

**Adhäsion und Entwicklung von *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. auf Apfel-
und Modelloberflächen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften

(Dr. agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 16. Juli 2007

von

Christina Friederike Anna Schumacher

aus

Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert (2007).

Referent:

Prof. Dr. H.-W. Dehne

Korreferent:

Prof. Dr. H. Goldbach

Tag der mündlichen Prüfung:

30. November 2007

Meinem geliebten Mann Peter

Christina Friederike Anna Schumacher

Adhäsion und Entwicklung von *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. auf Apfel- und Modelloberflächen

Für einen erfolgreichen Infektionsverlauf muss ein Pathogen in der Lage sein, sich auf der Wirtspflanze zu etablieren, um anschließend in das Gewebe einzudringen. In der frühen Phase der Pathogenese steht das Pathogen in unmittelbarem Kontakt zur Wirtsoberfläche. In der vorliegenden Arbeit wurde die Adhäsion und präinfektionelle Entwicklung von Konidien des hemibiotrophen Erregers des Apfelschorfes, *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., auf Apfelblättern und Modelloberflächen untersucht. Die Apfelblätter unterschieden sich hinsichtlich ihrer Anfälligkeit gegenüber *V. inaequalis*, die Modelloberflächen hinsichtlich ihrer Hydrophobizität und Festigkeit. Zur Erfassung der Ergebnisse wurden mikroskopische Methoden sowie Analysen zur physikalischen und chemischen Charakterisierung der Oberflächen angewandt.

Die Blattoberfläche zeigte in Abhängigkeit vom Alter ontogenetische Veränderungen. Junge Blätter wiesen, bedingt durch die chemische Zusammensetzung der kutikularen Wachse, eine schlechtere Benetzbarkeit mit Wasser auf als alte Blätter. Die Oberflächenstruktur wies auf jungen Blättern stärker ausgeprägte Lamellen auf, und zeigte somit eine andere Topographie als alte Blätter. Auf die Anheftung der Konidien von *V. inaequalis* auf der adaxialen Seite von Apfelblättern hatte das Blattalter keinen Einfluss. Generell war die Adhäsion auf hydrophoben Oberflächen besser als auf hydrophilen. Die Anheftung von *V. inaequalis* resultierte aus dem Vorhandensein einer Haftsubstanz an der Konidienspitze (spore tip glue, STG), die erstmalig für dieses Pathogen nachgewiesen werden konnte. Eine erfolgreiche Anheftung wurde nur bei Kontakt zu einer feuchten hydrophoben Oberfläche erreicht. Die Abgabe der Substanz erfolgte passiv und wurde durch die Zugabe von Hemmstoffen zur Konidien suspension nicht beeinflusst.

Die Keimung von Konidien von *V. inaequalis* wurde nicht durch verschiedene hydrophobe und hydrophile Oberflächen beeinflusst. Anders war dies bei der Keimschlauch- und Appressorienbildung. Die Länge der Keimschläuche nahm mit zunehmendem Blattalter zu, die Bildung von Appressorien blieb deutlich geringer. Dies hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Symptomausprägung, die auf jungen Blättern früher und stärker zu sehen war als auf älteren Blättern. Die längsten Keimschläuche wurden auf weichen, hydrophoben Modelloberflächen gebildet. Die Appressorienbildungsrate war hingegen auf hydrophoben und hydrophilen Oberflächen gleich.

Erstmals konnte der Prozess der Anheftung für Konidien von *V. inaequalis* sowie Details über deren präinfektionelle Entwicklung auf verschiedenen Oberflächen beschrieben werden. Dies trägt zu einem besseren Verständnis des Infektionsprozesses bei, und erweitert das Wissen über die ablaufenden Mechanismen und deren Beeinflussbarkeit grundlegend.

Christina Friederike Anna Schumacher

Adhesion and development of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. on apple leaves and model surfaces

For a successful infection a pathogen must be able to establish itself on the host plant. Only then will it be able to penetrate into the tissue. In the early phase of pathogenesis the pathogen is in direct contact to the host surface. In present study the adhesion and pre-infection development of conidia of the hemibiotrophic apple scab fungus *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. on apple leaves and model surfaces were investigated. The apple leaves differed with regard to their susceptibility to *V. inaequalis*, while the model surfaces differed in hydrophobicity and hardness. Microscopical methods and analysis for physical and chemical characterization of the surfaces were used to collect the results.

Depending on age the leaf surface showed ontogenetic changes. Young leaves were less wettable with water than old leaves due to the chemical composition of the cuticular wax. The structure of the surface showed more pronounced lamellae on young than on older leaves resulting in a different topography. Attachment of conidia of *V. inaequalis* to the adaxial side of apple leaves was not influenced by leaf age. In general, adhesion to hydrophobic surfaces was much better than to hydrophilic. Attachment of *V. inaequalis* resulted from the existence of an adhesive material at the conidia apex (spore tip glue, STG), which was detected for this pathogen for the first time. Successful adhesion was only obtained after contact to a wet hydrophobic surface. The release of the substance occurred in a passive process and could not be affected by the addition of inhibitors to the conidia suspension.

Germination of conidia of *V. inaequalis* was not influenced by different hydrophobic or hydrophilic surfaces. This was different for germ tube und appressoria formation. Germ tube length increased with increasing leaf age while the formation of appressoria remained significantly lower. These circumstances had an influence on the symptom development which was seen earlier and more intensively on young leaves compared to older leaves. The longest germ tubes were formed on soft hydrophobic surfaces. However, appressoria formation rate was similar on hydrophobic and hydrophilic model surfaces, respectively.

The process of adhesion of conidia of *V. inaequalis* and details about the pre-infection development on different surfaces were described for the first time. This contributes to a better understanding of the infection process and at the same time fundamentally enlarges the knowledge of the proceeding mechanisms and how they can be influenced.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1	Versuchsorganismen und -materialien	8
2.1.1	Pflanzen	8
2.1.2	Pathogen	8
2.1.3	Modelloberflächen	8
2.2	Pflanzenanzucht	8
2.3	Applikationstechniken	10
2.3.1	Sprühinokulation	10
2.3.2	Applikation mittels Pipette	10
2.4	Wachsextraktion	10
2.4.1	Beschichtung von Glas mit Apfelblattwachsen	11
2.5	Gaschromatographie.....	12
2.5.1	Probenvorbereitung	12
2.5.2	Quantitative Analyse der Wachskomponenten	12
2.5.3	Identifizierung der Wachskomponenten	13
2.6	Charakterisierung von Oberflächen	13
2.6.1	Bestimmung der Blattflächen	13
2.6.2	Messung von Zellfläche und -höhe	14
2.6.3	Bestimmung der Hydrophobizität von Oberflächen	14
2.7	Erfassung der Pilzentwicklung	14
2.7.1	Konidiengröße	14
2.7.2	Keimung und Appressorienbildung	15
2.7.3	Keimschlauchwachstum	15
2.7.4	Melaninringausprägung und Eindringungsstelle	15
2.7.5	Primärstroma- und Laufhyphenbildung	16
2.7.6	Bewertung des Pathogenbefalls	16
2.8	Mikroskopische Untersuchungen	16
2.8.1	Durchlicht- und Auflichtmikroskopie	17
2.8.1.1	Präparation	17
2.8.1.2	Farbstoffe	17

2.8.1.3	Mikroskopie	17
2.8.2	Stereomikroskopie	20
2.8.3	Konfokale Lasermikroskopie	20
2.8.3.1	Präparation	20
2.8.3.2	Lektine	21
2.8.3.3	Mikroskopie	22
2.8.4	Transmissionselektronenmikroskopie.....	22
2.8.4.1	Präparation	22
2.8.4.2	Mikroskopie	24
2.8.5	Rasterelektronenmikroskopie	25
2.9	Untersuchungen zur Haftfähigkeit von Konidien von <i>V. inaequalis</i>.....	25
2.9.1	Allgemeine Vorgehensweise	25
2.9.2	Hemmstoffe und Detergenzien	26
2.9.3	Vorbehandlung der Konidien in Wasser.....	26
2.9.4	Lösungen zum Abwaschen der appressorialen Haftsubstanz	26
2.10	Biochemische Methoden	27
2.10.1	Aufreinigung von hydrophoben Proteinen.....	27
2.10.2	Bestimmung des Proteingehaltes	28
2.10.3	Methanolfällung.....	28
2.10.4	Proteingelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	29
2.10.5	Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen.....	30
2.10.6	Sequenzierung der Proteine	30
2.11	Statistische Auswertung	30
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Charakterisierung von Apfelblättern in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums	32
3.1.1	Wachstum von Apfelblättern	32
3.1.2	Struktur von Apfelblattoberflächen	34
3.1.2.1	Topographie	34
3.1.2.2	Zellfläche und -höhe	35
3.1.3	Chemische Charakterisierung der kutikularen apolaren Wachse	36
3.1.4	Hydrophobizität von Apfelblatt- und Modelloberflächen	40
3.2	Charakterisierung der Konidien von <i>V. inaequalis</i>	41
3.2.1	Konidiengröße und -volumen.....	41
3.2.2	Oberflächenbeschaffenheit/Morphologie	42

3.3	Adhäsion von Konidien auf Oberflächen.....	45
3.3.1	Einfluss der Oberfläche.....	45
3.3.2	Entwicklung von haftenden und abgewaschenen Konidien.....	50
3.3.3	Einfluss von Hemmstoffen und Detergenzien	50
3.3.4	Einfluss der Zugabe von SDS	54
3.3.5	Einfluss der vorherigen Inkubation von Konidien in Wasser	55
3.3.6	Einfluss der vorherigen Inkubation von Konidien in Wasser auf deren Entwicklung.....	56
3.4	Art der Anheftung der Konidien von <i>V. inaequalis</i> an Oberflächen.....	57
3.5	Visualisierung und Charakterisierung der Haftsubstanzen	58
3.5.1	Komponenten der Haftsubstanzen	58
3.5.2	Ausprägung und Lokalisierung der Haftsubstanzen	60
3.5.2.1	Ungekeimte Konidien	60
3.5.2.2	Gekeimte Konidien ohne Appressorien	65
3.5.2.3	Gekeimte Konidien mit Appressorien.....	67
3.5.3	Ablösbarkeit der appressorialen Haftsubstanz	72
3.6	Verlagerung von Lipiden während der Entwicklung von <i>V. inaequalis</i>	73
3.7	Einfluss der Oberfläche auf die Entwicklung von <i>V. inaequalis</i>.....	75
3.7.1	Keimung.....	75
3.7.1.1	Zeitlicher Verlauf.....	75
3.7.1.2	Blattinsertion	77
3.7.1.3	Mit Apfelblattwachs beschichtete Glasoberflächen.....	78
3.7.1.4	Modelloberflächen	79
3.7.2	Keimschlauchwachstum.....	79
3.7.2.1	Zeitlicher Verlauf.....	79
3.7.2.2	Blattinsertion	80
3.7.2.3	Mit Apfelblattwachs beschichtete Glasoberflächen.....	81
3.7.2.4	Modelloberflächen	82
3.7.3	Appressorienbildung	83
3.7.3.1	Zeitlicher Verlauf.....	83
3.7.3.2	Blattinsertion	84
3.7.3.3	Mit Apfelblattwachs beschichtete Glasoberflächen.....	87
3.7.3.4	Modelloberflächen	89
3.7.4	Primärstroma- und Laufhyphenbildung auf Apfelblättern.....	90
3.7.5	Symptomentwicklung auf Apfelblättern	91

3.8	Isolierung und Analyse von hydrophoben Proteinen	93
4	DISKUSSION	97
5	Zusammenfassung.....	121
6	Literaturverzeichnis	124

1 EINLEITUNG

Lebewesen treten über ihre Oberfläche mit der Umwelt in Kontakt. Für die präinfektionelle Entwicklung eines Erregers auf einer Wirtsoberfläche sind viele Faktoren von Bedeutung. Sowohl bei der Oberfläche der Pflanzen als auch bei der des Pathogens vollziehen sich während der Interaktion morphologische und funktionelle Veränderungen. Bei höheren Pflanzen sind alle oberirdischen Pflanzenteile wie Blätter, Blüten, Früchte und Stängel mit einer hydrophoben Kutikula umgeben (MARTIN und JUNIPER 1970). Sie bildet mit der darunter liegenden Epidermis die erste Barriere, die von Pathogenen und Schaderregern durchbrochen werden muss, damit sich diese auf bzw. in einer Pflanze etablieren können (JUNIPER und JEFFREE 1983, JUNIPER und COX 1973, HOLLOWAY 1969). Die Kutikula mit den ihr aufgelagerten Wachsen stellt eine Schutzschicht dar, die die Pflanze vor Austrocknung durch übermäßigen nicht-stomatären Wasserverlust, Verlusten von organischen Substanzen und anorganischen Nährstoffen durch Auswaschung, Eindringung schädlicher Strahlung und Verletzungen durch Wind, Frost und physikalischer Abnutzung bewahrt (GORDON et al. 1998, SCHÖNHERR 1982, CLARK und LISTER 1975, JUNIPER und COX 1973, TUKEY 1971, MARTIN und JUNIPER 1970). Neben der Schutzfunktion wird eine Mitwirkung der Oberfläche in der Kontrolle des Gas- und Stoffaustausches zwischen Pflanze und Umwelt beschrieben (TAIZ und ZEIGER 1998, ROSENQUIST und MORRISON 1989). Weiterhin hat sie eine wichtige Bedeutung für die Wechselbeziehungen zwischen Pflanzenoberfläche und epiphytischen Mikroorganismen, die unter anderem mit der Wirtserkennung durch phytopathogene Pilze und Insekten beziehungsweise allelochemischen Effekten von Blattoberflächen-Komponenten auf Mikroorganismen und Insekten einhergehen (SCHREIBER et al. 2005, KNOLL und SCHREIBER 2000, TAIZ und ZEIGER 1998, JACKSON und DANEHOWER 1996, EIGENBRODE und ESPELIE 1995, KOLATTUKUDY 1985, KLINCARE et al. 1971).

Die lipophile Kutikula variiert in ihrer Dicke in Abhängigkeit der Pflanzenspezies, des -organs sowie der Anzuchtbedingungen (MARTIN und JUNIPER 1970). Die Kutikula wird durch zwei spezifische Gruppen von Lipidsubstanzen charakterisiert: Unlösliche polymere Cutine, die als Gerüst der Membran dienen, und lösliche Wachse (BAKER 1982, HOLLOWAY 1982a). Die Wachse wiederum werden je nach dem Ort ihres Vorkommens in der Cutinmatrix oder auf der Oberfläche als intra- bzw. epikutikulare Wachse bezeichnet. Sie setzen sich aus einer komplexen Mischung aus langkettigen Kohlenwasserstoffen (Alkanen), Alkoholen (primäre, sekundäre Alkohole, Diole), Ketonen, Fettsäuren, Estern und Sterolen zusammen. Eine weitere Hauptkomponente sind Triterpene (HOLLOWAY 1993, BAKER 1982, MARTIN und JUNIPER 1970). Die chemische Zusammensetzung bzw. die Mengenverhältnisse der

kutikularen Wachse unterscheidet sich zwischen und auch innerhalb der Pflanzenspezies (POSTBEITTENMILLER 1996, WATANABE und YAMAGUCHI 1991). Die Anordnung und chemische Zusammensetzung der epikutikularen Wachse können wiederum die Morphologie und Benetzungseigenschaften bzw. Hydrophobizität der Pflanzenoberfläche bestimmen (JETTER et al. 2000, JETTER und RIEDERER 1994, MCWHORTER et al. 1990, HOLLOWAY 1970).

Die Kutikula muss von über natürliche Öffnungen eindringenden Erregern besiedelt werden, von vielen direkt eindringenden Pathogenen muss zusätzlich die Epidermis überwunden werden. In beiden Fällen kommt es zu einem engen Kontakt zwischen Pflanzenoberfläche und Pathogen. *Venturia inaequalis*, der Erreger des Apfelschorfes, ist ein Pathogen, das nach der Bildung eines Appressoriums die Kutikula penetriert und das Wirtsgewebe bis oberhalb der Epidermis infiziert. *V. inaequalis* ist ein hemibiotroph lebender, zu den Ascomyceten gehörender Pilz, der in den meisten apfelproduzierenden Regionen der Welt von großer Bedeutung ist (MACHARDY 1995). Für die Keimung der Ascosporen ist im Frühjahr eine Blattnässedauer von 10 bis 20 Stunden bei gleichzeitigen Temperaturen von 10 bis 20 °C erforderlich. Nachdem der Erreger das Wirtsgewebe infiziert und sich zwischen Kutikula und Epidermis etabliert hat, werden nach Aufreißen der Kutikula die an Konidiophoren gebildeten Konidien (asexuelle Nebenfruchtform *Spilocaea pomi* Fr. oder *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fckl.) freigesetzt. Diese werden durch Regentropfen auf andere Blätter verteilt und führen während der Vegetationsperiode zur Ausbreitung des Erregers im Bestand. Die Konidien sind für die Keimung auf freies Wasser auf der Blattoberfläche angewiesen (MACHARDY 1995, ADERHOLD 1896). Dementsprechend müssen ungekeimte Konidien von *V. inaequalis* in der Lage sein, auf nassen Oberflächen zu haften.

Die Adhäsion von Konidien und anderen Infektionsstrukturen auf der Wirtsoberfläche ist ein wichtiger Schritt im Infektionsprozess von phytopathogenen Pilzen (EPSTEIN und NICHOLSON 1997). Für zahlreiche pilzliche Pathogene ist bekannt, dass sie noch vor Beginn der Keimung zur Anheftung an eine Oberfläche klebrige bzw. schleimartige Substanzen sekretieren (EPSTEIN und NICHOLSON 1997, NICHOLSON und EPSTEIN 1991, HAMER et al. 1988). Diese extrazelluläre Matrix, welche die Sporen, Hyphen und Appressorien vieler Pilze umgibt, hat neben der Wirkung als Adhärens aber auch andere Funktionen. So schützt sie die Konidie vor dem Austrocknen oder vor toxischen Substanzen, die sich auf oder im Wirt befinden (NICHOLSON et al. 1989, NICHOLSON et al. 1986, NICHOLSON und MORAES 1980). Durch die Beteiligung von Enzymen, die in der Matrix enthalten sind, wirkt sie zudem beim Infektionsprozess unterstützend (PASCHOLATI et al. 1993). Für die extrazelluläre Matrix von

Colletotrichum graminicola, dem Erreger der Blattanthraknose, ist eine keimhemmende Funktion beschrieben, die mit der Verhinderung des Auskeimens der Konidien in den Acervuli einhergeht (LEITE und NICHOLSON 1992).

Die Fähigkeit, bei Vorhandensein von Wasser auf einer Oberfläche zu haften, ist für eine Vielzahl von Blattpathogenen von großer Bedeutung. Viele pilzliche Sporen, wie z. B. die von *Colletotrichum* spp. oder *Cochliobolus heterostrophus*, werden mittels Wasser bzw. Regentropfen verteilt. Pilze, die sich an eine Blattoberfläche anheften können, haben somit einen selektiven Vorteil, da Sporen, die sich nicht anheften können, direkt oder aber beim nächsten Regenfall von der Oberfläche abgewaschen werden. Auch Wind und der Wettbewerb mit anderen Pathogenen um eine Stelle auf der Wirtsoberfläche sind bei nicht haftenden Konidien limitierende Faktoren. „Freies Wasser“ und die Fähigkeit, in einer nassen Umgebung zu haften, ist daher eine wichtige Komponente in der Entwicklung von vielen Pathogenen (TUCKER und TALBOT 2001, BRAUN und HOWARD 1994a, NICHOLSON und EPSTEIN 1991).

Obwohl bei pathogenen Pilzen ein allgemeiner Mechanismus der Sporenanheftung verbreitet ist (BRAUN und HOWARD 1994a), gibt es zwischen verschiedenen Spezies Abweichungen in der Zusammensetzung der Haftsubstanz, in den Faktoren, durch die die Haftfähigkeit eingeleitet wird, sowie in den Entwicklungsstadien der Pilze, bei denen es zur Adhäsion kommt (EPSTEIN und NICHOLSON 1997). So unterscheidet sich die Anheftung von Sporen der Echten Mehltau-Pilze grundlegend von der von Konidien von *V. inaequalis* und *Magnaporthe grisea*, dem Erreger des Reisbrandes, was vor allem daran liegt, dass für die präinfektionelle Entwicklung Echter Mehltau-Pilze zwar eine hohe Luftfeuchtigkeit, aber kein tropfbares Wasser notwendig ist (TUCKER und TALBOT 2001, DRANDAREVSKI 1969). Echte Mehltau-Pilze wie z. B. *Uncinuliella australiana* heften sich durch die Ausscheidung einer extrazellulären Matrix und Bildung eines Adhäsionskissens an eine hydrophobe Oberfläche an (MIMS et al. 1995a). *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* gibt ein Exudat ab, welches Esterasen und Cutinasen enthält, um die Kutikula anzulösen. Gleichzeitig macht es die Pflanzen- sowie Sporenoberfläche hydrophiler, um dadurch den Kontakt zwischen den beiden Oberflächen zu verbessern (CARVER et al. 1999, NICHOLSON et al. 1993, PASCHOLATI et al. 1992). Die Sporen von *M. grisea* benötigen hingegen zur Keimung einen Wasserfilm und sind in der Lage, sich auf nassen hydrophoben Oberflächen zu entwickeln ohne vom Blatt abgewaschen zu werden. Die Haftfähigkeit der Sporen resultiert aus einer Haftsubstanz (spore tip mucilage, STM), die in einem periplasmatischen Raum an der Spitze von trockenen Konidien aufbewahrt wird. Nach Hydratation der Konidien durch hohe Luftfeuchtigkeit, Regen oder Tau, zerreißt die Membran an der Konidienspitze, so dass die Haftsubstanz sofort entlassen wird (HAMER et al.

1988). Die von Pilzen abgesonderte Haftsubstanz scheint hauptsächlich aus Glykoproteinen zu bestehen. Bei einigen Arten sind auch Lipide und Polysaccharide zu finden (MERCURE et al. 1995, XIAO et al. 1994a, KWON und EPSTEIN 1993). Auch Enzyme wie z. B. Cutinase und Esterase können Bestandteile der Haftsubstanz sein (GEVENS et al. 2001, PASCHOLATI et al. 1992).

Der Prozess der Anheftung von Sporen auf einer Oberfläche kann sowohl aktiv als auch passiv erfolgen (TUCKER und TALBOT 2001, JONES 1994). NICHOLSON und EPSTEIN (1991) beschreiben den aktiven Prozess der Sekretion eines Adhärens und somit der Anheftung als einen hoch spezifischen, bei dem die Spore durch Stimuli des Wirtes zur Produktion einer Matrix angeregt wird. Der Wirtserkennung eines Pathogens wie z. B. von *Colletotrichum graminicola* folgt die zeitlich verzögerte Abgabe einer Haftsubstanz, und für die Adhäsion ist dementsprechend eine aktive Stoffwechselleistung des Pilzes erforderlich. MERCURE et al. (1994) vermuten, dass eine Glykoproteinsynthese *de novo* in den Anheftungsprozess von ungekeimten Konidien von *C. graminicola* involviert ist. Ähnliche Erkenntnisse gibt es auch über Konidien von *Nectria haematococca* und *Cochliobolus heterostrophus* (BRAUN und HOWARD 1994b, JONES und EPSTEIN 1989). Beim passiven Prozess der Anheftung sind zunächst bei trockenen Konidien hydrophobe Wechselwirkungen von Bedeutung. Bei Konidien in wässriger Umgebung erfolgt die Abgabe der extrazellulären Matrix unabhängig von der Oberfläche und ohne Mitwirkung der mitochondrialen Atmung oder Proteinsynthese direkt nach dem Kontakt auf eine Oberfläche als präformierte Substanz (BRAUN und HOWARD 1994a, CLEMENT et al. 1993, HAMER et al. 1988). Bei Uredosporen von *Uromyces viciae-fabae* wird die Bildung eines Adhäsionskissens nach Kontakt der Sporen auf eine nasse Wirtsoberfläche ebenfalls als ein passiver Prozess beschrieben (CLEMENT et al. 1994). Aber von der Sporenoberfläche isolierte Cutinase und Esterasen, die in dem Anheftungsprozess involviert sind, deuten auf einen aktiven Prozess der Haftung hin (DEISING et al. 1992).

Für die Anheftung von Sporen sowie die Bildung von Keimschläuchen und Appressorien ist die Hydrophobizität und Festigkeit der zu besiedelnden Oberfläche von Bedeutung. Konidien von *M. grisea* und *C. graminicola* haften auf hydrophoben Oberflächen wie Teflon® oder Polystyrol weitaus fester als auf einer hydrophilen Glasoberfläche (BRAUN und HOWARD 1994a, MERCURE et al. 1994, HAMER et al. 1988). Die Sporenkeimung kann durch den Prozess der Haftung an eine Oberfläche induziert werden, aber auch andere Faktoren, wie das Vorhandensein von freiem Wasser und die Verfügbarkeit von Nährstoffen, sind von Bedeutung (SHAW et al. 2006, KUO und HOCH 1996a, HOWARD 1994, LEE und DEAN 1993).

Weiterhin können die Hydrophobizität und Festigkeit einer Oberfläche die Keimung von Sporen beeinflussen (CHAKY et al. 2001).

Das Keimschlauchwachstum und die Orientierung auf der Pflanzenoberfläche unterliegt speziellen chemischen und physikalischen Signalen (HOCH und STAPLES 1991). Das gerichtete Wachstum der Keimschläuche von *U. viciae-fabae* ist mit dem pH-Gradienten, der sich um geschlossene Stomata befindet, korreliert (EDWARDS und BOWLING 1986). Die Penetration von Zuckerrübenblättern durch *Cercospora beticola* ist mit Wassergradienten um den Spaltöffnungen, einem sog. Hydrotropismus, verbunden (RATHAIAH 1977). Pflanzliche Exsudate sowie die Topographie der Pflanzenoberfläche stellen weitere Stimuli für phytopathogene Pilze dar. Thigmotropismus, in Form von gerichtetem Wachstum der Hyphen in einem rechten Winkel zu den Furchen der Verbindungsstellen der antiklinen Zellwände auf der Epidermis, ist bei Rostpilzen wie z. B. *Puccinia graminis tritici* zu finden (JOHNSON 1934).

Auch die Appressorienbildung ist von ähnlichen, bereits oben genannten, Faktoren und Signalen abhängig (HOCH und STAPLES 1991). Uredosporen von *Uromyces appendiculatus* reagieren stark auf topographische Signale und bilden auf Oberflächen mit künstlichen Leisten von 0,5 µm Höhe vermehrt Appressorien (BOURETT et al. 1987, HOCH et al. 1987). Bei *M. grisea* steht die Generierung von Appressorien im Zusammenhang mit der Hydrophobizität und der Härte der Oberfläche (XIAO et al. 1994b, LEE und DEAN 1993). Pflanzenexsudate können als chemische Signale die Bildung von Appressorien oder Infektionskissen (Myzelverdichtungen) bei *Rhizoctonia solani* induzieren (STOCKWELL und HANCHEY 1984, MARSHALL und RUSH 1980). Für *V. inaequalis* ist die Festigkeit der Kontaktoberfläche ein Stimulus für die Bildung von Appressorien sowie einer melanisierten appressorialen Ringstruktur (STEINER und OERKE 2007). Im Vergleich zu anderen Pilzen bilden Konidien und Ascosporen von *V. inaequalis* unmittelbar nach dem Auskeimen Appressorien, so dass häufig keine Keimschläuche zu erkennen sind (NUSBAUM und KEIT 1938). Das Appressorium, welches durch ein Septum vom Keimschlauch getrennt ist, stellt meistens eine mehr oder weniger deutliche zylinder-halbkugelige oder keulenförmige Verdickung des Keimschlauches dar (HERING et al. 1993). Sie werden häufig, wie auch bei anderen Pilzen, über den antiklinen Zellwänden gebildet (HOCH und STAPLES 1991, LAPP und SKOROPAD 1978, CLARK und LORBEER 1976, PREECE et al. 1967).

