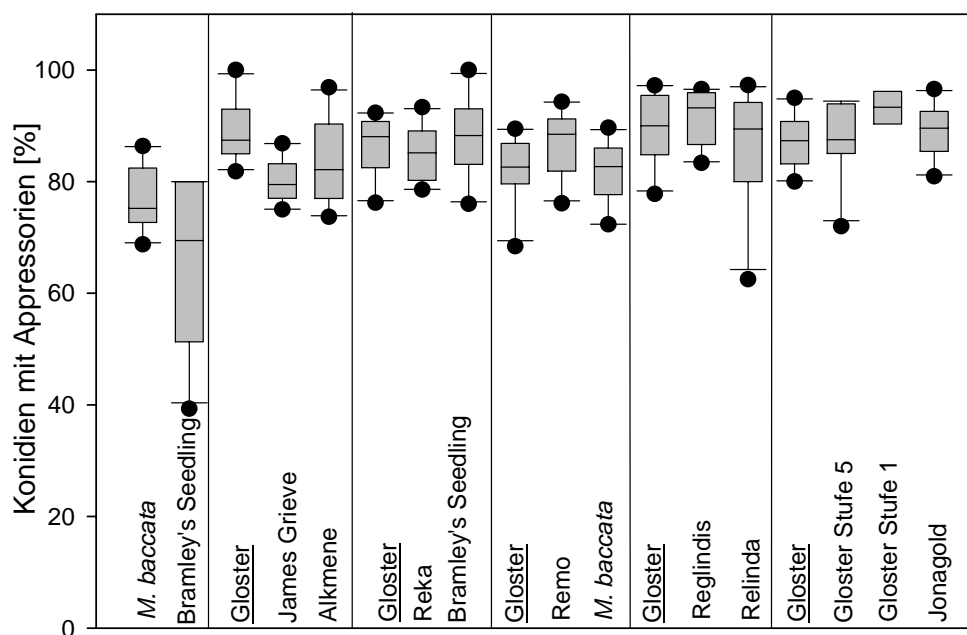


Abbildung 12: Appressorienbildung auf CMs verschiedener Apfelsorten und *M. baccata*.

Die Daten für jeden Versuchszeitpunkt sind durch vertikale Linien getrennt. Die Werte resultieren aus den Anteilen von Konidien mit Appressorien von je 10 CMs. Die Box Plots zeigen die 5th/95th Perzentile mit Fehlerbalken und den Median als durchgezogene Linie. Zu jedem Termin, außer beim ersten Mal, wurden CMs der Sorte ‚Gloster‘ als Kontrolle herangezogen ($\Delta t = 2$ bis 7d).

Die Appressorienbildung auf CMs von schorfanfälligen und –resistenten Apfelsorten wurde untersucht, um einen möglichen Einfluss des Resistenzstatus auf die Appressorienbildung zu untersuchen. Die Raten zwischen den verschiedenen Untersuchungsterminen schwanken leicht, wobei diese Unterschiede der Vitalität der Sporen zuzuordnen ist (Abb. 12). Zu jedem Termin außer dem ersten wurden CMs der Sorte ‚Gloster‘ als Kontrolle herangezogen. Außer für den zweiten Termin ergeben sich keine signifikanten Unterschiede für die Appressorienbildung auf CMs von anfälligen oder resistenten Apfelsorten verglichen zur ‚Gloster‘-Referenz (t -Test, P-Werte von 0,013 bis 0,581 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%).

Bei der Keimung auf CMs verschiedener Nichtwirte (Abb. 13) zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Keimraten zwischen den untersuchten CMs zu den jeweiligen Untersuchungsterminen (P-Werte von 0,063 bis 0,992 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%).

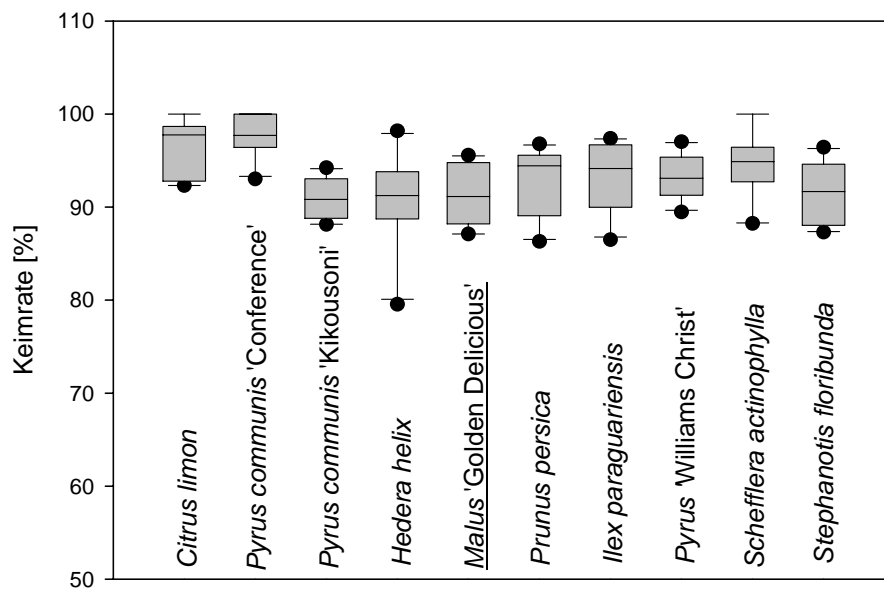


Abbildung 13: Keimraten auf CMs verschiedener Nichtwirte und *Malus x domestica* ‚Golden Delicious‘.

Je zwei aufeinander folgende Box Plots resultieren von einem Versuchstermin. Zwischen den Terminen ist $\Delta t = 2$ bis 7d. Die Werte resultieren aus den Keimraten von je 10 CMs. Die Box Plots zeigen die 5th/95th Perzentile mit Fehlerbalken und sämtlichen Ausreißern und den Median als durchgezogene Linie.

Bei der Penetration zeigte sich folgendes Bild (Abb. 14). Die Penetrationsraten unterlagen im Gegensatz zu den Keimraten z. T. erheblichen Schwankungen. Die Raten waren gemessen an der hier verwendeten Standardsorte ‚Gloster‘ zum Teil signifikant verschieden, wobei sowohl anfällige als auch resistente Sorte zu einem geringeren Maße (Alkmene, Bramley’s Seedling, Reglindis, Remo) oder zu einem höheren Maße (*M. baccata*, Relinda) als ‚Gloster‘ penetriert wurden.

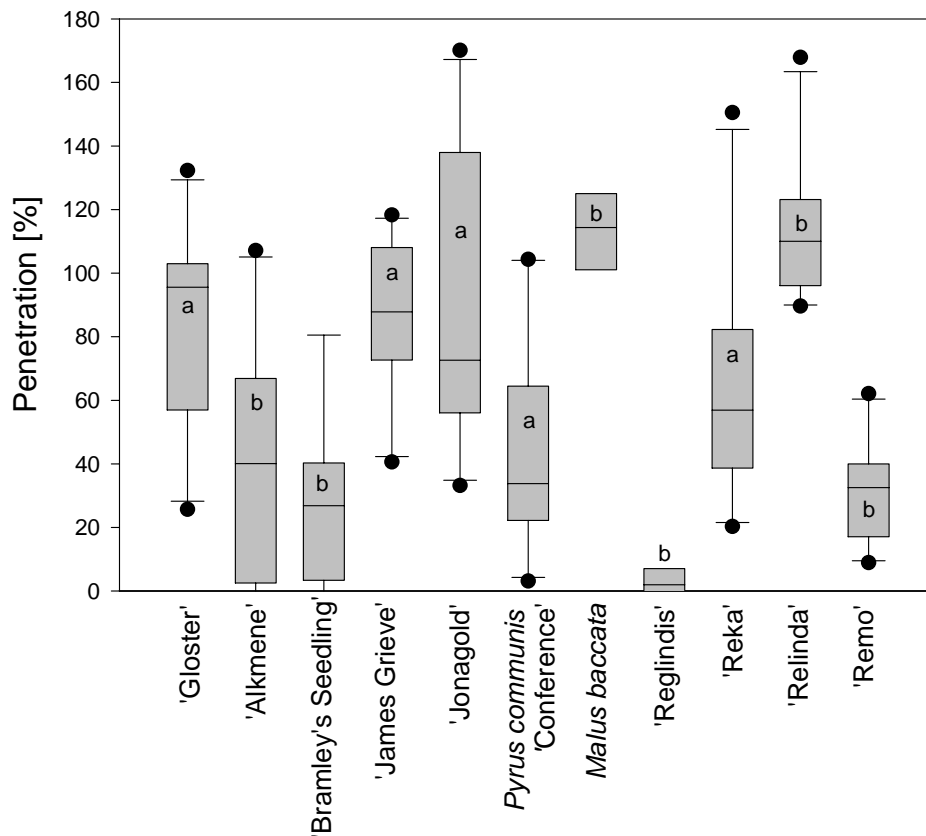


Abbildung 14: Penetrationsraten auf CMs verschiedener Apfelsorten und *M. baccata* und *Pyrus communis* ‚Conference‘.

Die Werte resultieren aus den Penetrationsraten von je 10 CMs. Angegeben ist die Summe aus in der CM wachsenden und durchgewachsenen Hyphen. Die Box Plots zeigen die 5th/95th Perzentile mit Fehlerbalken und sämtlichen Ausreißern und den Median als durchgezogene Linie. Statistische Tests (Students t-Test) wurden mit der SigmaStat 3.0 Software von SPSS durchgeführt. Werte die den gleichen Buchstaben tragen waren nicht signifikant verschieden zur Vergleichssorte ‚Gloster‘ ($P < 0,05$).

3.1.3.8 Konidienkeimung und Penetration auf CMs unterschiedlicher Dicke

Abb. 15 zeigt die Ergebnisse für ‚Alkmene‘ und ‚James Grieve‘. Bei beiden Apfelsorten zeigte sich, dass die Summe aller Penetrationshyphen (Abb. 15 oben) zu dem Gewicht der CMs in keiner Korrelation stand ($r^2 < 0,01$). Bei den durchgewachsenen Hyphen zeigte sich bei beiden Sorten mit zunehmendem Gewicht, d. h. dickeren CMs, eine Abnahme der Anzahl. Jedoch bestand hier ebenfalls keine signifikante Korrelation ($r^2 = 0,33$ bei ‚Alkmene‘ und $0,13$ bei ‚James Grieve‘). Komplementär dazu verlief die Anzahl der Hyphen in der CM (Abb. 15, unten), welche mit zunehmender Dicke der Membran zunahm, wobei jedoch auch hier sehr niedrige Korrelationskoeffizienten gefunden wurden ($r^2 = 0,13$ und $0,08$). Daher kann nicht von einer Korrelation, sondern höchstens von Tendenzen gesprochen werden.

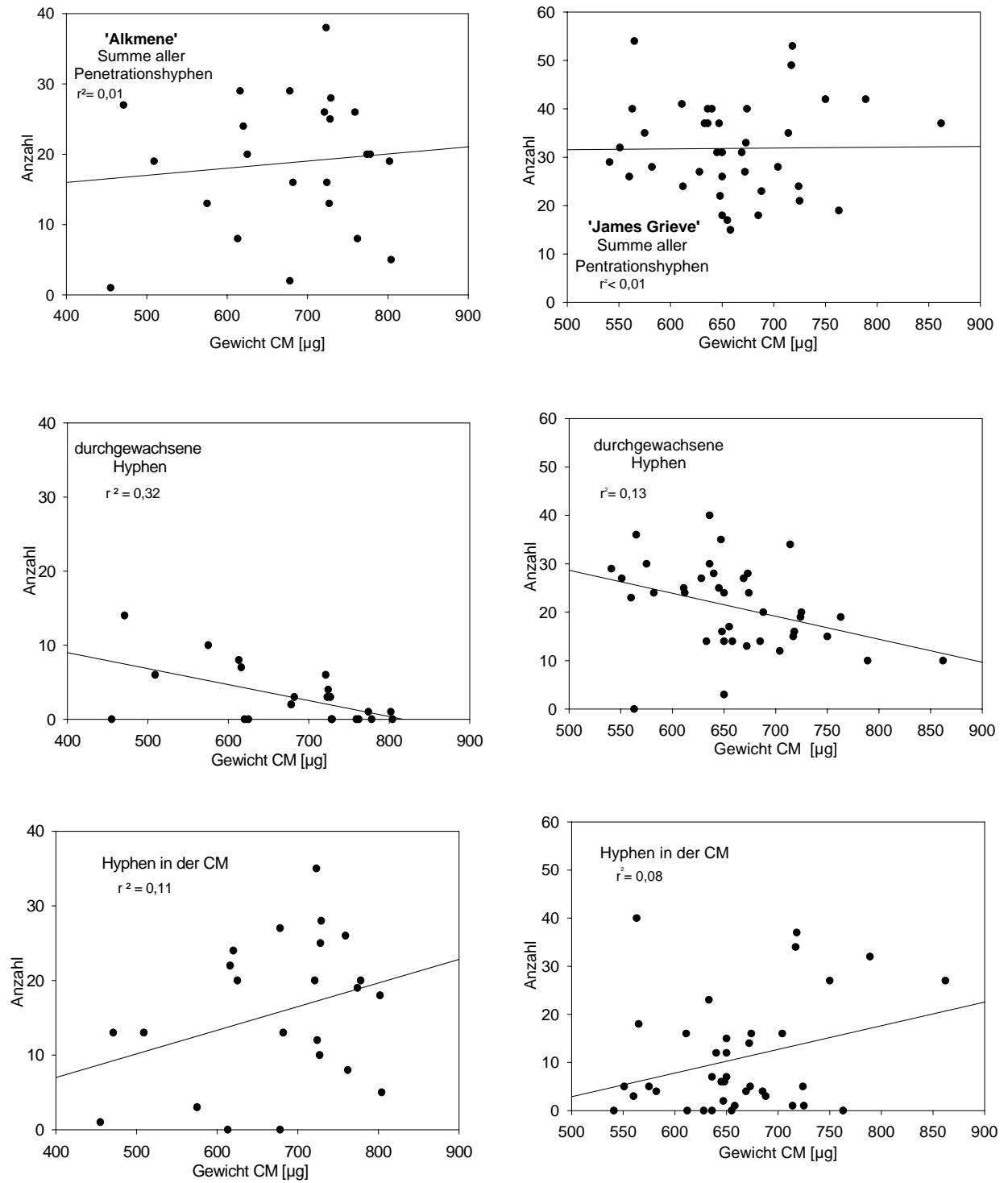


Abbildung 15: Einfluss des Gewichts der CMs auf den Anteil von durchgewachsenen und in die CM gewachsenen Penetrationshyphen bei ‚Alkmene‘ (linke Spalte) und ‚James Grieve‘ (rechte Spalte)

r^2 gibt das Bestimmtheitsmaß an, welches mit SigmaPlot anhand einer linearen Regressionsanalyse bestimmt wurde.

3.1.4 Diskussion des Abschnittes A: Entwicklung des Testsystems

Es ist gelungen, gemäß der Aufgabenstellung, ein Testsystem basierend auf isolierten CMs zur Untersuchung von *Venturia inaequalis* zu entwickeln. Neben Untersuchungen zur Zusammensetzung und Struktur der Cuticula an sich dienten isolierte CMs in der Vergangenheit zumeist der Ermittlung von Aufnahme- und Transportraten von Stoffen (SCHMIDT ET AL. 1981, HOLLOWAY 1982, SCHÖNHERR UND RIEDERER 1986, SCHREIBER UND SCHÖNHERR 1993, BUCHHOLZ ET AL. 1998, JENKS 2002) während die Rolle der Cuticula in der Wirt-Pathogen-Beziehung zumeist an intakten Pflanzen untersucht wurde.

Versuche zum Mechanismus der Oberflächenerkennung, Keimung und Appressorienbildung von phytopathogenen Pilzen wurden häufig auch auf künstlichen Oberflächen durchgeführt, die die Manipulation der Hydrophobizität, Wachszusammensetzung und Festigkeit erlauben. Harte Oberflächen und eine gewisse Hydrophobizität wirken bei *Colletotrichum* spp. (CHAKY ET AL. 2001, KIM ET AL. 2002), *Magnaporthe grisea* (JELITTO ET AL. 1994, XIAO ET AL. 1994), *Erysiphe graminis* (CARVER UND INGERSON 1987), *Phyllosticta amelicida* (SHAW UND HOCH 1999) und *Blumeria graminis* (WRIGHT ET AL. 2002 A UND B) stimulierend auf die Appressorienbildung.

Die Keimung und Appressorienbildung bei *Venturia inaequalis* wurde zumeist mikroskopisch an intakten Blättern oder BS untersucht (SMEREKA ET AL. 1986, TURNER ET AL. 1986, VALSANGIACOMO UND GESSLER 1988, CHEVALIER ET AL. 1991, ORTEGA ET AL. 1998) und auch an etiolierten Apfelhypokotylen (NICHOLSON ET AL. 1972, 1973 UND 1977).

Viele Laborversuche mit phytopathogenen Pilzen wurden auf künstlichen Nährmedien durchgeführt und dabei z. B. Keimraten und Hemmung des Myzels bonitiert (HIPSKIND UND PAIVA 2000, SEPPÄNEN ET AL. 2004). Das Keimverhalten der Sporen auf Wasseragar war in dieser Arbeit deutlich zu dem auf CMs verschieden. Auf Agar werden keine Appressorien gebildet. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen an anderen appressorienbildenden Pathogenen wie *Magnaporthe grisea* und *Colletotrichum graminicola*, in denen berichtet wird, dass die Appressorienbildung bestimmten Stimuli wie z. B. der Oberflächenfestigkeit und Hydrophobizität unterliegt (XIAO ET AL. 1994, HOWARD 1997, CHAKY ET AL. 2001).

Daher wird deutlich, dass Tests auf künstlichen Nährmedien für die Untersuchung einer differentiellen Wirkung auf die Keimung, Appressorienbildung und Penetration nicht ausreichen. Bei *V. inaequalis* setzt eine erfolgreiche Infektion die Penetration des Wirtsgewebes, d. h. der CM voraus und die Penetration ist nur möglich, wenn vorher ein Appressorium gebildet wurde (MACHARDY 1996).

Auskeimung und Appressorienbildung

Das hier entwickelte Testsystem sollte die Vorteile der leichten Handhabung eines Laborsystems unter Simulation einer natürlichen Blattoberfläche vereinen. Dabei sollte die Voraussetzung der Vergleichbarkeit des Verhaltens von *V. inaequalis*-Konidien zu lebenden Blättern gewährleistet werden. Der Vergleich gelang anhand der Gegenüberstellung des Verhaltens auf isolierten CMs zu mikroskopischen Arbeiten an lebenden Blättern. TURNER ET AL. (1986) beobachteten, dass Konidien typischerweise kurze Keimschläuche ausbildeten, die halb- bis doppelt so lang wie die Spore selbst waren und in einem Appressorium endeten, welches mit einem Septum von dem Keimschlauch abgetrennt war. Dieses typische Keimverhalten konnte auf isolierten CMs regelmäßig identisch festgestellt werden und wurde hier anhand von lichtmikroskopischen- und REM- Aufnahmen dokumentiert.

In den REM-Aufnahmen war auch zu erkennen, dass Keimschläuche und Appressorien oftmals turgeszenter erscheinen als die Spore selbst. Möglicherweise ist das Appressorium durch Melanineinlagerungen besser gegen Trocknungsschäden, die durch die Aufbereitung für die REM-Untersuchungen auftreten können, geschützt als die Keimschläuche. Der Begriff Stroma wird in dieser Arbeit analog zu anderen (CORLETT UND CHONG 1977, GESSLER UND STUMM 1994) für das subcuticuläre Myzel verwendet.

Auf Abb. 7 D ist eine extrazelluläre Matrix zu erkennen, wobei es sich aber u. U. um einen Artefakt der Probenaufbereitung handeln könnte. Allerdings wurde die Bedeutung einer extrazellulären Matrix für die Anhaftung von Sporen und Appressorien für *V. inaequalis* bereits gezeigt (CORLETT UND CHONG 1977), ebenso wie für andere phytopathogene Pilze (WATANABE ET AL. 2000, CARZANIGA ET AL. 2001, HUTCHINSON ET AL. 2002, DOSS ET AL. 2003). Die Pilze nutzen verschiedene Mechanismen der Anhaftung, abhängig von der Hydrophobizität und anderer Eigenschaften des zu besiedelnden Pflanzengewebes (MENDGEN UND DEISING 1993), wobei die sekretierten Klebstoffe verschiedenen Stoffklassen wie Polysacchariden, Lipiden, Proteinen oder Glycoproteinen angehören (EMMET UND PARBERY 1975, EPSTEIN UND NICHOLSON 1997, MENDGEN UND DEISING 1993, DEAN 1997, TUCKER UND TALBOT 2002). Die Anhaftung ist der erste Schritt zu einer erfolgreichen Etablierung des phytopathogenen Erregers auf seinem Wirt (TUCKER UND TALBOT 2002).

TURNER ET AL. untersuchten auch den zeitlichen Verlauf der Keimung und Appressorienbildung bei verschiedenen Temperaturen. Die in dieser Arbeit gefundenen Werte für den zeitlichen Verlauf der Keimschlauch- und Appressorienentwicklung decken sich mit den Werten von TURNER ET AL. für Konidien bei 20°C. Demnach beginnen die Keimung nach drei Stun-

den und die Appressorienbildung nach einer Inkubationsdauer von sechs Stunden. Dementsprechend nimmt der Anteil von Konidien, die bisher nur Keimschläuche ausgebildet hatten bis zur Dauer von 20 Stunden ab. Das war der Zeitpunkt bei eigenen Untersuchungen, zu dem alle Sporen, die vorher nur einen Keimschlauch hatten, ihre Appressorienbildung vollendet hatten. BECKER UND BURR (1993) geben als Zeitdauer bei 20C° bis die Hälfte der Konidien gekeimt sind, vier Stunden an.

Dies verdeutlicht, dass der natürliche Verlauf der Konidienkeimung und Appressorienbildung auf isolierten CMs, unabhängig von deren Herkunft, gewährleistet ist.

Penetration der CMs

Der auf die Appressorienbildung folgende Entwicklungsschritt bei der Infektion mit *V. inaequalis* ist die Penetration der Cuticula und die Etablierung eines subcuticulären Stromas. Das parasitische Myzelium, bzw. Stroma von *V. inaequalis*, aus welchem bei einer kompatiblen Wirt-Parasitbeziehung die Konidienträger entstehen, ist auf den subcuticulären Bereich des Blattes beschränkt (CORLETT UND CHONG 1976, MACHARDY 1996). Die Cuticula ist die einzige mechanische Barriere der Penetration von *V. inaequalis*, denn die Stromaentwicklung erfolgt zwischen Cuticula und Epidermiszellen. Der Pilz bildet keine Haustorien und penetriert die Epidermiszellwände nicht (NICHOLSON ET AL. 1973, SMEREKA ET AL. 1987 für Ascosporen). ORTEGA ET AL. (1998) fanden coralloide Strukturen im Stroma von *V. inaequalis*. Sie vermuteten, dass diese coralloiden Hyphen entlang der Laufhyphen und des sekundären Stromas in sehr engem Kontakt zu epidermalen Zellen stehen und zur Oberflächenvergrößerung dienen könnten und daher eine Art spezifischer Nährstoffgewinnungsstruktur darstellen könnten. Ähnliche Strukturen wurden auch hier an natürlich infizierten Apfelblättern gefunden (Abb. 6 G). Bei einer kompatiblen Wirt-Parasit-Interaktion verzweigt sich das Stroma strahlenförmig und flächig unter der Infektionsstelle, wobei die Hyphen zunächst nur eine Lage aus einer Zelldicke bilden. Besonders über Blattadern und auf Früchten wird das Stroma mehrere Zelllagen dick. Der Pilz fügt den Zellen keine makroskopisch sichtbaren Schäden während seiner Ernährung zu (PAUL 1981, STADELMANN UND SCHWINN 1981, MACHARDY 1996, ORTEGA ET AL. 1998). Wenn man die Entwicklung des Erregers in anfälligen und resistenten Pflanzen vergleicht, zeigt sich, dass die Ausbildung von Penetrationshyphen und Penetrationsraten ähnlich ist. Bei kompatiblen Reaktionen wird ein subcuticuläres Stroma ausgebildet, doch umso schwächer, je weniger anfällig der Wirt ist. Eine Resistenzreaktion scheint mit Stoffen zusammenzuhängen, die ihren Ursprung im Wirtsgewebe haben und weniger mit mechanischen Barrieren (SHAY UND HOUGH 1952, MACHARDY 1996). Wenn man

die in dieser Arbeit auf isolierten CMs gefundenen Penetrationsstrukturen, bzw. das entwickelte Stroma mit mikroskopischen Untersuchungen an lebenden Blättern vergleicht, zeigen sich Übereinstimmungen in der Morphologie (GESSLER UND STUMM 1984, VALSANGIACOMO UND GESSLER 1988, ORTEGA ET AL. 1998). Auch das Stroma, welches LI UND XU (2002) an ihren Untersuchungen an den Unterseiten alter, ontogen resistenter Blättern fanden und als rhizomorph bezeichneten, ähnelt dem, welches auf isolierten CMs nach einer längeren Inkubationsdauer entsteht.