Bei vielen Prozessen im Wachstum und in der Entwicklung von Pilzen sind Polysaccharide, Lipide und Proteine von Bedeutung (MÜLLER und LOEFFLER 1982). Eine besondere Gruppe von Proteinen, die an der Außenfläche der Zellwand filamentöser Pilze

lokalisiert sind, stellen die sogenannten Hydrophobine dar. Hydrophobine sind kleine, sekretierte und hydrophobe Proteine, die ein konserviertes Aminosäuremotiv von acht Cystein-Resten in einer charakteristischen Abfolge zeigen (WESSELS 1997). Sie besitzen verschiedene Funktionen unter anderem auf der Oberfläche von Pilzsporen, bei der Bildung von Luftmyzel, Appressorien und Fruchtkörpern, bei der Sporulation sowie bei der Anheftung von Hyphen auf hydrophoben Oberflächen (KERSHAW und TALBOT 1998, WESSELS 1997, WESSELS 1994, WESSELS et al. 1991). Hydrophobine werden unter anderem anhand ihrer chemischen Eigenschaften sowie ihrer Wirkungsweise und Bedeutung für die Pilzentwicklung in zwei Klassen aufgeteilt (KERSHAW und TALBOT 1998, WESSELS 1994). Ihre besondere Eigenschaft beruht auf der Fähigkeit, durch das sogenannte „Self-Assembly“ an einer hydrophoben-hydrophilen Grenzschicht einen amphipatischen Film zu bilden, der eine Dicke von 10 nm aufweist. Diese oberflächenaktiven Proteine können somit hydrophobe Oberflächen hydrophiler machen und hydrophile Oberflächen hydrophober. Weiterhin sind Hydrophobine als Monomere beim Aufbau der pilzlichen Zellwände beteiligt, und können sogar als Toxine und Elicitoren wirken (WÖSTEN 2001). Sie wurden bereits bei einer Vielzahl von phytopathogenen Pilzen der Ascomyceten und Basidiomyceten entdeckt (WHITEFORD und SPANU 2002), ein Auftreten bei *V. inaequalis* ist allerdings bis dato noch nicht beschrieben.

Zur postinfektionellen Entwicklung, zum Lebenszyklus und den Möglichkeiten der Bekämpfung des Apfelschorfs sowie Fragen zur Altersresistenz von Apfelblättern sind über Jahrzehnte eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden (LI und XU 2002, MACHARDY et al. 2001, BENAOUF und PARISI 1998, KOLLAR 1996, HERING et al. 1993, VALSANGIACOMO und GESSLER 1988, PAUL und BRANDES 1983, GUPTA und LELE 1980, SCHWABE 1980, SCHWABE 1979, BIEHN et al. 1966). Mikroskopische und morphologische Studien über die primären Infektionsstrukturen von *V. inaequalis* bzw. der Nebenfruchtform *Spilocaea pomi* gibt es hingegen abgesehen von einigen klassischen Arbeiten wenig (TURNER et al. 1986, GESSLER und STUMM 1984, CORLETT et al. 1976, NUSBAUM und KEIT 1938, ADERHOLD 1900, ADERHOLD 1896). Während für andere Erreger der Einfluss verschiedener Pflanzen- und Modelloberflächen auf die Adhäsion und Entwicklung in einer Reihe von Studien bereits untersucht worden ist (WRIGHT et al. 2002, APOGA et al. 2001, BRAUN und HOWARD 1994b, TERHUNE und HOCH 1993, JONES und EPSTEIN 1989), liegen für *V. inaequalis* noch keine Untersuchungen vor.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erfassung der sehr frühen Prozesse der Interaktion zwischen dem Pathogen *V. inaequalis* und verschiedenen Oberflächen. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die Morphologie der Konidien und ihre Adhäsion auf nassen

Apfel- und Modelloberflächen unterschiedlicher Hydrophobizität gelegt. Neben der Charakterisierung der Konidien erfolgte auch eine Beschreibung der verwendeten Oberflächen. Die Versuche sollten weiterhin Einblicke in das Keimungsverhalten sowie die Appressorienbildung der Konidien auf natürlichen und modifizierten Oberflächen geben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsorganismen und -materialien

2.1.1 Pflanzen

Apfel

In den Untersuchungen wurden Apfelsämlinge (*Malus x domestica* Borkh.) der Sorte „Golden Delicious“ verwendet. Das Saatgut für die Anzucht der Sämlinge wurde von der Firma Eichenberg (Miltenberg) bezogen. Es handelte sich um Standardmaterial mit „EG-Qualität“ nach der Anbaumaterialverordnung (AGOZV).

Rose

Für Untersuchungen zur Haftfähigkeit von Konidien auf einer Nicht-Wirtspflanze wurden Rosen (Teehybride) der Sorte „Claudia“ verwendet, die im Bestand des Instituts für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz, Bereich Phytomedizin vorhanden waren.

2.1.2 Pathogen

Venturia inaequalis (Cke.) Wint., Erreger des Apfelschorfs

Bei dem verwendeten Isolat handelte es sich um den Hausstamm 1 (HS1) des Instituts für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz, Bereich Phytomedizin.

2.1.3 Modelloberflächen

Als Modelloberflächen dienten Glas (Objektträger, Marienfeld, Lauda-Königshofen), Parafilm[®] (Alcan Packaging, Chicago, IL, USA) und Polystyrol (Kunststoffpetrischalen, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich).

2.2 Pflanzenanzucht

Apfel

Die Apfelpflanzen wurden aus Samen angezogen. Die Stratifizierung erfolgte durch Lagerung der Apfelsamen bei -18 °C für mindestens eine Woche. Dann wurden die Samen bei 4 °C für vier Tage in demineralisiertem Wasser (A. demin.) vorgequollen, wobei kein Wasserwechsel durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Samen mit 0,1 % a. i. Euparen M WG 50

(Tolyfluanid, Bayer CropScience Deutschland GmbH, Langenfeld) für fünf Minuten gebeizt und für zwei Wochen bei 4-8 °C im Dunkeln inkubiert. Die Aussaat erfolgte in Erde für salzempfindliche Saaten (pH 5-6, Salzgehalt: 0,8 g l⁻¹, Klasmann Seedlingssubstrat, Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste). Nach ca. ein bis zwei Wochen wurden die Sämlinge vereinzelt und in Plastiktöpfe (8,5 cm x 8,5 cm x 7,5 cm) mit Einheitserde gepflanzt. Die verwendete Erde (Klasmann Spezialmischung, Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste) wurde vor dem Topfen mit 0,2 % Kalk sowie 0,2 % Plantosan Langzeitdünger (NPK 20 + 10 + 15) gedüngt.

Um eine Verunreinigung der Blattoberflächen mit Staub, Schwefel, Salzresten vom Gießwasser, Pilzinfektionen etc. zu vermeiden und dennoch einen guten Luftaustausch zu gewährleisten, wurden die Sämlinge kurz nach dem Pikieren in eine Klimakammer unter Cellophan-Hauben gestellt. Diese Hauben hatten eine Größe von 125 cm x 100 cm x 60 cm. Die Seitenwände waren mit 0,2 mm dicker durchsichtiger Folie versehen, die Decke bestand aus Cellophan-Folie (Konditoreigewerbe). Die Temperatur betrug unter den Hauben 24 ± 1 °C, die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 58 ± 9 %. Die Beleuchtung mit Natriumdampflampen (SGR 140, Philips, Hamburg) gewährleistete eine Photoperiode von 16 Stunden und eine Beleuchtungsstärke von 7600 lux. Die Versuchspflanzen wurden alle drei Wochen mit einem Flüssig-Volldünger gedüngt (4 % Flory 2 spezial 16 + 9 + 22, Euflor, München).

Die Untersuchungen wurden an acht Wochen alten Apfelsämlingen durchgeführt. Es wurden die adaxialen Seiten von vier verschiedenen Blattinsertionen untersucht, wobei es sich um das jüngste vollständig entfaltete Blatt (erste Blattinsertion) sowie die dritte, fünfte und siebte darunter liegende Blattinsertion handelte. In den Diagrammen, Tabellen und im Text sind die Blattinsertionen mit „oben“, „oben-2“, „oben-4“ und „oben-6“ benannt. Die Pflanzen waren zum Untersuchungszeitpunkt ca. 20-25 cm hoch und hatten durchschnittlich 12 Blätter.

Rose

Es standen Rosenstöcke zur Verfügung, die in 13er Rundtöpfen angezogen worden waren. Sie wurden im Gewächshaus bei 26 ± 5 °C und 59 ± 13 % relativer Luftfeuchte gehalten.

Für die Versuche wurden die adaxialen Seiten der Endfieder sowie der beiden darunter liegenden Seitenfiedern des jüngsten Fiederblattes verwendet, das nach dem Rückschnitt ausgebildet worden war.

2.3 Applikationstechniken

2.3.1 Sprühinokulation

Blätter mit sporulierenden Befallsstellen wurden bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung des Inokulums wurden aufgetaute Blätter in 100 ml Wasser gegeben und geschüttelt. Mit Hilfe einer Zählkammer (Fuchs-Rosenthal-Kammer) wurde die Konidiendichte auf $1-1,5 \times 10^5\text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Die Sporensuspension wurde mittels einer Sprühflasche auf die Pflanzen appliziert. Der Sprühkopf wurde vorher mit 75 %igem Alkohol gereinigt. Die Blätter sollten nach der Behandlung tropfnass sein. Um die Benetzbarkeit der Blätter zu verbessern, erfolgte die Zugabe von Tween 20 (0,01 %, Merck-Schuchardt) zur Sporensuspension. Die Pflanzen wurden für 48 Stunden bei ca. 18 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, und anschließend bis zur Probennahme oder Entwicklung der Symptome in einer Klimakammer gehalten. Die Temperatur betrug in der Klimakammer $19 \pm 1\text{ °C}$.

Für die Erhaltung wurden die Pflanzen auf gleiche Weise inokuliert. Sie wurden 12-14 Tage kultiviert, dann wurden Blätter mit sichtbarem Befall abgesammelt, und diese in Kunststoffdosen bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Applikation mittels Pipette

Für die Untersuchungen zur Adhäsion und Entwicklung von *V. inaequalis* auf Oberflächen wurden etwa zwei Wochen nach der Inokulation der Pflanzen trockene Konidien mit einem Borstenpinsel vorsichtig von den auf den Blättern befindlichen sporulierenden Befallsstellen abgebürstet und in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Lagerung der Konidien erfolgte bei 4 °C . Bei Bedarf wurden Konidien entnommen, und mit demineralisiertem Wasser eine Sporensuspension hergestellt. Die Konidiendichte betrug $5 \times 10^4\text{ ml}^{-1}$. Die Applikation von Tropfen mit einem Volumen von 5 bzw. 20 μl erfolgte mittels Eppendorf-Pipette auf die entsprechende Oberfläche. Die Inkubation wurde bei $20 \pm 1\text{ °C}$ in Boxen mit gesättigter Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

2.4 Wachsextraktion

Die Extraktion der kutikularen Wachse von vier verschiedenen Blattinsertionen erfolgte an frischen Blättern von neun Wochen alten Apfelsämlingen. Es war darauf zu achten, dass die Blattspreiten nicht berührt wurden, um die Wachszusammensetzung nicht zu beeinflussen bzw. Verunreinigungen der Blätter vorzubeugen. Für die Extraktion der kutikularen Wachse wurden

die Blattoberseiten zweimal für zehn Sekunden in Chloroform (> 99 %, ca. 4 ml) gelegt. Dabei sollte vermieden werden, dass Chloroform in die Blattstiele gelangte bzw. die Blattunterseite berührte. Vorversuche¹ hatten gezeigt, dass die kutikularen Wachse von Blattproben bereits nach zehn Sekunden fast vollständig extrahiert waren, und dass längere Einwirkzeiten zu Gewebeschäden durch CHCl_3 führen. Nachdem das anhaftende Chloroform verdampft war, wurden die Blätter fotokopiert, wobei sich die Blattspreiten nicht überlagern durften. Mittels Adobe[®] Photoshop[®] Elements 2.0 (Vers. 2.0.2, Adobe Systems Inc., USA) wurden die Blattflächen bestimmt.

Pro Wiederholung wurden jeweils zwei Blätter der jeweiligen Blattinsertion extrahiert. Pro Versuch wurden zehn Pflanzen untersucht ($n = 5$). Um die sensitive Analyse nicht zu verfälschen, wurden nur mittels Chloroform gereinigte Glasmaterialien verwendet.

2.4.1 Beschichtung von Glas mit Apfelblattwachsen

Die Extraktion erfolgte auf die gleiche Weise wie im vorgehenden Abschnitt für 20 Sekunden mit Chloroform. Je nach Blattinsertion wurden zwischen 140 μl und 460 μl des Chloroform-Wachs-Gemisches mit Pasteurpipetten auf vorher mit Chloroform gereinigte Glasobjektträger gebracht, so dass ein dünner Flüssigkeitsfilm zu sehen war. Die benetzte Fläche betrug ca. 2,3 cm^2 . Anschließend konnte das Chloroform unter einem Abzug verdampfen, so dass sich auf den Objektträgern ein Belag aus Wachs bildete (Abb. 1). Die beschichteten Glasoberflächen wurden für die Untersuchung der Entwicklung von *V. inaequalis* sowie für Kontaktwinkelmessungen verwendet.



Abb. 1: Ein mit kutikularen Wachsen von der adaxialen Seite von Apfelblättern beschichteter Glasobjektträger.

¹ Die Vorversuche wurden von Frau Bringe, INRES, Bereich Pflanzen- und Gartenbauwissenschaften durchgeführt.

2.5 Gaschromatographie

2.5.1 Probenvorbereitung

Der im Chloroform enthaltene Wachsextrakt wurde in kleine Glasgefäße überführt. Es wurden 20 µl des internen Standards zugegeben. Dabei handelte es sich um ein C₂₄-Alkan (Tetracosan), welches den Wachskomponenten ähnlich ist, aber nicht in der zu untersuchende Wachsmischung vorkommt. Mit Hilfe des internen Standards lassen sich später die Wachskomponenten quantitativ bestimmen. Die definierte Menge des internen Standards wurde direkt nach der Extraktion zugegeben, so dass sich alle weiteren Arbeitsschritte gleichermaßen auf das Wachsgemisch und den Standard auswirkten. Nach Zugabe des internen Standards wurden die Proben bei 60 °C mit Stickstoff eingedampft (Reacti Therm-Heating Module) bis noch ca. 100-150 µl Chloroform im Gefäß vorhanden waren. Dieser Überstand sollte nicht verfärbt sein, da Verfärbungen auf Verunreinigungen hindeuten. Anschließend wurden je 20 µl Pyridin und N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA) zugegeben. Pyridin dient lediglich als Katalysator, während BSTFA für die Umsetzung von Verbindungen mit polaren funktionellen Gruppen (z. B. Hydroxyl- und Carboxylgruppen) in stabile, leichtflüchtige Derivate verantwortlich ist. Nach Zugabe der Reagenzien erfolgte eine Inkubation bei 70 °C für 40 Minuten (verändert, nach HAUKE und SCHREIBER 1998). Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurde sie mit 100 µl Chloroform verdünnt, gevortext und in Probengefäße für den GC-Autosampler überführt.

2.5.2 Quantitative Analyse der Wachskomponenten

Die Analysen wurden an einem Kapillar-Gaschromatographen (GC) (5890 Series II, Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA) durchgeführt. Die Injektion (1 µl) erfolgte „on column“, d. h. ohne Vorsäule direkt auf die Säule. Bei der Säule handelte es sich um eine hoch auflösende GC-Säule (Agilent Technologies, 30 m x 0,321 mm DB-1, Phasendicke 0,1 µm, J & W, Folsom, CA, USA). Als Detektor wurde für die quantitative Analyse ein Flammen-Ionisations-Detektor (FID) verwendet. Als Trägergas diente Wasserstoff. Die Temperatur- und Druckeinstellungen waren folgendermaßen (Tab. 1):

Tab. 1: Temperatur- und Druckeinstellungen für die quantitative Analyse der Wachskomponenten von Apfelblättern mittels Kapillar-Gaschromatographie.

	Aufheiz-/Druck- erhöhungsrate	Temperatur / Druck	Dauer
Temperatureinstellungen	1.	50 °C	2 min
	2. 40 °C min ⁻¹	200 °C	2 min
	3. 3 °C min ⁻¹	310 °C	30 min
Druckeinstellungen	1.	50 kPa	5 min
	2. 3 kPa min ⁻¹	150 kPa	39 min

Die Durchflussrate lag bei 2,2 ml min⁻¹, die durchschnittliche Durchflussgeschwindigkeit betrug 42 cm s⁻¹.

2.5.3 Identifizierung der Wachskomponenten

Die qualitative Analyse bzw. die Identifizierung der einzelnen Wachskomponenten erfolgte mittels eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer (MS) als Detektor. Die Methode entsprach der für die quantitative Analyse beschriebene, aber diesmal diente Helium als Trägergas. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl. Zur Identifizierung der Wachskomponenten wurden Vergleichsspektren herangezogen.

2.6 Charakterisierung von Oberflächen

2.6.1 Bestimmung der Blattflächen

Die Untersuchungen zur Blattflächenbestimmung wurden an sechs Apfelsämlingen durchgeführt, die bereits 40 Tage seit Aussaat gewachsen waren. Die Flächen aller Blätter jeder Pflanze wurden fünf Mal in einem Abstand von jeweils vier Tagen gemessen. Am Ende dieser Untersuchung waren die Sämlinge 56 Tage alt. Dieses Alter entsprach dem der in den anderen Untersuchungen verwendeten Pflanzen. Die Blattfläche der adaxialen Blattseite wurde aus der Länge und Breite der Blätter errechnet. Anschließend wurden die Werte mit dem Faktor 0,71 multipliziert, der von vorausgehenden destruktiven Blattflächenmessungen abgeleitet worden war. Für die Bewertung des Wachstums in Abhängigkeit von der Blattinsertion bzw. des Blattalters der Apfelblätter wurde die relative Wachstumsrate (RGR) herangezogen. Die RGR wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{RGR} = (\ln A_{L2} - \ln A_{L1}) / (t_2 - t_1),$$

wobei A_{L2} die Blattfläche zum Zeitpunkt t_2 und A_{L1} die Blattfläche zum Zeitpunkt t_1 ist (modifiziert nach HUNT 1982).

2.6.2 Messung von Zellfläche und -höhe

Die Fläche und Höhe von Epidermiszellen der adaxialen Blattseite von Apfelblättern wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie (CLSM) gemessen. Das CLSM war dafür mit einem Neon-Helium-Laser ausgestattet (543 nm). Die ausgestanzten Blattscheiben wurden in Chloralhydrat (250 g 100 ml⁻¹ A. demin., Sigma-Aldrich, Steinheim) entfärbt und mit dem 40er Ölimmersions-Objektiv betrachtet. Die Topographie der periklinen Zellwände wurde über Bildstapel in xy-Richtung analysiert. Es wurden je fünf Messungen an Blattscheiben von sechs verschiedenen Pflanzen durchgeführt (n = 30).

2.6.3 Bestimmung der Hydrophobizität von Oberflächen

Die Hydrophobizität von Apfelblättern, Modelloberflächen sowie wachsbeschichteten Glasoberflächen wurde mittels eines Kontaktwinkelmessgerätes (Contact Angle System OCA 30-2, Software SCA 202, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt) gemessen. Längliche Blattstücke wurden aus der Blattspreite herausgeschnitten und mit doppelseitigem Klebeband so auf einem Objektträger befestigt, dass eine ebene Oberfläche gewährleistet war. Dabei durfte die Blattoberfläche nicht berührt werden. Für die Untersuchungen wurde die „sessile drop“-Methode verwendet. Die Kontaktwinkel wurden anhand der Laplace-Young-Fitting-Methode errechnet. Das Volumen der applizierten Tropfen (A. demin.) betrug 10 µl. Die Messungen auf Apfelblättern wurden auf der adaxialen Seite von vier verschiedenen Blattinsertionen durchgeführt. Es wurden sechs Sämlinge herangezogen, an denen pro Blattinsertion jeweils drei Messungen durchgeführt wurden (n = 18). Für Polystyrol wurden ebenfalls 18, für Glas und Parafilm jeweils 12 Messwiederholungen durchgeführt.

2.7 Erfassung der Pilzentwicklung

2.7.1 Konidiengröße

Konidien von *V. inaequalis* wurden vor und nach Wasseraufnahme mikroskopisch untersucht. Es wurden Länge, Breite und Höhe der Konidien gemessen. Anschließend wurde das Volumen

bestimmt. Die Berechnung des Volumens erfolgte nach folgender Formel (AUST 1981):

$$V = 4/3 * \pi * a * b * c$$

Dabei entsprach *a* der halben Konidienlänge, *b* der halben Konidienbreite und *c* der halben Konidienhöhe. Die Breite und Höhe wurden jeweils in der Mitte der Konidien gemessen. Pro Variante wurden 30 Konidien ausgewertet.

2.7.2 Keimung und Appressorienbildung

Die Keimrate sowie die Appressorienbildung der Konidien von *V. inaequalis* auf vier verschiedenen Blattinsertionen wurde durch Auszählen von maximal 40 x 10 zufällig gewählten Konidien auf Blattscheiben (Ø 9 mm) von sechs Pflanzen lichtmikroskopisch bestimmt. Auf Modelloberflächen wurden maximal 6 x 10 Konidien ausgezählt. Die Bestimmung der Keimrate und der Appressorienbildung erfolgte prozentual zu der Gesamtzahl ausgewerteter Konidien.

2.7.3 Keimschlauchwachstum

Das Keimschlauchwachstum wurde auf Apfelblättern und auf Modelloberflächen erfasst. Bei *V. inaequalis* wurde die Länge von dem ersten in der Konidie gebildeten Septum bis zur Keimschlauchspitze gemessen. Bildeten die Konidien ein Appressorium aus, so wurde das Appressorium in die Längenmessung mit einbezogen. Die Anzahl der gemessenen Keimschläuche war in den Versuchen unterschiedlich und variierte zwischen 25 und 120 pro Variante.

2.7.4 Melaninringausprägung und Eindringungsstelle

Für die Charakterisierung der melanisierten Ringstruktur im Appressorium wurden vier Klassen aufgestellt. Mittels dieser Klassen wurde die Ausprägung der Melaninringe auf Apfelblättern und Modelloberflächen bestimmt. Eine Klassifizierung wurde auch für die Beurteilung des Ortes der Eindringung des Pathogens in das Blatt vorgenommen. Die Klassen wurden folgendermaßen definiert:

Tab. 2: Charakterisierung der Melaninringausprägung im Appressorium bzw. der Eindringungsstelle von *V. inaequalis* auf Apfelblättern.

Klasse	Melaninringausprägung	Eindringungsstelle
1	schwach/sehr dünn/kaum sichtbar	über den antiklinen Zellwänden
2	dünn	≤ 3 µm Entfernung zu den antiklinen Zellwänden
3	mittelkräftig	> 3 und ≤ 10 µm Entfernung zu den antiklinen Zellwänden
4	sehr kräftig	> 10 µm Entfernung zu den antiklinen Zellwänden/auf der Zelle

2.7.5 Primärstroma- und Laufhyphenbildung

Um die Primärstromata und Laufhyphen im Mikroskop sichtbar machen zu können, wurden die Blattscheiben mit 0,05 % Anilinblau in 0,067 M K₂HPO₄ pH 9,0 (modifiziert nach HOOD und SHEW 1996) gefärbt. Vor der Aufbringung des Farbstoffes wurden die Blattscheiben für fünf Minuten in 0,067 M K₂HPO₄ pH 9,0 gelegt, um den pH-Wert zu erhöhen und damit die Anfärbbarkeit der Strukturen zu gewährleisten. Es wurden auf vier Blattscheiben je 4 x 10 Konidien von *V. inaequalis* ausgewertet. Für die Ermittlung des prozentualen Anteils gebildeter Primärstromata und Laufhyphen wurden nur diejenigen Konidien berücksichtigt, die nach 48 Stunden ein Appressorium bzw. ein Primärstroma gebildet hatten. Die Anzahl an ausgebildeten Appressorien variierte zwischen den Blattinsertionen von 31-36 pro Blattscheibe.

2.7.6 Bewertung des Pathogenbefalls

Der Pathogenbefall wurde makroskopisch durch die Bestimmung des prozentualen Anteils befallener Blattfläche pro Blattinsertion ermittelt. Es wurden acht Pflanzen ausgewertet. Innerhalb von 14 Tagen fanden drei Bonituren statt, so dass der zeitliche Verlauf der Symptomentwicklung auf vier verschiedenen Blattinsertionen festgestellt werden konnte.

2.8 Mikroskopische Untersuchungen

Mikroskopische Untersuchungen erfolgten mittels Durchlicht-, Stereo-, konfokaler Lasermikroskopie sowie Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie.

2.8.1 Durchlicht- und Auflichtmikroskopie

2.8.1.1 Präparation

Die Entwicklung von *V. inaequalis* auf Apfelblättern bis 48 Stunden nach der Inokulation wurde an fixierten Präparaten untersucht. Dazu wurden zu verschiedenen Zeiten nach Applikation und Inkubation mit einem Korkbohrer (Ø 9 mm) Blattproben genommen. Die Blattscheiben wurden in einer gesättigte Chloralhydratlösung (250 g 100 ml⁻¹ A. demin., Sigma-Aldrich, Steinheim) fixiert und dadurch das Blattgewebe fast vollständig entfärbt. Die Fixierung bzw. Entfärbung erfolgte über 21 Tage bei Raumtemperatur.

2.8.1.2 Farbstoffe

Zur Charakterisierung der pilzlichen Strukturen und Haftsubstanzen wurden verschiedene Farbstoffe getestet (Tab. 3). Auf die Konidiensuspension bzw. auf die nach dem Abwaschen noch vorhandenen Konidien, die sich auf Glasobjektträgern und Polystyrol befanden, wurden jeweils 10 µl des Farbstoffes gegeben und die Objekte dann unmittelbar am Mikroskop betrachtet.

PNA, GS-II und ConA, die im Abschnitt 2.8.3 genauer beschrieben werden, wurden auch am Leitz-Mikroskop verwendet. Entsprechend der Lektine wurde der Filterblock FI/RH (BP 490-560, FT 500, LP 525-605) ausgewählt, und die pilzlichen Strukturen im Auflicht fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

2.8.1.3 Mikroskopie

Untersuchungen zur pilzlichen Entwicklung und Anfärbbarkeit von Strukturen von *V. inaequalis* wurden mit einem Leitz DMRB Fotomikroskop (Leica, Wetzlar) durchgeführt. Die Betrachtung erfolgte mittels 40- und 100-facher Vergrößerung im Hellfeld, Nomarski-Interferenz-Kontrast sowie im Fluoreszenzmodus. Bei epifluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde je nach Farbstoff entweder der Filterblock D (BP 340-380, FT 400, LP 430) oder der Filterblock FI/RH (BP 490-560, FT 500, LP 525-605) ausgewählt. Die Dokumentation der Ergebnisse konnte durch eine am Mikroskop angeschlossene digitale Kamera (HV-C20A, Hitachi, Japan) gewährleistet werden. Das Vermessen einzelner Strukturen erfolgte mittels der Software Discus (Version 4.30.138, Technisches Büro Hilgers, Königswinter).

Tab. 3: Zusammenstellung der verwendeten Farbstoffe für die Lichtmikroskopie mit Angabe der Konzentration sowie deren Spezifität (Verwendung der Farbstoffe im Interferenz/Hellfeld (I) bzw. im Fluoreszenzmodus (F) mit Angabe des Filters).

Farbstoff	Konzentration	Spezifität der Färbung
Alcianblau 8 GS (Fluka, Buchs, Schweiz) (BRAUN und HOWARD 1994b)	1,0 % (in 5 % Essigsäure)	(I) Saure Mucosubstanzen (BANCROFT 1975); Saure Mucopolysaccharide (KH) (SPANNHOF 1967, STEEDMAN 1950)
Anilinblau (HOOD und SHEW 1996)	0,05 %	(F, Filter D) Callose; Glucan-Verbindungen in pilzlichen Zellwänden
Blankophor BA 267 %	1,0 %	(F, Filter D) Polysaccharide mit β -glykosidischen Verbindungen, pilzliche Zellwände
Coomassie Brilliantblau R 250 (Fluka, Buchs, Schweiz)	0,06 % (in 15 % TCA und A. demin.)	(I) Proteine (BRAUN und HOWARD 1994b)
blaue Tinte (Triarylmethan-Farbstoff, Resorcin)	1:1 mit A. demin. verdünnt (zentrifugiert)	(I)
Diethanol (Uvitex 2B)	0,05 %	(F, Filter D) Chitin von pilzlichen Zellwänden, Polysaccharide mit β -glykosidischen Verbindungen
Erythrosin B	1,0 %	(I) Cytoplasma (GERLACH 1969); zur Vitalfärbung (BÖCK 1989)

Fortsetzung von Tab. 3:	Konzentration	Spezifität der Färbung
Kongorot (Serva, Heidelberg)	0,1 % (0,1 g Kongorot und 0,05 ml EtOH in 100 ml A. demin.)	(I und F, Filter FI/RH) F: Polysaccharide (Chitin, Cellulose) (RONCERO und DURAN 1985); I: Cellulosefasern (GERLACH 1969), Polysaccharide enthaltende Amyloide (BÖCK 1989)
Methylenblau	0,02 %	(I) Polysaccharide, Nukleole, Ribosomen (BÖCK 1989); Pektinstoffe (GERLACH 1969)
Nigrosin (APOGA und JANSSON 2000)	2,0 %	(I) Polysaccharide außen an der Zellwand; Proteine (BRAUN und HOWARD 1994b)
Nilrot	0,12 % (in 98 % Ethanol)	(F, Filter FI/RH) Intrazelluläre, neutrale Lipidtropfen (GREENSPAN et al. 1985)
Säurefuchsin (Merck, Darmstadt)	0,01 % (in Lactophenol)	(I und F, Filter FI/RH) Kohlenhydrate, pilzliche Strukturen
schwarze Tinte (Pigmentfarbstoff)	unverdünnt	(I)
Sudan III (GERLACH 1969)	0,1 % (0,2 g in 100 ml abs. Isopropanol und 100 ml A. demin.)	(I) Lipide und fettartige Substanzen (GERLACH 1969); neutrale Fette, freie FS (GAHAN 1984)
Sudan Rot B	0,1 % (Ansatz siehe Sudan III)	(I) siehe Sudan III

Fortsetzung von Tab. 3:	Konzentration	Spezifität der Färbung
Toluidinblau	0,05 % (in 0,01 M PO ₄ -Puffer, pH 6)	(I) Phenole, Papillen, Polysaccharide; Mucopolysaccharide (KH) (SPANNHOF 1967); Nucleinsäure, Pektine (GAHAN 1984); Kernfärbung (BÖCK 1989)
Trypanblau	0,05 %	(I) Zellproteine, Kollagen; Cellulosefasern (GERLACH 1969); zur Vitalfärbung (BÖCK 1989)

2.8.2 Stereomikroskopie

Untersuchungen zur Wasseraufnahme und Entwicklung der globulären Struktur an der Konidienspitze von *V. inaequalis* wurden unter anderem an einem Stereomikroskop (MZ16 F Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Schweiz) durchgeführt. Eine angeschlossene digitale Kamera (HV-C20A, Hitachi, Japan) sowie die Software Discus (Version 4.60.1517, Technisches Büro Hilgers, Königswinter) gewährleisteten eine Dokumentation der Bilder. Das Stereomikroskop zeichnete sich durch eine hohe Auflösung von bis zu 840 Linienpaaren mm⁻¹ aus, so dass auch kleinere Strukturen wie Konidien gut betrachtet werden konnten. Die Konidien wurden mit 500-facher Vergrößerung betrachtet. Sie wurden nicht präpariert, sondern direkt nach Abbürsten von Blättern mit sporulierenden Befallsstellen im trockenen und nassen Zustand auf Glas betrachtet.

2.8.3 Konfokale Lasermikroskopie

2.8.3.1 Präparation

Die Untersuchung der Konidien und deren Keimstrukturen auf Glasobjektträgern erfolgte 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 und 24 Stunden nach der Zugabe von Wasser zu den Konidien. Es wurden 20 µl-Tropfen der Suspension auf eine Glasoberfläche appliziert. Zur Unterbrechung der Entwicklung nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden 5 µl Formaldehyd (3,5 %) zugegeben. In der

Regel wurden 10 μl eines Lektins auf die inkubierten Tropfen aufgebracht und die Konidien unmittelbar danach betrachtet. Pro Untersuchungszeitpunkt wurden 30 Konidien ausgewertet.

2.8.3.2 Lektine

Für den Nachweis von Zellwandkomponenten und den gebildeten Haftsubstanzen von *V. inaequalis* wurden Lektine (Molecular Probes, Leiden, NL) verwendet. Durch die Kopplung der Lektine an einen Fluoreszenzfarbstoff wird deren Bindung an bestimmte Monosaccharide sichtbar.

Wheat Germ Agglutinin (WGA)

WGA dient zum Nachweis von Zuckerliganden. Es bindet mit abnehmender Bindungsstabilität an β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₃ und β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₂N-Acetylneuraminsäure. Zur Herstellung der Lektin-Suspension wurden 5 mg des Oregon Green[®]-markierten WGA in 2,5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4 gelöst (Tab. 4). Die Markierung der Monosaccharide erfolgte nach Verdünnen dieser Lösung mit PBS auf 0,1 mg ml⁻¹.

Tab. 4: Zusammensetzung und Ansatz der phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS).

8,0 g	NaCl
0,2 g	KCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄
1,44 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
ad 1000 ml	A. demin., pH-Wert mit 3 M NaOH auf 7,4 einstellen

Concanavalin A (Con A)

Concanavalin A bindet an α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin. Es wurden 10 mg des mit Texas Red[®] markierten ConA in 1 ml PBS gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit PSB auf 0,1 mg ml⁻¹ bzw. 1 mg ml⁻¹ verdünnt.

Peanut Agglutinin (PNA)

PNA weist eine Spezifität für terminale β -Galaktosereste von Glykoproteinen auf. Es wurde 1 mg des Alexa Fluor 488-markierten PNA in 1 ml demineralisiertem Wasser gelöst. Vor der Verwendung wurde die Lösung auf 0,1 mg ml⁻¹ verdünnt.

GS-II

GS-II, isoliert aus *Griffonia simplicifolia*, ist das einzige bekannte Lektin, welches mit hoher Selektivität an terminale, nicht-reduzierte α - und β -N-Acetyl-D-Glucosaminyreste von Glykoproteinen bindet. Zur Herstellung der Lösung wurden 500 μg GS-II, ebenfalls Alexa Fluor 488-markiert, in 500 μl 0,1 mM CaCl_2 -Puffer, pH 7 gelöst, und anschließend auf eine Konzentration von 0,1 mg ml^{-1} verdünnt.

2.8.3.3 Mikroskopie

Die Betrachtung erfolgte am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop LSM 310 (CLSM, Zeiss, Oberkochen) mit einem 100er Ölimmersions-Objektiv. Es standen zwei Laser sowie verschiedene Bandpassfilter für die jeweiligen Lektine zur Verfügung (Tab. 5). Die Scanzeit betrug für alle aufgenommenen Bilder 32 Sekunden.

Tab. 5: Anregungswellenlängen der Laser sowie Emissionswellenlängen der Bandpassfilter für die konfokale Lasermikroskopie bei Verwendung verschiedener Lektine.

Lektin mit gebundenem Farbstoff	Anregungswellenlängen der Laser [nm]	Bandpassfilter für die Emission [nm]
Wheat Germ Agglutinin mit Oregon Green [®]	488	510-565
Concanavalin A mit Texas Red [®]	543	575-640
Peanut Agglutinin mit Alexa Fluor [®]	488	510-565
GS-II mit Alexa Fluor [®]	488	510-565

2.8.4 Transmissionselektronenmikroskopie

2.8.4.1 Präparation

Von Befallsstellen abgebürstete trockene Konidien wurden auf einen sauberen Objektträger gegeben und für 24 Stunden im Osmiumtetroxid (OsO_4)-Dampf (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim) bei Raumtemperatur inkubiert. Osmiumtetroxid ist flüssig, gast allerdings sehr schnell aus, so dass der entstehende Dampf zur Vorfixierung von Proben genommen werden

konnte. Um hydrierte Konidien zu untersuchen, wurden diese in ein als kleines Tütchen gefaltetes Filterpapier gegeben und für wenige Sekunden bzw. eine Stunde in Wasser gehalten. Anschließend wurden die trockenen und hydrierten Konidien in Agar (SeaPlaque Agarose low melting, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) eingebettet. Nach Festwerden des Agars erfolgte eine Fixierung zur Strukturhaltung der Proben nach KARNOVSKY (1965) in einer Lösung aus 8 % Paraform- und 8 % Glutaraldehyd in 0,2 M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,3) bei Raumtemperatur für 2,5 Stunden. Anschließend wurden die Proben fünfmal in 0,2 M Na-Cacodylat-Puffer gewaschen und in einer Osmiumtetroxid-Fixierlösung nach DALTON (1955) nachfixiert (Tab. 6). Osmiumtetroxid erhöht die Elektronenabsorption and führt zu einem besseren Photokontrast. Chrom in der Fixierlösung sorgt für die Strukturhaltung des Gewebes und hilft bei der Fixierung von Lipiden (PLATTNER 1981). Nach erneutem achtmaligen Waschen in Na-Cacodylat-Puffer wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (15 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 100 %) für jeweils 20 Minuten dehydriert. Die Einbettung der Proben erfolgte mit ERL-Harz nach SPURR (1969) (Tab. 6). Dazu wurden die Proben in einer aufsteigenden ERL-Harz-/Propylenoxid-Reihe (1:3 für 16 Stunden, 1:1 für 8 Stunden, 3:1 für 16 Stunden) bei 4 °C überführt. Abschließend erfolgte die Polymerisation in 100 % ERL-Harz in Flacheinbettungsschalen (Agar Aids Ltd., Stansted, UK) für acht Stunden bei 70 °C.

Semidünnschnitte

Semidünnschnitte mit einer Dicke von 500 nm wurden mit einem 45°-Glasmesser geschnitten und direkt in demineralisiertem Wasser suspendiert. Anschließend wurden die Schnitte in einem Wassertropfen auf Glasobjektträger gelegt und auf einer Heizplatte bei 70 °C getrocknet. Die Färbung der Semidünnschnitte erfolgte in 0,05 % Toluidinblau (w/v) in 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,4). Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Schnitte zuerst in Leitungswasser und anschließend für je fünf Minuten in demineralisiertem Wasser und in Xylol gespült. Dann wurden sie in Entellan rapid mounting media (Merck, Darmstadt) gegeben und über Nacht im Exsikator getrocknet. Die Betrachtung der Schnitte erfolgte am Lichtmikroskop (DMRB, Leica, Wetzlar) im Hellfeld.

Ultradünnschnitte

Zeigten die Semidünnschnitte im Lichtmikroskop die gewünschten Strukturen wurden aus demselben Blöckchen Ultradünnschnitte geschnitten. Die Herstellung der Ultradünnschnitte erfolgte auf einem Ultramikrotom Ultracut E (Reichert-Jung, Nussloch) in einer Dicke von 62-66 nm mit einem Diamantmesser. Die Schnitte wurden auf Nickelnetzchen (Plano, Wetzlar)

übertragen, welche Maschenweiten von 100-150 mesh pro Inch aufwiesen, und anschließend getrocknet.

Die Verstärkung des Kontrastes durch die Anlagerung von elektronendichtem Material in Form von Schwermetallsalzen wurde durch eine Kontrastierung nach GEYER (1973) erreicht. Dazu wurden die Netzchen für acht Minuten in 2 % Uranylacetat inkubiert, anschließend zweimal in demineralisiertem Wasser gewaschen und dann für zwei Minuten in eine Bleicitratlösung nach REYNOLDS (1963) gegeben (Tab. 6). Nach erneutem zweimaligen Waschen der Netzchen in demineralisiertem Wasser wurden sie getrocknet und bei Raumtemperatur in Grid-Boxen (4828B, LKB, Stockholm, Schweden) gelagert.

Tab. 6: Für die Fixierung und Einbettung von Proben verwendete Lösungen in der Transmissions-Elektronenmikroskopie.

Osmiumtetroxid-Fixierlösung (nach DALTON 1955)	ERL-Harz (nach SPURR 1969)	Bleicitratlösung (nach REYNOLDS 1963)
1 Teil 0,4 % KCr_2O_7	10,0 g ERL-4206	1,33 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
1 Teil 3,4 % NaCl	(Vinylcyclohexandioxid)	1,76 g $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2 \text{H}_2\text{O}$
2 Teile 2,0 % OsO_4	4,0 g D.E.R. 736	mit 30 ml A. demin. mischen,
	(Diglycidaminoethanol von	3 min kräftig schütteln und
	Polypropylenglycol)	30 min dunkel stellen,
	26,0 g NSA	mit A. demin. auf 50 ml
	(Nonenylsuccinatanhydrid)	auffüllen,
	0,4 g S-1	pH-Wert mit 1 N NaOH auf
	(Dimethylaminoethanol)	12,0 einstellen

2.8.4.2 Mikroskopie

Für die Auswertung der Ultradünnschnitte stand ein Transmissionselektronenmikroskop EM 109 (Zeiss, Jena) zur Verfügung. Die Spannung betrug 50 kV. Zur Aufnahme der pilzlichen Strukturen wurden Schwarz-Weiß-Filme mit ISO 25 (Technical Pan TP 6415, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) verwendet. Die Negativabzüge wurden mit einer Auflösung von 1200 dpi eingescannt (HP Scanjet 7400C, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen). Weitere Aufnahmen wurden mit einem CM 10 (Philips, Eindhoven, Niederlande) durchgeführt², welches mit einer

² Mit freundlicher Unterstützung von Herrn J. Bedorf, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Bonn

Digitalkamera ausgestattet war (Mega View III Soft Imaging System[®], Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster). Die Betrachtung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 60 kV.

2.8.5 Rasterelektronenmikroskopie

Die Oberflächenstruktur von Apfelblättern sowie die Oberfläche der Konidien und Infektionsstrukturen von *V. inaequalis* wurden mit einem JSM-5600 LV (JEOL, Eching) untersucht³. Aus der Mitte der Blattspreite von unbehandelten und mit *V. inaequalis* inokulierten Blättern wurde ein ca. 1 cm² großes Stück ausgeschnitten und mit einem Polycarbonat-Klebeetikett auf den Aluminiumprobenteller befestigt. Auch trockene Konidien bzw. Konidien, die fünf Minuten in Wasser inkubiert wurden, wurden auf diese Weise platziert. Das Wasser der Suspension wurde kurz vor der Goldbeschichtung mittels Filterpapier abgesaugt. Alle Proben wurden bei 30 mA für 100 Sekunden mit Gold besputtert (Sputter SCD 005, BAL-TEC AG, Liechtenstein) und bei 7-10 kV unter Hochvakuum-Bedingungen mit einem Secondary Electron Image (SEI)-Detektor ungekühlt betrachtet.

2.9 Untersuchungen zur Haftfähigkeit von Konidien von *V. inaequalis*

2.9.1 Allgemeine Vorgehensweise

V. inaequalis wurde auf seine Fähigkeit hin untersucht auf Apfelblättern und Modelloberflächen zu haften. Auf die zu testende Oberfläche wurden je vier Tropfen einer Konidien suspension á 5 µl gegeben und in einer Kunststoffbox bei 19 ± 1 °C und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Konidiendichte lag zwischen $4 - 6 \times 10^4$ Konidien ml⁻¹. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0, 1, 5, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 und 48 h) wurden die Tropfen mit 50 ml Leitungswasser abgewaschen und die Anzahl der noch haftenden Konidien innerhalb einer Markierung am Mikroskop gezählt. Das Wasser wurde aus einer Höhe von ca. vier Zentimetern auf die Oberfläche gegeben, welche in einem 45°-Winkel gehalten wurde. Die prozentuale Adhäsion der Konidien auf der Oberfläche wurde aus dem Verhältnis der nach dem Abwaschen vorhandenen Konidien zu der ursprünglich zugegebenen Konidienanzahl bestimmt. In allen Versuchen zur Haftfähigkeit wurden die Konidien von jeweils vier Tropfen ausgezählt (n = 4).

³ Mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Pontzen und Herrn S. Teitscheid, Abteilung Formulertechnik, Bayer CropScience AG, Monheim

2.9.2 Hemmstoffe und Detergenzien

Um zu untersuchen, ob ein aktiver Stoffwechsel für die Adhäsion nötig ist bzw. ob es sich bei der Haftsubstanz um eine präformierte Substanz handelt, wurden 11 verschiedene Hemmstoffe und Detergenzien zur Konidiensuspension zugegeben (Tab. 7). Als Kontaktfläche diente Polystyrol. Die Konidiensuspensionen wurden vor der Applikation auf die Oberfläche mit den Substanzen versehen und dann wie oben beschrieben inkubiert und abgewaschen.

Außerdem wurde untersucht, ob die Zugabe von 5 µl einer 0,2 %igen SDS-Lösung einen Einfluss auf die Haftfähigkeit der Konidien hat, wenn es erst fünf Minuten vor dem Abwaschprozess zugegeben wird. Um ein identisches Tropfenvolumen in beiden Varianten zu haben, wurden bei der Kontrollvariante 5 µl demineralisiertes Wasser zugegeben.

2.9.3 Vorbehandlung der Konidien in Wasser

Es wurde untersucht, ob eine vorherige mehrstündige Vorbehandlung der Konidien in Wasser einen Einfluss auf die Haftfähigkeit und die Entwicklung von *V. inaequalis* hat. Dazu wurden Konidiensuspensionen mit einer Dichte von ca. $4-5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ für 1, 3, 4, 6, 8 und 24 Stunden im Eppendorfgemisch durch einen Überkopfschüttler (36 U min^{-1}) geschüttelt und dann erst auf eine Polystyrol-Oberfläche aufgebracht. Die Gefäße der geschüttelten Variante wurden stündlich geöffnet, um eine ausreichende Versorgung der Konidien mit Sauerstoff zu gewährleisten.

2.9.4 Lösungen zum Abwaschen der appressorialen Haftsubstanz

Auf Polystyrol gekeimte Konidien mit Appressorien wurden mit verschiedenen Lösungen gewaschen, um festzustellen, wodurch sich die Haftsubstanz von der Unterlage ablösen ließ. Neben demineralisiertem Wasser als Kontrolle dienten ein Extraktionspuffer (MANKEL 2001), Trifluoressigsäure (TFA), $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Proteinase K, 10 % SDS sowie 60 % iger und 98 % iger Alkohol als Versuchslösungen. Die Lösungen wurden in Glasgefäße gegeben und die Polystyrolstückchen mit den daran anhaftenden Haftsubstanzen der Appressorien für eine und fünf Minuten sowie 12 Stunden darin inkubiert.

Tab. 7: Zur Kondiensuspension von *V. inaequalis* zugegebene Hemmstoffe und Detergenzien mit Angaben zur verwendeten Konzentration und zum Hersteller.

Substanz	Konzentration	Hersteller/Anbieter
Actinomycin D	200 µg ml ⁻¹	AppliChem GmbH, Darmstadt
Benocap [®] (Flusilazol)	0,0125 %	DuPont de Nemours Deutschland GmbH
Chloramphenicol	10 µg ml ⁻¹	Fluka-Chemie AG, Buchs, Schweiz
Cycloheximid	10 µg ml ⁻¹	AppliChem GmbH, Darmstadt
Discus [®] 50 WG (Kresoxim-methyl)	0,0125 %	BASF AG, Ludwigshafen
Flint [®] 50 WG (Trifloxystrobin)	0,0125 %	Bayer CropScience Deutschland GmbH, Langenfeld
Kresoxim-methyl CGA 311089 (mit 1000 ppm Aceton, 200 ppm NP 15 in 100 ml Reinstwasser)	0,00625 %	BASF AG, Ludwigshafen
Methanol	5,5 %	Merck, Darmstadt
Proteinase K	100 µg ml ⁻¹ und 10 µg ml ⁻¹	AppliChem GmbH, Darmstadt
Sodium dodecylsulfate (SDS)	0,2 % und 0,02 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween 80	0,01 % und 0,001 %	Merck, Darmstadt

Außer Kresoxim-methyl wurden alle Substanzen mit A. demin. angesetzt.

2.10 Biochemische Methoden

2.10.1 Aufreinigung von hydrophoben Proteinen

Die Isolation von hydrophoben Proteinen erfolgte nach einer abgeänderten Methode von MANKEL (2001). Die Reinigung wurde sowohl aus Konidien als auch aus dem Medium - Reinstwasser, in dem die Konidien 18 Stunden inkubiert wurden - vorgenommen. Zunächst wurden die Konidien mit dem Medium bei 4 °C für 30 Minuten bei 30.100 g zentrifugiert (Avanti[®] Centrifuge J-25, Beckmann, Krefeld). Der Überstand wurde abgenommen und das Konidienpellet mit flüssigem Stickstoff gefroren und gemahlen. Die Konidienbestandteile

wurden in einem Extraktionspuffer (2 % SDS; 0,05 M Tris-HCl, pH 6,8) aufgenommen, und das Ganze für 10 Minuten aufgekocht. Anschließend wurde wieder für 30 Minuten zentrifugiert (23.269 g, 4 °C). Das nach der Zentrifugation gewonnene Sediment wurde viermal mit Reinstwasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet (Lyovac GT 2, Leybold-Heraeus GmbH, Köln). Dann erfolgte eine Extraktion mit eiskalter Trifluoressigsäure (TFA) für zwei Stunden bei 4 °C. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 23.269 g, 4 °C) wurde der TFA-haltige Überstand abgenommen und im Stickstoff-Strom getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert, und schließlich unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation (2 min, 18.403 g) entfernt (PK 121 R, ALC Int., Mailand, Italien).

Für die Reinigung aus dem Medium wurde dieses mit einem Labormixer (Ultra Turrax T25 basic, IKA[®] Labortechnik, Staufen) für sieben Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (24.000 min⁻¹) mit Luft durchmischt. Dann wurde das Medium mit dem entstandenen Schaum für 30 Minuten bei 30.100 g und 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Sediment wurde zweimal mit Reinstwasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Alle weiteren Schritte entsprachen denen der Reinigung aus Konidien.

2.10.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinkonzentration wurde nach BRADFORD (1976) bestimmt. Als Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung diente der Wert der Adsorption bei 595 nm. Zur Herstellung des Bradford-Reagenzes wurden 100 mg Coomassie brilliant blue 250 G (Serva, Heidelberg) in 100 ml H₃PO₄ (85 % v/v) und 50 ml Methanol über Nacht im Dunkeln gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit Reinstwasser auf einen Liter aufgefüllt und einmal gefiltert. Die Messung des Proteingehaltes erfolgte mit Hilfe eines Spektrophotometers (LKB Ultrospec III[®], Pharmacia, Freiburg). Dazu wurden 10 µl der Proteinprobe mit 990 µl des Bradford-Reagenzes versetzt, und nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln bei 595 nm die Absorption gemessen. Rinderserumalbumin (BSA) diente als Standard für die Eichgerade.

2.10.3 Methanolfällung

Da die Proteinmengen sehr gering waren, mussten die Proteine aufkonzentriert werden, um sie im Gel sichtbar machen zu können. Dazu wurde eine definierte Menge der Proteinlösung mit dem dreifachen Volumen Methanol versetzt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -80 °C. Danach

wurden die Proben zentrifugiert (15 min, 18.403 g, 4 °C), der Überstand abgenommen und das Sediment getrocknet.

2.10.4 Proteingelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Es wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte nach dem Bio-Rad-Protokoll mit Mini-Protean® II-Gelelektrophoresekammern (Bio-Rad, München). Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 8 aufgeführt. Die Geldicke betrug 0,5 mm. Zur Probenvorbereitung wurden die nach der Methanolfällung getrockneten Proben mit TFA versehen und für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13.521 g, 4 °C) wurde der TFA-haltige Überstand abgenommen und im Stickstoff-Strom getrocknet. Das Sediment wurde mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert (Tab. 9). Von jeder Probenlösung wurden 20 µl auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief 70 Minuten bei einer Spannung von konstant 120 V. Der Laufpuffer bestand aus 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin und 0,1 % SDS. Als Proteingrößenstandards wurden „SeeBlue Plus2 Prestained Standard“ (Invitrogen, Paisley, Schottland) und „Protein Molecular Weight Marker“ # SM0431 (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

Tab. 8: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Lösung	Acrylamid-Endkonzentration	
	Trenngel (15%)	Sammelgel (5%)
Reinstwasser	2,3 ml	3,4 ml
30 % Acrylamid/Bis	5,0 ml	0,83 ml
Tris-HCl	2,5 ml	0,63 ml
	(1,5 M, pH 8,8)	(0,5 M, pH 6,8)
10 % SDS	100 µl	50 µl
10 % Ammoniumpersulfat	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	5 µl

2.10.5 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen

Zur Detektion der Proteine im Polyacrylamidgel wurde die Methode von REISNER et al. (1975) verwendet. Die Coomassie-Färbelösung bestand aus 1,25 g Coomassie brilliant blue 250 G, 454 ml 50 % Ethanol und 46 ml Essigsäure. In dieser Lösung wurden die Gele für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (SM, Edmund Bühler GmbH, Tübingen) inkubiert, und anschließend in eine Lösung zur Entfärbung gegeben. Die Entfärbelösung wurde aus 75 ml Essigsäure, 50 ml Ethanol und 875 ml Reinstwasser hergestellt. Die Gele wurden für ca. zwei Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich der Gelhintergrund soweit aufgehellt hatte, dass die Proteinbanden sichtbar wurden.

Tab. 9: Zusammensetzung des 5x SDS-Ladepuffers für die SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

7,5 %	Reinstwasser
12,5 %	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
50,0 %	Glycerin
20,0 %	SDS (10 % w/v)
5,0 %	β -Mercaptoethanol
5,0 %	Bromphenolblau (0,5 % w/v)

2.10.6 Sequenzierung der Proteine

Die Sequenzierung der Proteine aus ausgewählten Banden wurde von der Firma OMX (München) durchgeführt. Die nach der Färbung sichtbaren Banden wurden vorsichtig mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß verschickt. Zunächst wurden die Proben vorbereitet, wobei ein Verdau der Proteine mit Trypsin bzw. Thermolysin durchgeführt wurde. Außerdem wurde bei der Probe A zusätzlich eine chemische Aufspaltung mit HCl versucht. Es folgte die Extraktion der Peptide sowie eine Entsalzung und anschließende Konzentrierung der Proben. Die Messung erfolgte per offline nano-ESI-MS (nano-electrospray-ionization mass spectrometry). Relevante Peptide wurden mittels Datenbanksuche über Peptide Mass Fingerprint (PMF, Suchmaschine: Mascot) identifiziert.