Die in der CM wachsenden Penetrationsstrukturen von *V. inaequalis* haben eine größere morphologische Ähnlichkeit mit denen in Blattscheiben gefundenen Penetrationsstrukturen als die durchgewachsenen Hyphen, die eher dem superfiziell wachsenden Myzel ähneln (Abschnitt 3.3). Daher wird angenommen, dass das in der CM lokalisierte Stroma für Aussagen, die das Verhalten von *V. inaequalis in planta* vorhersagen sollen, den am besten geeigneten Parameter darstellt. Bei den durchgewachsenen Hyphen, die bei REM-Untersuchungen an CMs von ‚Relinda‘ gefunden wurden, scheint es sich um Artefakte zu handeln. Bei REM-Untersuchungen der Innenseiten von *Pyrus*-CM wurden keine Hyphen gefunden. Jedoch wurden bei LM-Untersuchungen an denselben CMs viele Konidien, die ein Stroma ausgebildet hatten, gefunden. Dies könnte als indirekter Beweis für das Wachstum in der CM gewertet werden.

Die physiologischen Unterschiede zwischen einem lebenden Blatt und einer isolierten CM beschränken sich auf den subcuticulären Bereich, der offensichtlich bei isolierten CMs fehlt. Daher ist es besonders bemerkenswert, dass das in isolierten CMs entstandene Stroma dem in lebenden Blättern gebildeten zumindest in der Anfangsphase, d. h. vor der Sporulation, entspricht.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass ein Einzelsporisolat von *V. inaequalis* zur Inokulation verwendet wurde und der Einfluss des Isolates daher anhand dieser Daten nicht zu erfassen ist. SIEROTZKI ET AL. (1994) haben beobachtet, dass Isolate, die von einer bestimmten Sorte gewonnen wurden, bei Infektionsversuchen ihre Ursprungssorte am stärksten befallen, d. h. dass diese Interaktionen der Gen-für-Gen-Hypothese folgen. Jedoch kann vermutlich davon ausgegangen werden, dass die CM auch bei diesen Interaktionen nicht die limitierende Barriere darstellen wird.

Aufgrund hier gefundener ähnlicher Penetrationsraten eines bestimmten Isolates (iso 15) auf den unterschiedlichen CMs lässt sich schließen, dass die Isolatspezifität sich nicht auf der Cuticulaebene abspielt.

Auch der zeitliche Verlauf der Penetration auf CMs war dem auf lebenden Blättern analog. GESSLER UND STUMM (1984) fanden bei kompatiblen Reaktionen erste Stromata nach 24h, dies konnte auch in dieser Arbeit bei einer Inkubationstemperatur von 20°C festgestellt werden. Die Versuchsauswertungen zur Penetration wurden dennoch erst nach 48 h oder 72h vorgenommen, wenn das Stroma eine messbare, die mikroskopische Untersuchung vereinfachende, Ausprägung erreicht hatte.

Einflussfaktoren der CMs

Intrinsische Eigenschaften der CMs sollten untersucht werden, um deren Einfluss auf das Testsystem zu erkennen. Neben der Pflanzenart und Apfelsorte als Variable wurde die Dicke der CMs stellvertretend für das Blattalter herangezogen. Apfelblätter unterliegen der so genannten ontogenen Resistenz. Diese bewirkt, dass ältere Blätter nicht mehr von *V. inaequalis* befallen werden (KEITT UND JONES 1926, GESSLER UND STUMM 1984, MACHARDY 1986 zur Zusammenfassung). Die Natur dieser Resistenz ist noch nicht vollständig aufgeklärt, die morphologischen Prozesse ähneln denen der V_T -Resistenz (VALSANGIACOMO UND GESSLER 1988). Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass sehr alte Blätter die ontogene Resistenz wieder verlieren bzw. eine sehr lange Latenzphase haben (KOLLAR 1996, LI UND XU 2002). In früheren Veröffentlichungen zu *Venturia inaequalis* bestand noch die Meinung, die Dicke der Cuticula sei verantwortlich für die Alters- bzw. ontogene Resistenz (NICHOLSON ET AL. 1973 A UND B). Diese Aussage findet man immer noch in neueren Aufsätzen zitiert (GEVENSEN UND NICHOLSON 2000).

Die meisten untersuchten CMs stellten eine Mischung aus dünneren, von jüngeren Blättern gewonnenen und dickeren, von älteren Blättern isolierten CMs dar. Da auffällig oft makroskopisch dünn erscheinende CMs einen hohen Anteil von durchgewachsenen Penetrationshyphen aufwiesen, wurde bei zwei Apfelsorten, ‚Alkmene‘ und ‚James Grieve‘, der Zusammenhang zwischen Dicke der Membran und Art der Penetrationshyphen untersucht. Die absolute Dicke, die eine CM erreichen kann, ist von der Pflanzenart abhängig (HOLLOWAY 1982, RIEDERER UND SCHÖNHERR 1984, JEFFREE 1996). Die adaxiale CM bei *Malus* ssp. hat eine maximale Dicke von etwa 2 µm. Während der Entwicklung eines Apfelblatts hat die Cuticula nach einer Woche ca. 80% der finalen Stärke erreicht und nach drei Wochen ihr Wachstum beendet (HELLMANN UND STÖSSER 1992). Als Maß für die Dicke wurde das Gewicht der CMs herangezogen, welches naturgemäß einfacher zu erfassen ist.

Es zeigte sich jedoch, dass unabhängig vom Gewicht der untersuchten CMs keine Korrelationen zwischen der Gesamtpenetration und der Dicke der CMs festgestellt werden konnte (Abb. 15).

Tendenziell wurden bei dünneren CMs mehr durchgewachsene Hyphen gefunden, doch es gab keine signifikanten Korrelationen (Abb. 15). FICKE ET AL. (2004) fanden ebenfalls heraus, dass bei Weintrauben die Dicke der Cuticula nicht mit der ontogenen Resistenz der Beeren zusammenhängt. Bei Bohnen soll allerdings die Resistenz gegenüber *Rhizoctonia solani* mit der Stärke der CM korreliert sein (STOCKWELL UND HANCHEY 1983).

Die hier vorliegenden Resultate beim Apfel bestätigen, dass die Stärke der CM keinen Einfluss auf die Penetrationsrate hat und somit die ontogene Resistenz nicht durch eine Zunahme der Dicke der CMs begründet ist.

Auch der Resistenzstatus der Apfelsorten wirkt sich nicht auf Eigenschaften der CM, die die Penetration von *V. inaequalis* beeinflussen könnten, aus. Es ließen sich keine Unterschiede der Penetrationsraten von anfälligen und resistenten Apfelsorten finden, welche eindeutig mit dem Resistenzstatus zu erklären wären.

Daher konnte hier bestätigt werden, was schon länger bekannt ist: die Cuticula stellt für *V. inaequalis* keinen Resistenzfaktor dar (VALSANGIACOMO UND GESSLER 1988). Untersuchungen zeigen, dass das Auskeimen und die Penetration von Schorfsporen auf anfälligen und resistenten Wirten sowie auf ontogen resistenten Blättern gleich verlaufen (VALSANGIACOMO UND GESSLER 1988, GESSLER UND STUMM 1984). Auch YEPES UND ALDWINCKLE (1993) konnten bestätigen, dass Konidien von *V. inaequalis* auf Cuticeln von anfälligen und resistenten Sorten vergleichbar auskeimen, Appressorien bilden und penetrieren. Sie schließen daraus, dass die Cuticularmembranen von ausgewachsenen und noch nicht voll entwickelten Apfelblättern keine effektive vorgeformte Barriere für den Apfelschorferreger darstellen.

Möglicherweise spielen andere intrinsische Faktoren eine Rolle, die hier zu den Schwankungen führen, über die aber anhand dieser Ergebnisse nicht spekuliert werden kann. Es war aber möglich, basierend aus diesen Voruntersuchungen, Chargen von CMs auszuwählen, die zu hohen Penetrationsraten bei niedrigen Schwankungen führen und daher bei Untersuchungen zur Penetrationshemmung eine gute Kontrolle abgeben. Auch Nicht-Wirte zeigten hohe Penetrationsarten, dies wurde stellvertretend an *Pyrus communis* ‚Conference‘ untersucht.

Ob es auf intakten Birnenblättern zur Ausbildung von Appressorien kommt, wurde nicht untersucht, jedoch sollte diese Frage zukünftig noch geklärt werden. Es wäre dann auch ersicht-

lich, ob bei der enzymatischen Isolierung Resistenzfaktoren der Nicht-Wirtebene ausgewaschen werden.

Nach der Entwicklung und Etablierung des Systems wurde es im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung mit unterschiedlichen Substanzen gebracht, die im Folgenden vorgestellt werden.

3.2 Abschnitt B: Anwendung des Testsystems

Nachdem die Produktion eines sterilen, einheitlichen und stets verfügbaren Inokulums sichergestellt war und die äußeren Bedingungen für das Testsystem überprüft und standardisiert waren, folgte der zweite Teil der Arbeit, die Überprüfung der Anwendbarkeit unter praktischen Fragestellungen. Konkret sollten Stoffe mit verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften exemplarisch auf ihre Wirkung gegen *V. inaequalis* anhand des Testsystems untersucht werden. Zu den Stoffklassen gehörten Salze, Tenside, Pflanzenstärkungsmittel, Gerbstoffe, bakterielle Tenside und Resveratrol, als phenolisches Phytoalexin. Hier werden drei große Versuchsblöcke vorgestellt, aus denen zwei Veröffentlichungen hervorgegangen sind.

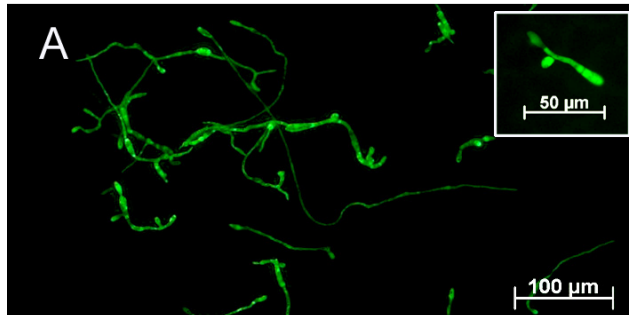
3.2.1 Wirkung von Calciumhydroxid, Calciumcarbonat, Kaliumcarbonat und Alkylpolyglukosiden

Die Sporen und Keimschläuche von *V. inaequalis* wurden durch Calciumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), Kaliumcarbonat (K_2CO_3) und die APG-Tenside Plantacare 1200 UP und Glucopon 215 CSUP abgetötet oder schwer geschädigt (Tab. 7). Weder Calciumcarbonat (CaCO_3) noch Calciumchlorid (CaCl_2) schädigten Sporen oder Keimschläuche. Calciumhydroxid hemmte bei präinfektioser Applikation die Keimung erst bei einer Konzentration von $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ vollständig, tötete aber sofort Keimschläuche bei $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und höheren Konzentrationen. Das Abtöten erfolgte innerhalb weniger Sekunden. Eine Vorbehandlung der CMs vor der Inokulation mit Sporen hatte keine Wirkung, da $\text{Ca}(\text{OH})_2$ unter Bildung von Calciumcarbonat mit dem CO_2 der Luft reagiert.

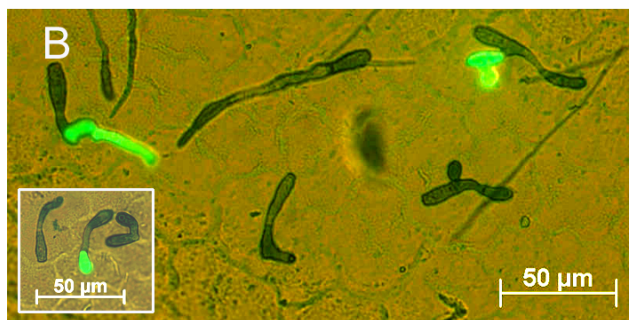
Die ersten Versuche wurden mit CMs von ‚Gloster‘ durchgeführt, doch diese waren teilweise sehr empfindlich und hatten kleine Löcher während der Isolation bekommen, so dass die Tensidlösungen in die Subphase diffundieren konnten. Da Apfelschorfkonidien auch auf CMs von Nichtwirten auskeimen und Appressorien bilden (Abb. 14), war es möglich, die Versuche mit CMs von *Stephanotis floribunda* durchzuführen. Diese sind fester und leichter zu handhaben.

Wenn Konidien von *V. inaequalis* in einem Wassertropfen auf CMs für 24h inkubiert wurden, keimten sie mit Keimschläuchen verschiedener Länge und Appressorien aus (Abb. 16 A), welche nach kurzer Färbung mit FDA intensiv fluoreszierten. Eine kurative Behandlung mit Plantacare 1200 UP ($0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) tötete die meisten Sporen ab (Abb. 16 B), doch ein paar Ap-

pressorien fluoreszierten auch 24h nach der Behandlung noch. Eine Behandlung der gekeimten Sporen mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) tötete sämtliche Sporen ab und keine Fluoreszenz war mehr erkennbar (Abb. 16 C).



Kontrolle: Inkubation 48 h, Färbung mit FDA. Die intensive Fluoreszenz zeigt die Vitalität der Sporen, Hyphen und Appressorien an (kl. Bild).



Plantacare 1200 UP ($0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) kurative Behandlung nach erfolgter Keimung. Nur sehr wenige Hyphen fluoreszieren und die Fluoreszenz ist nur partiell, d.h. begrenzt auf Appressorien (kl. Bild).



$\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) kurative Behandlung nach erfolgter Keimung. Weder Sporen, Hyphen noch Appressorien fluoreszieren. Zwischen einem Niederschlag von CaCO_3 sind ausgekeimte Sporen erkennbar, die mit Methylenblau gefärbt worden sind.

Abbildung 16: Kurative Wirkung von Plantacare 1200 UP und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ auf *Venturia inaequalis* Sporen und Keimhyphen auf CMs von *S. floribunda*.

A wurde nur mit Fluoreszenz, B mit zusätzlicher Hellfeldbeleuchtung und C aufgrund der fehlenden Fluoreszenz nur mit Hellfeldbeleuchtung aufgenommen.

Die simultane Applikation der Sporen mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Konzentrationen von $0,3\text{-}5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Plantacare 1200 UP ($0,13\text{-}1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), oder K_2CO_3 ($8,8\text{-}140,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) hemmte die Sporenkeimung komplett und führte dazu, dass die Sporen nach 24h keine Fluoreszenz mehr exhibierten.

Bei der präinfektiösen Behandlung reagierte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in wässriger Lösung mit dem CO_2 der Luft unter Bildung des unlöslichen CaCO_3 Niederschlags. Wenn $\text{Ca}(\text{OH})_2$ auf CMs appliziert wurde, die Suspension trocknete und 24h danach die Sporensuspension zugegeben wurde, kam es zu keiner Verringerung der Keimrate bei $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ oder darunter. Bei $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ war die

Keimrate leicht gehemmt (50% im Vergleich zu 71% bei der Kontrolle) (Tab. 7). Außerdem konnte festgestellt werden, dass bei der Kontrolle die Sporen mehr Appressorien ausbildeten. Nach einer Vorbehandlung mit K_2CO_3 wurde bei allen Konzentrationen keine Keimung beobachtet, während Plantacare 1200 UP nur bei 0,5 bis $1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ effektiv war (Tab. 7).

Tabelle 7: Der Einfluss einer präinfektiösen Behandlung mit $Ca(OH)_2$, K_2CO_3 und Plantacare 1200 UP auf die Vitalität der Sporen von *Venturia inaequalis*.

Die Chemikalien wurden 24 Stunden vor der Sporensuspension auf CMs (*Stephanotis floribunda*) appliziert. Als Vitalitätskriterium der Sporen diente die Fluoreszenz mit FDA nach weiteren 24 Stunden.

$Ca(OH)_2$ [g·L ⁻¹]	Fluoreszenz ¹⁾	K_2CO_3 [g·L ⁻¹]	Fluoreszenz ¹⁾	Plantacare1200 UP [g·L ⁻¹]	Fluoreszenz ¹⁾
5,0	++	140,0	-	1,00	-
2,5	+++	70,0	-	0,50	-
1,3	+++	35,0	-	0,25	++
0,6	+++	17,5	-	0,12	+++
0,3	+++	8,8	-	0,06	+++
Kontrolle	+++	Kontrolle	+++	Kontrolle	+++

1) – Keine Fluoreszenz, + schwache Fluoreszenz, ++ moderate Fluoreszenz, +++ starke Fluoreszenz

Um den Einfluss der Substanzen auf die Keimschläuche bereits gekeimter Konidien zu testen, wurde die Applikation nach der erfolgten Keimung durchgeführt (kurative Applikation). $Ca(OH)_2$ bei $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ tötete effektiv alle Keimschläuche ab, während bei Konzentrationen von 0,6 bis $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ noch eine teilweise Fluoreszenz zu erkennen war (Tab. 8). Dabei fluoreszierten lediglich Teile der gekeimten Spore, nie die ganze Spore mit Appressorium. Konzentrationen von $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ waren nicht letal für die Keimschläuche. Mit Plantacare 1200 UP waren ebenfalls nie die ganzen Konidien fluoreszierend (Abb. 16 B). Obwohl die Konzentrationen beim $CaCl_2$ zehnmal höher waren als beim $Ca(OH)_2$, hatte das $CaCl_2$ keinen Effekt auf die Vitalität der Keimschläuche. Die pH-Werte der $CaCl_2$ Lösungen lagen bei 6, während die der $Ca(OH)_2$ Lösungen sehr alkalisch waren. Die pH-Werte der K_2CO_3 Lösungen waren auch alkalisch, doch etwas niedriger als beim $Ca(OH)_2$. Bei hohen Konzentrationen tötete das K_2CO_3 alle Keimschläuche ab, doch auch Konzentrationen von 4,4 bis $17,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ waren effektiv. Ähnlich wie beim $Ca(OH)_2$ wurde nur eine partielle Fluoreszenz beobachtet und die Keimschläuche selber waren nicht vital (Tab. 8).

Tabelle 8: Der Einfluss einer kurativen Behandlung mit Ca(OH)_2 , CaCl_2 und K_2CO_3 in verschiedenen Konzentrationen auf die Vitalität der Keimhyphen von *Venturia inaequalis* auf CMs (*S. floribunda*)

Die Testlösungen wurden gekeimten Konidien zugegeben, die für 24 Stunden auf den CMs inkubiert wurden. Als Vitalitätskriterium diente die Fluoreszenz der Keimschläuche mit FDA nach weiteren 24 Stunden.

Substanzen	Konzentration [g·L ⁻¹]	pH der Lösung	Fluoreszenz ¹⁾
Ca(OH) ₂	5,0	12,4	-
	2,5	12,4	+
	1,3	12,4	+
	0,6	12,2	+
	0,3	11,7	+++
CaCl ₂	70,0	5,8	+++
	35,0	5,9	+++
	17,5	5,9	+++
	8,8	6,3	+++
	4,4	6,4	+++
K ₂ CO ₃	70,0	11,4	-
	35,0	11,4	-
	17,5	11,4	+
	8,8	11,4	+
	4,4	11,4	+
Kontrolle		5,5	+++

1) – Keine Fluoreszenz, + schwache Fluoreszenz, ++ moderate Fluoreszenz, +++ starke Fluoreszenz

Ca(OH)₂ tötete die Keimschläuche sehr schnell ab. Wenn 5 µL einer gesättigten Lösung zu mit FDA gefärbten Keimschläuchen gegeben wurden, verblasste die Fluoreszenz innerhalb von Sekunden, und es war nicht möglich, den Prozess mikroskopisch festzuhalten.

Plantacare 1200 UP-Lösungen sind leicht alkalisch, und es wurde untersucht, ob dies bei der Toxizität eine Rolle spielt. Wenn der pH auf 7,0 eingestellt wurde, töteten lediglich die höchsten Konzentrationen (0,5 g·L⁻¹) alle Keimschläuche. Mit 0,25 und 0,13 g·L⁻¹ wurde eine leichte Fluoreszenz festgestellt. Plantacare 1200 Up-Lösungen ohne Einstellung des pH-Wertes gaben ähnliche Ergebnisse, mit der Ausnahme, dass bei 0,25 g·L⁻¹ alle Keimschläuche abgetötet wurden (Tab. 9). Diese geringen Unterschiede können allerdings auch zufällig sein.

Tabelle 9: Der Einfluss des pH-Wertes und der Konzentration von Plantacare 1200 UP bei kurativer Applikation auf die Vitalität der Keimhyphen von *Venturia inaequalis* auf CMs (*S. floribunda*).

Die Testlösungen wurden auf gekeimte Sporen 24 h nach der Inokulation der CMs appliziert. Als Vitalitätskriterium diente die Fluoreszenz der Keimschläuche mit FDA nach weiteren 24 Stunden.

pH eingestellt auf 7,0		pH nicht eingestellt	
Konz. [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Fluoreszenz ¹⁾	pH-Wert	Fluoreszenz ¹⁾
0,50	-	9,4	-
0,25	+	7,6	-
0,13	+	7,3	+
0,06	++	6,3	++
0,03	+++	5,8	+++
Kontrolle	+++	5,5	+++

1) – Keine Fluoreszenz, + schwache Fluoreszenz, ++ moderate Fluoreszenz, +++ starke Fluoreszenz

Gekeimte Konidien, die mit Plantacare 1200 UP bei Konzentrationen von 0,5, 1,0 und 2,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ behandelt wurden, stoppten das Wachstum (Abb. 17). Nur die Keimschläuche der Kontrollen nahmen an Länge während des Intervalls zwischen 24 h und 48 h zu. Dies zeigt, dass das Abtöten schnell erfolgte. Glucopon 215 CSUP hemmte das Keimschlauchwachstum ebenfalls. Keimschläuche in der Kontrollgruppe waren durchschnittlich 400 μm lang, die bei den Glucopon 215 CSUP Behandlungen von 1,0 und 2,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nur etwa 100 μm . Die 0,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Behandlung reduzierte das Wachstum zu einem geringeren Maße.

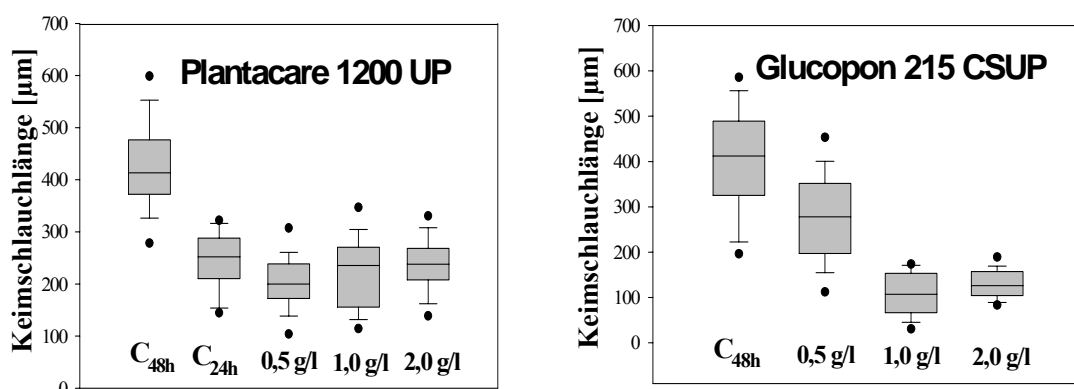


Abbildung 17: Die kurative Wirkung von Plantacare 1200 UP und Glucopon 215 CSUP in verschiedenen Konzentrationen auf das Längenwachstum von *V. inaequalis*-Keimschläuchen auf CMs (*S. floribunda*).

Die Testlösungen wurden 24 h nach der Inokulation den CMs zugegeben und die Länge der Hyphen wurde 24 h später gemessen. Die Länge der unbehandelten Hyphen nach 24 Stunden und den zweiten 24 Stunden diente als Kontrolle und ist mit C_{24h} bzw. C_{48h} gekennzeichnet.

Auch Kaliumcarbonat verhinderte die Sporenkeimung und tötete bereits gekeimte Konidien bei $4,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und höher. Mit Plantacare 1200 UP behandelte Konidien keimten nur zu geringen Raten aus und bei bereits ausgekeimten Konidien wurden die Keimschläuche schon bei sehr niedrigen Konzentrationen ($0,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) abgetötet. Glucopton 215 CSUP stoppte das Keimschlauchwachstum bei $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.2.2 Wirkung von Resveratrol und Piceid

Da Resveratrol in Pflanzen oft als Zuckerkonjugat auftritt (SOTHEESWARAN UND PASUPATHY 1993), wurde das häufigste derivatisierte Trans-Resveratrol-3-O- β -D-Glycopyranosid (Piceid) für diese Versuche mit aufgenommen.

Bestimmung der Wasserlöslichkeit und des Cuticula/ Wasser-Verteilungskoeffizienten K_{CW}

Die Wasserlöslichkeit des Resveratrols wurde mit $52,2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ und einer Standardabweichung von $\pm 2,3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($= 2,29\cdot 10^{-4} \text{ Mol}\cdot\text{L}^{-1} \pm 1,01\cdot 10^{-5} \text{ Mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ermittelt. Die Wasserlöslichkeit des Piceids lag bei $161 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ mit einer Standardabweichung von $\pm 5,7 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($= 4,14\cdot 10^{-4} \text{ Mol}\cdot\text{L}^{-1} \pm 1,47\cdot 10^{-5} \text{ Mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Der K_{CW} des Resveratrols war 3079 (s. d. ± 686). Mit der Vorhersagegleichung

$$\log K_{CW} = 1.118 - 0.596 \cdot \log S_{\text{Water}} \quad (3)$$

von SCHÖNHERR UND RIEDERER (1989), die die Ermittlung von Cuticula/Wasser-Verteilungskoeffizienten aus der Wasserlöslichkeit S_{Wasser} [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] lipophiler Moleküle erlaubt, wurde ein K_{CW} von 1939 für Resveratrol und von 1370 für Piceid errechnet.