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS für Windows, Vers. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Daten wurden mit dem Kolmogoro-Smirnov-Anpassungstest

auf Normalverteilung und mit dem Levene-Test auf Varianzgleichheit überprüft. Es wurde in der Regel eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angenommen. In seltenen Fällen betrug die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,01$. Waren die Voraussetzungen erfüllt, wurden die Werte durch die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verrechnet. Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurden mit dem t-Test, bei mehr als zwei Varianten mit dem Tukey-Test verrechnet. Bei Werten, die nicht normalverteilt waren, wurden nichtparametrische Tests durchgeführt. Dafür standen der Kruskal-Wallis-H-Test (mehrere Varianten) und der Mann-Whitney-U-Test (Paarvergleich) zur Verfügung. In den Tabellen und Abbildungen werden signifikante Unterschiede der Mittelwerte durch unterschiedliche Buchstaben sowie Sternchen gekennzeichnet. In der Regel werden Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SE) angezeigt. Alle Laborversuche wurden mindestens zweimal durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, wenn nicht anders vermerkt, einzelne, repräsentative Versuche.

3 ERGEBNISSE

Der Erreger des Apfelschorfs, *Venturia inaequalis*, bildet asexuelle Sporen, die für die Ausbreitung der Krankheit im Bestand eine große Bedeutung haben. Zu Beginn ihrer Entwicklung sind diese Konidien auf tropfbares Wasser auf der Pflanzenoberfläche angewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Blattalters von Apfelsämlingen auf die Anheftung, Keimung sowie die Bildung von Infektionsstrukturen von *V. inaequalis* untersucht. Des Weiteren wurden Untersuchungen auf Modelloberflächen durchgeführt, um zu überprüfen inwieweit die Hydrophobizität und Festigkeit einer Oberfläche beeinflussende Faktoren für die Anheftung und Entwicklung darstellen. Der Prozess der Anheftung auf verschiedenen Oberflächen wurde dabei genau betrachtet. Zudem wurden die Kontaktoberflächen vor dem Zusammentreffen mit dem Pathogen charakterisiert

3.1 Charakterisierung von Apfelblättern in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums

Um den dynamischen Prozess der Blattentwicklung zu charakterisieren, wurde die adaxiale Seite vier verschiedener Blattinsertionen von Apfelsämlingen hinsichtlich ihrer Oberflächeneigenschaften und Morphologie untersucht.

3.1.1 Wachstum von Apfelblättern

Für die Untersuchung wurden Apfelsämlinge gewählt, die seit der Aussaat 40 Tage unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus gewachsen waren. Am Ende der Messungen hatten sie somit ein Alter, welches dem Alter der Pflanzen aus den anderen Versuchen entsprach. Die Entwicklung von Apfelblättern wurde anhand mehrerer Messungen innerhalb von 16 Tagen ermittelt. Es wurde die Fläche aller am Sämling vorhandenen Blätter gemessen. Blattinsertion 1 war am Ende der Untersuchung das jüngste Blatt, Blattinsertion 12 das älteste Blatt (Tab. 10). Die Pflanzen bildeten alle vier bis fünf Tage ein neues Blatt aus. Diese jungen Blätter verdoppelten innerhalb von vier Tagen ihre Fläche. Mit zunehmendem Alter nahm die Wachstumsrate kontinuierlich ab, und erreichte ca. 20 Tage nach dem Erscheinen des ersten Blattes einen Wert von null. Blätter der unteren Blattinsertionen, also ältere Blätter, blieben kleiner als jüngere Blätter höherer Blattinsertionen, die zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung des Sämlings gebildet wurden. Zu Beginn der Messungen hatte das größte voll entfaltete Blatt eine Fläche von fast 18 cm², 16 Tage später von ca. 23 cm².

Tab. 10: Entwicklung der Fläche von Apfelblättern während der Ontogenese der Apfelsämlinge mit Darstellung der relativen Wachstumsrate (MW \pm SE, n = 6).

Tag	Blattfläche \pm SE [cm ²] und relative Wachstumsrate pro Tag [cm ² Tag ⁻¹]											
	Blattinsertion											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0						2,87 \pm 0,47	11,27 \pm 1,87	17,42 \pm 0,66	15,97 \pm 2,92	16,76 \pm 1,84	14,06 \pm 0,75	12,69 \pm 2,34
4				1,51 \pm 0,03	3,92 \pm 1,23	0,378	0,107	0,039	0,011	0,002	0,001	0,000
8			2,82 \pm 0,33	0,414	0,246	0,108	0,032	0,009	0,006	0,000	0,000	0,000
12		2,79 \pm 0,37	0,327	0,163	0,119	0,029	0,009	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
16	3,72 \pm 1,08	0,217	0,103	0,037	0,039	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Endgröße	3,72 \pm 1,08	6,64 \pm 2,99	15,75 \pm 4,28	17,57 \pm 4,49	19,79 \pm 2,44	20,78 \pm 1,91	20,46 \pm 2,43	21,30 \pm 1,24	17,07 \pm 3,07	16,88 \pm 1,89	14,12 \pm 0,73	12,94 \pm 2,32

Publiziert in Bringe et al. (2006)

3.1.2 Struktur von Apfelblattoberflächen

Zur Charakterisierung des Apfelblattes wurden die Oberflächen verschiedener Blattinsertionen am Rasterelektronenmikroskop betrachtet und die Zellfläche und Zellhöhe von Epidermiszellen berechnet.

3.1.2.1 Topographie

Die Oberfläche zeigte im Rasterelektronenmikroskop das für Dikotyledonen typische Puzzleartige Muster der Epidermiszellen. Auf der adaxialen Seite befanden sich keine Stomata. Das Blattalter hatte einen Einfluss auf die Oberflächenstruktur. Junge Blätter („oben“) wiesen eine hohe Anzahl an stark ausgeprägten Lamellen, vor allem in der Mitte der Epidermiszellen, auf. Die Oberfläche hatte eine wellenartige Struktur, die auf die starken Wölbungen der periklinen Zellwände zurückzuführen war (Abb. 2 A und C). Epikutikulare Wachskristalle wurden nicht nachgewiesen. Im Laufe ihrer Entwicklung wurde die Oberfläche der Blätter bzw. die Epidermisoberfläche glatter. Die Lamellen waren weniger ausgeprägt und die Anzahl der kutikularen Lamellen pro Zelle nahm ab (Abb. 2 B und D).

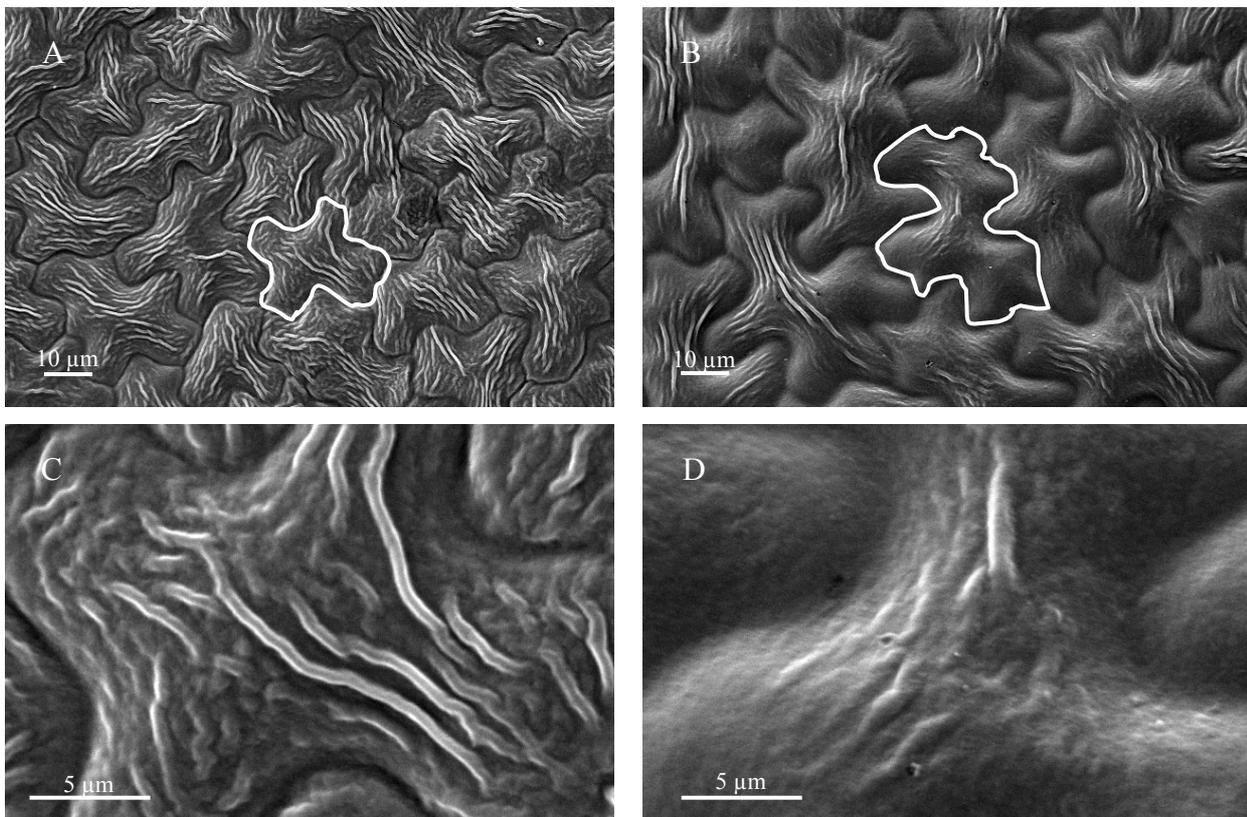


Abb. 2: Einfluss der Blattinsertion auf die Struktur der epikutikularen Wachse auf der Epidermis der adaxialen Blattseite von acht Wochen alten Apfelsämlingen (A und C: Blattinsertion „oben“, B und D: Blattinsertion „oben-6“, Rasterelektronenmikroskopie).

Querschnitte von jungen Blättern zeigten, dass die stark ausgeprägten Lamellen nicht nur aus Wachs (dunkle Oberfläche) bestanden, sondern auch mit Bestandteilen der Epidermiszellwand (helle Bereiche) gefüllt waren (Abb. 3 A). Es war ebenfalls der schichtweise Aufbau der Cellulosefasern in der Zellwand zu sehen. Bei älteren Blättern waren die Lamellen kleiner und weniger Zellwandbestandteile war in den Leisten vorhanden (Abb. 3 B). Zudem wirkte die Oberfläche diffuser und weniger scharf abgegrenzt als auf jungen Blättern. Des Weiteren wurde sichtbar, dass die Dicke der Zellwand inklusive der Kutikula von jungen zu alten Blättern deutlich zunahm. Während sie bei jungen Blättern eine Dicke von nur ca. 1,4 μm aufwies, war sie bei alten Blättern mehr als doppelt so dick.

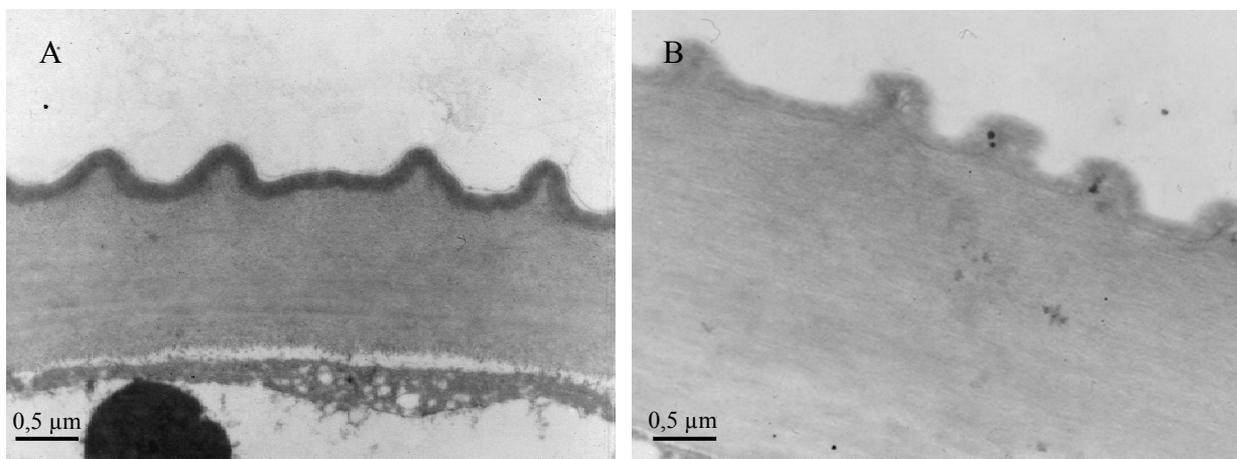


Abb. 3: Einfluss der Blattinsertion auf die Entwicklung der Lamellen auf der adaxialen Blattseite von acht Wochen alten Apfelsämlingen (A: Blattinsertion „oben“, B: Blattinsertion „oben-6“, Transmissionselektronenmikroskopie 80 kV).

3.1.2.2 Zellfläche und -höhe

Die Zellfläche und -höhe von Epidermiszellen der adaxialen Seite von Apfelblättern wurde mittels CLSM ermittelt. Die Oberfläche der Zellen vergrößerte sich von ca. 630 μm^2 bei der Blattinsertion „oben“ auf ca. 2220 μm^2 bei der Blattinsertion „oben-4“ (Tab. 11). Das älteste Blatt („oben-6“) wies mit ca. 1976 μm^2 wieder eine kleinere Zellfläche auf. Die Höhe der Epidermiszellen nahm im Laufe der Blattentwicklung ab. Sie war mit 26,8 μm bei der Blattinsertion „oben“ am größten. Die größte Differenz von fast 7 μm wurde zwischen der jüngsten und der ältesten Blattinsertion gemessen. Die Veränderung der Zellhöhe bestätigte die Beobachtungen der veränderten Oberflächenstruktur auf alten und jungen Blättern.

Tab. 11: Einfluss der Blattinsertion auf die Fläche und Höhe von Epidermiszellen der adaxialen Seite von Apfelblättern (MW \pm SE).

	Blattinsertion			
	oben	oben-2	oben-4	oben-6
Zellfläche [μm^2]	634 \pm 20 d ¹	1566 \pm 52 c	2224 \pm 82 a	1976 \pm 51 b
Zellhöhe [μm]	26,8 \pm 0,5 a	26,0 \pm 0,5 a	22,7 \pm 0,4 b	20,1 \pm 0,5 c

¹ Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$
publiziert in Bringe et al. (2006)

3.1.3 Chemische Charakterisierung der kutikularen apolaren Wachse

Die chemische Zusammensetzung der kutikularen apolaren Wachse, die von der adaxialen Seite von Apfelsämlingen extrahiert wurden, wurde in Abhängigkeit vom Blattalter vier verschiedener Blattinsertionen untersucht. Die durchschnittliche detektierbare Menge der apolaren Wachse pro Flächeneinheit betrug auf der Blattinsertion „oben“ 3,6 $\mu\text{g cm}^{-2}$ und nahm auf den anderen Blattinsertionen bis auf 1,9 $\mu\text{g cm}^{-2}$ („oben-6“) signifikant ab (Abb. 4). Die Menge der apolaren Wachse pro Blatt hingegen nahm zunächst zu, dann aber wieder etwas ab. Signifikante Unterschiede konnten nur zwischen Blattinsertion „oben“ und „oben-2“ festgestellt werden (Abb. 5). Während der Ontogenese nahm die Fläche junger Blätter zu, während die Menge der apolaren Wachse pro Flächeneinheit abnahm.

In den untersuchten Wachsfraktionen konnten sechs Substanzklassen identifiziert werden. Dabei handelte es sich um primäre Alkohole, Säuren, Ester, Triterpene, Alkane und Sterole. Die primären Alkohole setzten sich aus geradzahligem Komponenten von C₂₀ - C₃₂ zusammen. Detektierte Säuren wiesen geradzahlige Kettenlängen von 20 – 26 C-Atomen auf, und bei den Estern traten geradzahlige Einzelkomponenten mit Kettenlängen von 40 – 48 und 52 C-Atomen auf. Des Weiteren wurden Alkane mit ungeradzahligem Einzelkomponenten von C₂₇ – C₃₁ gefunden. Die Triterpene setzten sich aus Oleanolsäure und Ursolsäure zusammen, die Sterole bestanden aus β -Sitosterol und Stigmasterol.

Bei jungen Blättern („oben“) gehörten Ester, Triterpene und primäre Alkohole zu den Hauptsubstanzklassen (Abb. 6). Im Laufe der Ontogenese nahm der prozentuale Gehalt an Triterpenen von 31 % auf 8 % ab, dagegen nahm der Gehalt an primären Alkoholen von 21 % auf 39 % zu. Der prozentuale Anteil der primären Alkohole war mit fast 50 % der Gesamtmenge

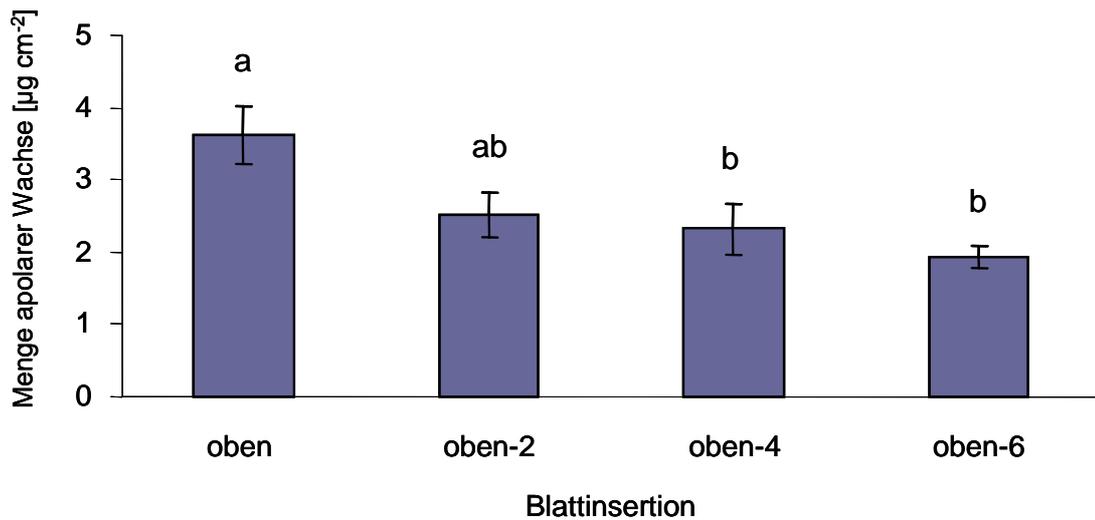


Abb. 4: Einfluss der Blattinsertion auf die Menge apolarer Wachse pro Flächeneinheit der auf der adaxialen Seite detektierten Wachskomponenten von Apfelblättern (MW \pm SE, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

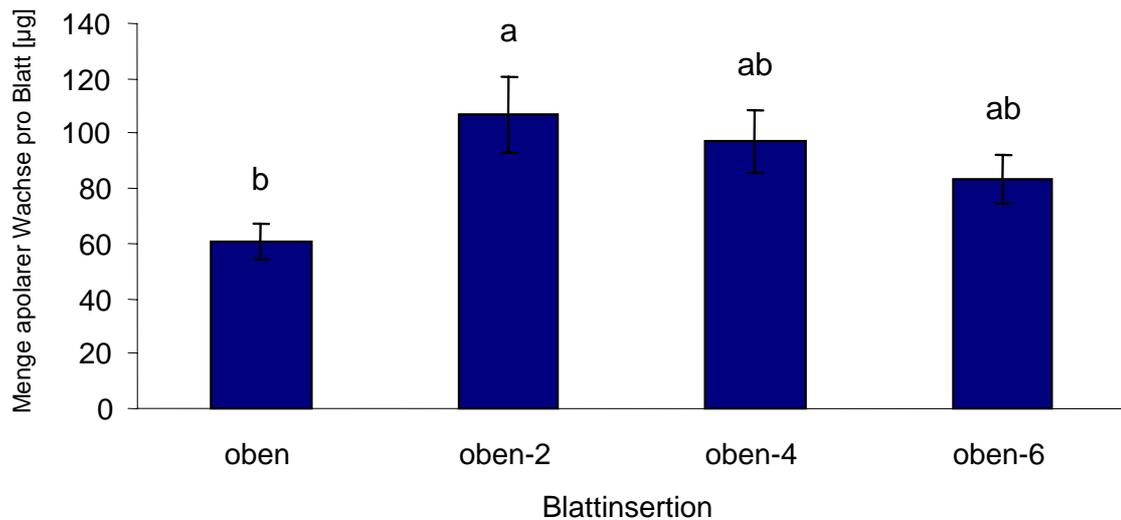


Abb. 5: Einfluss der Blattinsertion auf die Menge apolarer Wachse pro Blatt der auf der adaxialen Seite detektierten Wachskomponenten von Apfelblättern (MW \pm SE, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

apolarer Wachse bei der Blattinsertion „oben-2“ am höchsten und nahm bei den älteren Blattinsertionen wieder leicht ab. Der Gehalt an Sterolen nahm von Blattinsertion „oben“ (3 %) auf Blattinsertion „oben-6“ (14 %) stetig zu. Die Gehalte an Säuren und Alkanen blieb bei allen Blattinsertionen in etwa gleich, und variierten nur um maximal 4 % (Säuren) bzw. 2 % (Alkane). Der Gehalt an Estern betrug bei jungen Blättern 33 % und hatte damit den höchsten prozentualen Anteil an der Gesamtmenge apolarer Wachse. Mit zunehmendem Blattalter nahm der Gehalt an

Estern bis auf 13 % („oben-2“) ab und nahm dann wieder leicht auf 24 % („oben-6“) zu. Zwischen den Blattinsertionen „oben“ und „oben-2“ war die Abnahme mit 21 % am höchsten.

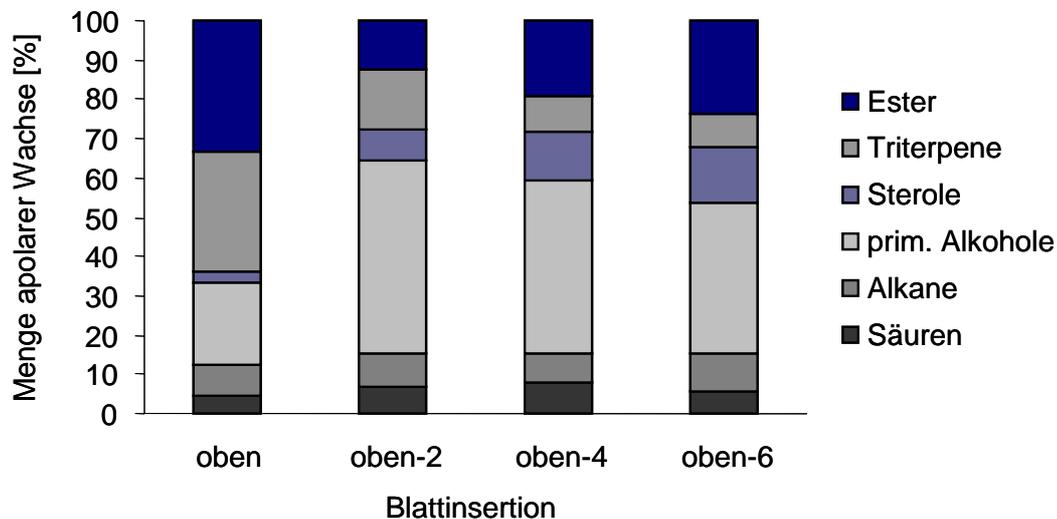


Abb. 6: Einfluss der Blattinsertion auf die relative Zusammensetzung der Wachskomponenten apolarer Wachse der adaxialen Seite von Apfelblättern.

Nicht nur zwischen sondern auch innerhalb der einzelnen Substanzklassen traten während der Ontogenese Unterschiede in den prozentualen Gehalten auf (Abb. 7). Mit zunehmendem Blattalter nahm bei den Alkanen der Anteil des Hentriacontans (C_{31}) zu, die des Heptacosans (C_{27}) und Nonacosans (C_{29}) ab. Bei den primären Alkoholen zeigten Hexacosanol (C_{26}) und Dotriacontanol (C_{32}) die stärksten Veränderungen. Während der Ontogenese nahm der prozentuale Anteil des Dotriacontanols am Gesamtwachs von 2 % („oben“) auf 15 % („oben-6“) stark zu. Auch Triacontanol (C_{30}) zeigte zunehmende Anteile am Gesamtwachs mit 2 % bei der Blattinsertion „oben“ und 8 % bei „oben-6“. Der Hexacosanol-Anteil erreichte bei der Blattinsertion „oben-2“ mit 21 % die höchsten Gehalte, nahm aber grundsätzlich von den jungen zu den alten Blättern um ca. 4 % ab. Der Anteil an Octacosanol (C_{28}) nahm während der Ontogenese leicht zu, war aber, wie Hexacosanol, bei der Blattinsertion „oben-2“ am höchsten. Die kurzkettigen Alkohole mit 20 und 22 C-Atomen hatten nur einen geringen Anteil. Den Hauptbestandteil der Sterole bildete β -Sitosterol, bei den Triterpenen war es die Ursolsäure. Die Zusammensetzung der Säurekomponenten veränderte sich während der Ontogenese kaum. Die längerkettige Hexacosansäure (C_{26}) bildete die Hauptkomponente. C40- bis C44-Ester nahmen von den jungen zu den alten Blättern stetig ab. Bei den Estern mit 46, 48 und 52 C-Atomen waren die Anteile bei der Blattinsertion „oben-2“ immer am geringsten. Tendenziell kam es bei den längerkettigen Estern während der Blattentwicklung zu wenigen Veränderungen.

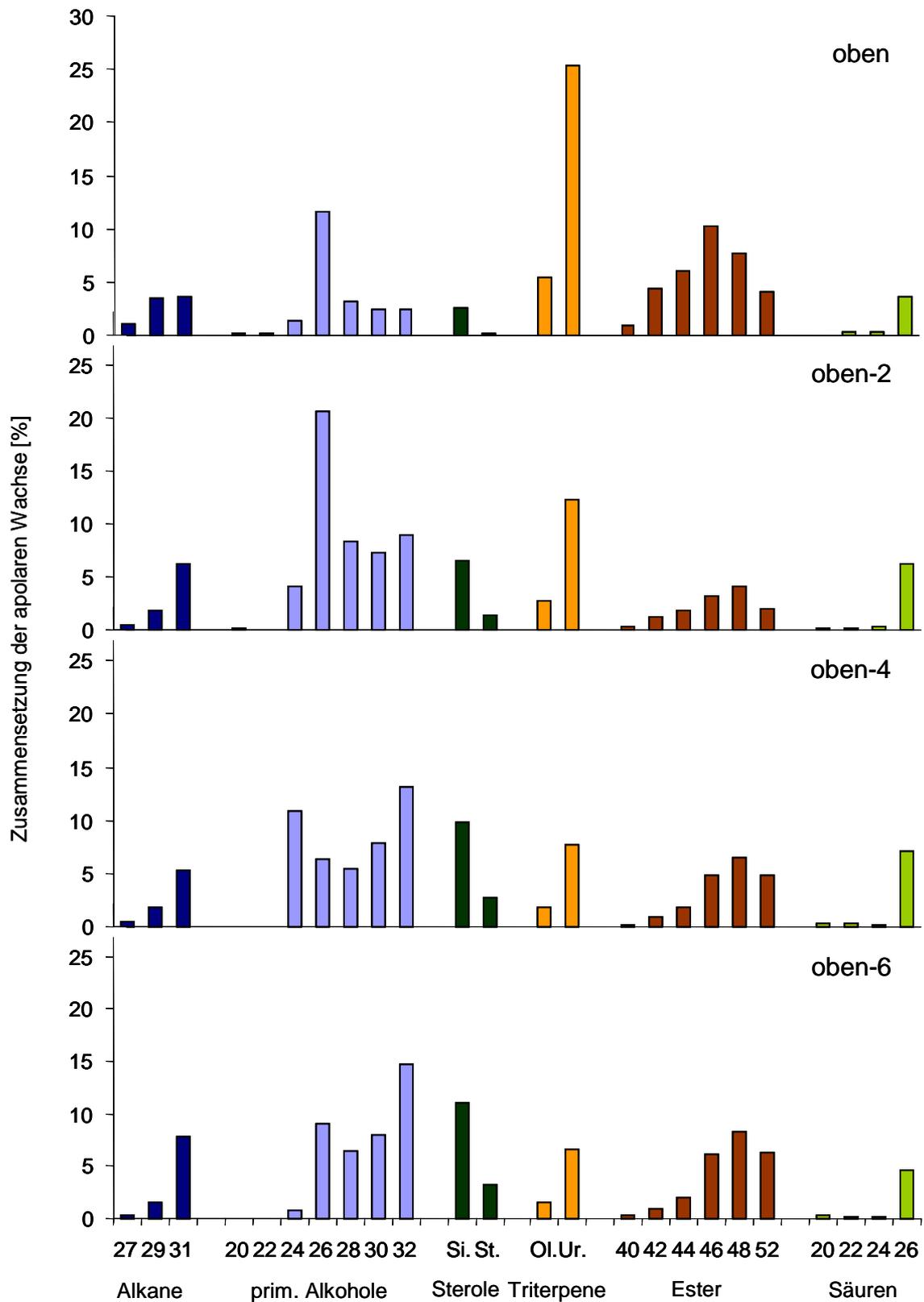


Abb. 7: Einfluss der Blattinsertion auf die relative Zusammensetzung einzelner Komponenten der apolaren Wachse der adaxialen Seite von Apfelblättern (MW, die Zahlen auf der x-Achse entsprechen den Kettenlängen der darunter angezeigten Wachskomponente, Si. = β -Sitosterol, St. = Stigmasterol, Ol. = Oleanolsäure, Ur. = Ursolsäure).

3.1.4 Hydrophobizität von Apfelblatt- und Modelloberflächen

Der Grad der Benetzbarkeit einer Oberfläche wird mit dem Kontaktwinkel (θ) ausgedrückt. Der Kontaktwinkel von Wasser auf der adaxialen Seite von Apfelblättern unterschied sich in Abhängigkeit von der Blattinsertion signifikant (Abb. 8). Junge Apfelblätter („oben“) wiesen einen Kontaktwinkel von $109,4^\circ$ auf, was eine hohe Hydrophobizität der Kutikula anzeigt. Mit zunehmenden Blattalter verringerte sich die Hydrophobizität der Blattoberfläche signifikant bis auf einen Kontaktwinkel von $76,4^\circ$ („oben-6“). Dabei wurde die größte Differenz zwischen der Blattinsertion „oben-2“ und „oben-4“ gemessen, die $25,4^\circ$ betrug.

Als Referenz für hydrophile und hydrophobe Oberflächen wurde die Benetzbarkeit auf den Modelloberflächen Glas, Parafilm[®] und Polystyrol untersucht. Dabei entsprachen die hydrophoben Oberflächen Parafilm[®] und Polystyrol in ihrer Benetzbarkeit in etwa der Blattinsertionen „oben“ und „oben-2“ bzw. „oben-4“. Lediglich Glas mit einem Kontaktwinkel von $27,2^\circ$ unterschied sich signifikant von allen anderen Oberflächen.

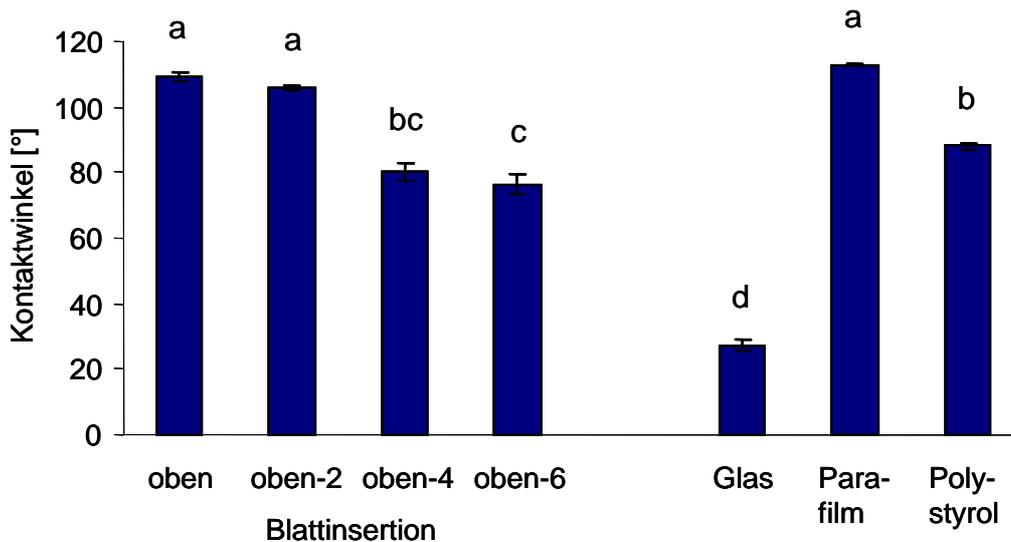


Abb. 8: Einfluss der Blattinsertion auf die Benetzbarkeit der adaxialen Oberfläche von Apfelblättern im Vergleich zu verschiedenen Referenzoberflächen (MW \pm SE, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

Die Hydrophobizität von Objektträgern, die mit den kutikulären Wachsen von vier verschiedenen Blattinsertionen beschichtet wurden, war sehr unterschiedlich (Abb. 9). Die Beschichtung von Glasoberflächen mit Wachsen führte zu signifikant höheren Kontaktwinkeln als auf unbeschichtetem Glas. Auch innerhalb der Wachse der Blattinsertionen gab es Unterschiede, die sich allerdings von den gemessenen Werten auf Apfelblättern gleichen Alters

deutlich unterschieden. Während die höchsten Kontaktwinkel auf jungen Blättern gemessen wurden, war dies bei den beschichteten Glasoberflächen bei den Wachsen der alten Blätter der Fall. Die Wachse der alten Blattinsertionen „oben-4“ und „oben-6“ wiesen mit ca. 83° eine signifikant schlechtere Benetzbarkeit auf als die der jüngeren Blattinsertionen, welche Kontaktwinkel von ca. 59° aufwiesen. Auch diesmal gab es zwischen den mit Wachsen der Blattinsertion „oben-2“ und „oben-4“ beschichteten Oberflächen mit knapp 24° die größte Differenz.

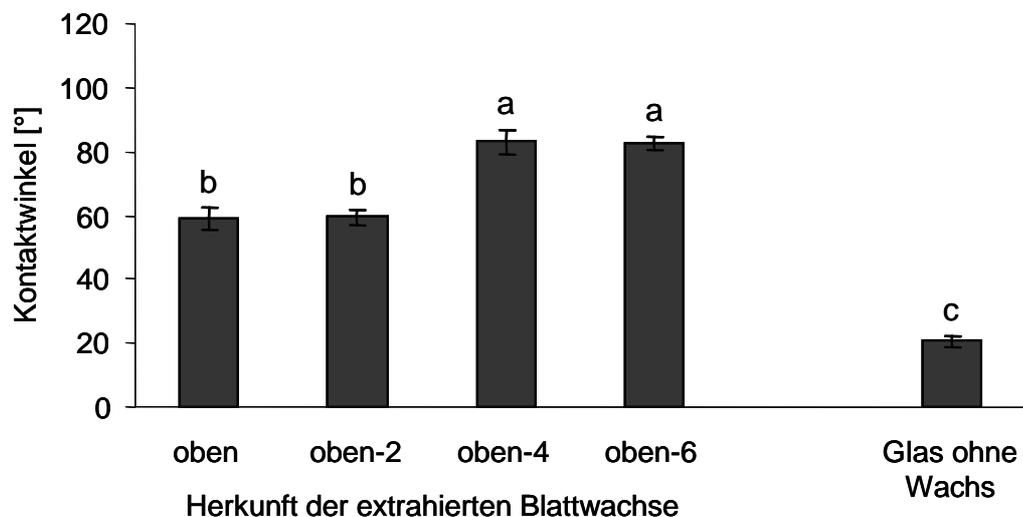


Abb. 9: Einfluss der Blattinsertion auf die Benetzbarkeit der mit kutikularen Wachsen beschichteten Glasoberflächen (MW \pm SE, n = 8, unbeschichtetes Glas = Referenz, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

3.2 Charakterisierung der Konidien von *V. inaequalis*

Zur Charakterisierung der Konidien von *V. inaequalis* wurde die Morphologie und Oberflächenbeschaffenheit mittels elektronen- und lichtmikroskopischer Methoden genauer untersucht.

3.2.1 Konidiengröße und -volumen

Mit Hilfe der Messungen der Länge, Breite und Höhe der Konidien von *V. inaequalis* vor und nach deren Hydratation sollte untersucht werden, ob die Wasseraufnahme einen Einfluss auf die Konidiengröße hat. Außerdem wurde anhand der Parameter das Volumen der Konidien nach AUST (1981) berechnet.

Konidien von *V. inaequalis* wiesen im trockenen, frisch von Befallsstellen abgebürsteten Zustand eine Länge von fast 18 μm bei einer Breite von ca. 8 μm und einer Höhe von ca. 2 μm auf (Tab. 12). Im Zuge der Wasseraufnahme änderte sich die Länge der Konidien signifikant, während die Breite fast unverändert blieb. Bei der Höhe der Konidien kam es zu einer hoch signifikanten Zunahme von über 400 %. Auf das Volumen hatte die Wasseraufnahme der Konidien daher einen großen Einfluss. Das Volumen nahm hoch signifikant von 137 μm^3 bei trockenen Konidien auf über 670 μm^3 bei hydrierten Konidien um das fünffache zu. Ob die Konidien eine oder sechs Minuten Kontakt mit Wasser hatten, war für die Größe und das Volumen nicht von Bedeutung.

Tab. 12: Einfluss der Wasseraufnahme auf die Länge, Breite, Höhe und das Volumen von Konidien von *V. inaequalis* (MW \pm SE).

	trocken	1 min in A. demin.	6 min in A. demin.
Länge [μm]	17,7 \pm 0,3 b ¹	20,3 \pm 0,4 a	20,8 \pm 0,4 a
Breite [μm]	7,9 \pm 0,2 a	8,3 \pm 0,2 a	7,8 \pm 0,2 a
Höhe [μm]	1,9 \pm 0,1 b	8,3 \pm 0,2 a	7,8 \pm 0,2 a
Volumen [μm^3]	137 \pm 6 b	725 \pm 25 a	673 \pm 30 a

¹ Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Zeile kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,01$

3.2.2 Oberflächenbeschaffenheit/Morphologie

Trockene Konidien von *V. inaequalis* wiesen eine gleichmäßige, aber aufgrund geringer Fältelungen eine leicht raue Oberflächenstruktur auf (Abb. 10 A). Eine als *rodlet layer* bezeichnete, aus Stäbchen bestehende Schicht, die auf das Vorhandensein von Hydrophobinen hindeutet, war auf der Konidienoberfläche nicht festzustellen. Im deturgeszenten Zustand wiesen die Konidien eine flache, zum Teil sehr stark eingedellte Form auf. An der Spitze der meisten Konidien war eine globuläre Struktur erkennbar, die einen Durchmesser von 1,4-1,6 μm aufwies (Abb. 10 B). Mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurden keine Hinweise auf das Vorhandensein einer Membran gefunden. Die globuläre Struktur, die nur an der Konidien Spitze zu finden war, war unterschiedlich stark ausgeprägt. Sie war sowohl mittels rasterelektronen- als auch lichtmikroskopischer Untersuchungen deutlich erkennbar (Abb. 10 B und C). Mit einem hochauflösenden Stereomikroskop betrachtete deturgeszente Konidien zeigten ebenfalls an ihrer Spitze diese typische globuläre Struktur (Abb. 10 C). Viele Konidien, die noch nicht von den

Konidiophoren abgefallen waren, hatten diese Struktur nicht oder sie war nur schwach ausgebildet (Abb. 10 D).

Wurde auf die Konidien Wasser gegeben, so schwammen diese zunächst auf der Wasseroberfläche und nahmen einen turgeszenten Zustand an, durch den sie ihre charakteristische „birnenartige“ Form erhielten. Nach der Wasseraufnahme war die globuläre Struktur im Rasterelektronenmikroskop nicht mehr sichtbar. Stattdessen hatten die Konidien eine abgerundete Spitze ohne Vesikel (Abb. 10 F). Die Oberflächenstruktur war im Vergleich zu der von deturgeszenten Konidien leicht verändert, und war mehr mikrostrukturiert (Abb. 10 E). Kam es zu einer Wasseraufnahme der Konidie, ohne dass die Spitze Kontakt zur einer Oberfläche oder dem Wasser selbst hatte, so blieb die globuläre Struktur erhalten (Abb. 10 G). Zum Teil war sogar eine Vergrößerung des Vesikels feststellbar. Der Vesikel vergrößerte sich innerhalb von 2,5 Minuten um etwas das Doppelte (Abb. 11). Wurde auf trockene Konidien Öl gegeben, so behielten sie ihre deturgeszente Form bei und die unversehrt gebliebene globuläre Struktur an der Konidienspitze war im Phasenkontrastmikroskop sichtbar (Abb. 10 H).

Um die Wasseraufnahme von Konidien zu untersuchen, wurden trockene Konidien auf eine Glasoberfläche gegeben. An die Seiten wurde jeweils ein nasses Stück Filterpapier gelegt und darauf ein Deckgläschen aufgebracht. Mit Erhöhung der Luftfeuchte unter dem Deckgläschen kam es zu einer Kondensation des Wassers an beiden Oberflächen. Das Kondenswasser wurde von den Konidien langsam aufgenommen, so dass eine Volumenzunahme beobachtet werden konnte (Abb. 12). Diese Zunahme konnte zunächst an der Basis festgestellt werden, die allerdings auch im trockenen Zustand der Konidie dicker war als der apikale Teil. Von der Basis ausgehend kam es innerhalb von knapp 20 Minuten zur Volumenzunahme der Konidie bis zur vollständigen Turgeszenz.

Folgende Seite:

Abb. 10: Charakterisierung von trockenen und hydrierten Konidien von *V. inaequalis*. Trockene Konidien mit einer rauen Oberflächenstruktur (A), trockene Konidien mit globulären Strukturen an der Konidienspitze (B, C), trockene Konidie auf einer Konidiophore (D), Nahaufnahme der Oberflächenstruktur (E), nach Wasseraufnahme turgeszente Konidien (F), hydrierte Konidien mit globulären Strukturen an der Konidienspitze (G), trockene Konidien mit globulären Strukturen an der Spitze, in Immersionsöl gebettet (H) (A, B, D, E, F: Rasterelektronenmikroskopie, C, G: Stereomikroskopie, H: Phasenkontrast).

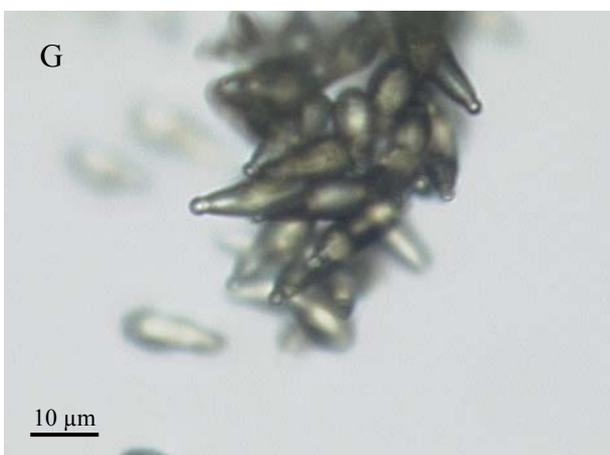
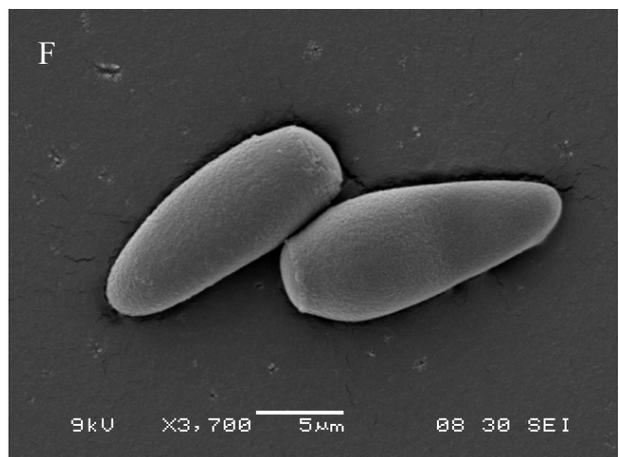
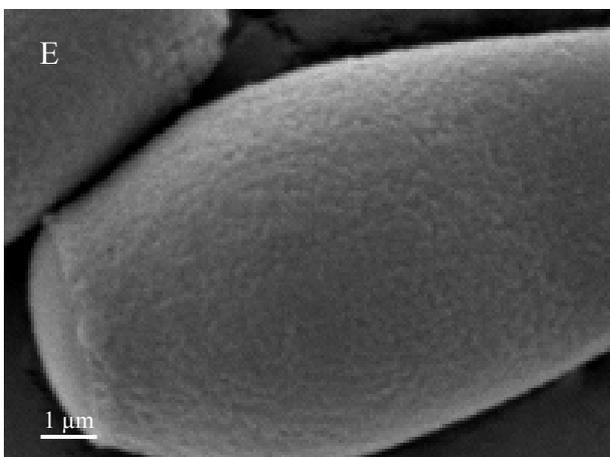
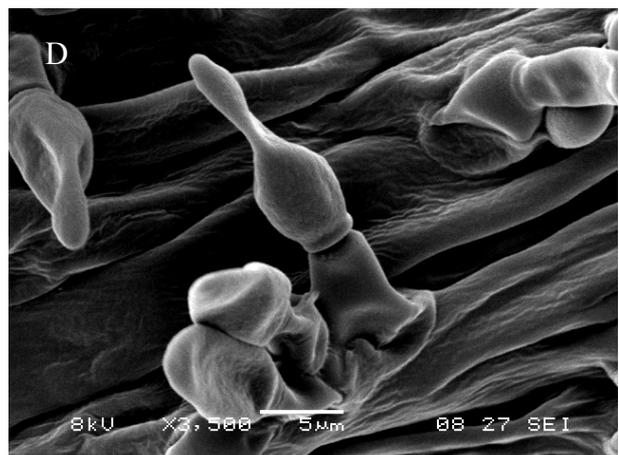
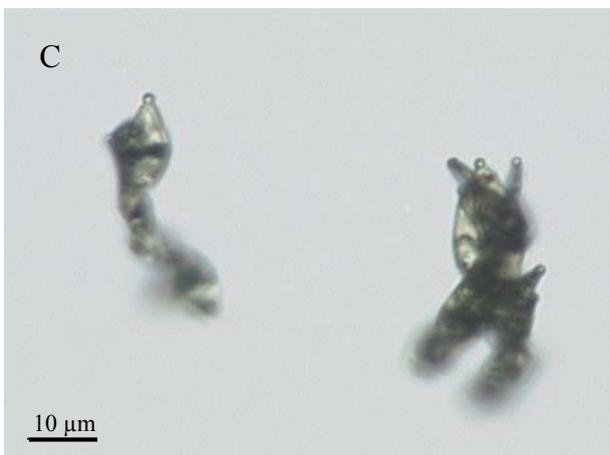
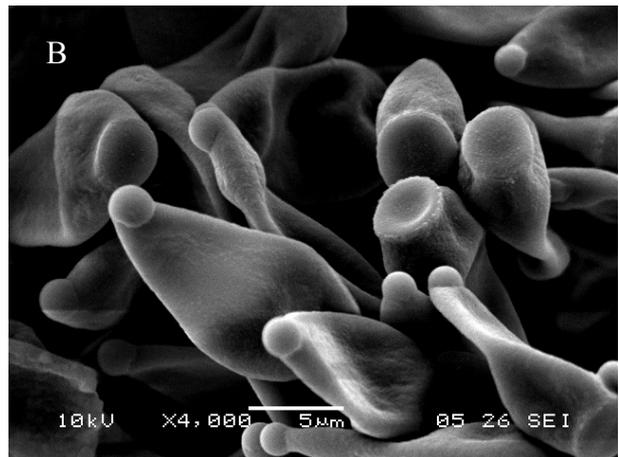
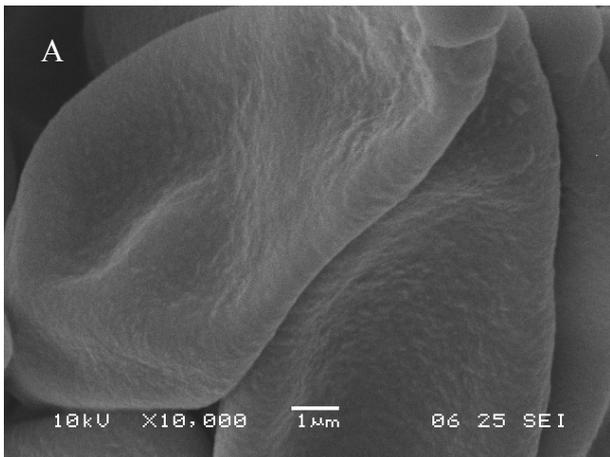




Abb. 11: Vergrößerung der globulären Struktur an der Konidienspitze von *V. inaequalis* während der Aufnahme von Wasser (Dauer: 150 s, Lichtmikroskopie).

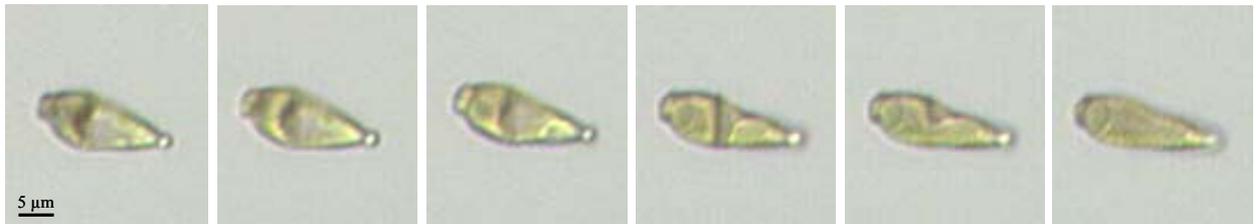


Abb. 12: Wasseraufnahme durch eine trockene Konidie von *V. inaequalis*. Die Konidie wird turgeszent, während die globuläre Struktur an der Kondienspitze erhalten bleibt (Dauer: 19 min, Aufnahme mit einem 40er Luftobjektiv, Lichtmikroskopie).

3.3 Adhäsion von Konidien auf Oberflächen

Für die Entwicklung von *V. inaequalis* auf einer Wirtsoberfläche ist die Adhäsion der Konidien ein essentieller Prozess. Daher wurden die in einer Suspension enthaltenen Konidien auf ihre Haftfähigkeit auf unterschiedlichen Oberflächen und nach verschiedenen Inkubationszeiten untersucht.

3.3.1 Einfluss der Oberfläche

Die Haftfähigkeit von Konidien von *V. inaequalis* wurde auf verschiedenen Apfel- und Modelloberflächen untersucht. Anhand der Beobachtungen über die Entwicklung von *V. inaequalis* im Lichtmikroskop und der Diagramme, in denen der prozentuale Anteil der nach einem Abwaschprozess noch haftenden Konidien bis 48 Stunden nach der Inokulation dargestellt ist, konnte eine Einteilung der Entwicklung des Pilzes vorgenommen werden. Demnach unterteilt sich die Entwicklung in drei Abschnitte. Der erste Abschnitt (A) war durch das Vorhandensein von ungekeimten Konidien charakterisiert (Abb. 13 A). Im zweiten Abschnitt (B) kam es zur Bildung der Keimschläuche (Abb. 13 B, C), und im letzten Abschnitt (C) wurden Appressorien gebildet (Abb. 13 D) bzw. erfolgte die Eindringung in das Blatt (Abb. 13 E, F).

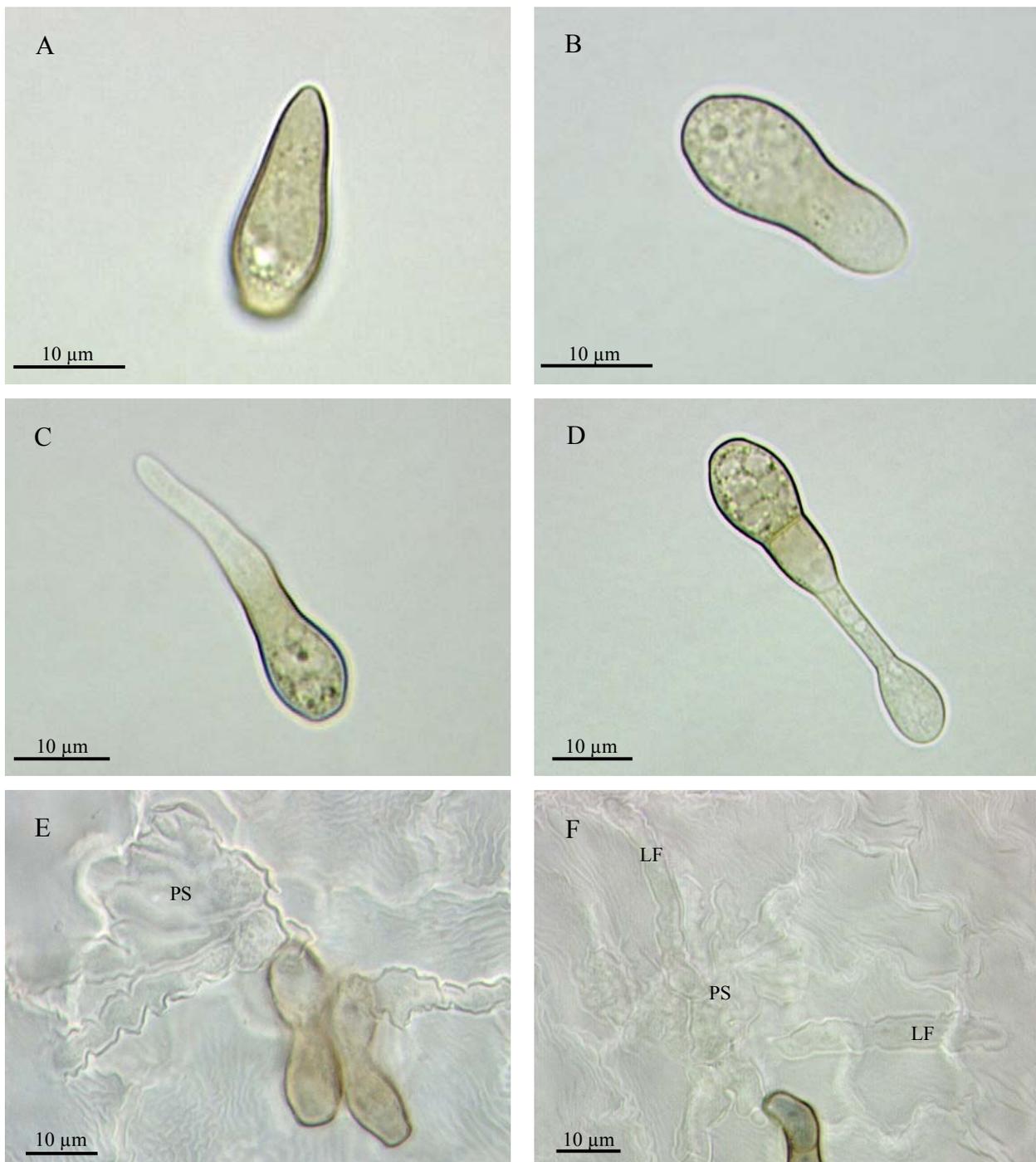


Abb. 13: Entwicklungsstadien von in Wasser inkubierten Konidien von *V. inaequalis* auf Polystyrol- und Apfelblattoberflächen. Ungekeimte Konidie direkt nach Aufbringen der Suspension (A), Schwellung der Konidienspitze zwei Stunden nach Applikation (B), Konidie mit Keimschlauch vier Stunden nach Applikation (C), Ausbildung eines durch eine Septe vom Keimschlauch getrenntes Appressorium acht Stunden nach Applikation und Inkubation (D), Bildung von Primärstroma (PS) und Laufhyphen (LF) zwei Tage nach Inokulation (E, F) (Durchlichtmikroskopie).