Wirkung von Resveratrol und Piceid bei simultaner und präinfektiöser Applikation

Das Resveratrol hatte keinen Effekt auf die Sporenkeimung (Tab. 10). Bei der simultanen Applikation des Piceids wurden steigende Konzentrationen von $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bis $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ eingesetzt. Die Wasserlöslichkeit des Piceids wurde erst später bestimmt. Bei Konzentrationen oberhalb $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ wurde zuvor ein kristalliner Niederschlag beobachtet. Dies deckt sich mit der Wasserlöslichkeit des Piceids, welches oberhalb der Sättigungskonzentration von $161 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ausfällt.

Bei allen Konzentrationen ergab sich eine signifikante Reduzierung der Keimrate der Konidien nach 24 h und auch der Anteil von Konidien mit Appressorien war reduziert (Abb. 19). Auf mit Piceid angereicherten CMs war keine Keimhemmung festzustellen (Tab. 10). Bei den Untersuchungen zur Penetration der Hyphen von *V. inaequalis* in CMs zeigte Resveratrol eine

deutliche Wirkung auf die Entwicklung von Penetrationsstrukturen bei der Präapplikation ($61,8 \pm 35,1\%$ Hemmung) und bei der simultanen Applikation ($89,7 \pm 11,5\%$ Hemmung).

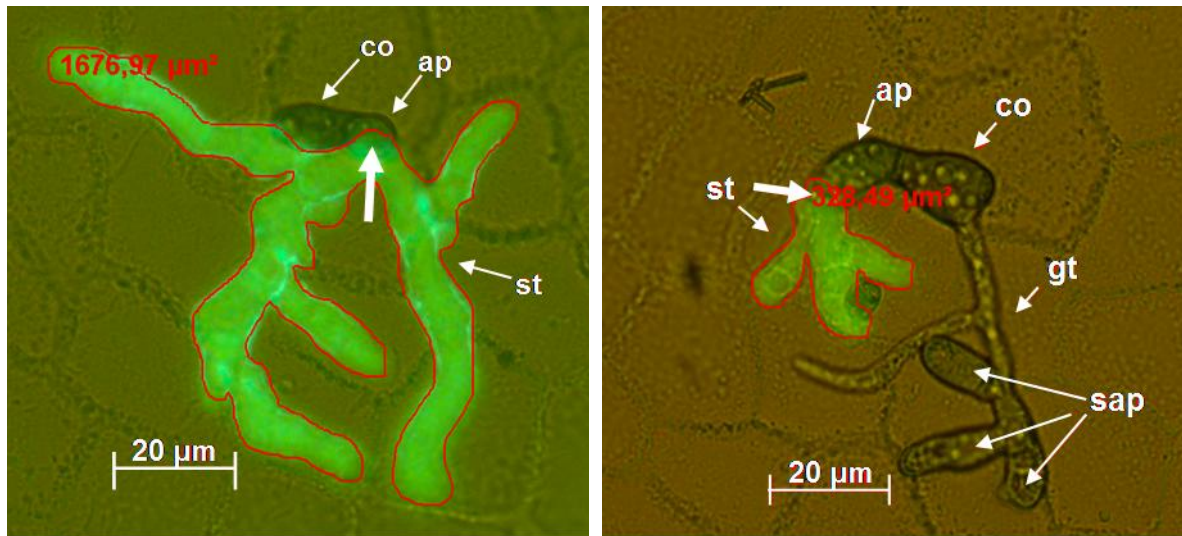


Abbildung 18: *Venturia inaequalis* Konidien auf Kontroll-CMs und mit Resveratrol angereicherten CMs 72 h nach der Sporenanplikation.

Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie wurden kombiniert, um gleichzeitig die mit Methyleneblau gefärbten Pilzstrukturen wie die Sporen, den Keimschlauch und das Appressorium sowie die mit FDA gefärbten Penetrationsstrukturen sichtbar zu machen. ap: Appressorium, co: Konidiospore, gt: Keimschlauch, sap: Sekundäres Appressorium, st: Stroma. Der dickere Pfeil zeigt auf die Penetrationsstellen.

Kontrolle (links): Ausgeprägt verzweigtes Stroma, welches von einem Appressorium ausgeht. Die Fläche des Stomas wurde mit der AxioVisison Software von Zeiss gemessen. **Resveratrolbehandlung (rechts):** Das Stroma ist deutlich weniger ausgeprägt als bei der Kontrolle. Die Fläche des Stomas bei behandelten CMs hatte durchschnittlich nur 24,3% der Ausbreitung der Kontroll-CMs.

Neben der Abnahme der Penetrationsrate war die Fläche des Myzels durch in den CMs sorbiertes Resveratrol deutlich reduziert (Abb. 18). Die Messung der Penetrationsstrukturen wurde zweimal durchgeführt ($N = 111$) und führte jeweils zu signifikant reduzierten Flächen ($P < 0.05$). Wenn die durchschnittliche Fläche des Stomas bei den Kontrollen auf 100% gesetzt wurde, hatte das Stroma bei den mit Resveratrol angereicherten CMs nur ca. ein Viertel (24,3%) dessen Fläche.

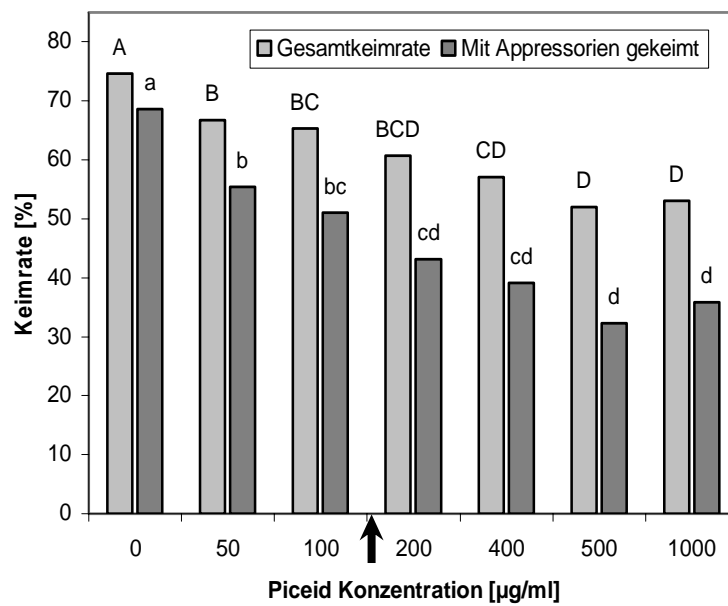


Abbildung 19: Einfluss des Resveratrolglukosids, Piceid, auf die Konidienkeimung nach simultaner Applikation auf die CMs.

Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus fünf (für $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vier) unabhängigen Experimenten mit je fünf CMs. Werte die den gleichen Buchstaben tragen waren nicht signifikant verschieden ($P < 0,05$). Der Pfeil markiert die Konzentration, ab der die Piceid-Lösung gesättigt vorlag ($161 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Eine beinahe 100%-ige Hemmung der Penetration wurde beobachtet, wenn die gesättigte Piceid-Lösung gleichzeitig mit den Konidien auf die CMs appliziert wurde. Die Penetration nahm konstant von Konzentrationen von 50 zu $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ab und wurde nahezu vollständig gehemmt bei 200 zu $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Abb. 20). Auch bei der Präapplikation des Piceids wurde eine annähernd 100%-ige Hemmung erreicht (Tab. 10).



Abbildung 20: Wirkung des Piceids auf die Penetrationsrate der Sporen bei simultaner Applikation.

Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit einem Minimum von fünf CMs pro Experiment. Werte die den gleichen Buchstaben tragen waren nicht signifikant verschieden ($P < 0,05$). Der Pfeil markiert die Konzentration, ab der die Piceid-Lösung gesättigt vorlag ($161 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Tabelle 10: Prozentuale Hemmung der Keimung und Penetration bei Prä- und simultaner Applikation von Resveratrol und Piceid.

Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm s. d. von drei unabhängigen Experimenten bei der simultanen Applikation und von sechs und zwei unabhängigen Experimenten für die Prä- und simultane Applikation bei dem Piceid.

	Präapplikation		Simultane Applikation	
	Piceid	Resveratrol	Piceid	Resveratrol
Keimung	Kein Effekt	Kein Effekt	$25,4 \pm 5,3\%^*$	Kein Effekt
Penetration	$96,1 \pm 5,1\%$	$61,8 \pm 35,1\%$	$94,9 \pm 9,1\%^*$	$89,7 \pm 11,5\%$

* Mittelwert \pm s. d. aller Konzentrationen über der Sättigung, d. h. 200, 400, 500 und $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.2.3 Wirkung von Saccharoseoctanoat (SO)

Saccharoseoctanoat hatte eine signifikante keimungs- und appressorienhemmende Wirkung gegen Konidien zweier Einzelsporisolate von *V. inaequalis* (Abb. 21). Die Keimung wurde bei einer Konzentration von 0,25% komplett verhindert. Bei niedrigeren Konzentrationen beschränkte sich die Hemmung speziell auf die Appressorienbildung, während die Keimrate zunächst gleich blieb.

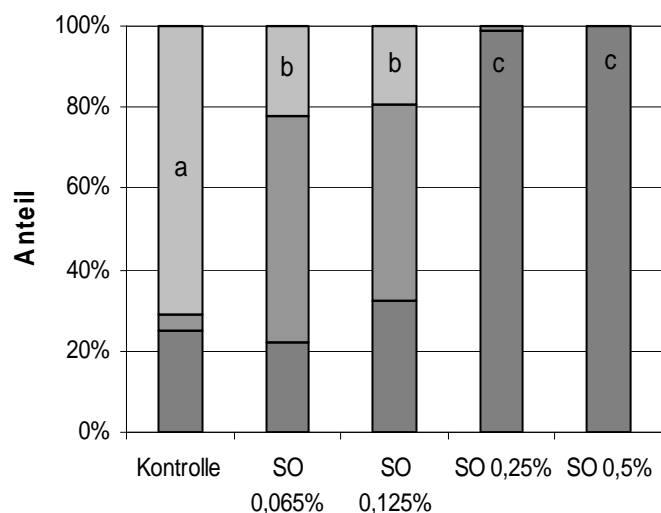
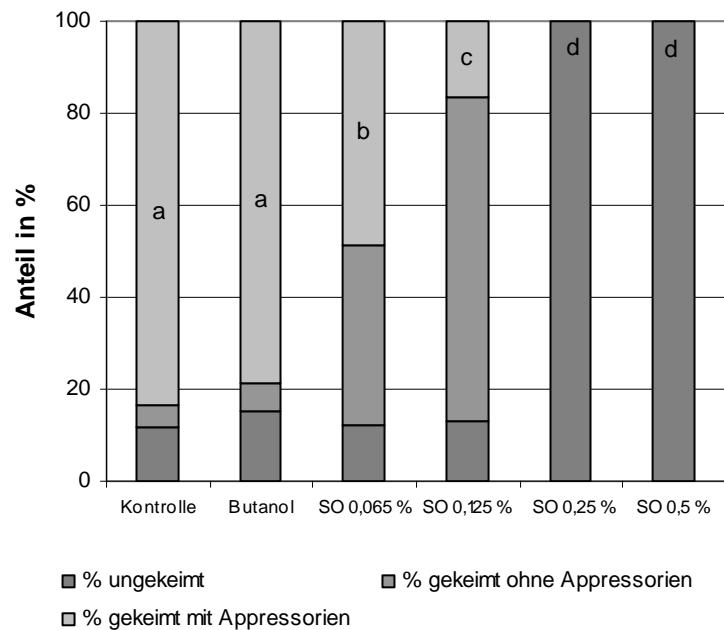


Abbildung 21: Die Wirkung von Saccharoseoctanoat auf Konidien des Isolats 15 (oben) und des Isolats GI 03 F (unten)

Für jede Konzentration wurden fünf CMs von ‚*Stephanotis*‘ inokuliert. Die Buchstaben geben die Signifikanzen für die Kategorie ‚gekeimt mit Appressorien‘ an, Werte, die mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind nach Student’ t-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ nicht signifikant verschieden.

3.2.4 Diskussion des Abschnittes B: Anwendung des Testsystems

Nachdem das Testsystem in seiner Grundanwendung etabliert und die wichtigsten biologischen Parameter eingegrenzt waren, sollte der Einfluss verschiedener Stoffe auf die Keimung, Appressorienbildung und Penetration von *V. inaequalis* untersucht werden. Oberflächenwirksame Substanzen, anorganische Salze, bakterielle Tenside und das Phytoalexin Resveratrol wurden in die Untersuchungen einbezogen, um ein breites Spektrum von Substanzen zu testen und damit die Möglichkeiten des Systems auszuloten.

In dieser Arbeit wurden neue Substanzen für den Einsatz gegen *V. inaequalis* mit dem Testsystem bezüglich ihrer schorfhemmenden Wirkung untersucht. Es sollte geklärt werden, wie lipophile, hydrophile und oberflächenwirksame Substanzen am besten mit dem System *V. inaequalis*/ isolierte CMs getestet werden können.

Calciumhydroxid, Calciumcarbonat, Kaliumcarbonat und Alkylpolyglukoside:

Es wurde gezeigt, dass $\text{Ca}(\text{OH})_2$, K_2CO_3 und beide APG Tenside in den verwendeten Konzentrationen die Sporenkeimung von *V. inaequalis* verhindern und die Keimschläuche abtöten. Dies deutet auf das Potential dieser Stoffe zur Bekämpfung von Apfelschorf und möglicherweise auch Birnenschorf hin. Basierend auf den Ergebnissen der drei verschiedenen Applikationsmethoden kann eine Strategie zur erfolgreichen Bekämpfung des Apfelschorfs entwickelt werden. Es wurde nicht untersucht, ob $\text{Ca}(\text{OH})_2$, K_2CO_3 und die Tenside fähig sind, den Pilz nach seiner Penetration der Cuticula zu schädigen. Die Diskussion beschränkt sich daher auf Bekämpfungsstrategien, die auf die Verhinderung der Sporenkeimung und Keimschlauchabtötung abzielen.

Die Präapplikation von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hemmte die Sporenkeimung nicht und tötete die Keimschläuche nicht ab, da die Base schnell in das ineffektive Calciumcarbonat umgewandelt wird (Tab. 7). Hohe pH-Werte der Lösung, die im Falle von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und K_2CO_3 über 11,4 lagen (Tab. 8) scheinen für die Keimhemmung und Abtötung der Keimschläuche notwendig zu sein.

Neutrale CaCl_2 Lösungen waren ineffektiv (Tab. 8). K_2CO_3 reagiert auch mit CO_2 bei Entstehung von KHCO_3 . Diese Lösung ist auch alkalisch und könnte daher für die Verhinderung der Sporenkeimung bei der Präapplikation von K_2CO_3 verantwortlich sein (Tab. 7). KHCO_3 penetriert CMs, (SCHÖNHERR UND LUBER 2001), doch muss noch genügend Salz auf der CM nach 24h vorhanden gewesen sein, denn sogar bei $8,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ fand keine Sporenkeimung statt.

Die Präapplikation von Plantacare 1200 UP bei 0,5 bis 1,0 g·L⁻¹ war ebenfalls wirksam, während bei 0,25 g·L⁻¹ noch einige Sporen keimten (Tab. 7). Mit späterer Applikation von 0,25 g·L⁻¹ wurden alle Keimschläuche abgetötet (Tab. 9). Anscheinend hatte ein Teil der Tensidlösung die CMs penetriert, was zu geringeren Konzentrationen nach 24h führte.

Bei K₂CO₃ und Ca(OH)₂ scheint die Alkalität der Lösung für die fungiziden Wirkungen verantwortlich zu sein, eher als die Kationen an sich. Die Plantacare-Lösungen waren auch bei neutralem pH fungizid (Tab. 9), dies deutet auf einen anderen Wirkmechanismus hin. Die toxische Wirkung von Tensiden auf Zellen und Gewebe beruht auf der Schädigung von Zellmembranen (KRISTEN ET AL. 1993, MÜLLER ET AL. 1999).

Die Blattzellen werden von der Cuticula geschützt, welche die Penetration von Tensiden verlangsamt oder unterbindet. Dennoch können Tenside in hohen Konzentrationen Blätter schädigen (UHLIG UND WISSEMEIER, 2000), doch dies trifft auf die hier verwendeten APG-Tenside nicht zu (GARST 1996, STEBER ET AL. 1999, und SCHÖNHERR, pers. Mitt.). Plantacare war fungizid, und da sein Wirkmechanismus sich von dem von Ca(OH)₂ und K₂CO₃ unterscheidet, sind die Mechanismen wahrscheinlich unabhängig und könnten bei der Spritzung von Obstbäumen eine additive Wirkung zeigen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Sprühapplikationen von Ca(OH)₂ (2,5 bis 5,0 g·L⁻¹) oder K₂CO₃ (35 bis 70 g·L⁻¹) in Kombination mit Plantacare 1200 UP (0,25 bis 0,5 g·L⁻¹) erfolgreich den Apfelschorf bekämpfen sollten. Allerdings sind diese Substanzen wahrscheinlich nicht protektiv einsetzbar. Ca(OH)₂ wird schnell zum ineffektiven CaCO₃ und Ca(HCO₃)₂ umgewandelt. K₂CO₃ und Plantacare 1200 UP sind gut wasserlöslich und werden schon von geringen Niederschlagsmengen von den Blättern abgewaschen. Daher wird der Zeitpunkt der Behandlung von höchster Bedeutung sein. Sporen und gekeimte Konidien mit Keimschläuchen werden abgetötet aber eine lang anhaltende Wirkung wird nicht erwartet. Dies ist ein Nachteil gegenüber den konventionellen protektiven Fungiziden. Andererseits könnte die Applikation der toxischen Kupferverbindungen vermieden werden, wenn das Problem des optimalen Spritztermins gelöst wird. Eine Mischung von Ca(OH)₂ und Plantacare 1200 UP sollte K₂CO₃ gegenüber überlegen sein, welches höhere Konzentrationen und häufige Spritzungen verlangt. Dies könnte neben höheren Kosten zu einem Ungleichgewicht in der Nährstoffbilanz führen. In der Tat kontrollierten in vorläufigen Feldversuchen die Kombination von Ca(OH)₂ und Plantacare 1200 UP den Apfelschorf effektiv und keine Anzeichen von Phytotoxizität wurden beobachtet (GRIMM-WETZEL, unveröffentlicht). Die sehr schlechte Kontrolle des Schorfs

durch Löschkalk, die von BERESFORD ET AL. (1995) und WASHINGTON ET AL. (1998) beobachtet wurde, könnte mit einer protektiven Strategie der Behandlung zusammenhängen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Ca(OH)_2 und K_2CO_3 zusammen mit dem Benetzungsmittel Plantacare 1200 UP potentielle Schorfbekämpfungsmittel im integrierten und biologischen Obstbau sein könnten, wenn der richtige Bekämpfungszeitpunkt eingehalten wird.

Mittlerweile ist aus Versuchen der Arbeitsgruppe SCHÖNHERR bekannt, dass eine Behandlung mit $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Ca(OH)_2 auch bei einer 400%igen Sporenreife nach Mills (MILLS UND LAPLANTE 1951), d. h. 24 h nach der Keimung, die gekeimten Sporen im Laborversuch auf isolierten CMs effektiv abtötet (MONTAG 2004).

Resveratrol und Piceid

Hier sollen Versuche zur *in vitro*-Wirkung des Resveratrols und seinem Glukosid trans-Resveratrol-3-O- β -D-Glykopyranosid (Piceid) auf *V. inaequalis* vorgestellt werden. Das Ziel war, das Leistungsvermögen des Testsystems bezüglich der Untersuchung von lipophilen Substanzen zu eruieren und das Potential von transgenen Äpfeln mit dem Stilbensynthasegen in Hinsicht auf eine erhöhte Schorfresistenz abzuschätzen.

Ein wichtiger Aspekt bei der pflanzlichen Pathogenabwehr ist die Akkumulation von Phytoalexinen. Phytoalexine sind sekundäre Metabolite mit geringem Molekulargewicht und biologischer Aktivität gegenüber einer breiten Masse von Pathogenen. Das Phytoalexin Resveratrol wird von mehreren verschiedenen Pflanzenarten wie Wein (*Vitis vinifera*), Erdnuss (*Arachis hypogaea*) und Pinie (*Pinus sylvestris*) synthetisiert (SZANKOWSKI ET AL. 2003). Die antifungalen Eigenschaften des Resveratrols wurden durch *in vitro* Untersuchungen (ADRIAN ET AL. 1997, ALI ET AL. 2003, SEPPÄNEN ET AL. 2004) und durch externe Applikation auf Früchte (GONZALES UREÑA 2003, MONTERO ET AL. 2003) gezeigt. Das Stilbensynthase-Gen, welches die Schlüsselrolle bei der Resveratrolbiosynthese spielt, wurde erfolgreich in Kiwi und Apfel transferiert (KOBAYASHI ET AL. 2000, SZANKOWSKI ET AL. 2003).

Resveratrol:

Da das Resveratrol keinen Einfluss auf die Sporenkeimung und Appressorienbildung hatte, könnte die Hemmung mit einer Störung der darauf folgenden Penetration zusammenhängen. Aufgrund des recht hohen K_{CW} von 3079 des Resveratrols wird das meiste Resveratrol in der CM unter Bildung eines lipophilen Depots akkumulieren. Daher wird die Konzentration in der wässrigen Sporenlösung gering sein. Aufgrund der Wasserlöslichkeit von $52,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ist die Resveratrolkonzentration im Tropfen, in welchem die Sporen keimen, limitiert, und könnte nicht ausreichen, um die Sporenkeimung und Penetration zu hemmen. Dennoch entwickelt das Resveratrol seine hemmende Wirkung während der Penetration, da die Penetrationsraten signifikant geringer und das Stroma signifikant kleiner ist (Tab. 10, Abb. 18). Da während der Penetration der Gehalt des Resveratrols in den CMs von Bedeutung ist, wurden keine Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Applikationsmethoden, d.h. Prä- oder gleichzeitiger Applikation gefunden (Tab. 10).

Der Aufbau der pflanzlichen Cuticula ist heterogen und die Haupttransportbarriere der CM wird durch die Wachse, welche in hoch geordneter, teilweise kristalliner Form auf die äußerste Schicht der Cuticula aufgelagert sind (RIEDERER UND SCHREIBER 1995). Das meiste Resveratrol wird in den inneren Schichten der CM, welche ein Sorptionskompartiment für lipophile Substanzen darstellen, gebunden (SCHÖNHERR UND RIEDERER 1989) und wird daher kaum Auswirkungen auf die Keimung und Appressorienbildung auf der Oberfläche der CM haben. Allerdings wird die pilzliche Hyphe während der Penetration in direkten Kontakt zum in den CMs akkumulierten Resveratrol gelangen.

In einer Reihe anderer Untersuchungen, wurde die Wirkung von Resveratrol gegen unterschiedliche pilzliche Pathogene untersucht (JEANDET ET AL. 2002). Die im Folgenden aufgeführten Untersuchungen müssen vor dem Hintergrund der nicht berücksichtigten Löslichkeit des Resveratrols ($52 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) kritisch bewertet werden. ADRIAN ET AL. (1997) verwendeten ein *in vitro*-Flüssigsystem zur Untersuchung der biologischen Aktivität von Resveratrol gegen *Botrytis cinerea*, den Erreger der Grauschimmelfäule, und fanden eine signifikante Hemmung der Sporenkeimung bei Einsatz von 60 bis $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Resveratrol. ALI ET AL. (2003) berichteten, dass eine geringere Konzentration von $40,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ausreichte um eine 50%ige Wachstumshemmung von *B. cinerea* zu erreichen, während eine entsprechende Konzentration ($78,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) nötig war, um eine 50%ige Hemmung von *Penicillium digitatum* zu erreichen. Mit Agarversuchen wurde der hemmende Effekt gegen die beiden Traubenpathogene *Botrytis*

cinerea und *Eutypa lata* untersucht (COUTOS-THÉVENOT ET AL. 2001). Für beide Pilze wurde eine signifikante Wachstumshemmung festgestellt, die sich als Durchmesser des Myzels bestimmen ließ, jedoch keine totale Hemmung bei einer Konzentration von $205 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. HIPSKIND UND PAIVA (2000) untersuchten die Aktivität von Resveratrol bei $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ auf das Myzelwachstum von *Phoma medicaginis*, was zu einer Reduktion des Hyphenwachstums von 50% führte. SEPPÄNEN ET AL. (2004) untersuchten 16 Pilzspezies mit einem Agartest. Sie fanden teilweise eine signifikante Hemmung des radialen Wachstums, aber alle Spezies bis auf eine waren bei $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ noch fähig zu wachsen. Dies ist besonders kritisch zu bewerten, da die Wasserlöslichkeit des Resveratrols nur $52 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ beträgt. Jedoch unterstreichen diese Studien den eher unspezifischen, nichtselektiven antifungalen Charakter des polyphenolischen Phytoalexins Resveratrol.