Pflanzenoberflächen

Die Haftfähigkeit von Konidien auf Apfelblättern und Blättern der Rose, einer Nicht-Wirtspflanze, wurden verglichen. Generell nahm mit zunehmender Inkubationszeit der Anteil an haftenden Konidien auf allen Pflanzenoberflächen zu (Abb. 14). Nach sechs bzw. acht Stunden kam es zu keinem Anstieg mehr und der maximale Anteil an haftenden Konidien wurde mit etwa 70-77% (Apfel) bzw. 89 % (Rose) erreicht. Auf den Blättern der Rose konnten nach acht Stunden signifikant mehr Konidien haften als auf denen des Apfels.

Die Betrachtung von Abschnitt A zeigte die Adhäsion von ungekeimten Konidien. Auf den Apfelblättern beider Insertionen konnten bereits nach einer Inkubationszeit von nur 15 Minuten ca. 35 % aller applizierten Konidien haften, während sich auf den Rosenblättern nicht einmal 6 % der Konidien anheften konnten (Abb. 15). Auf der jüngsten Blattinsertion kam es 45 Minuten nach der Inokulation zu einer deutlichen Abnahme in der Haftfähigkeit von über 20 %, wohingegen die Haftfähigkeit auf dem älteren, hydrophileren Blatt weiter zunahm. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden zeigte sich auf beiden Apfelblattinsertionen eine geringere Haftfähigkeit der Konidien im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten. Zwei Stunden später konnten bereits wieder ca. 50 % der Konidien auf Apfelblättern haften, auf Rosenblättern waren es hingegen nur ca. 25 %. Zwischen den Apfel- und Rosenblättern war die Adhäsion der Konidien demnach innerhalb der ersten vier Stunden nach Applikation der Tropfen sehr unterschiedlich.

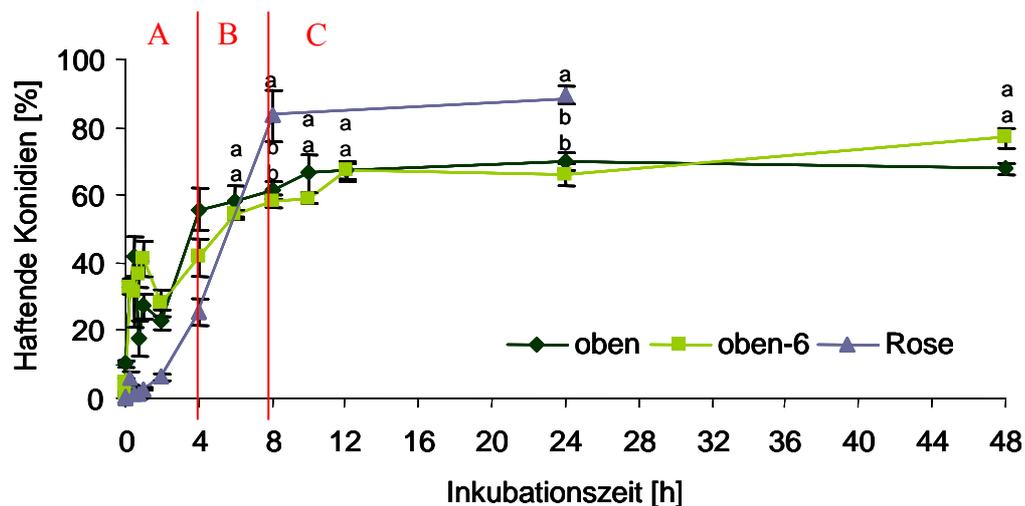


Abb. 14: Einfluss der Inkubationszeit auf den Anteil haftender Konidien von *V. inaequalis* auf Apfelblättern unterschiedlicher Insertion sowie auf Rosenblättern (MW \pm SE, Konidiendichte: 5×10^4 Konidien ml^{-1} , unterschiedliche Buchstaben zu einem Zeitpunkt kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bzw. nach one-way ANOVA bei $p \leq 0,05$).

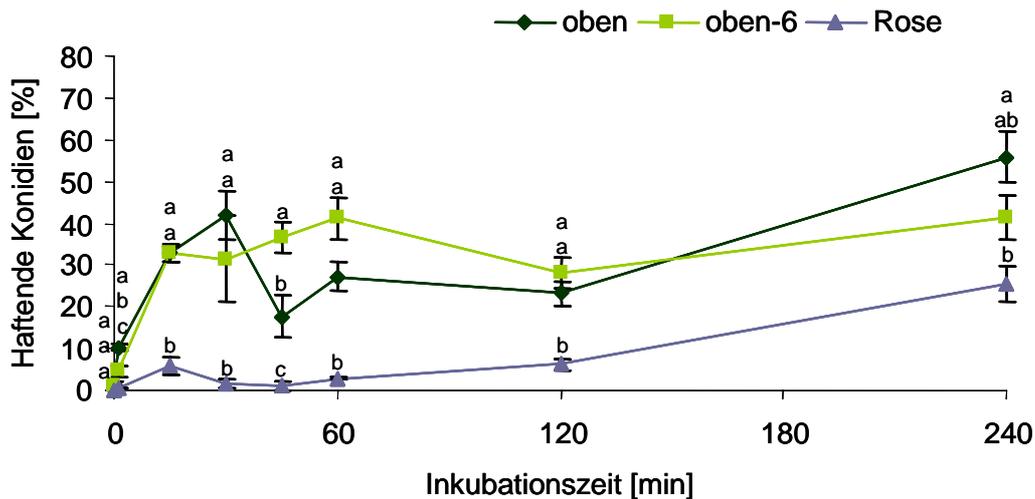


Abb. 15: Einfluss der Inkubationszeit auf den Anteil haftender Konidien von *V. inaequalis* bis vier Stunden nach Inokulation auf Apfelblättern unterschiedlicher Insertion sowie auf Rosenblättern (MW \pm SE, Konidiendichte: 5×10^4 Konidien ml^{-1} , unterschiedliche Buchstaben zu einem Zeitpunkt kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

Modelloberflächen

Der gleiche Versuch wurde auf Modelloberflächen durchgeführt. Dazu wurden zwei hydrophobe Oberflächen (Parafilm[®] und Polystyrol) sowie eine hydrophile Oberfläche (Glas) verwendet. Auch auf den Modelloberflächen war die Tendenz sichtbar, dass der Anteil an haftfähigen Konidien mit der Inkubationsdauer zunahm (Abb. 16). Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden gab es zwischen den Oberflächen keine signifikanten Unterschiede mehr. Der maximale Anteil an haftenden Konidien war mit fast 94 % erreicht, und lag auf artifiziellen Oberflächen um 5-24 % höher als auf natürlichen. Mit dem Beginn der Appressorienbildung (Abschnitt C) konnten die meisten Konidien auf Glas haften, wohingegen sie im Abschnitt A noch kaum anhefteten. Der Anteil haftender Konidien war im Abschnitt C auf Glas sogar signifikant höher als auf dem hydrophoben Parafilm[®].

Innerhalb der ersten vier Stunden nach Applikation der Suspensionen gab es zwischen den hydrophoben und hydrophilen Oberflächen große Unterschiede (Abb. 17). Auf Glas konnten bis zu einer Inkubationsdauer von zwei Stunden nur maximal 10 % der Konidien haften, dagegen lag der Anteil auf Polystyrol bereits nach 15 Minuten bei ca. 47 %. Auf beiden hydrophoben Oberflächen verringerte sich der Anteil an haftenden Konidien nach 60 Minuten um 12 % bzw. 21 %. Dieses Phänomen war auf Glas nicht feststellbar, da der Anteil an haftenden Konidien mit ca. 10 % noch sehr gering war. Ähnlich wie auf den natürlichen Oberflächen kam es dann zu einem Anstieg, der auf den künstlichen Oberflächen allerdings auf einem höheren Niveau lag. Es konnten nach vier Stunden bereits 54 % (Glas) bzw. 80 % (Polystyrol) aller Konidien haften.

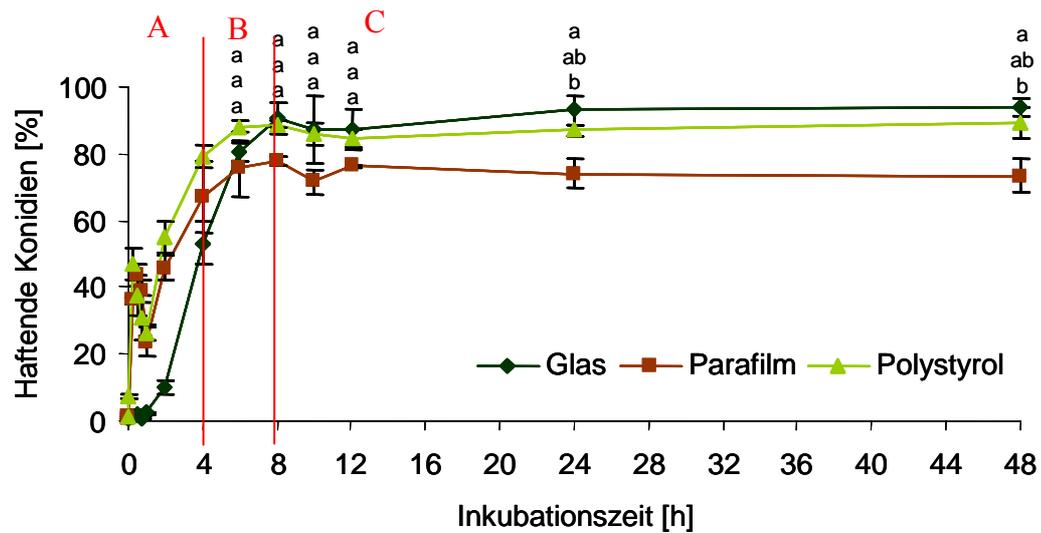


Abb. 16: Einfluss der Inkubationszeit auf den Anteil haftender Konidien von *V. inaequalis* auf artifiziellen Oberflächen unterschiedlicher Hydrophobizität (MW \pm SE, Konidiendichte: 4×10^4 Konidien ml^{-1} , unterschiedliche Buchstaben zu einem Zeitpunkt kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

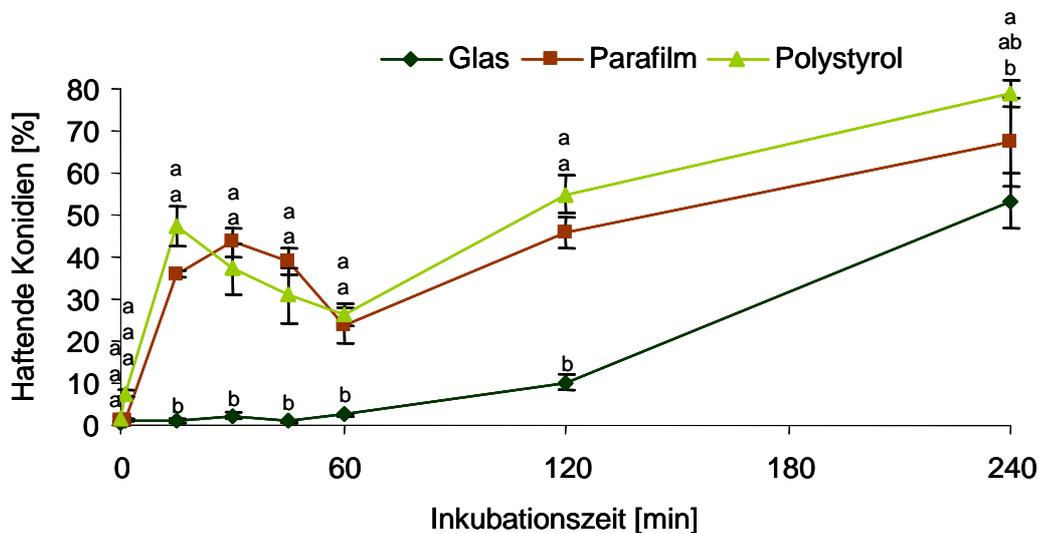


Abb. 17: Einfluss der Inkubationszeit auf den Anteil haftender Konidien von *V. inaequalis* bis vier Stunden nach Inokulation auf artifiziellen Oberflächen unterschiedlicher Hydrophobizität (MW \pm SE, Konidiendichte: 4×10^4 Konidien ml^{-1} , unterschiedliche Buchstaben zu einem Zeitpunkt kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

3.3.2 Entwicklung von haftenden und abgewaschenen Konidien

Es wurde untersucht, ob sich Konidien, die nicht abgewaschen wurden, besser entwickeln können, als Konidien, die von der Oberfläche abwaschbar waren. Die applizierten Tropfen wurden 15 Minuten auf Polystyrol inkubiert, dann abgewaschen und das Abwaschwasser aufgefangen. Davon wurden Aliquots entnommen und wiederum auf Polystyrol appliziert. Es erfolgte eine Inkubation bei 18 °C für 24 Stunden. Der Anteil ungekeimter und gekeimter Konidien nach 24 Stunden wurde in beiden Fraktionen (abgewaschene bzw. nicht abgewaschene Konidien) untersucht. Die Anzahl der Konidien war in den Fraktionen unterschiedlich hoch: in der nicht abwaschbaren Fraktion wurden ca. 300 Konidien pro Wiederholung berücksichtigt, in der abwaschbaren Fraktion waren es hingegen nur 20 Konidien.

Der Anteil ungekeimter Konidien betrug bei den nicht abwaschbaren Konidien fast 17 %, während der Anteil bei den abgewaschenen Konidien fast 80 % betrug (Tab. 13). Bei der abwaschbaren Fraktion hatte die Mehrzahl der Konidien nach 24 Stunden nur Keimschläuche, nur 11 % der Konidien hatten auch ein Appressorium gebildet. In der nicht abwaschbaren Fraktion hatten dagegen ca. 96 % aller Konidien ein oder mehrere Appressorien differenziert.

Tab. 13: Einfluss der Haftfähigkeit der Konidien von *V. inaequalis* nach 15 Minuten auf deren Entwicklung 24 Stunden nach Applikation auf eine Polystyrol-Oberfläche (MW ± SE, n = 8, Angaben in %).

	nicht abwaschbar	abwaschbar
ungekeimt	16,9 ± 1,4	78,2 ± 3,5
gekeimt	83,1 ± 1,4	21,8 ± 3,5
davon: ohne Appressorium	3,9 ± 0,6	88,9 ± 7,1
mit Appressorium	96,1 ± 0,6	11,1 ± 7,1

3.3.3 Einfluss von Hemmstoffen und Detergenzien

Der Einfluss verschiedener Hemmstoffe und Detergenzien auf die Haftfähigkeit der Konidien von *V. inaequalis* wurde untersucht. Diese Versuche sollten Aufschluss darüber geben, ob für die Adhäsion eine aktive Stoffwechselleistung der Konidien notwendig ist. Da für die erste Etablierung des Pilzes auf der Pflanze die sofortige Anheftung der ungekeimten Konidie eine Rolle spielt, wurde zunächst nur der Zeitraum bis vier Stunden nach der Inokulation (Abschnitt A) betrachtet. Aus dieser Zeitreihe wurden vier Zeitpunkte ausgewählt. Es wurden zwölf

Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Haftfähigkeit von Konidien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle untersucht.

Die beiden Proteinbiosynthesehemmer Cycloheximid und Chloramphenicol hatten zu keinem Zeitpunkt einen negativen Einfluss auf die Haftfähigkeit (Abb. 18 A). Die Haftfähigkeit änderte sich mit der Zugabe der beiden Hemmstoffe, trotz verzögerter Entwicklung der Konidien, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht. Sie lag bei der Kontrolle und den beiden Hemmstoffen nach 15 Minuten bei ca. 50 % und erreichte nach vier Stunden 75 - 78 %. Die Konidien, die mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D oder 5,5 % Methanol behandelt worden waren, wiesen nach 15 Minuten und einer Stunde eine schlechtere Adhäsion auf. Für die späteren Zeitpunkte war dieser Unterschied für Actinomycin D nach zwei Stunden und für Methanol nach vier Stunden nicht mehr nachweisbar. Methanol wurde untersucht, da es für die Lösung von Actinomycin D verwendet worden war.

Durch die Zugabe von Tween, Natriumdodecylsulfat (SDS) und Proteinase K kam es, unabhängig von der verwendeten Konzentration, zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl haftender Konidien (Abb. 18 B). Die Adhäsion verbesserte sich bei den Detergenzien erst nach einer Inkubationszeit von vier Stunden, war aber immer noch geringer als bei der unbehandelten Kontrolle. Während in der unbehandelten Kontrolle 78 % der Konidien auf der Oberfläche haften konnten, waren es in der Gegenwart von 0,02 % SDS nur 25 %, bei 0,001 % Tween ca. 36 % und bei der geringeren Proteinase K-Aktivität 50 %. Den größten Effekt auf die Haftfähigkeit hatte die Zugabe von 0,2 % SDS. In den ersten zwei Stunden hafteten keine Konidien auf Polystyrol und auch nach vier Stunden hafteten maximal 0,4 % der Konidien.

Auch die Zugabe von Fungiziden hatte einen Einfluss auf die Haftfähigkeit (Abb. 18 C). Nach 15 Minuten hafteten in Gegenwart von Flint[®] 50 WG, Benocap[®] und Discus[®] maximal 20 % der Konidien, nach vier Stunden war keine Verbesserung der Haftfähigkeit festzustellen. Ein noch geringerer Anteil an haftenden Konidien - maximal 3,5 % nach vier Stunden - wurde durch die Zugabe des Wirkstoffes Kresoxim-methyl erreicht. Die Leerformulierung von Kresoxim-methyl, die 0,1 % Aceton und 0,02 % NP15 ohne Zugabe des Wirkstoffes enthielt, hatte einen ähnlichen Effekt, denn es hafteten unabhängig vom Inkubationszeitpunkt nur 1,5 % der Konidien.

Des Weiteren wurde der Einfluss einiger Hemmstoffe und Detergenzien auf die Haftfähigkeit von in der Entwicklung fortgeschrittenen Konidien untersucht (Abschnitte B und C). Acht und 24 Stunden nach der Applikation der behandelten Konidien suspension wurden die Tropfen abgewaschen und, wie in den vorherigen Versuchen, der Anteil haftender Konidien bestimmt (Tab. 14).

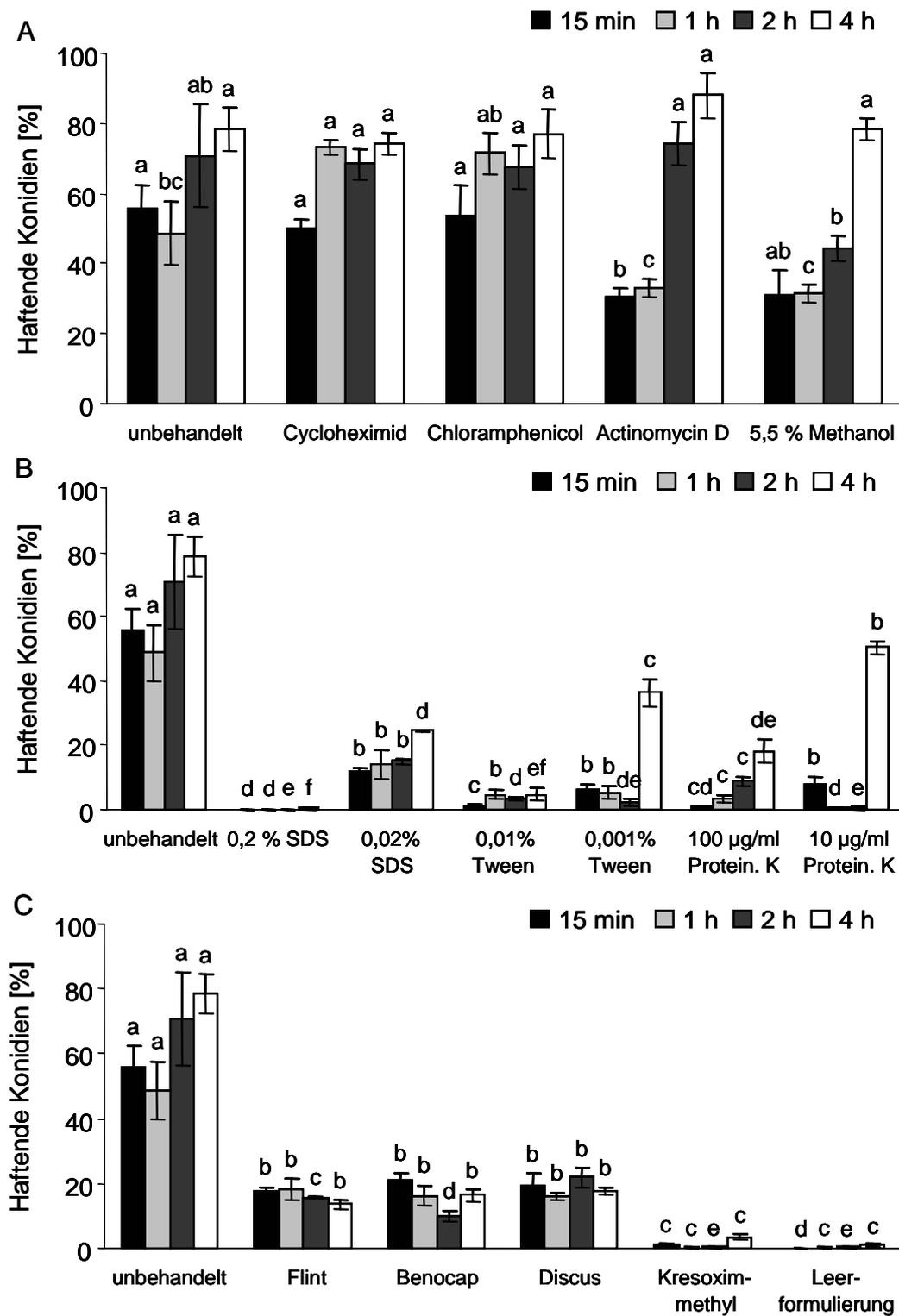


Abb. 18: Einfluss von Hemmstoffen und Detergenzien auf den Anteil haftender Konidien von *V. inaequalis* 15 Minuten, 1, 2 und 4 Stunden nach Inkubation auf Polystyrol (MW \pm SE, Konidiendichte: $3 - 5 \times 10^4$ Konidien ml^{-1} , verwendete Konzentrationen: je $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Cycloheximid und Actinomycin D, $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol, $0,00625 \%$ Kresoxim-methyl, je $0,0125 \%$ Flint[®] 50 WG, Benocap[®] und Discus[®], unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Zeitpunktes kennzeichnen in den Diagrammen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$).

Dieser Anteil unterschied sich bei beiden Konzentrationen von Proteinase K nach acht Stunden nicht von der unbehandelten Kontrolle (Tab. 14). Die Haftfähigkeit der mit Flint[®], Benocap[®] und Discus[®] behandelten Konidien hingegen war signifikant geringer und betrug maximal 35 %. Noch schlechter konnten Konidien haften, die mit Kresoxim-methyl und der entsprechenden Leerformulierung behandelt worden waren. Die Haftfähigkeit nach 24 Stunden unterschied sich kaum von der nach acht Stunden. Eine Zunahme des Anteils haftender Konidien wurden bei 10 µg ml⁻¹ Proteinase K, Benocap[®] und der Leerformulierung beobachtet. Bei den anderen Substanzen blieb die Haftfähigkeit von Konidien unverändert.

Tab. 14: Einfluss von Hemmstoffen und Detergenzien auf den Anteil haftender Konidien von *V. inaequalis* acht und 24 Stunden nach Inkubation auf Polystyrol (MW ± SE, Konidiendichte: 3 - 5 x 10⁴ Konidien ml⁻¹).

Hemmstoff/Detergenz	Anteil haftender Konidien [%] nach einer Inkubationszeit von	
	8 h	24 h
Kontrolle (*) ¹	88,8 ± 0,9 a ³	87,0 ± 1,9 a
0,2 % SDS (k. A.) ²	k. A.	0,3 ± 0,2 d
0,02 % SDS (*)	k. A.	84,1 ± 4,2 a
0,01 % Tween	k. A.	11,7 ± 5,8 d
0,001 % Tween (*)	k. A.	66,2 ± 1,5 b
10 µg ml ⁻¹ Proteinase K (*)	57,8 ± 6,3 a	90,0 ± 7,1 a
100 µg ml ⁻¹ Proteinase K (*)	75,1 ± 7,0 a	74,7 ± 2,3 ab
Flint [®] 50 WG	17,7 ± 1,8 bc	16,9 ± 1,3 d
Benocap [®] (*)	34,6 ± 2,8 b	73,8 ± 1,3 ab
Discus [®]	12,2 ± 1,5 c	12,6 ± 0,5 d
Kresoxim-methyl	0,9 ± 0,3 c	1,0 ± 0,2 d
Leerformulierung (*)	12,0 ± 2,0 c	37,4 ± 4,6 c

¹ (*) = Konidien nach acht Stunden gekeimt; ² k. A. = keine Angaben

³ Unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Zeitpunktes kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei p ≤ 0,05

Neben der Haftfähigkeit wurde auch die Keimung der Konidien nach acht und 24 Stunden untersucht (Tab. 14). Das Vorhandensein von 0,01 % Tween sowie Discus[®] und Kresoxim-methyl führte dazu, dass die Konidien auch nach acht Stunden nicht gekeimt waren. Bei den anderen Substanzen kam es zur Keimung, aber im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war

die Entwicklung der Keimschläuche teilweise verzögert oder es kam nicht bzw. seltener zur Bildung von Appressorien. Nach 24 Stunden war der Anteil haftender Konidien bei den Behandlungen am geringsten, bei denen die Konidien nicht gekeimt waren; dies waren 0,01 % Tween, Discus[®] und Kresoxim-methyl.

3.3.4 Einfluss der Zugabe von SDS

Es hatte sich gezeigt, dass die anfängliche Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) zur Konidien suspension einen Einfluss auf die Haftfähigkeit der Konidien hat. Daher wurde untersucht, ob die Zugabe von 0,2 % SDS fünf Minuten vor dem Abwaschprozess auch einen Einfluss auf die Haftung der Konidien hatte. Es fand ein Vergleich zur Kontrolle statt, bei der anstelle von SDS demineralisiertes Wasser zugegeben wurde (Abb. 19).