Piceid:

Im Gegensatz zu Resveratrol, hemmte sein Glukosid, das Piceid, die Keimung von *V. inaequalis* signifikant. Die bei Konzentrationen oberhalb der Sättigung ($161 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) gefundenen Ergebnisse für die Hemmung von Keimung und Appressorienbildung unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Eine durchschnittliche Hemmung der Keimung von 25,4% und der Appressorienbildung von 45,2% wurde zwischen $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ und $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ erreicht (Abb. 19). Da das Glukosid eine 1,8-mal höhere Wasserlöslichkeit als das Resveratrol hat, kommen die Sporen mit höheren Konzentrationen in Kontakt wenn sie zusammen mit dem Piceid inkubiert werden. Dies könnte den hemmenden Effekt erklären, der bei der simultanen Applikation beim Piceid im Gegensatz zum Resveratrol auftritt. Wenn Piceid-angereicherte CMs mit den Sporen inokuliert wurden, war die Keimung nicht beeinflusst, was bedeutet, dass das in den CMs sorbierte Piceid keine Wirkung auf die Sporen auf der Oberfläche hat. Im Gegensatz zum Resveratrol, welches die Penetration nur teilweise hemmte, unterbindet das Piceid die Penetration fast 100%ig, unabhängig davon, wie das Piceid appliziert wurde (Abb. 20). Daher zeigt sich, dass das Piceid eine stärkere antifungale Wirkung hat als das Resveratrol.

In Bezug auf die antifungale Wirkung des Piceids sind Literaturergebnisse, von mit der Stilbensynthase transformierten Pflanzen stammen, teilweise widersprüchlich. Während transgene Kiwis, die Resveratrol und Piceid synthetisieren, keine erhöhte Resistenz gegen *Botrytis cinerea* aufwiesen (KOBAYASHI ET AL. 2000), zeigten transgene Luzerne, die Piceid akkumulierten, eine signifikante Reduktion der Läsionsgröße nach der Infektion mit dem Pathogen *Pho-*

ma medicaginis. Die Wirksamkeit des Glukosids wurde mit Agartests untermauert (HIPSKIND UND PAIVA 2000).

Abschätzung der Resveratrolaktivität in planta:

In all den Beispielen oben eingeschlossen den eigenen Ergebnissen, zeigt sich, dass die höchstmöglichen Konzentrationen in wässrigen Lösungen für Resveratrol und Piceid verwendet wurden. Zum Teil lagen die Konzentrationen sogar über den Wasserlöslichkeiten von $52,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ für Resveratrol und $161 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ für Piceid in diesen Experimenten. In den meisten Fällen wurden erst dann signifikante Effekte beobachtet. Daher stellt sich die Frage, ob derartige Konzentrationen in Pflanzen, die natürlicherweise Resveratrol produzieren oder die mit der Stilbensyntase transformiert wurden, erreichbar sind. Um extern applizierte Resveratrol- und Piceidkonzentrationen mit den natürlich vorkommenden im Blatt- und Fruchtgewebe vergleichen zu können, wird angenommen, dass die Konzentrationsangaben in $\mu\text{g}/\text{g}$ Frischgewicht direkt vergleichbar sind zu den experimentellen Konzentrationen in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Da Blätter und Früchte meist zu mehr als 90% aus Wasser bestehen, ist diese Annahme berechtigt.

Für *Vitis* werden Werte von $16 \pm 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (MONTERO ET AL. 2003) bis zu $330 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in der Beerenschale (BAIS ET AL. 2000) abhängig von der Sorte und dem Entwicklungsstadium berichtet. UV-Bestrahlung erhöhte die Konzentration bis zu $810\text{-}1075 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in der Beerenschale. In ganzen Weintrauben wurden ca. $1,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischgewicht an Piceid gefunden (CANTOS ET AL. 2003). Die heterologe Expression eines Stilbensyntasegens von *Vitis vinifera* in transgenen Äpfeln führte zu einer Akkumulation des Resveratrolglukosids (SZANKOWSKI ET AL. 2003). Die höchste im Apfelgewebe gemessene Menge war $34,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischgewicht im Apfelblattgewebe, während in der Fruchtschale transgener Äpfel $13,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ gefunden wurden (SZANKOWSKI, pers. Mitt.). Es muss in Betracht gezogen werden, dass das Stilbensyntasegen in Äpfeln unter der Kontrolle eines UV-, Wunden- und Pathogen-induzierbarem Promotor steht. Die Bildung und Akkumulation des Resveratrols wurde routinemäßig durch UV-Bestrahlung induziert. Die oben angegebenen Werte beziehen sich auf den durchschnittlichen Gehalt an Resveratrolglukosid im gesamten Gewebe. Daher ist es möglich, dass lokale Konzentrationen, z. B. in infiziertem Gewebe, höher sein könnten. Daher zeigen die im Gewebe gefundenen Konzentrationen, dass die experimentell verwendeten Konzentrationen nicht unrealistisch hoch waren.

Exogene Applikation von Resveratrol:

Durch die Wasserlöslichkeit des Resveratrols und seines K_{CW} ist es möglich, die maximale Menge von Resveratrol zu kalkulieren, die in einer CM im Gleichgewicht mit einer gesättigten wässrigen Lösung von Resveratrol akkumuliert. Diese beträgt $160,7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Cuticula.

GONZÁLES ET AL. (2003) und MONTERO ET AL. (2003) applizierten Resveratrol exogen durch kurzes Eintauchen von Trauben und Äpfeln in eine Resveratrollösung von $36,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($= 1,6\cdot 10^{-4} \text{ M}$) und untersuchten den Effekt auf die Fruchtkonservierung während der Lagerung und die Ethylenproduktion. Die behandelten Früchte hatten eine länger anhaltende Qualität mit deutlichen Unterschieden zur unbehandelten Kontrolle. Sie fanden auch eine signifikante Abnahme der Etylenproduktion in behandelten Tafeltrauben (MONTEREO ET AL. 2003). Dies wurde möglicherweise durch die Wirkung von trans-Resveratrol auf verschiedene ethylenproduzierende Mikroorganismen auf den Trauben hervorgerufen. Durch Messung der Volumenabnahme der Lösung kalkulierten sie, dass $7,64 \text{ }\mu\text{g/g}$ Traubenschale an Resveratrol zugegeben wurde. Diese Annahme basiert nur auf dem Resveratrolgehalt der Lösung, ohne den Verteilungskoeffizienten zu berücksichtigen. Da in dieser Arbeit die CMs für 24 h in einer gesättigten Resveratrolösung inkubiert wurden, stellte sich ein Gleichgewicht zwischen der Lösung und der Cuticula ein. Aufgrund des K_{CW} ist die Löslichkeit des Resveratrols in CMs ungefähr 3000mal höher als im Wasser und dies sollte berücksichtigt werden, wenn bestimmt wird, wie hoch der Maximalgehalt nach der exogenen Applikation sein kann. Aufgrund des hohen K_{CW} wird das meiste Resveratrol in der Cuticula akkumulieren.

Nach eigenem Kenntnisstand wird angenommen, dass dies das erste Mal ist, dass der Effekt von Resveratrol und seinem Glukosid Piceid speziell gegen *V. inaequalis* untersucht wurde. Mit dem neu entwickelten Testsystem sollte es in Zukunft möglich sein, die antifungalen Wirkungen anderer Substanzen gegen dies Pathogen zu untersuchen. Die eher unspezifische Wirkung der beiden polyphenolen Phytoalexine wurde unterstrichen. Die vorgelegte Arbeit zeigt die Wirksamkeit von Resveratrol und Piceid bei endogener Erhöhung, wie sie in transgenen Pflanzen mit dem Stilbensyntasegen gefunden wird und das Potential bei exogener Applikation. Da Äpfel, die natürlichen Wirte von *V. inaequalis*, üblicherweise kein Resveratrol produzieren, sollte der Pilz nicht in der Lage sein, diesen neuartigen Wirkstoff zu detoxifizieren oder zu metabolisieren.

Malus produziert auch seine eigenen Phytoalexine. HRADZINA ET AL. (1997) fanden in Zellkulturen der resistenten Sorte ‚Liberty‘ eine Verbindung, die sie als Malusfuran bezeichneten

und als 2,4-Methoxy-3-Hydroxy-9-O- β -D-Glucosyloxydibenzofuran bestimmten. Malusfuran und sein Aglykon hemmten die Sporenkeimung und das Wachstum von *V. inaequalis*, wobei das Aglykon toxischer war. Sie vermuten, dass auf diese Verbindungen die Definition eines Phytoalexins zutrifft. In den Versuchen dieser Arbeit war das Aglykon allerdings weniger wirksam als das Glukosid. Möglicherweise hängt dies mit der besseren Wasserlöslichkeit des Piceids zusammen, welches dadurch langsamer in die Cuticula penetriert und in größeren Konzentrationen in der wässrigen Phase vorliegt. Dies könnte dazu führen, dass auskeimende Sporen höheren Phytoalexinkonzentrationen ausgesetzt sind.

Saccharoseoctanoat:

Saccharoseoctanoat (SO) ist ein Tensid auf der Basis von Zuckerestern (C_8 Fettsäure mono-, di- und triester von Saccharoseoctanoat und Saccharosedioctanoat-D-Glucopyranosid,-D-Fructofuranosyl, Monooctanoat und Dioctanoat). Von verschiedenen *Nicotiana* Spezies isolierte Zuckerester wirken z. B. gegen die Weiße Fliege. Synthetische Zuckerester werden durch die Reaktion von Zuckern mit Fettsäuren gewonnen und haben neben der Verwendung in der Nahrungsmittelindustrie als Emulgatoren und Stabilisatoren oder Befeuchtungsmittel auch eine Bedeutung als relativ neue Klasse insektizider Substanzen (PUTERKA ET AL. 2003, SHEPPARD ET AL. 2003, CHORTYK ET AL. 1996). Neben der vermuteten fungiziden Wirkung dieser Substanzklasse, schien SO wegen der günstigen ökologischen Verträglichkeit ebenso interessant für die Schorfbekämpfung wie die APGs (s. o.) zu sein.

SO wirkte zunächst auf die Appressorienbildung bei gleich bleibender Keimrate. Ab einer Konzentration von 0,25% wurde bei beiden untersuchten Isolaten eine vollständige Hemmung der Keimung beobachtet. Bei niedrigen Konzentrationen wurde nur die Appressorienbildung gehemmt. Bei 0,065 % war die Appressorienbildung bei Isolat 15 um 41% verringert und bei GL 03 F um 71%. Bei 0,125 % war die Appressorienbildung bei iso 15 um ca. 80% verringert und bei iso GL 03 F um 73% (Abb. 21).

Bei den Untersuchungen mit den APG-Tensiden wurde erwähnt, dass Tenside membranschädigend wirken (s. o.). Das Wachstum von Pilzhyphen wird durch den Turgor gesteuert (MONEY 1998). Mit Ausnahme einiger Hefen wachsen Pilze durch Hyphen, die sich nur an ihren Spitzen ausdehnen und zu einem Myzelium verzweigen. Der Prozess des apikalen Wachstums der Hyphen erfordert die kontrollierte Expansion der apikalen Zellwand, welche darauf folgend wieder in eine feste Wand transformiert werden muss, welche dem Turgor standhält und

den röhrenförmigen Aufbau der Hyphe erhält (WESSELS 1993). Dies bedeutet gleichzeitig, dass die Hyphen in ihrer Wachstumszone am empfindlichsten sind.

Für Appressorien z. B. von *Magnaporthe grisea* wurden extrem hohe Turgordrücke bestimmt (BECHINGER ET AL. 1999, MONEY 1998, 1999). Wenn der Druck von $17 \mu\text{N}\cdot\mu\text{m}^{-2}$, der für Appressorien von *Colletotrichum graminicola* angenommen wird, auf eine menschliche Handfläche übertragen würde, wäre dieser Mensch in der Lage, einen 8000 kg Schulbus hochzuheben (MONEY 1999).

Möglicherweise sind die Appressorien selbst widerstandsfähiger als die Keimschläuche. Mit dem APG-Tensid Plantacare 1200 UP konnte bei nachträglicher Behandlung bereits gekeimter Konidien beobachtet werden, dass die Restfluoreszenz oftmals von Appressorien ausging (Abb. 16). Dies könnte als Indiz für eine höhere Toleranz der Appressorien gegenüber membranschädigenden Tensiden sprechen. Auch gegen Austrocknung sind Keimschläuche empfindlicher als die Appressorien (BECKER UND BURR 1994). Diese Autoren untersuchten anhand einer FDA Färbung, wie sich unterschiedlich lange Trocknungsperioden während des Auskeimens auf das Überleben der gekeimten Konidien auswirkten. Sie erkannten, dass mehr Konidien mit Appressorien die Trocknungsintervalle überlebten als Keimlinge, d.h. gekeimte Konidien ohne Appressorien. Eine gekeimte Konidie von *V. inaequalis* kann drei oder mehr hyphale septierte Zellen zwischen Spore und Appressorium, bzw. der letzten Zelle haben. Die Septen innerhalb der Hyphen von *V. inaequalis* sind typisch für Ascomyzeten. Sie haben eine einzige, zentrale Pore, die in Verbindung zu sog. Woronin-Bodies, d. h. membrangebundenen Partikeln, steht. Wenn bei *Penicillium chrysogenum* eine hyphale Zelle zerstört wird, versiegeln die Woronin-Bodies die septalen Poren und die anliegenden Zellen bzw. die Spore selbst bleiben intakt (COLLINGE UND MARKHAM 1985, BECKER UND BURR 1994). Dies könnte auch für *V. inaequalis* gelten, was hieße, dass die Appressorien überleben können, auch wenn die Spore und der Keimschlauch abgestorben sind. Bei der Keimung werden die zellulären Inhaltsstoffe von der Spore in den Keimschlauch, das Appressorium und nach der Penetration in das Stroma weitertransportiert (MACHARDY 1996, PARK ET AL. 2000 für *V. nashicola*), die Appressorien hätten somit bis zur Penetration genügend Reservestoffe zur Verfügung.

Mit SO wurde nicht untersucht, wie sich das Tensid auf bereits gekeimte Sporen auswirkt, es wird vermutet, dass die Ergebnisse vergleichbar zu denen mit den APG-Tensiden gefundenen sein würden, denn membranschädigende Wirkungen sollten besonders die im Wachstum befindlichen Keimschläuche hemmen (BECKER UND BURR 1994).

Dass beide Isolate von *V. inaequalis*, die mit SO untersucht worden sind, eine vergleichbare Hemmung erfahren, wurde erwartet. Die Membran schädigende Wirkung von Tensiden sollte sich unspezifisch auswirken, da der Aufbau von Membranen bei Pilzen konservativ ist (SCHLEGEL 1992), und daher war keine isolatspezifische, d.h. genetisch verursachte Variabilität zu erwarten.

3.3 Abschnitt C: Begleitende Untersuchungen

Neben dem eigentlichen Gang der Untersuchungen wurden Versuche angestellt, um wichtige Fragen zu klären, die sich während der Arbeiten ergaben. Diese sind hier als begleitende Untersuchungen zusammengefasst und beinhalten verschiedene methodische Ansätze.

3.3.1 Effekt der Boraxbehandlung

Borax (Natriumtetraborat) wird verwendet, um die bei der enzymatischen Herstellung von isolierten CMs freigesetzten lipophilen Substanzen zu extrahieren, welche in hohem Maße während der Isolation sorbiert werden (SCHÖNHERR UND RIEDERER 1986, BAUR 1993). Hier wurde untersucht, ob diese Substanzen, zu denen im besonderen Phenole gehören, einen Einfluss die Penetration der *Venturia*-Sporen hatten.

Abb. 22 zeigt den Einfluss der Boraxbehandlung auf die Penetrationsraten bei CMs unterschiedlichen Alters.

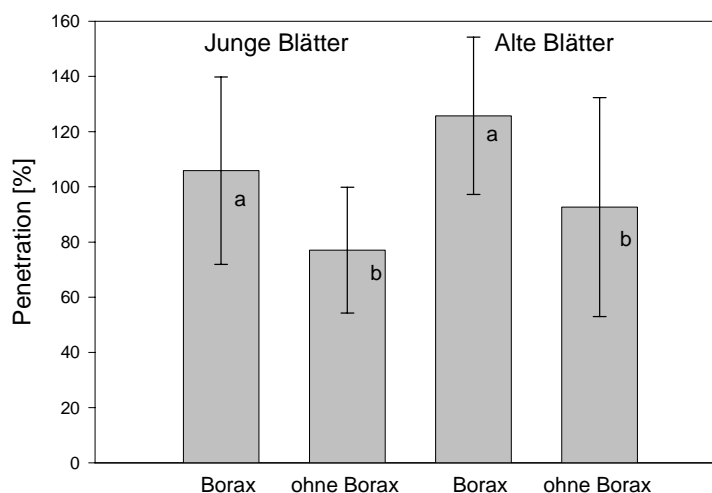


Abbildung 22: Einfluss einer Boraxbehandlung nach der enzymatischen Isolierung von CMs aus und jungen ,Gloster'-Blättern

Voll entfaltete Blätter der Positionen 1 und 5 am Langtrieb wurden als ‚jung‘ und ‚alt‘ bezeichnet, gesammelt und daraus CMs durch enzymatische Isolation gewonnen. Mit Borax behandelte und unbehandelte CMs wurden mit einer Sporensuspension beimpft und die Keimung und Penetration wie bereits beschrieben bonitiert. Dargestellt sind die Ergebnisse des Penetrationsversuchs mit je zehn CMs. Geringe signifikante Unterschiede (*t*-Test, zu einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$) bestehen zwischen behandelten CMs des gleichen Alters (junge Blätter $P = 0,047$, alte Blätter $P = 0,051$). Zwischen gleichen Behandlungen und verschiedenem Alter bestehen keine signifikanten Unterschiede. Werte die den gleichen Buchstaben tragen, waren nicht signifikant verschieden.

Bei den unbehandelten CMs ist die Penetration signifikant geringer als bei den behandelten CMs in beiden Altersstufen. Gleichzeitig wird verdeutlicht, dass in diesem Versuch das Alter der Blätter, von denen die CMs isoliert wurden, keinen Effekt auf die Penetrationsrate hatte.

3.3.2 Wachsextraktion aus Cuticularmembranen

3.3.2.1 Untersuchung des Wachsgehalts verschiedener CMs

Bei CMs verschiedener Apfelsorten und Nichtwirte wurde der Gehalt an löslichem Wachs durch Wiegen vor und nach der Extraktion bestimmt und die Penetration auf extrahierten und unbehandelten CMs untersucht. Abb. 23 zeigt eine Reihenfolge des Wachsgehalts. *Stephanotis floribunda* weist mit knapp 5% den geringsten Gehalt an löslichem Wachs auf, *Pyrus communis* var. ‚Conference‘ mit fast 30% den höchsten. Die Apfelsorten liegen zwischen 20 und 30%. Dies deckt sich mit Daten aus der Literatur (BAKER 1982).

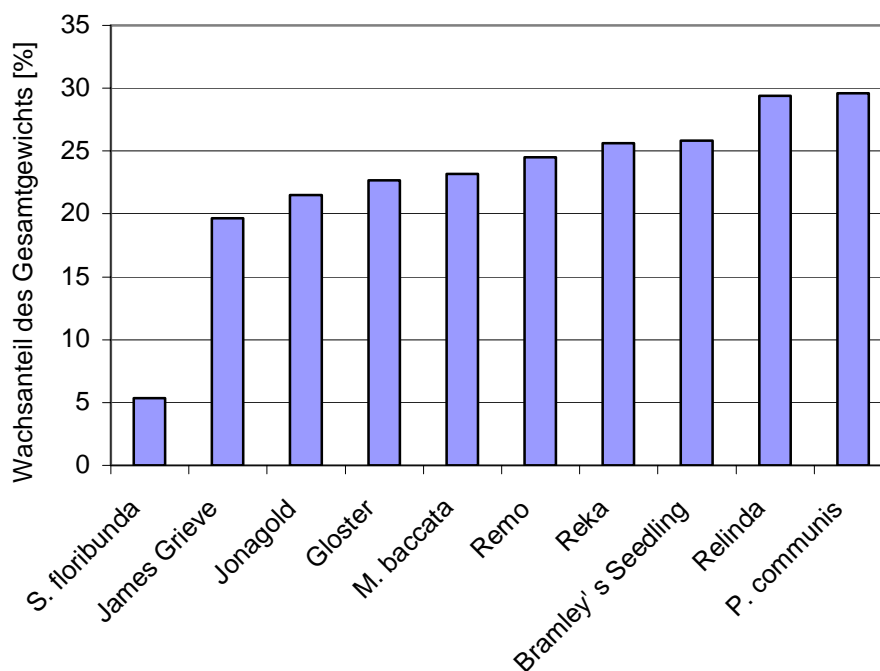


Abbildung 23: Anteil des löslichen Wachses am Gesamtgewicht der CMs.

Ermittelt durch Wiegen von je 3 CMs mit einer Präzisionswaage vor und nach Chloroformextraktion der Oberflächenwachse und bezogen auf das Ursprungsgewicht.

3.3.2.2 Wachsextraktion und Bestimmung der Wachsbestandteile mittels GC und MS

Aus je drei CMs der in Abb. 24 dargestellten Apfelsorten und dem Wildapfel *Malus baccata* wurden die cuticulären Wachse extrahiert und mittels GC und MS in ihre Bestandteile aufgetrennt und bestimmt. Es sollte untersucht werden, ob schorfanfällige und -resistente Apfelsorten Unterschiede in der Wachszusammensetzung ihrer CMs aufweisen. Den Hauptanteil in der Wachsfraktion nehmen hier die Triterpene ein, gefolgt von Estern und Alkoholen

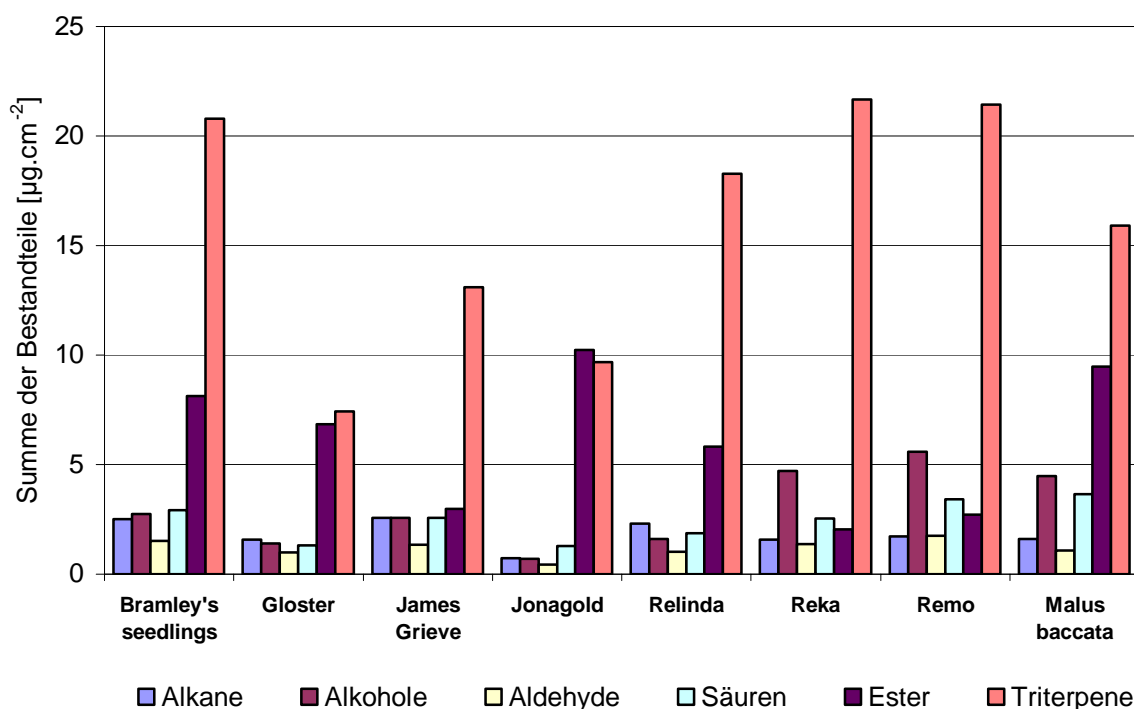


Abbildung 24: Bestandteile der extrahierten Wachsfraktionen

Aus einer Mischprobe von je drei CMs der genannten Sorten und *Malus baccata* wurde die Wachsfraktion extrahiert und in die genannten Substanzklassen aufgetrennt.

3.3.2.3 Vergleich der Penetration auf CMs und MXs

CMs, denen durch Extraktion die Wachse entzogen wurden, werden üblicherweise als MX für Polymermatrix Membranen, (SCHÖNHERR UND RIEDERER 1986) bezeichnet. Es sollte untersucht werden, ob die Entfernung der Wachse einen Einfluss auf die Penetrationsraten hat. Daher wurden die CMs und MXs verschiedener Apfelsorten und Nichtwirte (Abb. 25) von der morphologischen Außenseite inokuliert und die Keimung und Penetration bonitiert. Bei allen untersuchten CMs wurde die Appressorienbildung negativ beeinflusst. Der Effekt auf die Appressorienbildung war signifikant bei ‚Gloster‘, ‚Holsteiner Cox‘ und *P. communis*

„Conference“ ($P = 0,002$ bzw. $< 0,001$ und $0,019$), und nicht signifikant bei *S. floribunda* ($P = 0,085$) (Abb. 25).

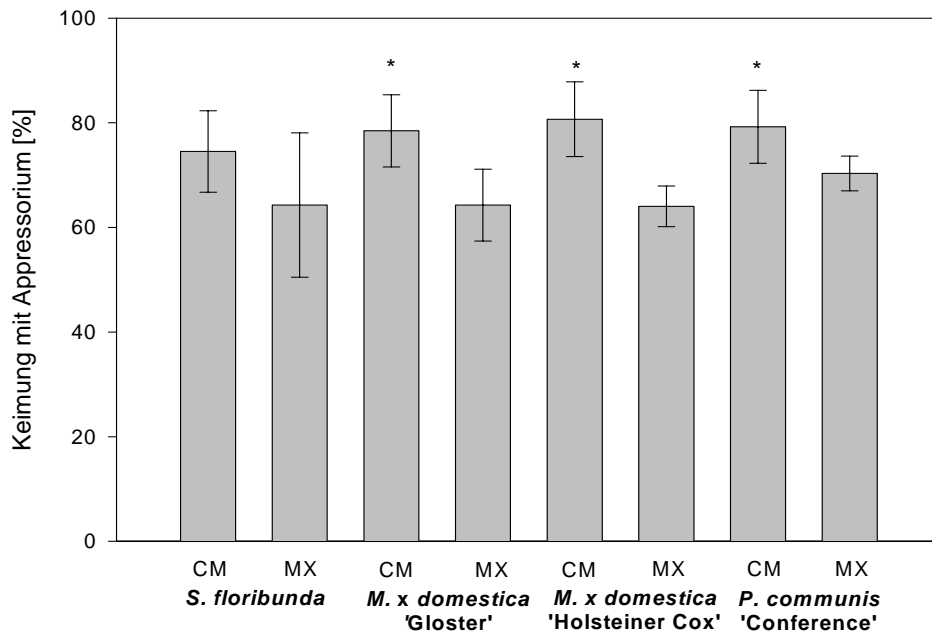


Abbildung 25: Vergleich der Keimung auf CMs und MXs.

Probenumfang für jeden Versuch waren je zehn Membranen. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikant verschieden zu einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bei Students-t-Test waren die Keimraten bei den mit Sternchen versehenen Paaren (CM/MX).

Bei der Penetration kam es zu zwei unterschiedlichen Ergebnissen (Abb. 26). Bei *S. floribunda* nahm die Penetration durch die Wachsextraktion deutlich von durchschnittlich 3,8% auf 100% zu, bei den Apfel-CMs nahm die Penetration ab, wobei die Abnahme bei „Gloster“ nicht signifikant war ($P = 0,052$).

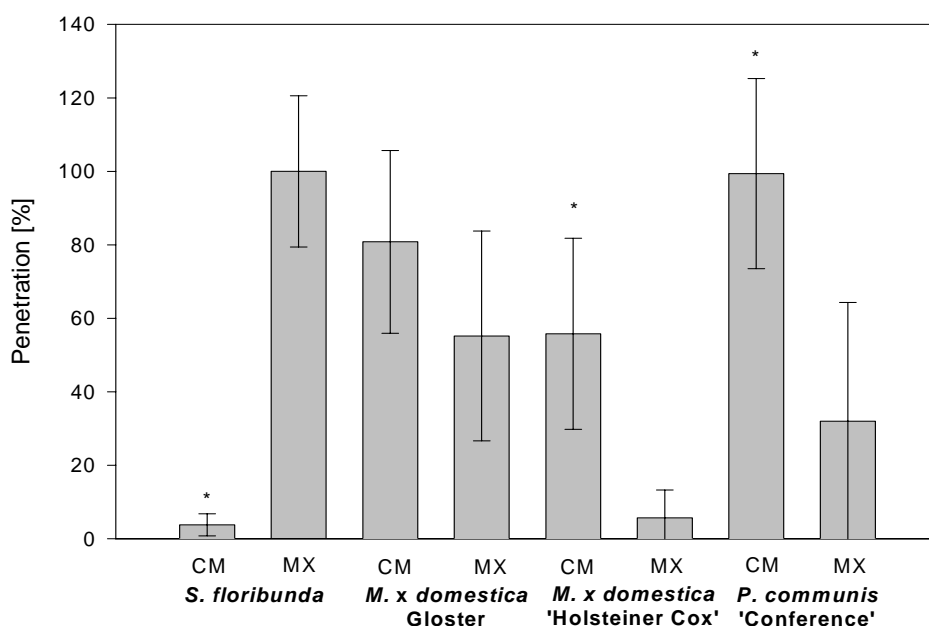


Abbildung 26: Vergleich der Penetration auf CMs und MXs.

Probenumfang für jeden Versuch waren je zehn Membranen. Die Balken geben die Standardabweichung an. Signifikant verschieden zu einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bei Students-t-Test waren die Penetrationsraten vor und nach Extraktion der mit Sternchen versehenen Paare (CM/MX).

3.3.3 Inokulation von der morphologischen Innenseite

Es fiel auf, dass CMs, die versehentlich von der morphologischen Innenseite inokuliert wurden, eine schlechtere bis fehlende Penetration zeigten.

Wie oben gezeigt, erreichen Konidien auf manchen CMs sehr hohe Penetrationsraten. Manchmal kam es vor, dass trotzdem vereinzelt sehr geringe Penetrationsraten auftraten. In diesem Fall waren versehentlich CMs von der morphologischen Innenseite inkubiert worden. Interessant war auch, dass sich im Gegensatz dazu bei den Keimraten keine signifikanten Unterschiede zeigten. Daher wurde dies genauer untersucht. Aus Abb. 27 ist ersichtlich, dass bei allen untersuchten CMs die Penetrationsraten extrem zurückgehen, wenn die Inokulation von der morphologischen Innenseite erfolgte.

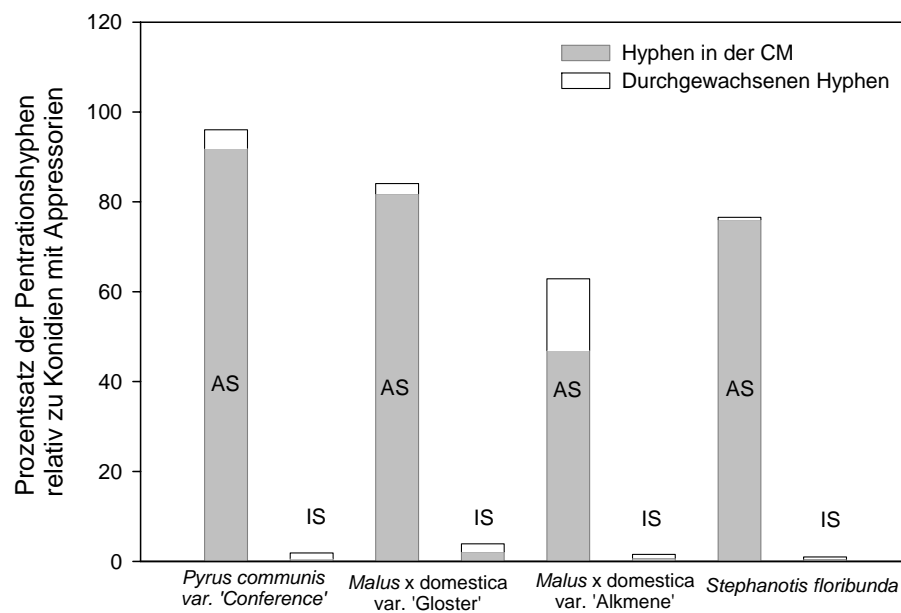


Abbildung 27: Penetrationsraten nach Inokulation von der morphologischen Außen- und Innenseite.

Je zehn CMs der genannten Apfelsorten und Nichtwirte wurden von der morphologischen Außen- und Innenseite mit einer Sporensuspension inokuliert und die Keimung und Penetration bonitiert. Bei den *Keimraten* zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, daher beschränkt sich die Darstellung auf die Penetration. AS= Inkubation der Außenseite, IS= Inkubation der Innenseite

Als mögliche Erklärung kam zunächst ein Versuchsfehler in Betracht. Der Vitalfarbstoff zur Detektion muss zur Färbung des Stromas von der morphologische Außenseite einen anderen Weg durch die CM zurücklegen als bei der Färbung von der Innenseite. Die Cuticularschicht stellt die eigentliche Penetrationsbarriere für Stoffe durch die Cuticula dar (RIEDERER UND SCHREIBER 1995). Diese Schicht liegt zwischen der Wachsschicht und dem Sorptionskompartiment (JEFFREE 1996). Wenn die Penetration von der Innenseite erfolgt und der Farbstoff von der Außenseite appliziert wird, werden die vorhandenen Infektionsstrukturen eventuell nicht gefärbt. Um dem entgegenzuwirken, wurde in einem weiteren Versuch der Farbstoff von der Inokulationsseite zugegeben, so dass er über das externe Myzel aufgenommen und ins Stroma weitergeleitet werden konnte, und dadurch die Barriere nicht überwinden musste.

Aus diesem Versuch mit *P. communis* ‚Conference‘ stammen folgende Abbildungen (Abb. 28 A-C) die den Beweis erbringen, dass die Konidien bei Inkubation von der morphologischen Innenseite keine Penetrationsstrukturen ausbilden, obwohl sie zuvor Appressorien gebildet hatten.

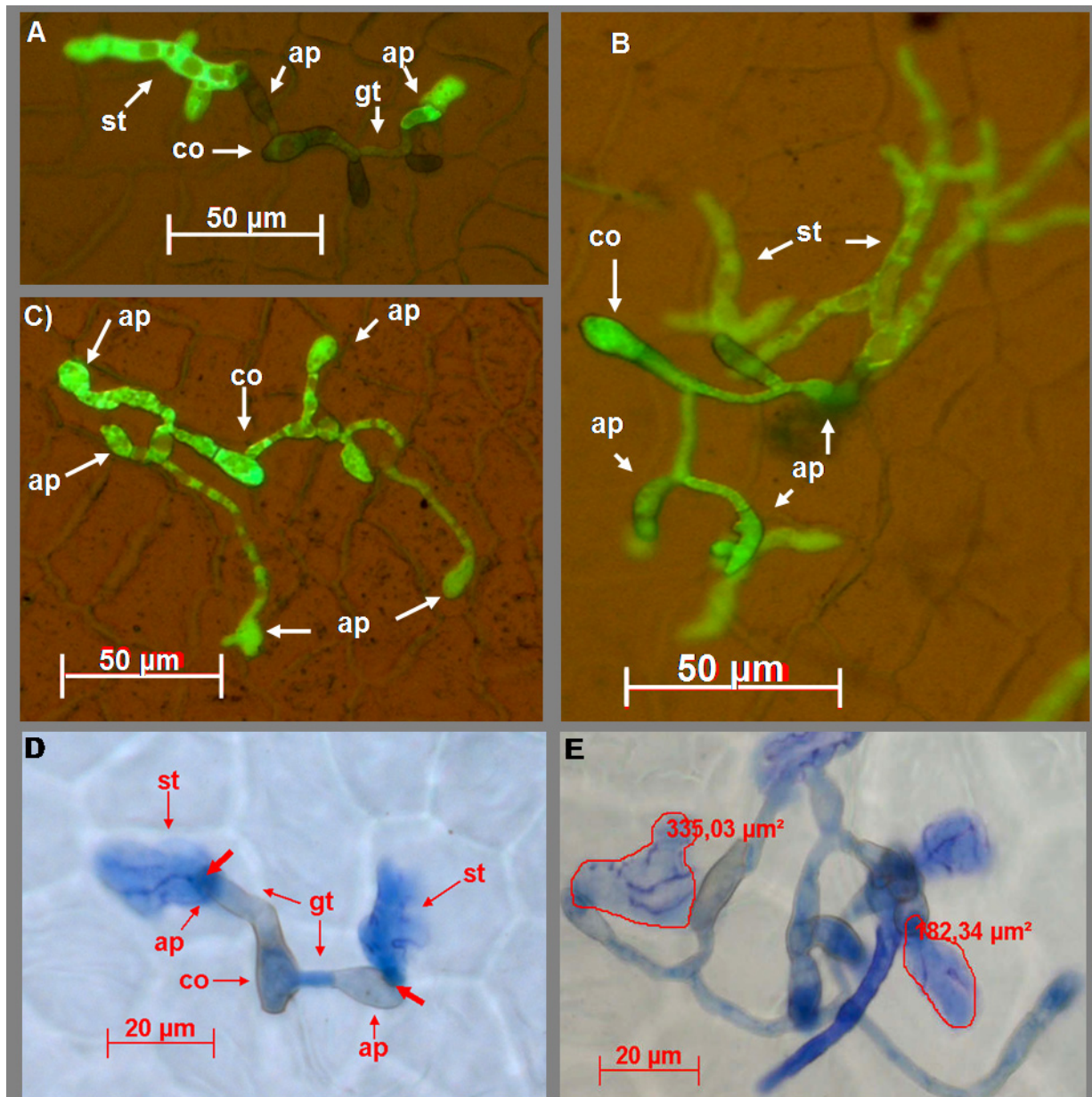


Abbildung 28: Vergleich der Penetration von der Außen- und Innenseite auf CMs von *P. communis* ‚Conference‘ (A-C) und Penetrationsstrukturen von Konidien auf Blattscheiben der Sorte ‚Topaz‘ (D und E).

A-C: Die Penetration wurde nach 72 h Inkubationsdauer bei 20°C nach FDA-Färbung dokumentiert.

D und E: Alte und jüngere Blätter (bestimmt durch die Position am Langtrieb) wurden mit einer Sporensuspension (Isolat15) beimpft und in Petrischalen auf Wasseragar in der Klimakammer inkubiert. Nach 3, 4 und 5 Tagen wurden Proben entnommen, das Chlorophyll extrahiert und mit Laktophenolblau gefärbt. Fotos wurden mit der AxioVision 3.0 Software von ZEISS aufgenommen und zeigen exemplarisch das Stroma nach 3 und 5 Tagen.

ap= Appressorium, co = Konidie, gt = Keimschlauch (germ tube), st = Stroma, die dicken Pfeile markieren die Penetrationsstellen

A: Inkubation von der Außenseite, FDA Färbung von der Innenseite. Methyleneblau gefärbte Konidie mit hellgrün fluoreszierendem Stroma, welchen an zwei Appressorien gebildet wurde.

B: Inkubation von der Außenseite, FDA Färbung von der Außenseite. Eine Konidie mit mehreren Keimschläuchen und Infektionsstellen. Appressorien und Stroma sind deutlich zu erkennen, im Stroma sind Septen und Vakuolen zu sehen.

C: Inkubation von der Innenseite, FDA Färbung von der Innenseite. Die Konidie, Keimschläuche und Appressorien fluoreszieren, es ist kein Stroma zu erkennen. Auffällig ist die hohe Anzahl von Appressorien.

D: Topaz' 3d Inkubationsdauer, altes Blatt. Diese Konidie hatte zwei Keimschläuche und Appressorien ausgebildet, von welchen jeweils ein Stroma ausgeht. Die antiklinen Zellwände der Epidermiszellen schienen das Stroma zu begrenzen, dies wurde in den meisten Fällen beobachtet

E: ‚Topaz‘ 5d Inkubationsdauer, altes Blatt. Nach einer längeren Inkubationsdauer entstanden aus dem subcuticulärem Stroma morphologisch verschiedene Hyphen (hier dunkler gefärbt), die anscheinend durch die Cuticula nach außen wuchsen.

3.3.4 Inokulation von Blattscheiben anfälliger und resistenter Apfelsorten

Eine wichtige Voraussetzung für die Aussagefähigkeit von Ergebnissen, die mit dem *in vitro*-Testsystem erzielt wurden, ist die Übertragbarkeit *in vivo*. Dies setzt ein vergleichbares Verhalten von *V. inaequalis* auf isolierten CMs und intakten Blättern voraus. Nachdem gezeigt wurde, dass CMs anfälliger und resistenter Sorten sowie junger und alter, d. h. ontogen resistenter Apfelblätter von Konidien des Apfelschorferregers penetriert werden können, sollte geklärt werden, inwiefern sich solche Ergebnisse auf Blattscheiben (BS) wiederholen lassen. Die Abbildungen 28 D und E (s. o.) zeigen beispielhaft die auf BS von ‚Topaz‘ gefundenen Strukturen.

Zunächst musste eine Methode zur mikroskopischen Untersuchung etabliert werden. Das Ziel war, die Färbung von Strukturen auf den Innenseiten der CMs zu verbessern. Die Laktophenol/Anilinblaufärbung führte zu guten Ergebnissen. Zuerst sollte geklärt werden, ob *V. inaequalis* auf BS und isolierten CMs ähnliche Morphologien ausprägt. Dazu wurden BS mit Konidien des Isolats 15 beimpft, inkubiert und für die Mikroskopie aufgearbeitet.

Eine Färbemethode (LI UND XU 2002) erwies sich als wenig erfolgreich. Nur die CMs von den Blattunterseiten lösten gut ab, wenn die Scheiben 60 min gekocht wurden. Die CMs von den Oberseiten ließen sich kaum oder in Stücken ablösen. Bei den ersten Versuchen wurden keine Konidien wieder gefunden. Eine verkürzte Kochdauer der Proben in der Natronlauge auf 30 min ermöglichte es, die CMs intakt von den Oberseiten der Scheiben abzuziehen. Die gekeimten Sporen waren noch zu erkennen. Ein Stroma war nur sehr schwach und undeutlich oder gar nicht zu erkennen. Diese Methode eignete sich besser zur Mikroskopie bereits vorhandener Läsionen (s. Abb. 6 F und G).

Nach der Penetration der Cuticula verlief das Wachstum in mehrere Richtungen, aber flächig und die Cuticularleisten schienen das Wachstum zu behindern. Das Stroma war morphologisch verschieden zu den außen liegenden Pilzstrukturen, dies wurde analog auf isolierten CMs (s. o.) und auch bei VALSANGIACOMO UND GESSLER (1988) an ihren Untersuchungen an ‚Golden Delicious‘-Blättern beobachtet. Daher wird davon ausgegangen, dass das Verhalten von *V. inaequalis* auf isolierten CMs dem auf BS und lebenden Blättern entspricht.

Mit der Sorte ‚Topaz‘ wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, da das Blattmaterial ausreichend und im richtigen Wachstumsstadium zur Verfügung stand. Es sollte untersucht werden, ob sich das Alter der Blätter in einer ontogenen Resistenz ausprägt, welche sich auf die Penetration und Stromaentwicklung auswirkte.

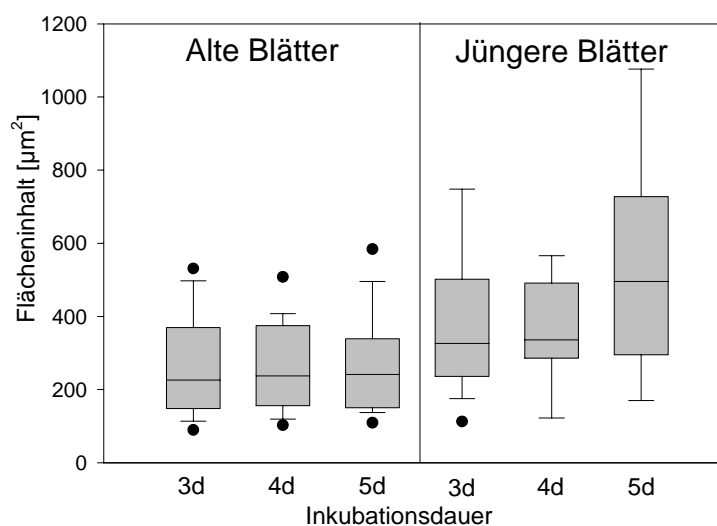


Abbildung 29: Flächeninhalte der Infektionsstrukturen auf Blattscheiben alter und jüngerer Blätter der Sorte ‚Topaz‘

Die Flächeninhalte wurden nach drei, vier und fünf Tagen Inkubationsdauer mit der AxioVision 3.0 Software von ZEISS gemessen. Die Box Plots zeigen die 5th/95th Perzentile mit Fehlerbalken und den Median als durchgezogene Linie.

Bei BS von alten und jungen Blättern wurden vergleichbare Raten für die Konidienkeimung und Penetration gefunden. Die Stromaentwicklung verlief unterschiedlich. Bei BS von jüngeren Blättern hatte das Stroma zu jedem Versuchszeitpunkt eine größere Fläche als bei den BS von alten Blättern (Abb. 29). Die Flächeninhalte in beiden Altersgruppen veränderten sich nicht mit der Inkubationsdauer, d.h. zwischen dem dritten und fünften Tag der Inkubation nahm das Stroma nicht mehr an Fläche zu. Die Penetrationsraten auf BS von alten und jüngeren Blättern waren vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

3.3.5 DNA-Isolierung aus Einzelsporisolaten

3.3.5.1 RAPD-PCR mit DNA aus Einzelsporisolaten

Die genetische Variabilität von 19 Einzelsporisolaten, die aus verschiedenen deutschen Standorten isoliert wurden, wurde aufgrund der Allelhäufigkeit von sieben RAPD (random amplification of polymorphic DNA) Primern untersucht. Die Primer wurden zwei Arbeiten entnommen, die sich mit der Populationsdynamik von *V. inaequalis* beschäftigen (SIEROTZKI ET AL. 1994, TENZER UND GESSLER 1999). Die PCR-Durchführung wurde mehrmals wiederholt. Das Bandenmuster (Abb. 30) zeigt ein repräsentatives Ergebnis der für die einzelnen Isolate gefundenen Polymorphismen.

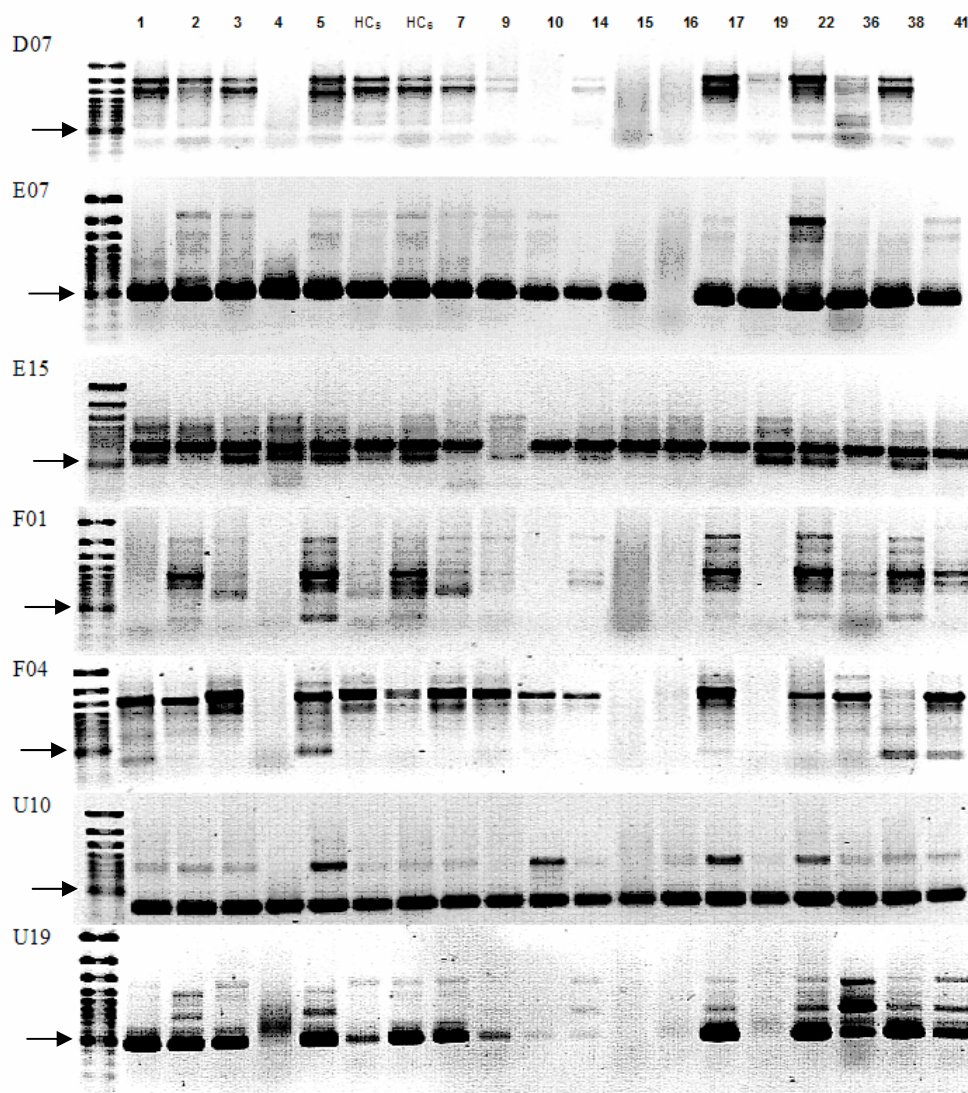


Abbildung 30: Amplifizierte DNA-Fragmente nach RAPD-PCR mit 7 verschiedenen Primern

Links angegeben sind die jeweiligen Primer, im Gel folgen zunächst der Größenstandard (100 bp Längemarkner GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus von MBI Fermentas) und die jeweiligen Banden. Die Fragmente werden jeweils von oben nach unten kleiner. Die Pfeile markieren an Position 500 bp. Die

Isolate sind oben angegeben. Die Sichtbarmachung erfolgte durch Färbung des Gels mit Ethidiumbromid und UV-Bestrahlung und wurde mit Bio-Rad Gel Doc erfasst.