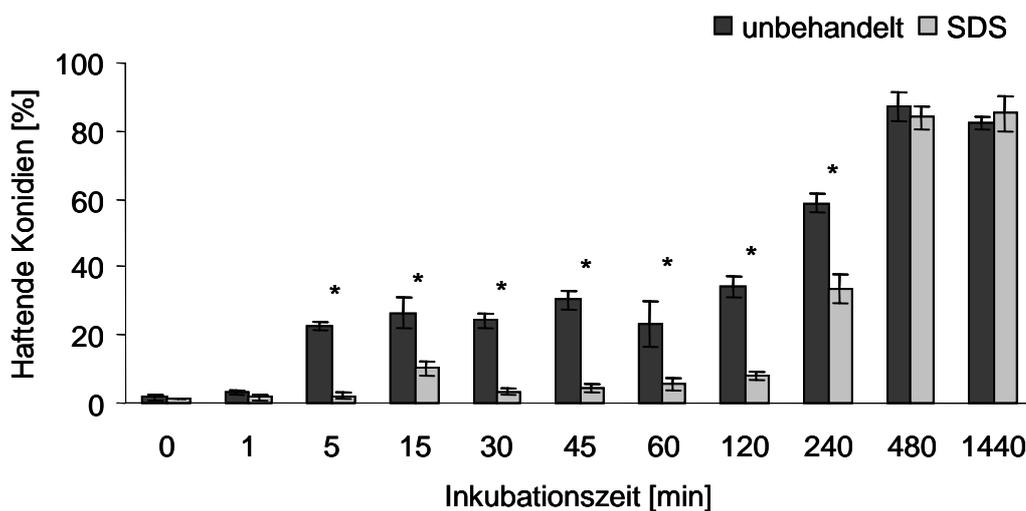


Abb. 19: Einfluss von 0,2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) auf den Anteil haftender Konidien von *V. inaequalis* auf Polystyrol (Zugabe von SDS bzw. A. demin. fünf Minuten vor dem Abwaschprozess, MW \pm SE, Konidiendichte: 4×10^4 Konidien ml^{-1} , * kennzeichnet Signifikanz nach t-Test bei $p \leq 0,05$).

In der kurzen Zeit von direktem Abwaschen bzw. einminütiger Inkubation bis Abwaschen der applizierten Tropfen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen feststellbar (Abb. 19). Dennoch konnten in der unbehandelten Kontrolle ein um 27 bzw. 41 % höherer Anteil Konidien haften als in der SDS-Variante. Bei den ersten beiden Zeitpunkten wurde SDS aufgrund der kurzen Inkubationsdauer sofort zugegeben. Zu den späteren Zeitpunkten führte die Zugabe von SDS kurz vor dem Abwaschen der Konidien zu einem bis zu 86 % geringeren Anteil haftfähiger Konidien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wurde der Unterschied zwischen den Varianten geringer

und betrug nur noch etwa 43 %, war allerdings nach dem t-Test immer noch signifikant. Erst nach acht Stunden konnte kein Unterschied mehr zwischen SDS-Zugabe und unbehandelter Kontrolle festgestellt werden, so dass zu diesem und einem späteren Zeitpunkt SDS keinen Einfluss mehr auf die Haftfähigkeit der nunmehr gekeimten Konidien ausübte.

3.3.5 Einfluss der vorherigen Inkubation von Konidien in Wasser

Um zu untersuchen, ob die längere Inkubation von Konidien in Wasser ohne Kontakt zu einer Oberfläche einen Einfluss auf die Haftfähigkeit hat, wurden Konidien suspensionen für eine, drei bzw. 24 Stunden im Eppendorfgefäß mittels eines Überkopfschüttlers geschüttelt und erst dann auf eine Polystyrol-Oberfläche aufgebracht. Diese Tropfen wurden in regelmäßigen Abständen mit Wasser abgewaschen. Als Vergleich dienten Tropfen, die ohne vorherige Inkubation direkt auf Polystyrol aufgebracht wurden.

In vielen Fällen war die Adhäsion der Konidien von *V. inaequalis* in den direkt aufgetragenen Tropfen am höchsten (Abb. 20). Ähnlich wie in den vorherigen Versuchen lag der Anteil an haftenden Konidien bereits nach 15 Minuten bei 44 %, nahm dann in den folgenden Minuten leicht ab und nahm ab einer Inkubationszeit von vier Stunden wieder zu. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden lag der Anteil an haftenden Konidien bei ca. 70 %. Die Inkubation der Konidien in Wasser für eine, drei bzw. 24 Stunden vor Aufbringen auf eine Oberfläche führte zu den meisten Zeitpunkten zu einem geringeren Anteil haftender Konidien, der aber nicht immer statistisch abzusichern war. Lediglich nach einer Inkubationszeit von null bzw. 30 Minuten auf der Oberfläche war der Anteil haftender Konidien in der direkt applizierten Variante signifikant höher. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnten sogar die Konidien, die vorher für 24 Stunden in Wasser auf dem Schüttler inkubiert worden waren, mit einem Anteil von fast 80 % am besten haften.

Die unterschiedliche Inkubationsdauer der Konidien in Wasser vor Aufbringen auf Polystyrol hatte nicht nur einen Einfluss auf die Haftfähigkeit, sondern auch auf die Konidiendichte. Die Konidiendichte betrug zu Beginn des Versuchs bzw. direkt nach dem Ansetzen ca. $1,1 \times 10^5$ Konidien ml^{-1} . Die Inkubation der Konidien suspension in einem Eppendorf-Gefäß führte nach einer Schütteldauer von einer bzw. drei Stunden zu einer Abnahme der Konidiendichte um knapp 7 %. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden waren sogar 15 % weniger Konidien in der Suspension als in der ursprünglich angesetzten. Die Konidien suspension hatte nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden eine Dichte von nur noch $9,4 \times 10^4$ Konidien ml^{-1} .

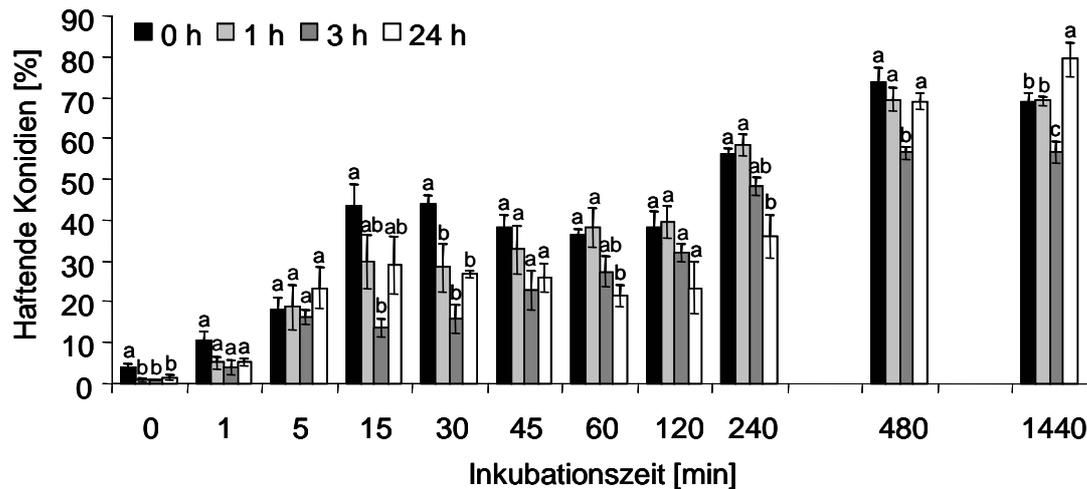


Abb. 20: Einfluss einer vorherigen Inkubation von Konidien in Wasser auf den Anteil haftender Konidien von *V. inaequalis* auf Polystyrol (MW \pm SE, ursprüngliche Konidiendichte: 1×10^5 Konidien ml^{-1} , Die Prozentangaben ergeben sich aus der Anzahl haftender Konidien zu der für jede Variante gegebenen Konidiendichte von nicht abgewaschenen Tropfen, unterschiedliche Buchstaben zu einem Zeitpunkt kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

3.3.6 Einfluss der vorherigen Inkubation von Konidien in Wasser auf deren Entwicklung

Durch die vorherige Inkubation der Konidiensuspension auf einem Überkopfschüttler wurde die primäre Haftfähigkeit der Konidien verschlechtert. Um zu untersuchen, ob dies auch einen Einfluss auf die Entwicklung von *V. inaequalis* hat, wurde eine Konidiensuspension entweder direkt oder erst nach mehrstündiger Inkubation auf einem Überkopfschüttler auf eine Oberfläche appliziert. Beide Varianten wurden nach vier-, sechs- und achtstündiger Inkubation untersucht. Die Keimrate der Konidien von *V. inaequalis* unterschied sich deutlich in Abhängigkeit der Inkubationsart (Abb. 21). Wurden Tropfen der Konidiensuspension auf eine Polystyrol-Oberfläche appliziert und dann für vier bis acht Stunden inkubiert, lag die Keimrate zu allen Inkubationszeiten über 75 %. Bei vorheriger vier- bis achtstündiger Inkubation auf einem Schüttler mit anschließender Applikation auf Polystyrol waren nur maximal 3,5 % der Konidien in der Lage auszukeimen. Nach einer Schüttlerdauer von vier Stunden war keine der applizierten Konidien gekeimt. Auch nach einer Inkubationsdauer von sechs und acht Stunden wurden nur vereinzelt gekeimte Konidien beobachtet.

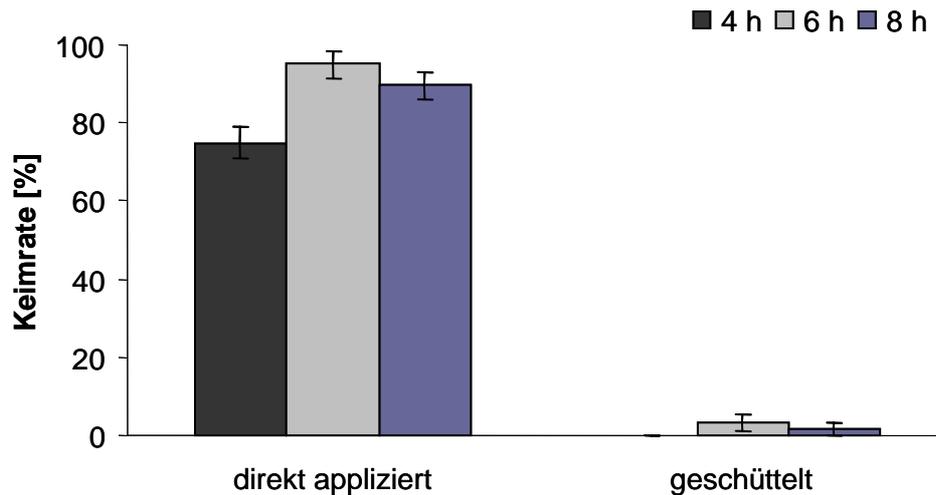


Abb. 21: Einfluss der vorherigen Inkubation von Konidien in Wasser auf die Keimrate von *V. inaequalis* auf Polystyrol (MW \pm SE, n = 6 x 10 Konidien).

3.4 Art der Anheftung der Konidien von *V. inaequalis* an Oberflächen

Die Art und Weise, wie sich Konidien an einer Oberfläche anheften, wurde lichtmikroskopisch untersucht. Dazu wurde die Bewegung von Konidien im künstlich erzeugten Wasserstrom erfasst. Konidien wurden auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Anschließend wurde von einer Seite Wasser zugegeben, welches mittels Filterpapier an der anderen Seite des Deckgläschens sofort wieder abgesaugt wurde, so dass ein Wasserstrom zustande kam. Wie in der Abfolge der Bilder in Abb. 22 zu erkennen ist, bewegte sich die Konidie im Wasserstrom. Die Spitze der Konidie schien fest an einer Stelle zu haften, während der basale Teil der Konidie beweglich war. Dadurch kam es durch die Fließbewegung des Wassers zu einer Drehbewegung der Konidienbasis um die Spitze herum, bis die Konidie im Wasserstrom ausgerichtet war.

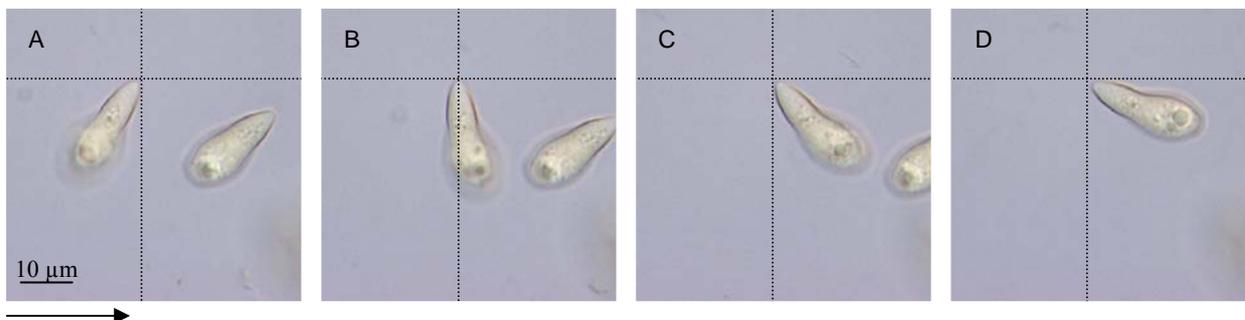


Abb. 22: Rotation einer ungekeimten Konidie von *V. inaequalis* auf Glas in einem Wasserstrom (die Aufnahmen entstanden kurz nach der Zugabe von Wasser auf trockene Konidien, Dauer der Serie: 6 Sekunden, Pfeil: Richtung des Wasserstroms).

Weiterhin konnte beobachtet werden, wie sich eine Konidie beim Kontakt an eine andere Konidie anheftete. Dabei wurde an der Spitze der Konidie eine Substanz sichtbar (Abb. 23). Diese Abbildung gibt einen Anhaltspunkt dafür, dass ungekeimte Konidien von *V. inaequalis* Haftsubstanzen bilden und diese an der Konidienspitze abgeben.



Abb. 23: Anheftung einer Konidie von *V. inaequalis* (rechts) mittels Haftsubstanz (Pfeil) nach Kontakt an eine andere Konidie (Konidien an einer Öl-Wasser-Grenzschicht unmittelbar nach Zugabe von Wasser).

3.5 Visualisierung und Charakterisierung der Haftsubstanzen

3.5.1 Komponenten der Haftsubstanzen

Mit Hilfe von Farbstoffen und spezifisch bindenden Lektinen erfolgte eine Identifizierung einzelner Komponenten der Haftsubstanz. Tab. 15 fasst zusammen, welche Farbstoffe in der Lage waren, Haftsubstanzen an Konidien und anderen Infektionsstrukturen von *V. inaequalis* anzufärben. Dargestellt sind auch Färbungen, die positiv waren, aber nicht immer auftraten bzw. Fluoreszenzmarkierungen, die positiv waren, aber eine für den Farbstoff untypische Färbung zeigten.

Ein Bestandteil der Haftsubstanz an der Spitze von ungekeimten Konidien konnte anhand der Lektine GS-II, welches an terminale, nicht-reduzierte α - und β -N-Acetyl-D-Glucosaminylreste bindet, und PNA, das selektiv an terminale β -Galaktosereste bindet, als Glykoprotein bestimmt werden. Des Weiteren konnten durch die Anfärbbarkeit mit Kongorot Kohlenhydrate bzw. Polysaccharide enthaltende Amyloide nachgewiesen werden. Toluidinblau, welches einen Hinweis auf das Vorhandensein von Phenolen und Polysacchariden gibt, war ebenfalls in der Lage, die Haftsubstanz an der Konidienspitze anzufärben. Die Anfärbbarkeit mit Alcianblau deutete auf das Vorhandensein von Glykoproteinen mit hohem Kohlenhydratanteil bzw. von

Tab. 15: Histochemische Charakterisierung der abgegebenen Haftsubstanz(en) an verschiedenen Strukturen von *V. inaequalis*.

	Ungekeimte Konidie	Keimschlauch	Appressorium
Lektine:			
Con A	Negativ	Negativ	Negativ
GS-II	Positiv	Negativ	Positiv
PNA	Positiv	Negativ	Positiv
WGA	Negativ	Negativ	Negativ
Farbstoffe:			
Alcianblau	Positiv	Negativ	Positiv
Coomassie	Positiv	(Positiv) ¹	Positiv
Blaue Tinte	Positiv	Negativ	Positiv
Erythrosin	Negativ	Negativ	Positiv
Kongorot	Positiv	Negativ	Positiv
Methylenblau	k. A. ¹	k. A.	Positiv
Nigrosin	Negativ	Negativ	Positiv
Säurefuchsin	Negativ	Negativ	Positiv
Schwarze Tinte	Negativ	Negativ	Positiv
Sudanfarbstoffe	Negativ	Negativ	Negativ
Toluidinblau	Positiv	Negativ	Positiv
Trypanblau	Positiv	Negativ	Positiv
Fluoreszenzfarbstoffe:			
Anilinblau	Negativ	Negativ	Negativ
Blankophor	k. A.	k. A.	Negativ
Diethanol	Negativ	Negativ	(Positiv) ²
Kongorot (F)	Negativ	Negativ	(Positiv) ¹
Nilrot	Negativ	Negativ	Negativ
Säurefuchsin (F)	Negativ	Negativ	Positiv

¹ k. A. = keine Angaben; ()¹ = i. d. R. positiv, aber nicht immer auftretend; ()² = immer auftretend, aber untypisch

Mucopolysacchariden hin. Auch Proteine scheinen Bestandteil dieser Haftsubstanz zu sein, da die Haftsubstanz sowohl mit Coomassie als auch mit Tinte anfärbbar war. Ein negatives Ergebnis für die Visualisierung der Haftsubstanz an ungekeimten Konidien brachte die Verwendung der Lektine Con A und WGA sowie die Farbstoffe Erythrosin, Nigrosin, Säurefuchsin, schwarze Tinte, Sudan III und Sudan Rot B sowie alle Fluoreszenzfarbstoffe. Somit waren u. a. Lipide bzw. neutrale Fette, Glukane sowie Acetylglucosamine (Chitin) nicht in der Haftsubstanz von ungekeimten Konidien nachweisbar.

Haftsubstanzen an den Keimschläuchen wurden nur in wenigen Fällen nachgewiesen. Lediglich mittels Coomassie wurden gefärbte Bereiche entlang des Keimschlauches sichtbar, die auf das Vorhandensein von Proteinen schließen lassen. In den anderen Fällen wurden nur Teile des Keimschlauches bzw. der Zellwand, aber keine als Haftsubstanz bestimmbar Bereiche gefärbt. Die meisten Farbstoffe ergaben keine Färbung.

Um die Appressorien bildete sich ein unterschiedlich stark ausgeprägter Bereich, der sich mit einer Vielzahl von Farbstoffen anfärben ließ. Einige Fluoreszenzfarbstoffe sowie die verwendeten Sudanfarbstoffe, welche Lipide und fettartige Substanzen färben, waren nicht in der Lage, Haftsubstanzen um die Appressorien anzufärben. Auch die Lektine Con A, ein Indikator für α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin, und WGA, welches mit abnehmender Bindungsstabilität an β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₃ und β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₂N-Acetylneuraminsäure bindet, konnten nicht an die appressoriale Haftsubstanz binden.

3.5.2 Ausprägung und Lokalisierung der Haftsubstanzen

Durch die Verwendung verschiedener Farbstoffe und Lektine sowie mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurde die Lage bzw. die Ausprägung der Haftsubstanzen an Konidie, Keimschlauch und Appressorium auf Glas und Polystyrol im Lichtmikroskop erkennbar.

3.5.2.1 Ungekeimte Konidien

Die mittels Kongorot und blauer Tinte anfärbbare Haftsubstanz an ungekeimten Konidien von *V. inaequalis* war auf einen engen Bereich dicht an der Konidienspitze beschränkt (Abb. 24 A und B). Der Farbstoff Trypanblau färbte nur ganz schwach die Haftsubstanz an der Konidienspitze, die nur als dünner Faden zu erkennen war (Abb. 24 C). Nach der Behandlung mit Coomassie hingegen war ein größerer Bereich sichtbar, der sich kreisförmig um die Konidienspitze legte. Dieser war auch nach der Entfernung der Konidie noch sehr gut auf der Polystyrol-Oberfläche erkennbar (Abb. 24 D). Alcianblau und Toluidinblau waren ebenfalls in

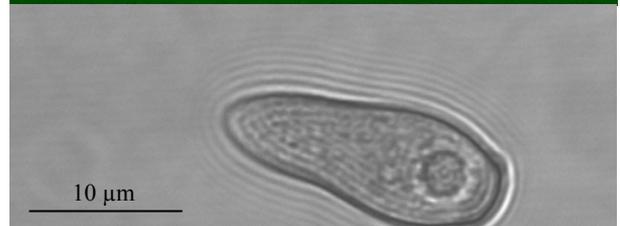
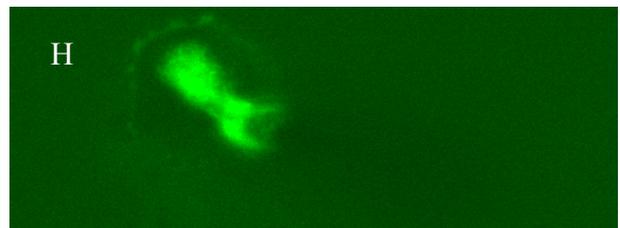
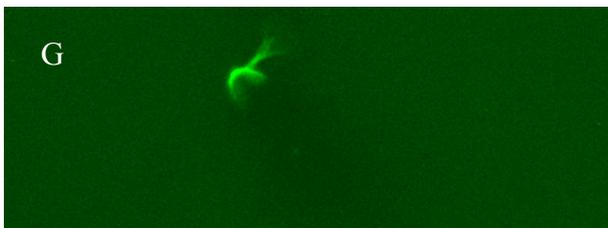
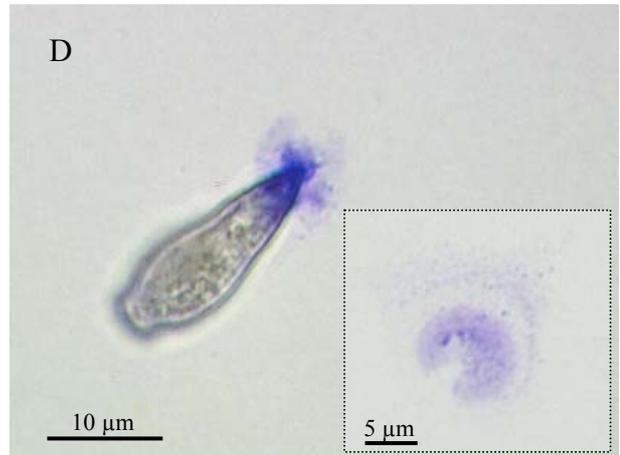
der Lage, einen kleinen kreisförmigen Bereich an der Konidienspitze anzufärben (Abb. 24 E und F). Die Farbintensität war bei Alcianblau allerdings gering.

Die Verwendung des Lektins GS-II zum Nachweis von Glucosaminyresten von Glykoproteinen führte zu einer Markierung der Haftsubstanz an der Konidienspitze (Abb. 24 G). Mittels GS-II wurde ein kleinerer Bereich markiert als mit dem Lektin PNA, welches selektiv an Galaktosereste von Glykoproteinen bindet. Das Aussehen der Haftsubstanz war ähnlich derjenigen, die durch die Färbung mit Coomassie sichtbar wurde (Abb. 24 H).

Mit dem Lektin WGA, welches zum Nachweis von Acetylglucosamin (Chitin) verwendet wird, ließ sich nur die Basis von ungekeimten Konidien markieren (Abb. 25 A). Erst mit beginnender Keimung, etwa zwei Stunden nach Inokulation, kam es auch an der abgerundeten Konidienspitze zu einer Anlagerung von WGA (Abb. 25 B). Haftsubstanzen konnten mittels Markierung mit WGA nicht festgestellt werden. Das Texas Red[®]-markierte Lektin Con A – zum Nachweis von Mannose - konnte an der Zellwand der Konidienspitze binden, nicht aber an die gebildete Haftsubstanz (Abb. 25 C). Auch Anilinblau zeigte im Fluoreszenzbild keine Färbung von Haftsubstanz, obwohl eine positive Färbung an der Konidienspitze gegeben war (Abb. 25 D).

Folgende Seite:

Abb. 24: Einfluss des Farbstoffes bzw. Lektins auf die Anfärbarkeit der Haftsubstanz von ungekeimten Konidien von *V. inaequalis* nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Glas und Polystyrol. Kongorot (A), blaue Tinte (B) Trypanblau (C), Coomassie (D), Alcianblau (E), Toluidinblau (F), GS-II (G), PNA (H) (Insert in D: Haftsubstanz nach Entfernung der Konidie, A, B, F-H: Glas, C-E: Polystyrol, A-F: Durchlicht-, G, H: Lasermikroskopie).



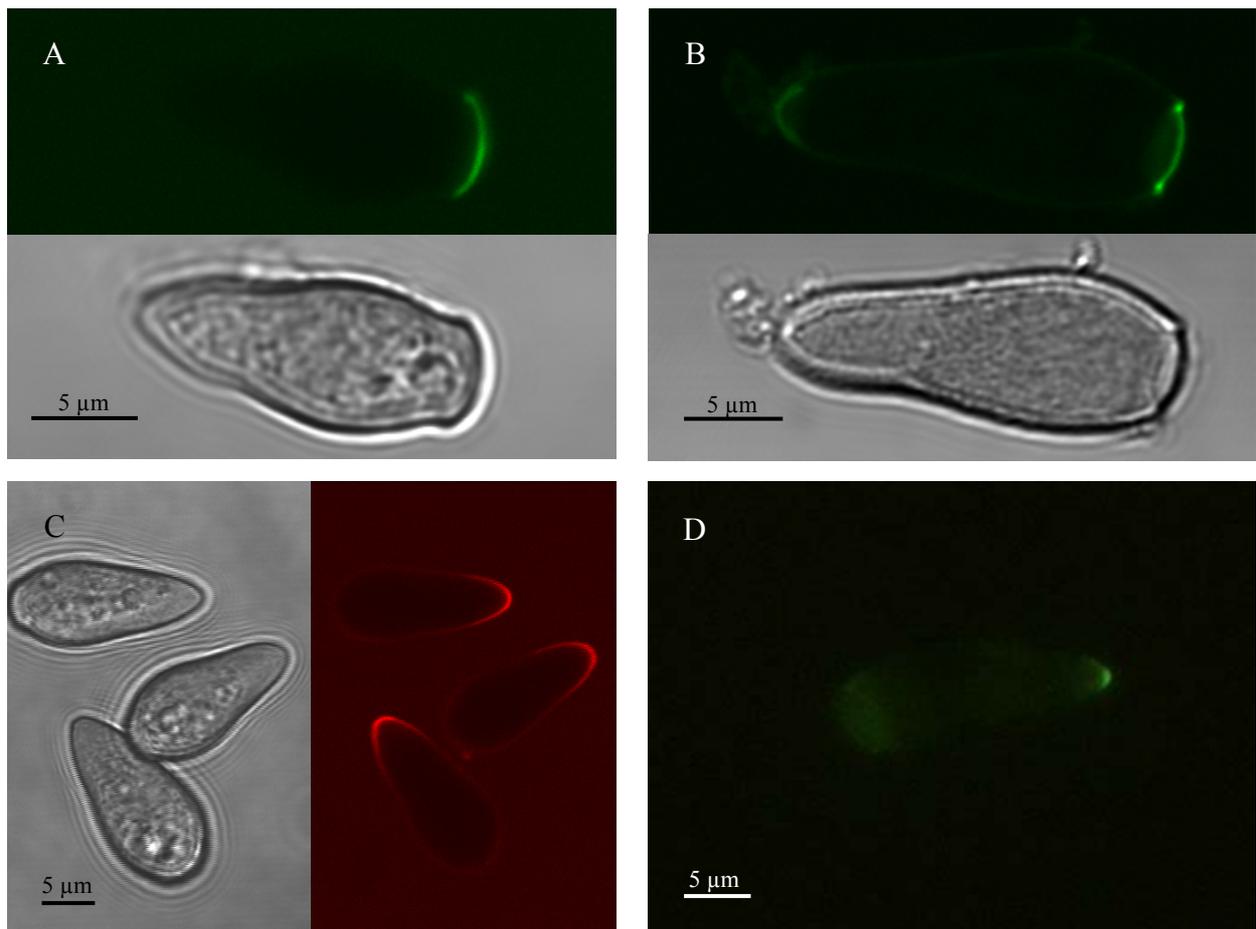


Abb. 25: Einfluss des Farbstoffes bzw. Lektins auf die Anfärbbarkeit von ungekeimten Konidien von *V. inaequalis* nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten und zwei Stunden auf Glas. WGA nach 15 min (A) und nach 2 h (B), Con A nach 2 h (C), Anilinblau nach 15 min (D), (A-C: Laser-, D: Durchlichtmikroskopie).