In allen Ansätzen wurde die gleiche Menge an DNA eingesetzt. Die Primer lieferten z. T. sehr prominente Banden (siehe Abb. 30: Primer E07, 500 bp), die eine leichte Zuordnung nach Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein erlaubten. Bei anderen Banden gestaltete sich die Auswertung schwieriger. Der Primer U10 amplifizierte zwei Fragmente bei 300 und 900 bp. Die Bande bei 300 bp war sehr prominent und bei allen Isolaten vorhanden. Die Bande bei 900 bp zeichnete sich durch verschieden starke Intensität aus, was möglicherweise bei den stärkeren Banden auf eine erhöhte Kopienzahl schließen lässt, d. h. der Primer könnte an mehreren Stellen gebunden haben. So war die 900 bp Bande beim Primer U10 bei den Isolaten 1, 2, und 3 schwach ausgeprägt, beim Isolat 4 nicht vorhanden und beim Isolat 5 prominent ausgeprägt (Abb. 30). Die Intensität der Banden wurde allerdings nicht in die Auswertung einbezogen, sondern es zählte nur eine +/- Entscheidung. Anhand der Polymorphismen wurde eine Matrix erstellt (Abb. 31), die die Unterschiede in Entfernungen auf einem Stammbaum darstellte.

D07	1	2	3	4	5	HC5	HC6	7	9	10	14	15	16	17	19	22	36	38	41
2000	+	+		-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
1900	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
1600	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
1500	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
1400	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
750	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
400	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E07	1	2	3	4	5	HC5	HC6	7	9	10	14	15	16	17	19	22	36	38	41
2100	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
1500	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
1200	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
1000	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
600	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
E15	1	2	3	4	5	HC5	HC6	7	9	10	14	15	16	17	19	22	36	38	41
1500	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
1200	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
700	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

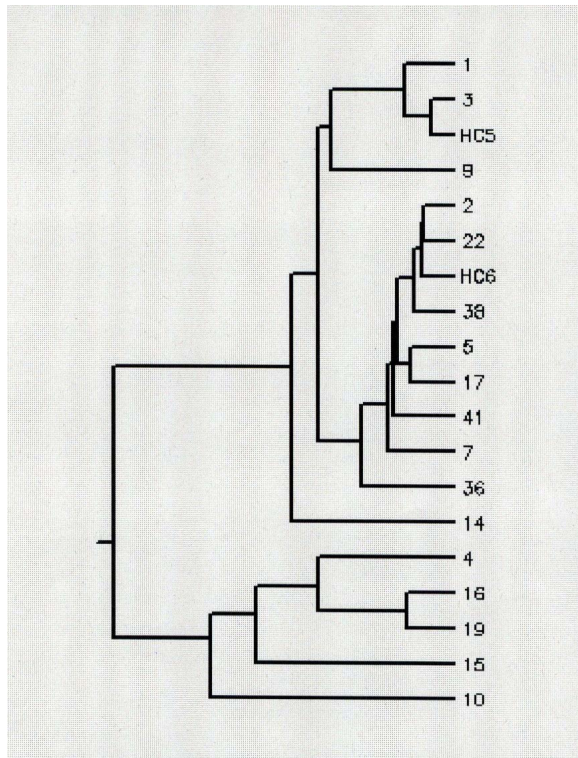
F01	1	2	3	4	5	HC5	HC6	7	9	10	14	15	16	17	19	22	36	38	41
2100	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
1600	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
1200	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
1000	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
900	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
750	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
400	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
F04	1	2	3	4	5	HC5	HC6	7	9	10	14	15	16	17	19	22	36	38	41
2200	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
1600	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1500	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
1200	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
800	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
450	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
U10	1	2	3	4	5	HC5	HC6	7	9	10	14	15	16	17	19	22	36	38	41
900	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U19	1	2	3	4	5	HC5	HC6	7	9	10	14	15	16	17	19	22	36	38	41
1400	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
1200	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
900	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
800	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
600	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
500	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+

Abbildung 31: Matrix nach RAPD-PCR mit 7 verschiedenen Primern / Auswertung des Agarosegel zur Erstellung eines Stammbaumes

Die in Abb. 30 dargestellten im Agarosegel gefundenen Polymorphismen wurden ihrer Größe in Basenpaaren zugeordnet. Hier steht für jeden Polymorphismus links die Größe in Basenpaaren, oben stehen jeweils die Isolate. + besagt dass ein Polymorphismus vorhanden ist und – steht für nicht vorhanden.

3.3.5.2 Erstellung eines Stammbaumes

Die Isolate wurden dem Stammbaum gegenübergestellt (Abb. 32). Dadurch ergab sich eine Einteilung in verschiedene Gruppen, die teilweise mit der Herkunft der Isolate übereinstimmen.



Nr.	Quelle	Herkunft
1	Elstar, Blatt1	Dossenheim
3	Elstar	Dossenheim
HC ₅	Holsteiner Cox	Quellen Iso 15 / 36
9	M9/ <i>M. baccata</i>	Steinberg
2	Wildapfel	Steinberg
22	M9/Wildapfel	Steinberg/GWH
HC ₆	Holsteiner Cox	Quellen Iso 15 / 36
38	M9/ <i>M. baccata</i>	Steinberg
5	<i>M. baccata</i>	Steinberg
17	M9/ <i>M. baccata</i>	Steinberg
41	Apfel nr.3	Urania, HH
7	Elstar	Dossenheim
36	Gloster	Ruthe
14	unbekannt	unbekannt
4	<i>M. baccata</i>	Steinberg
16	M9/Wildapfel	Steinberg/GWH
19	<i>M. baccata</i>	Steinberg
15	Elstar	Dossenheim
10	M9/Wildapfel	Steinberg/GWH

Abbildung 32: Stammbaum, der aus der Matrix aus Abb. 31 erstellt wurde und Herkunftsliste der Isolate

Der Stammbaum gibt die Unterschiede zwischen den Isolaten, die sich durch Übereinstimmung oder Differenzen im Bandenmuster ergeben, als Entfernungen auf dem Stammbaum wieder. Anhand der Matrix (Abb. 31) wurde mit dem Programm Tree Preview von Phylip ein Stammbaum der Isolate erstellt.

3.3.6 Diskussion des Abschnittes C: Begleitende Untersuchungen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Testsystem die Bonitur der Keimung, Appressorienbildung, Penetration und Stromaentwicklung von *V. inaequalis* erlaubt, sollte erörtert werden, wie sich Veränderungen bzw. Schwankungen des Ausgangsmaterials, sei es des Pathogens oder der CMs auswirken. Einige Fragen, wie die Herkunft der CMs (Blattalter, Apfelsorte, Nicht-Wirtspflanzen) oder die Inkubationsmethode (Inokulumkonzentration und –gewinnung, optimale Temperatur, Auswertungszeitpunkte, Färbemethoden) wurden naturgemäß im Verlauf der Entwicklung des Systems bearbeitet. Andere Fragen kamen im Verlauf der Arbeit auf standen nicht im direkten Zusammenhang mit dem Hauptgedanken der Arbeit. Da diese Fragen aber den Erkenntnisstand erweiterten und nachfolgenden Arbeiten von Nutzen sein können, wurden die daraus resultierenden Ergebnisse unter dem Punkt ‚Begleitende Untersuchungen‘ zusammengestellt.

Effekt der Boraxbehandlung

Die Wirkung phenolischer Inhaltsstoffe des Apfelgewebes auf *Venturia inaequalis* bzw. deren Bedeutung bei konstitutiver Erhöhung bei resistenten Sorten (HOLOWCZAK ET AL. 1962, TREUTTER UND FEUCHT 1990, SIEROTZKI UND GESSLER 1993, PICINELLI ET AL. 1995, TREUTTER 2001 als zusammenfassende Arbeit zur Biosynthese, RÜHMANN ET AL. 2002) sind schon umfassend untersucht worden. Dennoch kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, ob ein erhöhter Phenolgehalt ursächlich mit einer erhöhten Resistenz gegen *V. inaequalis* verbunden ist (SIEROTZKI UND GESSLER 1993, PICINELLI ET AL. 1995, MAYR ET AL. 1997, USENIK ET AL. 2004).

Während der enzymatischen Isolation werden durch die Verletzung des Gewebes u. a. lipophile Stoffe freigesetzt, welche im großen Maße von den CMs sorbiert werden (SCHÖNHERR UND RIEDERER 1986). Isolierte CMs sorbieren phenolische und andere lipophile Stoffe in sehr hohen Maße (RIEDERER UND SCHÖNHERR 1994). Die Sorption ist üblicherweise ein reversibler Prozess und zumindest Substanzen mit sauren Gruppen wie Phenole und Fettsäuren sollten mit einem Borax-Puffer mit alkalischem pH von 9 entfernt werden (SCHÖNHERR UND RIEDERER 1986). In den Versuchen dieser Arbeit nahm das Gewicht alter und junger ‚Gloster‘-CMs um je ca. 15% durch die Boraxbehandlung ab (Daten wurden nicht gezeigt), das bedeutet, sie hatten 15% ihres Eigengewichts an lipophilen Stoffen sorbiert. Der Einfluss der sorbierten Stoffe auf die Penetration von *V. inaequalis* wurde untersucht. Bei CMs von alten und jungen Blättern nahm die Penetration der CMs durch *V. inaequalis* in Folge der Ent-

fernung der sorbierten lipophilen Stoffe signifikant zu (Abb. 22). Daher wird angenommen, dass die sorbierten Stoffe eine hemmende Wirkung auf die Penetration und Stromaentwicklung von *V. inaequalis* haben.

Anhand des Testsystems könnte auch untersucht werden, inwiefern sich künstlich applizierte und sorbierte Phenole auf die Penetration von *V. inaequalis* auswirken. Dies wurde schon am Beispiel von Resveratrol gezeigt und ließe sich auf apfelspezifische phenolische Stoffe ausbreiten, die im Verdacht stehen, mit der Resistenz von Äpfeln gegen *V. inaequalis* in Verbindung zu stehen, wobei deren genaue Rolle noch unklar ist (MICHALEK ET AL. 1999). Dihydrochalkone (Phloridzin und Phloretin) und Flavanole (Quercetrin, Rutin) sind die hauptsächlichsten in Apfelblättern gefundenen phenolischen Verbindungen (PICINELLI ET AL. 1995, USENIK ET AL. 2004).

Wenn man diese Stoffe in ein Gleichgewicht mit Borax-behandelten CMs brächte, sorbierten die CMs höchstwahrscheinlich im gleichen Maße wie für Resveratrol und die bei der Isolation entstandenen Phenole gezeigt, und es ließen sich dann Vergleiche in Bezug auf die Hemmung des Stromas durchführen. Dies könnte dazu beitragen, die Bedeutung der für Apfelblätter konstitutiven phenolischen Verbindungen gegen den Apfelschorferreger aufzuhellen.

Ob natürliche Phytoalexine mit desorbiert wurden, wurde in diesem Zusammenhang nicht geklärt. Es wäre jedoch sinnvoll, zu untersuchen, ob eventuell die Desorption mittels Borax zur Entfernung dieser phenolischen Stoffe geführt hat und ob dies zu Unterschieden der Penetrationsraten beigetragen hat.

Inokulation von der morphologischen Innenseite

Es wurde gezeigt, dass *V. inaequalis* es nicht vermag, CMs zu penetrieren, wenn die Konidien auf der morphologischen Innenseite inkubiert werden (Abb. 27). Die Keimrate wird von der Inkubationsseite nicht negativ beeinflusst, der Pilz produziert jedoch tendenziell mehr Appressorien, wenn er auf der Innenseite von *Pyrus*-CMs auskeimt (Abb. 28 A-C). Auch bei anderen pathogenen Pilzen wurde beobachtet, dass diese vermehrt Appressorien ausbilden, wenn sie nicht penetrieren können bzw. auf einer ungeeigneten Wirtsoberfläche auskeimen (CARVER ET AL. 1996). STOCKWELL UND HANCHEY (1983) untersuchten den Einfluss der Cuticula von Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) auf *Rhizoctonia solani* und entdeckten, dass der Pilz auf älteren, stärker calcifizierten Pflanzen mehr Infektionsstrukturen ausbildet.

Die chemische Zusammensetzung der Innenseiten von CMs ist unterschiedlich zu der Außenseite. Auf der Innenseite können noch Pektin und Reste der Zellwände vorhanden sein, die Außenseiten sind durch die Oberflächenwachse hydrophober als die Innenseiten. Es wird

postuliert, dass Eigenschaften der Oberfläche verantwortlich für die Unterschiede in der Penetration von der Außen- und Innenseite von CMs sind.

Auf den Mechanismus der Oberflächenerkennung und die Bedeutung der Oberflächenbeschaffenheit für die Keimung, Appressorienbildung und Penetration von *V. inaequalis* wird im Zusammenhang mit der Wachsextraktion (s. u.) näher eingegangen.

Inokulation von BS anfälliger und resistenter Apfelsorten

In dieser Arbeit wurde auf CMs und BS ein ähnliches Verhalten der *V. inaequalis*-Konidien beobachtet. Das Stroma hatte in beiden Systemen eine ähnliche Morphologie (Abb. 6 und 28 D und E). Dies deckt sich mit den Untersuchungen Anderer an ganzen Blättern und Blattscheiben (BÉNAOUF UND PARISI 1998). Das Stroma ist wahrscheinlich bei isolierten CMs in der Cuticularmatrix lokalisiert, bei intakten Blättern wurde beschrieben, dass sich das Stroma zwischen der Cuticula und der Epidermisaußenwand befindet (MACHARDY 1996).

Auch die Raten für Keimung, Appressorienbildung und Penetration waren auf CMs und BS vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Es wird daher davon ausgegangen, dass das Stroma auf CMs der natürlichen Entwicklung des Pilzes in lebenden Blättern entspricht. Offenbar ist der Pilz in der Lage, sich von den Nährstoffen, die die CMs selbst liefern, zu ernähren. Die Sporen befinden sich zunächst in einer Suspension aus destilliertem Wasser, welches eventuell Restnährstoffe der Cellophanmembran oder des Nährmediums (PDA) enthält. Die CMs schwimmen jedoch auf reinem Wasser ohne jegliche Nährstoffe. Sogar nach neun Tagen wurde auf CMs von *P. communis* ein Stromawachstum beobachtet (Abb. 6 D und E). Die Konidien können höchstwahrscheinlich nicht genügend Nährstoffe vor ihrer Auskeimung speichern, um dies Wachstum aufrecht zu erhalten. Das Stromawachstum geschieht in der CM. Daher wird angenommen, dass sich der Pilz zu diesem Zeitpunkt ausschließlich von Metaboliten der CM ernährt. Dazu könnten Fettsäurereste, Cutinmonomere und Zellwandbausteine gehören. Es ist bekannt, dass *V. inaequalis* zur Synthese einer Reihe von Cutin-, Pektin- und Zellwandabbauenden Enzymen fähig ist (s. u.) (NICHOLSON ET AL. 1972, WAGNER ET AL. 1988, KÖLLER UND PARKER 1989, KÖLLER ET AL. 1991, VALSANGIACOMO ET AL. 1992, MÜLLER UND GESSLER 1993, KOLLAR 1994B, KOLLAR 1998).

Bemerkenswert war, dass es zu einer guten Penetration von Blattscheiben der V_F -resistenten Sorte ‚Topaz‘ kam. Bei den Versuchen auf BS von ‚Topaz‘ zeigte sich, dass das Stroma zwischen dem dritten und fünften Tag der Auswertung auf BS von alten und jüngeren Blättern nur wenig an Fläche zunahm (Abb. 28 D und E). Dies könnte auf eine bereits vorhandenen oder sich entwickelnde ontogene Resistenz hindeuten. Das Stroma ist auf den BS von jünge-

ren Blättern größer als auf den BS von alten Blättern. Diese hatten also neben der V_f -Resistenz zum Zeitpunkt der Infektion offenbar bereits eine gewisse zusätzliche ontogene Resistenz erreicht.

Sehr junge Blätter, die gerade entrollt waren, wurden ebenfalls untersucht. Hier wurde beobachtet, dass der Inokulationstropfen von den Blattoberseiten abperlte und auf präparierten Scheibchen wurden nur sehr wenige Konidien wieder gefunden. Daher konnten die jüngsten Blätter in die Untersuchungen mit Blattscheiben nicht mit einbezogen werden. Die Oberflächeneigenschaften von Blättern und Früchten können das Überleben von Konidien beeinflussen. Auf der Blattoberfläche vorhandene Trichome reduzieren den Anteil der Konidien die infizieren können. Die Konidien verfangen sich an den Trichomen und der direkte Kontakt zur Oberfläche wird verhindert. Zudem wird die Benetzbarkeit der Blattoberfläche durch Trichome herabgesetzt, so dass eventuell kein freies Wasser zur Auskeimung der Konidien vorhanden ist. Bei älteren Blättern nimmt die Dichte der Trichome ab oder sie gehen durch Witterungseinflüsse verloren, so dass deren Einfluss auf die Oberflächeneigenschaften bei den jüngsten Blättern am größten ist (MACHARDY 1996).

Die Vergleichbarkeit der mit dem hier entwickelten *in vitro*-System gefundenen Ergebnisse in das natürliche System ist durch das identische Verhalten von *V. inaequalis* auf CMs und Blättern gegeben. Dadurch ist eine wichtige Grundvoraussetzung des Systems erfüllt.

Wachsextraktion aus Cuticularmembranen

Die Ergebnisse der Wachsanalysen der verschiedenen CMs anfälliger und resistenter Apfelsorten (Abb. 24) machen die Korrelation mit der Herkunft der CMs kompliziert. Die CMs stammten nicht von Blättern, die einer Standardisierung unterlagen. Daher sind natürliche Schwankungen der Wachszusammensetzung je nach Alter und Position der Blätter am Baum wahrscheinlich. Bei Efeublättern schwankt die Zusammensetzung der einzelnen Wachsfraktionen je nach Exposition des Blattes und Alter (HANKE UND SCHREIBER, 1998). Auffällig ist, dass die Triterpene bei allen untersuchten Proben den Hauptanteil ausmachen. Um Korrelationen zwischen Einflüssen einzelner Apfelsorten auf die Bestandteile der Wachsfraktion machen zu können, bietet sich dieser Datensatz nicht an.

(BAKER (1982) erwähnt, dass *Malus* und *Pyrus* Spezies Wachsablagerungen von 25-50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aufweisen. Dies deckt sich mit den durch Wiegen ermittelten Daten (Abb. 23) und mittels GC /MS gefundenen Daten (Abb. 24). Bei einer Fläche von 3,14 cm^2 und einem Gewicht der CMs von ca. 650 μg vor der Extraktion ergeben die hier zusammengetragenen Daten einen durchschnittlichen Wachsgehalt von ca. 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für *Malus* und 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für

Pyrus. Stephanotis floribunda mit 5% extrahierbarem Wachs weist nur 11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf. Bei Früchten sind die Wachsablagerungen üblicherweise noch höher (BAKER 1982).

Die Mechanismen des Eindringens von pilzlichen Pathogenen und die Beteiligung von Enzymen wurden umfassend an Wirt-Pathogen Systemen untersucht. Die Rolle von Cutinasen bei der Hydrolyse der pflanzlichen Cuticula bzw. Cutin als Substrat mit *Fusarium solani pisi* als Modellpathogen (PURDY UND KOLATTUKUDY 1975, MAITI UND KOLATTUKUDY 1979, WOLOSHUK UND KOLATTUKUDY 1986), *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (FRANCIS ET AL. 1996), *Colletotrichum* ssp. (DICKMAN UND PATIL 1986, CRUICKSHANK 1995, HUANG UND KUĆ 1995), *Erysiphe polygoni* (WANG ET AL. 2000), *Magnaporthe grisea*, *Nectria haematococca* und *Alternaria brassiciola* (KÖLLER ET AL. 1995) wurde umfassend erforscht. Auch bei *Pseudomonas* spp. wurden Cutinasen und Pektinasen entdeckt (BASHAN ET AL. 1985, SEBASTIAN ET AL. 1987).

Für *V. inaequalis* wurde die Aktivität zahlreicher Enzyme *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. Gefunden wurden Esterasen (NICHOLSON ET AL. 1972), Cutinasen (KÖLLER UND PARKER 1989, KÖLLER ET AL. 1991), Cellulasen (WAGNER ET AL. 1988, KOLLAR 1994B) und Endopolygalakturonasen, bzw Pektinasen (VALSANGIACOMO ET AL. 1992, MÜLLER UND GESSLER 1993, KOLLAR 1998).

Es wird vermutet, dass die Freisetzung von Enzymen für die Penetration durch geringe Mengen des Substrats ausgelöst wird, und sich daraus eine Gewebespezifizierung der pilzlichen Pathogene ergibt (TRAIL UND KÖLLER 1990, KÖLLER ET AL. 1991). Möglicherweise sind auch cuticuläre Wachse bedeutsam für die Oberflächenerkennung von *V. inaequalis*. Wenn die löslichen cuticuläre Wachse durch eine Chloroformbehandlung entfernt wurden, fehlt deren induzierende Wirkung auf die Enzymsekretion. Dies wurde hier auch nach Chloroformbehandlung der CMs und nachfolgenden Penetrationsversuchen mit Konidien gezeigt (Abb. 26).

Durch eine Chloroformbehandlung werden aus den CMs die löslichen cuticulären Lipide, bzw. Wachse herausgelöst, wobei es sich sowohl um epicuticuläre als auch intracuticuläre Wachse handelt (SCHÖNHERR UND RIEDERER 1986).

Die Keimrate und Appressorienbildung wurde durch die Entfernung der Wachse signifikant bei den meisten untersuchten CMs gehemmt (Abb. 25). Die Wirkung war nominell allerdings nicht sehr bedeutend. Die Penetration nahm auf MX in den meisten Fällen signifikant ab (Abb. 26). Die Wachsextraktion führt bei ‚Gloster‘ zu keiner signifikanten Abnahme der Penetration, aber hatte einen signifikanten Effekt bei ‚Holsteiner Cox‘ und *P. communis*. Im

Fälle von *S. floribunda* erhöhte sich die Penetration nach Extraktion der Wachse. Damit verursachte die Wachsextraktion hier einen gegenteiligen Effekt.

Zunächst scheint die Wachsextraktion die Appressorienbildung negativ zu beeinflussen, dies deckt sich mit Untersuchungen an anderen Pilzen. Wachse, bzw. die langkettigen Alkohole des Oberflächenwachses von Avocado induzieren die Keimung und Appressorienbildung bei *Colletotrichum gloeosporioides* (PODILA ET AL. 1993). Bei *Magnaporthe grisea* ermöglichen Oberflächenwachse von Reis die Keimung und Appressorienbildung auf nicht-induzierenden Oberflächen (HEDGE UND KOLATTUKUDY 1997). Beim Wachs von Gerste scheint ein ganz bestimmtes Aldehyd mit einer Kettenlänge von C₂₆ für die Appressoriendifferenzierung von *Blumeria graminis* verantwortlich zu sein. (TSUBA ET AL. 2002).

Möglicherweise wird durch die Veränderung der Wirtsoberfläche nach Entfernung der Wachse die Enzymsekretion derart beeinflusst, dass *V. inaequalis* nicht mehr in der Lage ist, zu penetrieren. Im Wachs scheinen Induktoren für die Penetration vorhanden zu sein. Diese wirken sich schwächer auch auf die Keimung und Appressorienbildung aus. Wäre das Eindringen von *V. inaequalis* rein mechanisch verursacht, dürfte die Entfernung der Wachse keinen Einfluss auf die Penetrationsrate haben. Daher erlaubt sich hier der Umkehrschluss, dass die Penetration von *V. inaequalis* nicht ausschließlich mechanisch abläuft. Eine Restpenetration war zu beobachten. Diese könnte durch die induzierende Wirkung anderer Monomere begründet sein. Anhand von rekonstituierten Wachsen hätte diese Hypothese noch genauer untersucht werden können, jedoch wurden die dazu notwendigen Versuche nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Die Cuticula von *S. floribunda* enthält im Vergleich zu den untersuchten Apfelsorten und *P. communis* weniger lösliche Wachse, diese machen nur 5% des Gesamtgewichts der CM im Vergleich zu 20-30% bei den anderen untersuchten CMs aus. Die Appressorienbildung auf *Stephanotis*-CMs wurde durch die Extraktion der Wachse kaum beeinflusst und lag im gleichen Bereich wie bei den Apfel-CMs. Bei unbehandelten *Stephanotis*-CMs wurde kaum Penetration festgestellt, jedoch erhöhte sich die Penetrationsrate signifikant durch die Wachsextraktion. Diese Entwicklung ist konträr zu den Beobachtungen auf *Malus*-CMs. Eventuell wirkt das Wachs von *S. floribunda*, einem Nichtwirt für den Apfelschorf, penetrationshemmend bzw. nicht induzierend auf *V. inaequalis*-Konidien. Dieser hemmende Effekt wird durch die Extraktion aufgehoben, so dass die behandelte Oberfläche ohne Wachse dann induzierend wirkt.

Bei den Versuchen, die zu einer Reduktion der Penetration geführt haben, ist immer noch eine gewisse Restpenetrationsrate beobachtet worden. Die Wachsextraktion wirkt sich demnach quantitativ auf die Penetration aus. Extrahierte CMs (MXs) bestehen im Wesentlichen aus Cutin. Cutin spielt eine signifikante Rolle bei der Differenzierung verschiedener Pilze auf Pflanzenoberflächen (TSUBA ET AL. 2002). Es ist bekannt, dass neben Cutinmonomeren Alkohole und Fettsäuren von Pilzen erkannt werden und die Appressorienbildung induzieren (WOLOSHUK UND KOLATTUKUDY 1986, EILBERT ET AL. 1999, COLLINS ET AL. 2001). Eventuell wirken die Wachse sich nur auf einen Teil der für die Penetration notwendigen Enzyme aus.

Bei Untersuchungen an Tomatenfrüchten veränderten sich die Appressorien von *Colletotrichum gloeosporioides* durch die Entfernung der Wachse, doch die Penetration wurde nicht quantitativ bestimmt (CRUICKSHANK 1995). Der Autor vermutet, dass durch die Extraktion die Durchlässigkeit der Cuticula von Stoffen aus den Früchten erhöht wird. Die Entfernung der Wachse erhöht die Durchlässigkeit von MXs für Wasser gegenüber CMs um einen Faktor von 200-400 (SCHMIDT ET AL. 1981). Da hier isolierte CMs verwendet wurden, können diffundierte Stoffe aus Blättern keine Rolle spielen, für einen solchen Versuch müssten die Wachse von BS entfernt werden.

Isolierte CMs haben auf ihrer morphologischen Innenseite weniger Cutin und Wachse sondern hauptsächlich Pektinreste der ehemaligen Zellwände und andere eher saure, hydrophile Gruppen (JEFFREE 1996). Möglicherweise wirken die Innenseiten noch weniger induzierend als entwachste Außenseiten, denn von der Innenseite her wurde gar keine Penetration bei *P. communis* beobachtet (Abb. 28 C). Auf den morphologischen Innenseiten der CMs scheinen sämtliche Induktoren für die Penetration zu fehlen. Dies untermauert die Theorie, welche besagt, dass bei *V. inaequalis* die Penetration nicht mechanisch abläuft. YANG UND ELLINGBOE (1972) entdeckten an ihren Untersuchungen der morphologischen Innenseiten von isolierten CMs von Gerste, dass Konidien von *Erysiphe graminis* normal auskeimten, jedoch weniger und veränderte Appressorien ausbildeten. Für eine rein mechanische Penetration reicht die Appressorieninduktion als Voraussetzung (EMMET UND PARBERY 1975). Auf den Innenseiten von *Pyrus*-CMs wurden sogar mehr Appressorien gebildet wie auf den Außenseiten und trotzdem war keine Penetration zu beobachten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Wachse für die Penetration von *V. inaequalis* auf Wirtsoberflächen stimulierend wirken, jedoch im Falle von *S. floribunda* auch eine hemmende Wirkung haben können. Offenbar haben die phenolischen Wachsinhaltstoffe wie Phloridzin, Phloretin,

Quercetin und Quercetrin (TAIZ UND ZEIGER 2000, BAKER 1982) keine hemmende Wirkung auf Konidien von *V. inaequalis*, denn eine Wachsextraktion verringerte die Penetrationsraten.

Dies steht im Widerspruch zu den Versuchen mit Borax, bei denen sorbierte phenolische Stoffe hemmend auf die Penetration gewirkt haben. Die Wachsextraktion wurde mit boraxbehandelten CMs durchgeführt. Möglicherweise sind die konstitutiv im Wachs enthaltenen Phenole in zu geringen Konzentrationen enthalten, um hemmend zu wirken. Es könnte auch sein, dass bei Untersuchungen zum Phenolgehalt in CMs sorbierte Phenole miterfasst wurden, so dass die tatsächlichen konstitutiven Gehalte als noch geringer angesehen werden müssen.

Bei der enzymatischen Isolierung der CMs entstehen phenolische Stoffe, die vermutlich sonst nicht vorkommen (SCHÖNHERR UND RIEDERER 1986). Es wäre sinnvoll gewesen, den Überstand des Mediums auf hemmende Wirkungen gegenüber *V. inaequalis*-Konidien zu untersuchen, die dazu nötigen Versuche wurden jedoch in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

DNA-Isolierung aus Einzelsporisolaten

Es ist bekannt, dass Einzelsporisolate von *V. inaequalis* Apfelsorten gegenüber eine differentielle Virulenz ausprägen. Isolate, die von einer bestimmten Sorte gewonnen wurden, können diese Sorte auch am besten infizieren (SIEROTZKI ET AL. 1994, KOCH ET AL. 2000). In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit zwei Einzelsporisolaten gearbeitet: iso 36 von der Sorte ‚Gloster‘ aus Ruthe und iso 15 von der Sorte ‚Elstar‘ aus Dossenheim. Das Isolat 36 verlor im Laufe der Zeit die Fähigkeit, auf Cellophan Konidien zu produzieren. Isolat 15 wurde regelmäßig auf Apfelpflanzen (‚Holsteiner Cox‘) überimpft und Re-Isolate gewonnen, jedoch nahm auch die Fähigkeit zu infizieren ab. Die anderen Einzelsporisolate wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, *in vitro* Konidien zu produzieren, untersucht. Mit den Konidien der erfolgreichen Isolate (siehe Tab. 5) wurden Tests auf CMs von ‚Gloster‘ durchgeführt. Keines der Isolate hatte bessere Penetrationsraten als iso 15.

Dies muss nicht unbedingt auf einer differentiellen Virulenz begründet sein, sondern kann auch mit der langen Verweildauer der Isolate auf PDA zusammenhängen. *V. inaequalis* verliert seine Virulenz nach zu langer *in vitro*-Kultur (ROBERTS UND CRUTE 1994). Jedoch war das von ‚Elstar‘ gewonnene Isolat 15 in der Lage, ‚Holsteiner Cox‘ zu infizieren und sporulierende Läsionen hervorzurufen.

Aus dem Interesse heraus, die aus verschiedenen deutschen Standorten gewonnen Einzelsporisolate zu vergleichen, wurden RAPD-PCRs mit der aus den Isolaten gewonnenen DNA durchgeführt. Die Zufallsprimer sind zwei Arbeiten entnommen, die sich mit der Populati-

onsdynamik von *V. inaequalis* beschäftigen (SIEROTZKI ET AL. 1994, TENZER UND GESSLER 1999).

Die RAPD-PCR basiert auf einer *low-stringency*-Primerhybridisierung und eignet sich für genomische Fingerabdrücke, wobei die Primer an verschiedenen Stellen im Genom binden, von denen dann Fragmente amplifiziert werden. RAPD-Marker binden an neutralen Loci. Daher kann mit ihnen keine Aussage über Mutationen an Loci, die einem besonderen Mutationsdruck unterliegen getroffen werden. Dafür würde sich z. B. das β -Tubulin Loci von *V. inaequalis* eignen, das dem Selektionsdrucks des Fungizids Benomyl unterliegt (TENZER UND GESSLER 1997).

Nach der PCR mit sieben Primern und 19 Isolaten wurde das Bandenmuster in eine Matrix übertragen und daraus ein Stammbaum erstellt. Keines der Isolate lieferte Bandenmuster, die bei allen verwendeten Primern genau mit denen von einem anderen Isolat übereinstimmen (Abb. 30-32).

Die Isolate, die von gleichen Standorten stammten, lagen im Stammbaum (Abb. 32) überwiegend in Gruppen zusammen. Die erste Gruppe von oben mit den Isolaten 1, 3 und HC₅ umfasst Isolate, die alle von der Sorte ‚Elstar‘ aus Dossenheim stammen. Die beiden Isolate HC₅ und HC₆ stammen von einer Re-Isolation der Sorte ‚Holsteiner Cox‘ die mit einer Mischung der beiden Isolate 15 und 36 infiziert wurde, die von ‚Elstar‘ aus Dossenheim und ‚Gloster‘ aus Ruthe stammen. Die dabei gewonnenen Isolate müssen Klone eines der beiden Isolate sein. Daher hätte sich bei HC₅ und HC₆ entweder das Muster von iso 15 oder iso 36 im Gel wieder finden müssen. Eventuell unterlagen die Isolate Mutationen. In der nächsten großen Gruppe mit den Isolaten 2, 22, HC₆, 38, 5, 17, 41, 7 und 36 stammen die meisten Isolate vom Steinberg (2, 22, 38, 5, 17), bei HC₆ könnte es sich um einen Klon des Isolat 36 handeln, welches in der gleichen Gruppe liegt. Die Versuchsstation Ruthe ist etwa 4 km vom Steinberg lokalisiert. Obwohl Askosporen und Konidien in erster Line durch Regentropfen von infiziertem Material verbreitet werden, kann durch Wind und Blattflug sowie durch den Mensch die Migration des Pilzes erhöht werden (TENZER UND GESSLER, 1997, 1999). Das Isolat 14 mit ungeklärter Herkunft stellt eine eigene Gruppe dar. In der darauf folgenden Gruppe stammen alle Isolate der ersten Untergruppe vom Steinberg (4, 16, 19), das Isolat 15 aus Dossenheim steht für sich ebenso wie Isolat 10, welches allerdings vom Steinberg stammt.

Die in dieser Arbeit gefundenen Polymorphismen sind zwar mit denselben Primern wie in den o. g. Arbeiten (SIEROTZKI ET AL. 1994, TENZER UND GESSLER 1999) gewonnen worden, jedoch amplifizierten diese bei den hier verwendeten Isolaten dazu verschiedenen Banden. Die

Reproduzierbarkeit der RAPD-PCR ist grundsätzlich mit Schwierigkeiten verbunden, denn in verschiedenen Versuchen werden nicht immer ähnliche Primerbindungen erzielt (NICHOLL 2002). Für genauere Untersuchungen von Populationen wären sicherlich Microsatelliten die bessere Wahl (TENZER ET AL. 1999).

Jedoch zeigen die hier gefundenen Ergebnisse, dass Isolate gleicher geographischer Herkünfte im Stammbaum Gruppen bilden.

4 Zusammenfassung

Venturia inaequalis Cke. Wint. ist der Erreger des Apfelschorfs, der weltweit bedeutendsten Krankheit des Apfels (*Malus x domestica* Borkh.). Aufgrund von Resistenzentwicklungen des Pilzes gegen bestehende Fungizide und der Überwindung eingekreuzter Resistenzgene müssen weiterhin neue Wirkstoffe gegen *V. inaequalis* entwickelt und getestet werden. Laborversuche dienen der Erprobung von Wirkstoffen vor deren Feldeinsatz. In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges *in vitro*-Testsystem für Konidien von *V. inaequalis* entwickelt. Das System basiert auf isolierten Cuticularmembranen (CMs). Die CMs vereinen die Vorteile von *in vitro*- mit denen von *in vivo*-Tests.

Anhand des hier entwickelten Testsystems konnte die Konidienkeimung, Appressorienbildung, Penetration und Stromaentwicklung, bzw. Ausbildung des subcuticulären Myzels von *V. inaequalis*-Konidien auf CMs differenziert bonitiert werden. Ein Vitalfarbstoff diente zur Detektion des Myzels in den CMs. Der Vorteil des Systems auf Basis von CMs gegenüber bestehenden Systemen basierend auf Agar oder künstlichen Oberflächen wie Glas und Cellophan, beruhte auf der Entwicklung eines Stromas. Auf künstlichen Oberflächen bildet der Pilz kein Stroma aus. Die Stromaentwicklung *in vivo* ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion.

Die Hemmwirkungen verschiedener potentiell fungizider Substanzen wie Calciumhydroxid, Kaliumcarbonat, Alkylpolyglukosiden Tensiden, Resveratrol und Piceid sowie von Saccharoseoctanoat auf unterschiedliche Stadien der Pathogenese von *V. inaequalis* wurden untersucht. Die Applikation der Stoffe erfolgte sowohl simultan als auch protektiv. Mit den genannten Stoffen konnten konzentrationsabhängige Effekte auf die Keimung, Appressorienbildung, Penetration und Stromaentwicklung von *V. inaequalis* nachgewiesen werden.

In einem molekularbiologischen Ansatz wurden verschiedene Isolate von *V. inaequalis* verglichen und ein Stammbaum aufgestellt. Zudem wurde der Einfluss von cuticulären Wachsen auf die Keimung, Appressorienbildung und Penetration von Konidien auf CMs untersucht. Die Extraktion der Wachse beeinflusste die Keimung, Appressorienbildung und Penetration meist negativ. Um zu ermitteln, ob die *in vitro* gefundenen Ergebnisse denen *in vivo* entsprechen, wurden Vergleiche mit Blattscheiben angestellt. Die Keimung der Konidien, ihre Penetrationsrate und die Morphologie des subcuticulären Stromas waren vergleichbar auf CMs und auf Blattscheiben. Dies bewies, dass die *in vitro* gefundenen Ergebnisse den tatsächlichen Gegebenheiten *in vivo* entsprechen.

5 Literatur

- ADRIAN M, JEANDET P, VENEAU J, WESTON LA, BESSIS R (1997)** Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for grey mold. *Journal of Chemical Ecology* 23: 1689-1702
- ALI GS, HARMAN GE, REISCH BI (2003)** The interaction of endochitinase, a synthetic peptide and resveratrol in controlling fungi *In vitro*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 639-644
- APOGA D, JANSSON H-B (2000)** Visualization and characterization of the extracellular matrix of *Bipolaris sorokiniana*. *Mycological Research* 104: 564-575
- AYLOR DE, SANOGO S (1997)** Germinability of *Venturia inaequalis* conidia exposed to sunlight. *Phytopathology* 87: 628-633
- Bais, AJ, Murphy PJ, Dry IB (2000)** The molecular regulation of stilbene Phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 425-433
- BECHINGER C, GIEBEL KF, SCHNELL M, LEIDERER P, DEISING HB, BASTMEYER M (1999)** Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285: 1896-1899
- BAKER CJ, BATEMAN DF (1978)** Cutin degradation by Plant Pathogenic Fungi. *Phytopathology* 68: 1577-1584
- BAKER EA (1982)** Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. pp. 139-165 in: *The Plant Cuticle*. CUTLER DF, ALVIN KL, PRICE CE (Eds.) Academic Press, London
- BASHAN Y, OKON Y, HENIS Y (1985)** Detection of Cutinases and Pectic Enzymes During Infection of Tomato by *Pseudomonas syringae* f. sp. *Tomato*. *Phytopathology* 75: 940-945
- BAUR P (1993)** Barriereigenschaften pflanzlicher Cuticularmembranen und ihre Beeinflussung durch organische Xenobiotika. Diss. T. U. München
- BECKER CM, BURR TJ (1994)** Discontinuous wetting and survival of conidia of *Venturia inaequalis* on apple leaves. *Phytopathology* 84: 372-378
- BENAOUF C, PARISI L (1998)** Characterization of *Venturia inaequalis* pathogenicity on leaf discs of apple trees. *European Journal of Plant Pathology* 104: 785-793

- BERESFORD RM, WEARING CH, WALKER JTS, SPINK M, MARSHALL RR, WHITE V (1995)** Copper and slaked lime for the control of black spot and powdery mildew in apples. pp. 83-88 in: Proceedings of the 48th New Zealand Plant Protection Conference, The New Zealand Plant Protection Society Inc.
- BOONE DM (1971)** Genetics of *Venturia inaequalis*. Annual Review of Phytopathology 9: 297-318
- BUCHHOLZ A, BAUR P, SCHÖNHERR J (1998)** Differences among plant species in cuticular permeabilities and solute mobilities are not caused by different size selectivities. Planta 206: 322-328
- BURR TJ, MATTESON MC, SMITH CA, CORRAL-GARCIA MR, HUANG TC (1996)** Effectiveness of bacteria and yeast from apple orchards as biological control agents of apple scab. Biological Control 6: 151-157
- CANTOS E, TOMÁS-BARBERÁN FA, MARTÍNEZ A, ESPÍN JC (2003)** Differential stilbene induction susceptibility of seven red wine grape varieties upon post-harvest UV-C irradiation. European Food Research Technology 217: 253-258
- CARVER TLW, INGERSON SM (1987)** Responses of *Erysiphe graminis* germings to contact with artificial and host surfaces. Physiological and Molecular Plant Pathology 30: 359-372
- CARVER TLW, INGERSON SM, THOMAS BJ (1996)** Influences of host surface features on development of *Erysiphe graminis* and *Erysiphe pisi*. pp 255-266 in: Plant Cuticles. An integrated functional approach. KERSTIENS G (Ed.). BIOS Scientific Publishers Limited
- CARISSE O, BERNIER J (2002)** Effect of environmental factors on growth, pycnidial production and spore germination of *Microsphaeropsis* isolates with biocontrol potential against apple scab. Mycological Research 106: 1455-1462
- CARISSE O, DEWDNEY M (2002)** A review of non-fungicidal approaches for the control of apple scab. Phytoprotection 83: 1-29
- CARZANIGA R, BOWYER P, O'CONNELL RJ (2001)** Production of extracellular matrices during development of infection structures by the downy mildew *Peronospora parasitica*. New Phytologist 149: 83-93

- CHAKY J, ANDERSON K, MOSS M, VAILLANTCOURT L (2001)** Surface Hydrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore Germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 91: 558-564
- CHENG FS, WEEDEN NF, BROWN SK, ALDWINCKLE HS, GARDINER SE, BUS VG (1998)** Development of a DNA marker for *Vm*, a gene conferring resistance to apple scab. *Genome* 41: 208-214
- CHEVALIER M, LESPINASSE Y, RENAUDIN S (1991)** A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology* 40: 249-256
- CHORTYK OT, POMONIS JG, JOHNSON AW (1996)** Synthesis and Characterizations of Insecticidal Sucrose Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1551-1557
- COLLINGE AJ, MARKHAM P (1985)** Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae. *Experimental Mycology* 9: 80-85
- COLLINS TJ, MOERSCHBACHER BM, READ ND (2001)** Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 259-266
- CONNER PJ (2002)** A Detached Leaf Technique for Studying Race-specific Resistance to *Cladosporium caryigenum* in Pecan. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 781-785
- CORLETT M, CHONG J (1977)** Ultrastructure of the appressorium of *Spilocaea pomi*. *Canadian Journal of Botany* 55: 5-7
- COX PW, THOMAS CR (1999)** Mag fura staining of fungi. *Biotechnology Techniques* 13: 719-722
- CRUICKSHANK RH (1995)** The influences of epicuticular wax disruption and cutinase resistance on penetration of tomatoes by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Phytopathology* 143: 519-524
- DEAN RA (1997)** Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 35: 211-234
- DICKMAN MB, PATIL SS (1986)** A rapid and sensitive plate assay for the detection of cutinase produced by plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 76: 473-475

- DOSS RP, DEISENHOFER J, KRUG von NIDDA H-A, SOELDNER AH, McGUIRE RP (2003)** Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63: 687-691
- EILBERT F, THINES E, STERNER O, HEIDRUN A (1999)** Fatty Acids and their Derivates as Modulators of Appressorium Formation in *Magnaporthe grisea*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65: 879-883
- EMMET RW, PARBERY DG (1975)** Appressoria. *Annual Review of Phytopathology* 13: 147-167
- van den ENDE G, LINSKENS HF (1974)** Cutinolytic enzymes in relation to pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 12: 247-358
- EPSTEIN L, NICHOLSON RN (1997)** Adhesion of Spores and hyphae to plant surfaces. pp. 11-25 in *The Mycota. V. Plant Relationships*, CARROLL GC, TUDZYNSKI P (Eds.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- FICKE A, GADOURY DM, SEEM RC, GODFREY D, DRY IB (2004)** Host Barriers and Responses to *Uncinula nectator* in Developing Grape berries. *Phytopathology* 94: 438-445
- FILONOW AB (2003)** Germination and adhesion of fungal conidia on polycarbonate membranes and on apple fruit exposed to mycoactive acetate esters. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 130-138
- FISCHER C, BÜTTNER R, FISCHER M (1998)** Testing of the scab resistance stability of new resistant cultivars. *Erwerbsobstbau* 40: 130-135
- FISCHER M, Fischer C (2002)** The Dresden-Pillnitz Long-term Apple Breeding Program and Its Results. *The Compact Fruit Tree*, 35: 21-25
- FISS M (2001)** Evaluierung von epiphytischen Antagonisten zur biologischen Kontrolle des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis*. Dissertation Universität Hannover
- FRANCIS SA, DEWEY FM, GURR SJ (1996)** The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 201-211
- GARST R (1996)** Alkyl polyglycosides – new solutions for agricultural applications. pp. 131-137 in: *Alkyl Polyglycosides. Technology Properties and Applications*. HILL K, VON

- RYBINSKI W und STOLL G (Eds.). VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- GESSLER C, STUMM D (1984)** Infection and Stroma Formation by *Venturia inaequalis* on Apple Leaves with Different Degrees of Susceptibility to Scab. *Phytopathologische Zeitschrift* 110: 119-126
- GEVENS A, NICHOLSON RL (2000)** In This Issue: „Cutin Composition: A Subtle Role For Fungal Cutinase?“ *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 43-45
- GOLBA B (2002)** Alternativen zum Einsatz kupferhaltiger Präparate im Apfelanbau. Ergebnisse einer Literaturrecherche. *Berichte der Biologischen Bundesanstalt* 109: 67 pp.
- GONZALES UREÑA A, OREA JM, MONTERO C, JIMÉNEZ JB (2003)** Improving postharvest resistance in fruits by external application of trans-resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 82-89
- GRIJSEELS AJ, WILLIAMS EB, KUĆ J (1964)** Hypersensitive response in selections of *Malus* to fungi nonpathogenic to apple. *Phytopathology* 54: 1152-1154
- HAMEL C, Fyles H, Smith DL (1990)** Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using three different vital stains. *New Phytologist* 115: 297-203
- HARTMAN JR, PARISI L, BAUTRAIS P (1999)** Effect of leaf wetness duration, temperature, and conidial inoculum dose on apple scab infections. *Plant Disease* 83: 531-534
- HAUKE V, SCHREIBER L (1998)** Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix* L.) sun and shade leaves. *Planta* 207: 67-75
- HEATH MC, PERUMALLA CJ (1987)** Haustorial mother cell development by *Uromyces vignae* on collodion membranes. *Canadian Journal of Botany* 66: 736-741
- HEATH MC (2002)** Cellular interactions between biotrophic fungal pathogens and host or nonhost plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24: 259-264
- HEDGE Y, KOLATTUKUDY PE (1997)** Cuticular waxes relieve self-inhibition of germination and Appressorium formation by the conidia of *Magnaporthe grisea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51: 75-84
- HIPSKIND JD, PAIVA NL (2000)** Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 551-562

- HOFFMANN GM, NIEHAUS F, POEHLING H-M, SCHÖNBECK F, WELTZIEN HC, WILBERT H (1994)** Lehrbuch der Phytomedizin. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
- HOLLOWAY PJ (1982)** Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. pp. 1-32 in: The Plant Cuticle. CUTLER DF, ALVIN KL, PRICE CE (Eds.). Academic Press, London
- HOLOWCZAK J, KUĆ J, WILLIAMS EB (1962)** Metabolism *In Vitro* of Phloridzin and Other Compounds by *Venturia inaequalis*. Phytopathology 52: 1019-1023
- HOWARD RJ (1997)** Breaching the outer barriers – cuticle and cell wall penetration. pp. 43-60 in: The Mycota V Part A. Plant Relationships. CARROLL GC, TUDZYNSKI P (Eds.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- HOWDEN R, KI PARK, S, MOORE JM, ORME J, GROSSNIKLAUS U, TWELL D (1998)** Selection of T-DNA-Tagged Male and Female Gametophytic Mutants by Segregation Distortion in Arabidopsis. Genetics 149: 621-631
- HUANG Q, KUĆ J (1995)** Cutin, cutinase and esterase as related to the induced systemic resistance of cucumber against *Colletotrichum lagenarium*. Physiological and Molecular Plant Pathology 46: 215-226
- HUTCHINSON KA, GREEN JR, WHARTON PS, O'CONNELL RJ (2002)** Identification and localisation of glycoproteins in the extracellular matrices around germ-tubes and appressoria of *Colletotrichum* species. Mycological Research 106: 729-736
- JEANDET P, DOUILLET-BREUIL AC, BESSIS R, DEBORD S, SBAGHI M, ADRIAN M (2002)** Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 2731-2741
- JEFFREE CE (1996)** Structure and ontogeny of plant cuticles. pp. 33-75 in: Plant Cuticles. An integrated functional approach. KERSTIENS G (Ed.). BIOS Scientific Publishers Limited
- JELITTO TC, PAGE HA, READ ND (1994)** Role of external signals in regulating the pre-penetration phase of infection by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Planta 194: 471-477

- JENKS MA (2002)** Critical issues with the plant cuticle's function in drought tolerance. pp. 97-127 in: *Biochemical & Molecular Responses of Plants to the Environment*. WOOD AJ (ed.) Research Signpost, Kerala, Indien
- JONES PCT, MOLLISON, JE (1948)** A Technique for the Quantitative Estimation of Soil Microorganisms. *Journal of General Microbiology* 2: 54-68
- KEITT GW, JONES IK (1926)** Studies of the epidemiology and control of apple scab. Wisconsin College of Agriculture and Life Sciences Research Bulletin 73
- KIM Y-K, WANG Y, LIU Z-M, KOLATTUKUDY PE (2002)** Identification of a hard surface contact-induced gene in *Colletotrichum gloesporioides* conidia as a sterol glycosyl transferase, a novel fungal virulence factor. *The Plant Journal* 30: 177-187
- KOBAYASHI S, DING CK, NAKAMURA Y, NAKAJIMA I, MATSUMOTO R (2000)** Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis stilbene* synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). *Plant Cell Reports* 19: 904-910
- KOCH T, KELLERHALS M, GESSLER C (2000)** Virulence Pattern of *Venturia inaequalis* Field isolates and Corresponding Differential Resistance in *Malus x domestica*. *Journal of Phytopathology* 148: 357-364
- KOENRAADT H, JONES AL (1992)** The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 82: 1352-1358
- KÖLLER W, ALLAN CR, KOLATTUKUDY PE (1982)** Inhibition of Cutinase and Prevention of Fungal Penetration into Plants by Benomyl- A Possible Protective Mode of Action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 18: 15-25
- KÖLLER W, PARKER DM, BECKER CM (1991)** Role of cutinase in the penetration of apple leaves by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 81: 1375-1379
- KÖLLER W, YAO C, TRIAL F, PARKER D (1995)** Role of cutinase in the invasion of plants. *Canadian Journal of Botany* 73: 1109-1118
- KOLLAR A (1994B)** Characterization of specific induction, activity, and isozyme polymorphism of extracellular cellulases from *Venturia inaequalis* detected *in vitro* and on the host plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 603-611
- KOLLAR A (1996)** Evidence for loss of ontogenetic resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathology* 102: 773-778

- KOLLAR A (1998A)** A simple method to forecast the ascospore discharge of *Venturia inaequalis*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105: 489-495
- KOLLAR A (1998B)** Characterization of an endopolygalacturonase produced by the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*. *Mycological Research* 102: 313-319
- KRISTEN U, HOPPE U, PAPE W (1993)** The pollen tube growth test: A new alternative to the Draize eye irritation assay. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 44: 153-162
- KULA C (1999)** Auswirkungen von Kupfer auf die terrestrische Flora und Fauna. *Berichte der Biologischen Bundesanstalt. Pflanzenschutz im ökologischen Landbau-Probleme und Lösungsansätze*. 53: 38-43
- KÜNG FÄRBER RB, MIN CHIN K, LEADBITTER N (2002)** Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. *Pest Management Science* 58: 261-267
- KUNZ S, DEISING H, MENDGEN K (1997)** Acquisition of resistance to Sterol Demethylation Inhibitors by Populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 87: 1271-1278
- LI B, Xu X (2002)** Infection and Development of apple Scab (*Venturia inaequalis*) on Old Leaves. *Journal of Phytopathology* 150: 687-691
- LILLIE RD, STOTZ EH, EMMEL VM (1990)** H. J. Conn's Biological stains. Neunte Ausgabe. Sigma Chemical Company
- LYNGS JØRGENSEN HJ, De NEERGAARD E, SMEDEGAARD-PETERSEN V (1993)** Histological examination of the interaction between *Rhynchosporium secalis* and susceptible and resistant cultivars of barley. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 345-358
- MACHARDY WE (1996)** Apple Scab. Biology, Epidemiology, and Management. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota
- MAITI IB, KOLATTUKUDY PE (1979)** Prevention of fungal infection of plants by specific inhibition of cutinase. *Science* 205: 507-508
- MAYR U, MICHALEK S, TREUTTER D, FEUCHT W (1997)** Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. *Journal of Phytopathology* 145: 69-75
- MCCORMACK P, WILDMAN HG, JEFFRIES P (1995)** The influence of moisture on the suppression of *Pseudomonas syringae* by *Aureobasidium pullulans* on an artificial leaf surface. *FEMS Microbiology Ecology* 16: 159-166
- MCDONALD BA, LINDE C (2002)** The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124: 163-180

- MENDGEN K, DEISING H (1993)** Tansley Review No. 48. Infection structures of fungal plant pathogens- a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist* 124: 193-213
- MERZ U, MARTINEZ V, SCHWÄRZEL R (2004)** The potential for the rapid screening of potato cultivars (*Solanum tuberosum*) for resistance to powdery scab (*Spongospora subterranea*) using a laboratory bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 110: 71-77
- MICHALEK S, MAYR U, TREUTTER D, LUX-ENDRICH A, GUTMANN M, FEUCHT W, GEIBEL M (1999)** Role of flavan-3-ols in resistance of apple trees to *Venturia inaequalis*. *Acta Horticulturae* 484: 535-539
- MILLS WD, LAPLANTE AA (1951)** Diseases and Insects in the Orchard. Cornell Extension Bulletins 711
- MONEY NP (1998)** Mechanics of invasive fungal growth and the significance of turgor in plant infection. pp. 261-271 in: *Molecular genetics of host-specific toxins in plant diseases*. KOHMOTO K, YODER OC (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande
- MONEY NP (1999)** Fungus punches its way in. *Nature* 401: 332-333
- MONTAG J, GRIMM-WETZEL P, SCHÖNHERR J (2004)** Kurative Anwendung von Alkylpolyglukosiden, Calciumhydroxid, Kaliumcarbonat und Schwefelkalk zur Bekämpfung des Apfelschorfs (*Venturia inaequalis*) im ökologischen Obstbau- vergleichende Untersuchungen mit Hilfe eines *in vitro*-Testsystems. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 396:497
- MONTERO C, CRISTESCU SM, JIMÉNEZ JB, OREA JM, te LINTEL HEKKERT S, HARREN FJM, GONZÁLES-UREÑA A (2003)** Trans-resveratrol and grape disease resistance. A dynamical study by high-resolution laser-based techniques. *Plant Physiology* 131: 129-138
- MOOSHERR W, KENNEL W (1995)** Zu einer superfiziellen Form von Apfelschorf an Apfeltrieben. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 102: 171-183
- MÜLLER M, GESSLER C (1993)** A protein from apple leaves inhibits pectinolytic activity of *Venturia inaequalis in vitro*. pp. 68-71 in: *Mechanisms of Plant Defence Responses*. FRITIG B, LEGRANDS M (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande
- MÜLLER MT, ZEHNDER AJB, ESCHER BI (1999)** Membrane toxicity of linear alcohol ethoxylates. *Environmental and Toxicological Chemistry* 18: 2767-2774

- NICHOLL ST (2002)** Gentechnische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
- NICHOLSON RL, KUĆ J, WILLIAMS EB (1972)** Histochemical Demonstration of Transitory Esterase Acitivity in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 62: 1242-1247
- NICHOLSON RL, VAN SCOYOC S, KUĆ J, WILLIAMS EB (1973A)** Response of Detached Apple Leaves to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 63: 349-350
- NICHOLSON RL, VAN SCOYOC S, WILLIAMS EB, KUĆ J (1973B)** Etiolated apple hypocotyls: a useful host tissue in apple scab research. *Phytopathology* 63: 363-366
- NICHOLSON RL, Van SCOYOC S, WILLIAMS EB, KUĆ J (1977)** Host-pathogen interactions preceding the hypersensitive reaction of *Malus* sp. to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 67: 108-114
- NUSBAUM CJ, KEITT GW (1938)** A cytological study of *Venturia inaequalis* on apple leaves. *Journal of Agricultural Research* 56: 595-618
- OLAYA G, KÖLLER W (1999)** Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. *Pesticide Science* 55: 1083-1088
- ORTEGA F, STEINER U, DEHNE H-W (1998)** Induced resistance to apple scab: Microscopic studies on the infection cycle of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Journal of Phytopathology* 146: 399-405
- OUMET A, CARISSE O, NEUMANN P (1997)** Environmental and nutritional factors affecting the *in vitro* inhibition of the vegetative growth of *Venturia inaequalis* by five antagonistic fungi. *Canadian Journal of Botany* 75: 632-639
- PALMER JW, DAVIES SB, SHAW PW, WÜNSCHE JN (2003)** Growth and fruit quality of 'Braeburn' apple (*Malus domestica*) trees as influenced by fungicide programmes suitable for organic production. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 31: 169-177
- PARK P, ISHII H, ADACHI Y, KANEMATSU S, IEKI H, UMEMOTO S (2000)** Infection Behaviour of *Venturia nashicola*, the Cause of Scab on Asian Pears. *Phytopathology* 90: 1209-1216
- PARKER DM, HILBER UW, BODMER M, SMITH FD, YAO C, KÖLLER W (1995)** Production and transformation of conidia of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 85: 87-91

- PAUL V (1981)** Zur Biologie von *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, dem Erreger des Apfelschorfes. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 34: 60-74
- PHILION V, CARISSE O, PAULITZ T (1997)** *In vitro* evaluation of fungal isolates for their ability to influence leaf rheology, production of pseudothecia, and asospores of *V. inaequalis*. European Journal of Plant Pathology 103: 441-452
- PICINELLI A, DAPENA E, MANGAS JJ (1995)** Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance. A preliminary study. Journal of Agricultural Food Chemistry 43: 2273-2278
- PODIAL GK, ROGERS LM, KOLATTUKUDY PE (1993)** Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and Appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Physiology 103: 267-272
- PREECE TF (1962)**. Removal of apple leaf cuticle by pectinase to reveal the mycelium of *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.. Nature 193: 902-903
- PURDY RE, KOLATTUKUDY PE (1975)** Hydrolysis of Plant Cuticle by Plant Pathogens. Properties of Cutinase I, Cutinase II, and a Nonspecific esterase Isolated from *Fusarium solani pisi*. Biochemistry 14: 2832-2840
- PUTERKA GJ, FARONE W, PALMER T, BARRINGTON A (2003)** Structure-Function Relationships Affecting the Insecticidal and Miticidal Activity of Sugar Esters. Journal of Economic Entomology 96: 636-644
- PUTTOO BL, CHAUDHARY KCB (1988)** A muslin wick culture technique for mass production of conidia of *Venturia inaequalis*. Journal of Phytopathology 121: 373-375
- RAW F (1962)** Studies of earthworm populations in orchards. I. Leaf burial in apple orchards. Annals of Applied Biology 50: 389-404
- RIEDERER M, SCHÖNHERR J (1984)** Accumulation and transport of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in plant cuticles: I. Sorption in the cuticular membrane and its components. Ecotoxicology and Environmental Safety 8: 236-247
- RIEDERER M, SCHÖNHERR J (1986)** Thermodynamic analysis of nonelectrolyte sorption in plant cuticles: The effects of concentration and temperature on sorption of 4-nitrophenol. Planta 169: 69-80

- RIEDERER M, SCHREIBER L (1995)** Waxes: the transport barriers of plant cuticles. pp.131-156 in: Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions. HAMILTON RJ (Ed.). The Oily Press, Dundee
- ROBERTS AL, CRUTE IR (1994)**. Improved procedures for the *in vivo* and *in vitro* production of conidial inoculum of *Venturia* species of pome fruit. *Annals of Applied Biology* 125: 607-613
- ROTMAN B, PAPERMASTER BW (1966)** Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55: 134-141
- RÜHMANN S, LESER C, BANNERT M, TREUTTER D (2002)** Relationship between Growth, Secondary Metabolism, and Resistance of Apple. *Plant Biology* 4: 137-143
- SCHLEGEL HG (1992)** Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- SCHMIDT HW, MÉRIDA T, SCHÖNHERR J (1981)** Water Permeability and Fine Structure of Cuticular Membranes Isolated Enzymatically From leaves of *Clivia miniata* Reg. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 105: 41-51
- SCHMIDT HW, SCHÖNHERR J (1982)** Development of plant cuticles: occurrence and role of non-ester bonds in cutin of *Clivia miniata* reg. leaves. *Planta* 156: 380-384
- SCHNABEL G, PARISI L (1997)** Sensitivity of *Venturia inaequalis* to five DMI fungicides, including the new triazole fluquinconazole, and to pyrimethanil. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 104: 36-46
- SCHNABEL G, JONES AL (2001)** The 14 α -Demethylase (CYP51A1) gene is Overexpressed in *Venturia inaequalis* Strains Resistant to Myclobutanil. *Phytopathology* 91: 102-110
- SCHÖNHERR J, LUBER M (2001)** Cuticular penetration of potassium salts: effects of humidity, anions, and temperature. *Plant and Soil* 236: 117-122
- SCHÖNHERR J, RIEDERER M (1986)** Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. *Plant Cell and Environment* 9: 459-466
- SCHÖNHERR J, RIEDERER M (1989)** Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 108: 1-70

- SCHÖNHERR J, BAUR P (1994)** Modelling Penetration of Plant Cuticles by Crop Protection Agents and Effects of Adjuvants on their Rates of Penetration. *Pesticide Science* 42: 185-208
- SCHREIBER L, KIRSCH T, RIEDERER M (1996)** Diffusion through cuticles: principles and models. pp. 109-118 in: *Plant Cuticles*. KERSTIENS G (Ed.). BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford
- SCHULZE K, SCHÖNHERR J (2003)** Calcium hydroxide, potassium carbonate and alkyl polyglycosides prevent spore germination and kill germ tubes of apple scab (*Venturia inaequalis*). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 110: 36-45
- SCHULZE K, SCHREIBER L, SZANKOWSKI I (2004)** Inhibiting Effects of Resveratrol and its Glukosid Piceid against *Venturia inaequalis*, the Causal Agent of Apple Scab. *Im Druck*
- SCHWABE WFS, JONES AL, JONKER JP (1984)** Changes in the susceptibility of developing apple fruit to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 74: 118-121
- SEBASTIAN J, CHANDRA AK, KOLATTUKUDY PE (1987)** Discovery of a Cutinase-Producing *Pseudomonas* sp. Cohabiting with an Apparently Nitrogen-Fixing *Corynebacterium* sp. in the Phyllosphere. *Journal of Bacteriology* 169: 131-136
- SEPPÄNEN SK, SYRJÄLÄ L, von WEISSENBERG K, TEERI TH, PAAJANEN L, PAPPINEN A (2004)** Antifungal activity of stilbenes in *in vitro* bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding pinosylvin synthase. *Plant Cell Reports* 22: 584-593
- SHAW BD, HOCH HC (1999)** The pycnidiospore of *Phyllosticta ampellicida*: surface properties involved in substratum attachment and germination. *Mycological Research* 103: 915-924
- SHAY JR, HOUGH LF (1951)** Evaluation of apple scab resistance in selections of *Malus*. *American Journal of Botany* 39: 288-297
- SHEPPARD WS, GARDNER M, HASHER S, KAHKONEN B, MEIXNER MD, STRANGE JP (2003)** Use of Sucrose Octanoate Esters to Control the Parasitic Honey Bee Mite *Varroa destructor*. *American Bee Journal* 143: 982-985
- SIEBELS C, MENDGEN K (1994)** A microscopic evaluation of the sensitivity of *V. inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Mycological Research* 98: 619-624

- SIEROTZKI H, GESSLER C (1993)** Flavan-3-ol content and the resistance of *Malus x domestica* to *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 291-297
- SIEROTZKI H, EGGENSCHWILER M, BOILLAT O, McDERMOTT JM, GESSLER C (1994)** Detection of variation in virulence toward susceptible apple cultivars in natural populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 84: 1105-1109
- SILBEREISEN R, GÖTZ G, HARTMANN W (1996)** *Obstsortenatlas*. Ulmer, Stuttgart
- SLAVIC J (1994)** *Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology*. CRC Press, Boca Raton, USA
- SMEREKA KJ, MACHARDY WE, KAUSCH AP (1987)** Cellular differentiation in *Venturia inaequalis* ascospores during germination and penetration of apple leaves. *Canadian Journal of Botany* 65: 2549-2561
- SOTHEESWARAN S, PASUPATHY S (1993)** Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry* 32: 1083-1092.
- STADELMANN FX, SCHWINN FJ (1982)** Beitrag zur Biologie von *Venturia inaequalis* und *Venturia pirina*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 89: 96-109
- STEBER J, GUHL W, STELTER N, SCHRÖDER R (1996)** Ecotoxicological evaluation of alkyl polyglycosides. pp. In: *Alkyl Polyglycosides, Technology, Properties and Applications*. HILL K, VON RYBINSKI W, STOLL G (Eds.). VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- STEINFELD U, SIEROTZKI H, PARISI S, POIREY S, GISI U (2001)** Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pest Management Science* 57: 787-796
- STOCKWELL V, HANCHEY P (1983)** The Role of The Cuticle in Resistance of Beans to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 74: 1640-1642
- SZANKOWSKI I, BRIVIBA K, FLESCHHUT J, SCHÖNHERR J, JACOBSEN HJ, KIESECKER H (2003)** Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*) *Plant Cell Reports* 22: 141-149
- TAIZ L, ZEIGER E (2000)** *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg-Berlin

- TARTARINI S, GIANFRANCESCHI I, SANSAVINI S, GESSLER C (1999)** Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breeding* 118: 183-186
- TENZER I, GESSLER C (1997)** Subdivision and genetic structure of four populations of *Venturia inaequalis* in Switzerland. *European Journal of Plant Pathology* 103: 565-571
- TENZER I, GESSLER C (1999)** Genetic diversity of *Venturia inaequalis* across Europe. *European Journal of Plant Pathology* 105: 545-552
- TENZER I, IVANISSEVICH S, MORGANTE M, GESSLER C (1999)** Identification of Microsatellite Markers and Their Application to Population Genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 89: 748-753
- TRAIL F, KÖLLER W (1990)** Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 495-508
- TREUTTER D, FEUCHT W (1990)** The pattern of flavan-3-ols in relation to scab resistance of apple cultivars. *Journal of Horticultural Science* 65: 511-517
- TREUTTER D (2001)** Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation* 34:71-89
- TSUBA M, KATAGIRI C, TAKEUCHI Y, TAKADA Y, YAMAMOKA Y (2002)** Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 51-57
- TUCKER SL, TALBOT NJ (2001)** Surface Attachment and Pre-Penetration Stage development by Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39: 385-417
- TURNER ML, MACHARDY WE, GADOURY DM (1986)** Germination and appressorium formation by *Venturia inaequalis* during infection of apple seedling leaves. *Plant Disease* 70: 658-661
- UCHIYAMA T, OGASAWARA N, NANBA Y, ITÔ H (1979)** Conidial Germination and Appressorial Formation of the Plant Pathogenic Fungi on the Coverglass or Cellophane coated with various lipid Components of Plant Leaf Waxes. *Agricultural and Biological Chemistry* 43: 383-384
- UHLIG B, AH WISSEMEIER (2000)** Reduction of non-ionic surfactant toxicity by divalent cations. *Crop Protection* 19: 13-19

- USENIK V, MIKULIČ-PETKOVŠEK M, SOLAR A, ŠTAMPAR F (2004)** Flavonols of leaves in relation to apple scab resistance. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 111: 137-144
- VALSANGIACOMO C, GESSLER C (1988)** Role of the cuticular membrane in ontogenetic and Vf-resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 78: 1066-1069
- VALSANGIACOMO C, RUCKSTUHL M, GESSLER C (1992)** *In vitro* degradation of cell walls of apple leaves by pectinolytic enzymes of the scab fungus, *Venturia inaequalis*, and by commercial pectinolytic and cellulolytic enzyme preparations. *Journal of Phytopathology* 135: 20-27
- VILLENA JF, DOMINGUEZ E, STEWART D, HEREDIA A (1999)** Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles. *Planta* 208: 181-187
- WAGNER K, HITZ-GERMANN L, SENG JM, GESSLER C (1988)** Cellulolytic Ability of the Scab Fungus, *Venturia inaequalis*. *Journal of Phytopathology* 123: 217-221
- WANG C, CHIN CK, GIANFAGNA T (2000)** Relationship between cutin monomers and tomato resistance to powdery mildew infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 55-61
- WASHINGTON WS, VILLALTA O, APPELBY M (1998)** Control of pear scab with hydrated lime alone or in schedules with other fungicide sprays. *Crop Protection* 17, 569-580
- WATANABE K, PARBERY DG, KOBAYASHI T, DOI Y (2000)** Conidial adhesion and germination of *Pestalotiopsis neglecta*. *Mycological Research* 104: 962-968
- WESSELS JGH (1993)** Tansley Review No. 45. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytologist* 123: 397-413
- WILLIAMS EB, KUĆ J (1969)** Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Annual Review of Phytopathology* 7: 223-246
- WILLIAMS JS, COOPER RM (2004)** The oldest fungicide and newest phytoalexin- a reappraisal of the fungitoxicity of elemental sulphur. *Plant Pathology* 53: 263-279
- WINTER F, JANSSEN H, KENNEL W, LINK H, SCHERR F, SILBEREISEN R, STREIF J (1992)** Lucas' Anleitung zum Obstbau. Ulmer Verlag, Stuttgart
- WOLOSHUK CP, KOLATTUKUDY PE (1986)** Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. Proceed-

ings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83: 1704-1708

WRIGHT AJ, THOMAS BJ, KUNOH H., NICHOLSON RL, CARVER TLW (2002a) Influences of substrata and interface geometry on the release of extracellular material by *Blumeria graminis* conidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 163-178

WRIGHT AJ, THOMAS BJ, CARVER TLW (2002b) Early adhesion of *Blumeria graminis* to plant and artificial surfaces demonstrated by centrifugation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 217-226

XIAO J-Z, WATANBE T, KAMAKURA T, OHSHIMA A, YAMAGUCHI I (1994) Studies on cellular differentiation of *Magnaporthe grisea*. Physiochemical aspects of substratum surfaces in relation to appressorium formation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44:227-236

YANG SL, ELLINGBOE AH (1972) Cuticle layer as a determining factor for the formation of mature appressoria of *Erysiphe graminis* on wheat and barley. *Phytopathology* 62: 708-714

YEPES LM, ALDWINCKLE HS (1993) Pathogenesis of *Venturia inaequalis* on shoot-tip cultures and on greenhouse-grown apple cultivars. *Phytopathology* 83: 1155-1162

Danksagung

Diese Seiten möchte ich nutzen, um all denjenigen meinen Dank auszusprechen, die direkt oder indirekt das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Lukas Schreiber für die Überlassung des Themas, die sehr gute Betreuung und stete Gesprächsbereitschaft danken.

Prof. Dr. Jörg Schönherr gilt mein Dank für die Übernahme des Korreferates, seine Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit und seine stete Hilfs- und Gesprächsbereitschaft.

Dr. Andreas Kollar gilt mein besonderer Dank für seine Hilfe bei den Inkulturnahmen von *Venturia* und seiner kompetenten Beratung während meiner Untersuchungen.

Herrn Hans-Jürgen Ensikat möchte ich ganz herzlich für seine Hilfe bei den REM-Untersuchungen danken.

Herrn Dr. Achim Gau und seinen Mitarbeitern danke ich ganz herzlich für seine Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten und Herrn Dr. Gau für seine zuverlässige Unterstützung und hilfreichen Anregungen.

Prof. Dr. Poehling danke ich für die Benutzung der Sartorius-Waage.

Dr. Eva Simanova danke ich für Ihre Hilfe bei den Versuchen zur Wachsextraktion und der Bestimmung der Löslichkeiten des Resveratrols und Piceids.

Für Ihre stets zuverlässige Unterstützung danke ich ganz herzlich allen Mitarbeitern des Steinbergs, dabei vorrangig Karin Lader für ihre Unterstützung bei der Mikroskopie und Petra Cronfeld für ihre Hilfe bei der Isolation der Membranen. Den Mitarbeitern aus Ruthe gebührt Dank für ihre freundliche Hilfsbereitschaft in allen praktischen Fragen.

Peter Grimm-Wetzel möchte ich meinen besonderen Dank für seine unermüdliche Hilfe in allen Bereichen aussprechen. Seine Fachkompetenz war mir immer eine große Hilfe.

Dr. Iris Szankowski danke ich für ihre Hilfe bei den molekularbiologischen Arbeiten, für ihre unfehlbare Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Zeit auf dem Steinberg in allen Lebenslagen.

Jurith Montag möchte ich ganz herzlich für die Durchsicht des Manuskripts, seine unermüdliche Hilfe und für die schöne Zusammenarbeit danken.

Inge Reupke, Armgard Janczikowski und Astrid Rischmüller möchte ich für ihre Hilfe und Unterstützung danken. Frau Janczikowski hat mich sehr hilfsbereit in die Rasterelektronenmikroskopie eingearbeitet.

Gunda, Roberto und Marcel danke ich für die schöne Zeit in der Mikrobiologie. Unvergessen Weihnachtslieder, Zelltiter, Gruppo Sportivo und et al.!

Dir liebe Claudia danke ich dafür, dass ich in Bonn bei Dir wohnen durfte und für unsere gemeinsame Zeit in der Voßstraße. Nie werde ich eine bessere Mitbewohnerin haben!

Besonderer Dank gebührt Dr. Matthias Fiss. Ohne Ihn wäre ich vielleicht nie mit *Venturia inaequalis* in Kontakt gekommen. Mit Matthias als Betreuer hatte ich mein erstes Praktikum der Mikrobiologie in Hannover bei Herrn Prof. Dr. Georg Auling, dem ich an dieser Stelle für die gute Zusammenarbeit auch ganz herzlich danken möchte. Matthias war der beste Lehrer den ich mit hätte denken können und es tut mir sehr leid, dass ich Ihm nicht mehr persönlich danken kann.

Meinen Eltern und Freunden danke ich für die liebevolle Unterstützung, ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!