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurde die Form von dehydrierten Konidien mit deutlich erkennbarer globulärer Struktur an der Konidienspitze sichtbar (Abb. 26 A). Eine Zweiteilung der globulären Struktur an der Konidienspitze war als ein kleiner elektronendichter Bereich erkennbar, um dem sich ein größerer heller Bereich befand (Abb. 26 B). Weiterhin wurde beobachtet, dass es entweder zu einer Verteilung dieser meist rundlichen Teile bis in den äußeren Bereich der globulären Struktur (Abb. 26 C) oder zu einer vermehrten Anlagerung von dunkleren, elektronendichten Teilen direkt an der Konidienspitze kam (Abb. 26 D). In seltenen Fällen wurden auch zwei dieser globulären Strukturen an der Konidienspitze sichtbar (Abb. 26 E). Bei einigen Konidien hatte es den Anschein, als ob mehrere Poren an der Spitze der Konidie

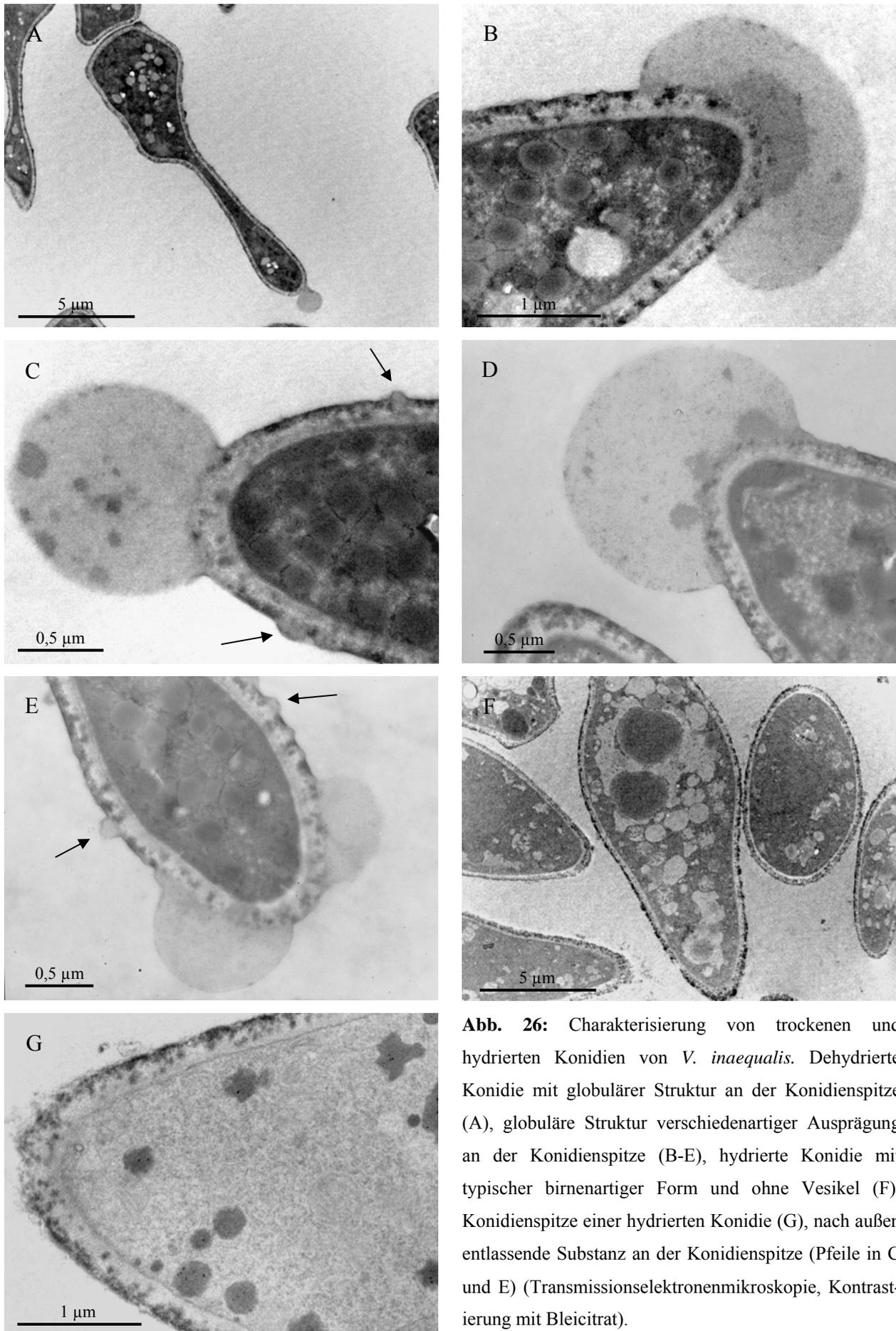


Abb. 26: Charakterisierung von trockenen und hydrierten Konidien von *V. inaequalis*. Dehydrierte Konidie mit globulärer Struktur an der Konidienspitze (A), globuläre Struktur verschiedenartiger Ausprägung an der Konidienspitze (B-E), hydrierte Konidie mit typischer birnenartiger Form und ohne Vesikel (F), Konidienspitze einer hydrierten Konidie (G), nach außen entlassende Substanz an der Konidienspitze (Pfeile in C und E) (Transmissionselektronenmikroskopie, Kontrastierung mit Bleicitrat).

vorhanden waren, die die Haftsubstanz nach außen entlassen (Abb. 26 C, E). Hydrierte Konidien wiesen im Transmissionselektronenmikroskop einen flaschenförmigen Umriss auf (Abb. 26 F), und an der Konidienspitze waren nur noch Reste der Haftsubstanz zu sehen; die globuläre Struktur war nicht mehr nachweisbar (Abb. 26 G). Eine Besonderheit an der Spitze von hydrierten Konidien war eine Aufhellung der Zellwand, sowie eine weniger scharf abgegrenzten Membran (Abb. 26 G).

3.5.2.2 Gekeimte Konidien ohne Appressorien

Die Verwendung der Farbstoffe erbrachte wenige Hinweise auf das Vorhandensein von Haftsubstanzen am Keimschlauch. Mittels Coomassie wurden zwar Bereiche an der Spitze des Keimschlauches sowie in der Höhe des Übergangs von der Konidie zum Keimschlauch gefunden, diese traten allerdings sporadisch auf (Abb. 27 A und B). In der Regel war mit Coomassie keine Färbung oder nur gelegentlich eine leichte Färbung am Übergang zwischen Konidie und Keimschlauch festzustellen. Auch mittels Alcianblau, Kongorot und blauer Tinte war dieser Bereich an Konidien anfärbbar, trat aber auch hier nur gelegentlich auf und war unterschiedlich stark ausgeprägt (Abb. 27 C-E). Der Keimschlauch selbst blieb in der Regel ungefärbt. Die Lektine GS-II und PNA sowie der Farbstoff Anilinblau markierten nur die Zellwand der noch wachsenden Keimschlauchspitzen (Abb. 27). An andere Teile des Pilzes konnten weder die Lektine noch Anilinblau binden. WGA markierte nur nicht-melanisierte Teile der Konidien und des Keimschlauches. Es war eine homogene Anlagerung am Keimschlauch festzustellen. Ein stärkeres Signal wurde nur an der Konidienbasis sowie am Übergang zwischen Konidie und Keimschlauch beobachtet (Abb. 28 A und B).

Folgende Seite:

Abb. 27: Einfluss des Farbstoffes bzw. Lektins auf die Anfärbbarkeit von gekeimten Konidien von *V. inaequalis* vier Stunden nach Applikation der Suspension auf Glas. Coomassie (A, B), Alcianblau (C), Kongorot (D), blaue Tinte (E), PNA (F) (Durchlichtmikroskopie).

Abb. 28: Nachweis von Acetylglucosamin in den Zellwänden von Konidie und Keimschlauch von *V. inaequalis* mit WGA 24 Stunden nach Applikation der Suspension auf Glas. (Lasermikroskopie).

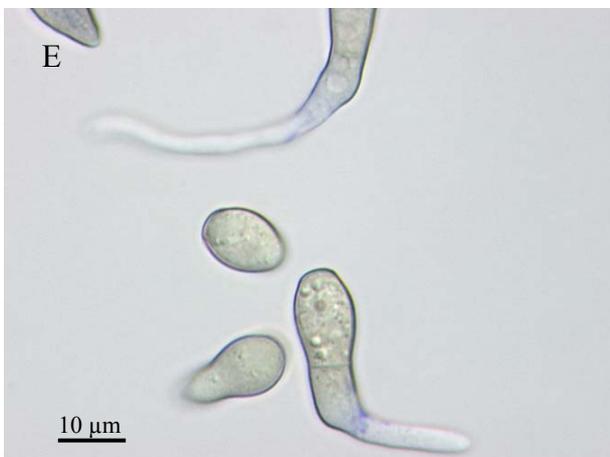
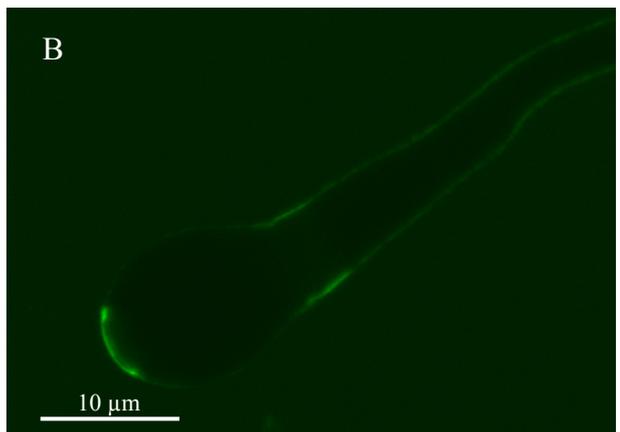
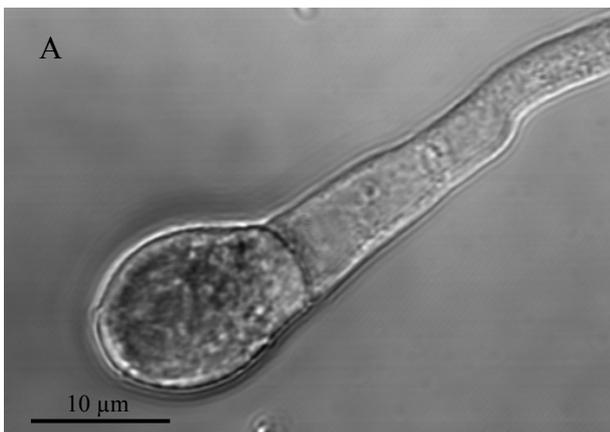


Abb. 27: oben; Abb. 28: unten



3.5.2.3 Gekeimte Konidien mit Appressorien

Die Haftsubstanz, die an Appressorien zu finden war, ließ sich durch die meisten der untersuchten Farbstoffe anfärben. Sie zeichnete sich durch einen kreisförmigen, etwas ausladenden Bereich aus, der sich um die Appressorien legte. Aufgrund der verschiedenen Färbungen konnte die Haftsubstanz in zwei unterschiedliche Bereiche eingeteilt werden: einen kompakt ausgebildeten Bereich, der eng am Appressorium anlag, und einen zweiten filigran geformten Bereich, der sich auf der Oberfläche, auf dem sich das Appressorium befand, ausbreitete. Beide Bereiche ließen sich gut mit Coomassie anfärben (Abb. 29 A). Ein Unterschied im Erscheinungsbild der Haftsubstanz auf Glas und Polystyrol konnte nicht festgestellt werden. Eine ähnliche Form der Haftsubstanz wurde mit Alcianblau, blauer Tinte, Kongorot, Methylenblau und Diethanol angefärbt (Abb. 29 B-F). Bei Säurefuchsin, Toluidinblau, Trypanblau und Erythrosin war der eng am Appressorium liegende Bereich nicht zu sehen, sondern nur der größere Bereich mit filigranem Rand (Abb. 30 A-D). Am schlechtesten ließ sich die Haftsubstanz mit Nigrosin und schwarzer Tinte anfärben (Abb. 30 E, F). Es war nur ein leicht schwarzer, diffuser Bereich um die Appressorien zu beobachten. Von den vier verwendeten Lektinen konnten nur diejenigen die Haftsubstanz am Appressorium markieren, die vorher an ungekeimten Konidien an die Haftsubstanz binden konnten. GS-II und PNA erzeugten mittels der gekoppelten Fluorochrome starke Signale an denjenigen Appressorien, die von Haftsubstanzen umgeben waren (Abb. 31 A, B). Auch hier wiesen die Randbereiche eine filigrane Struktur auf. Die anderen beiden Lektine Con A und WGA markierten nur die Zellwände von Keimschlauch und Appressorium bzw. von der Konidie (nur Con A), aber keine Haftsubstanz (Abb. 31 C, D). Blankophor zeigte ebenfalls keine Färbung.

Die Haftsubstanz wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie sowie auf Semi- und Ultradünnschnitten für die Transmissionselektronenmikroskopie sichtbar (Abb. 32). Konidien von *V. inaequalis* hatten 16 bis 24 Stunden nach der Inokulation Keimschläuche und Appressorien gebildet (Abb. 32 A). Häufig wurden von den Konidien direkt Appressorien, ohne Bildung eines Keimschlauches, generiert (Abb. 32 B). Auf der Blattoberfläche im Bereich des Appressoriums wurde die Haftsubstanz sichtbar, die unterschiedlich stark ausgeprägt war (Abb. 32 B-D, F). Diese extrazelluläre Matrix schien das Appressorium in unmittelbarer Nähe regelrecht einzubetten. Sie hatte eine fädige Erscheinungsform und flachte mit zunehmender Entfernung zum Appressorium immer mehr ab (Abb. 32 H). Die Bildung von Primärstromata 48 Stunden nach der Inokulation wurde durch die Aufwölbung der Kutikula erkennbar (Abb. 32 E, G).

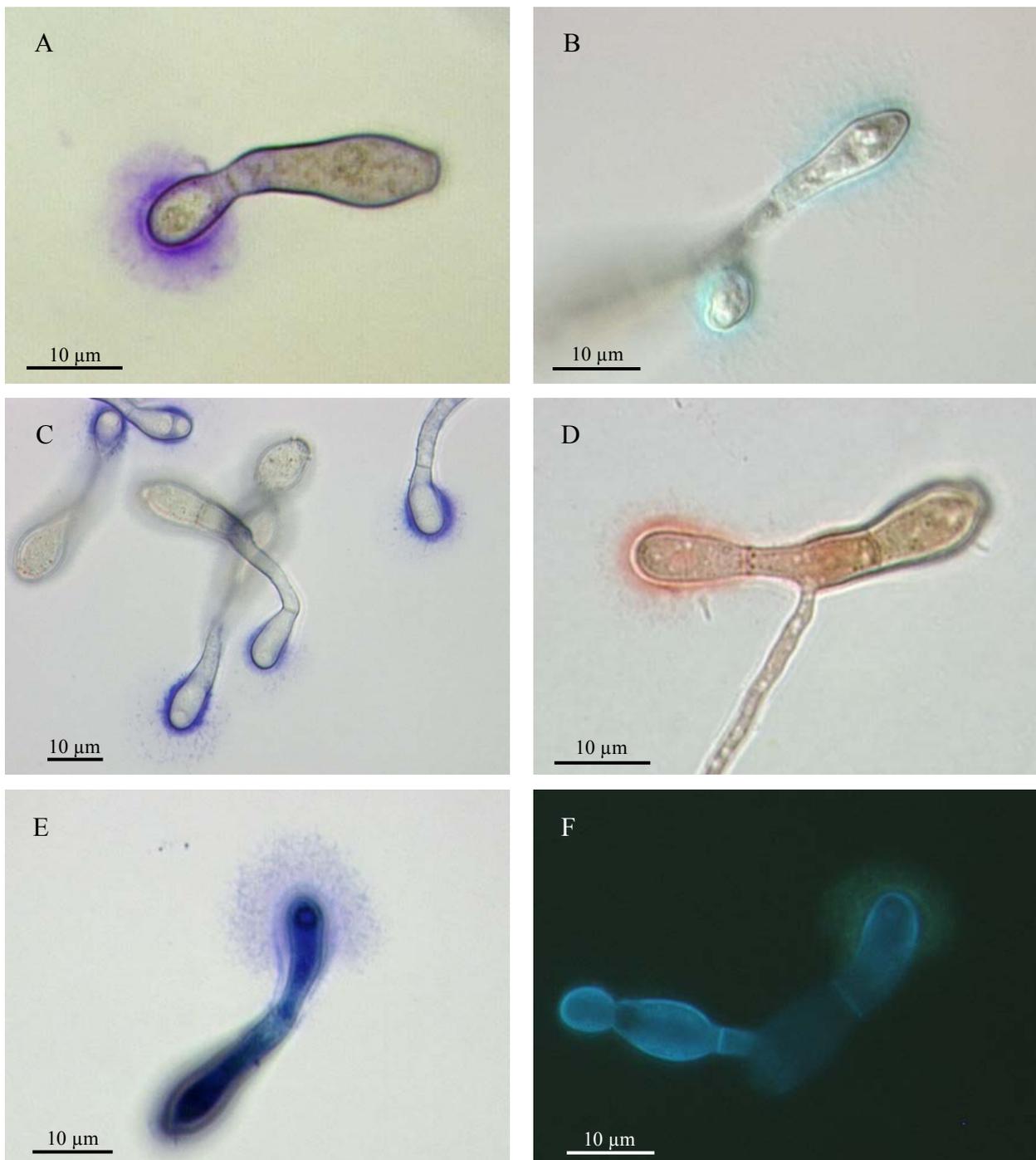


Abb. 29: Einfluss des Farbstoffes auf die Anfärbbarkeit der appressorialen Haftsubstanz von gekeimten Konidien von *V. inaequalis* 24 Stunden nach Applikation der Suspension auf Glas und Polystyrol. Coomassie (A), Alcianblau (B), blaue Tinte (C), Kongorot (D), Methylenblau (E), Diethanol (F) (B-E: Glas, A, F: Polystyrol, Durchlicht-, Fluoreszenzmikroskopie).

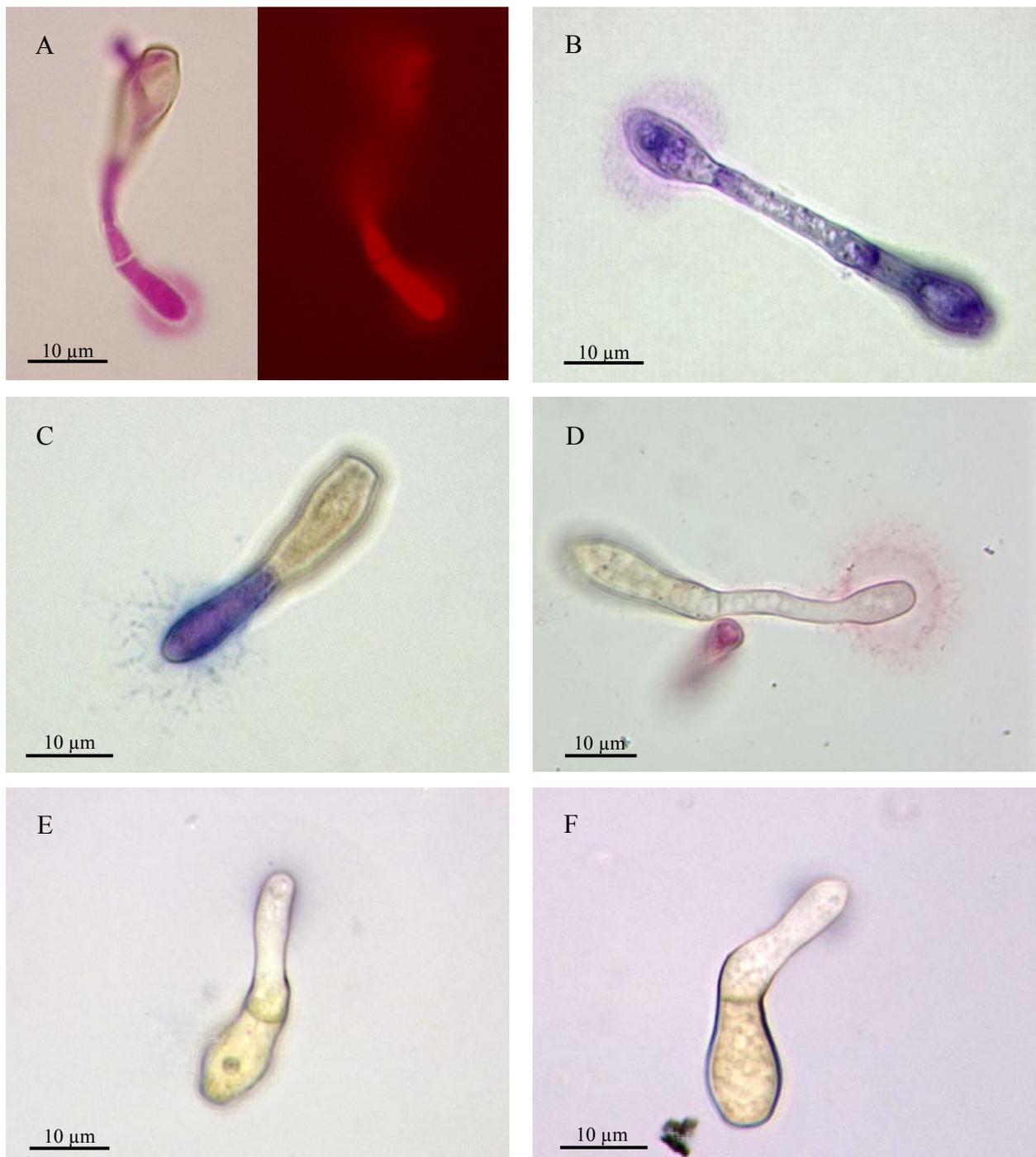


Abb. 30: Einfluss des Farbstoffes auf die Anfärbarkeit der appressorialen Haftsubstanz von gekeimten Konidien von *V. inaequalis* 24 Stunden nach Applikation der Suspension auf Glas und Polystyrol. Säurefuchsin (A), Toluidinblau (B), Trypanblau (C), Erythrosin (D), Nigrosin (E), schwarze Tinte (F) (A, B, D-F: Glas, C: Polystyrol, Durchlicht-, Fluoreszenzmikroskopie).

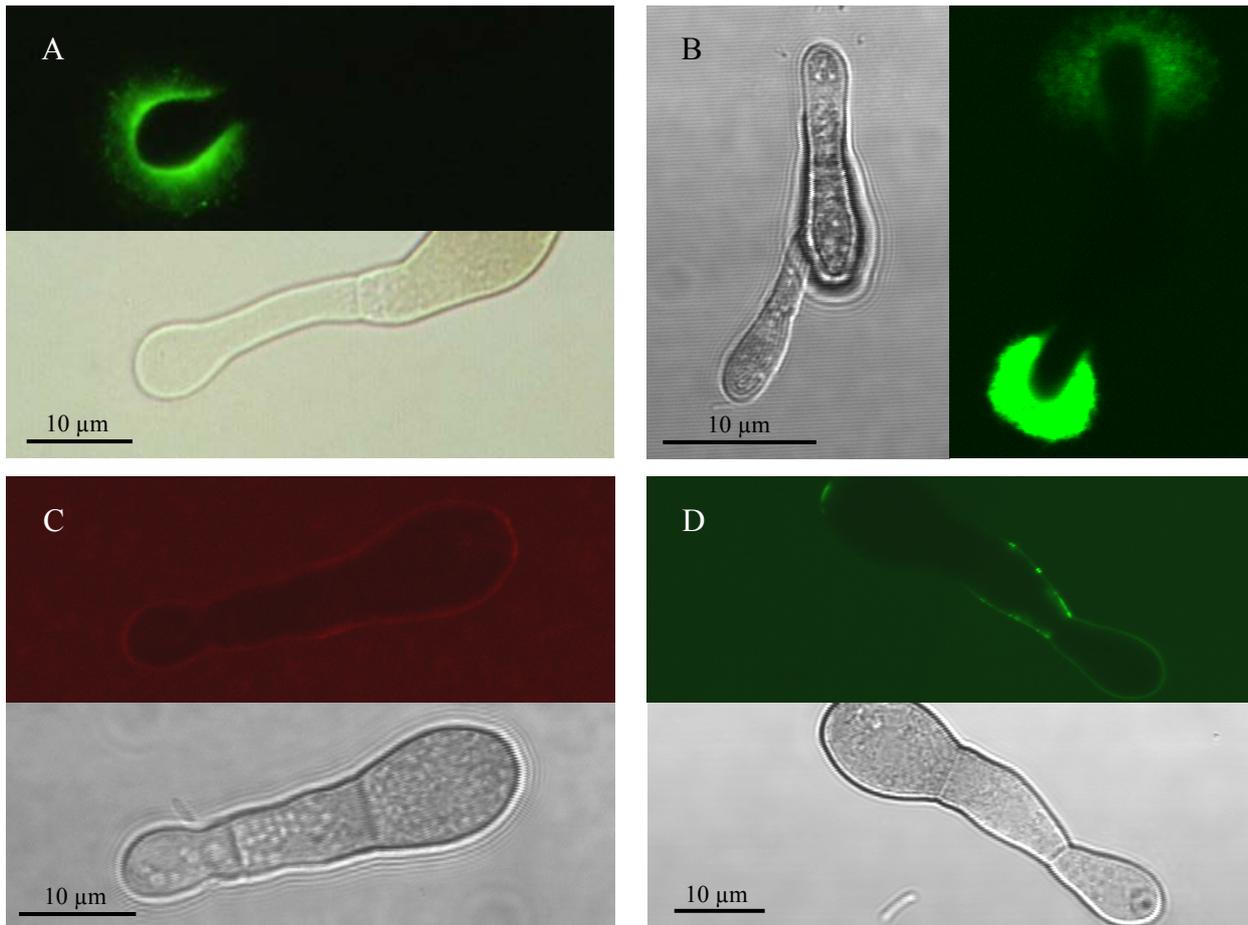
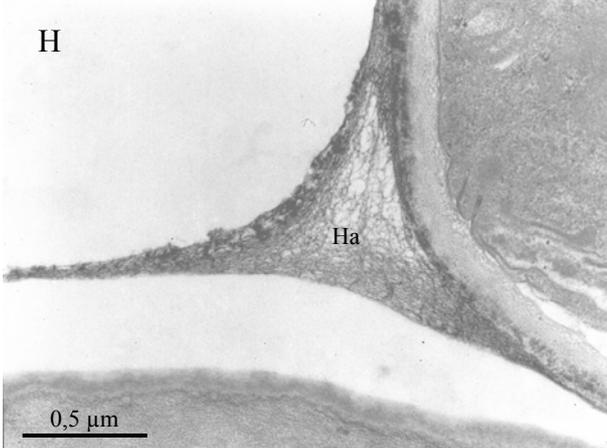
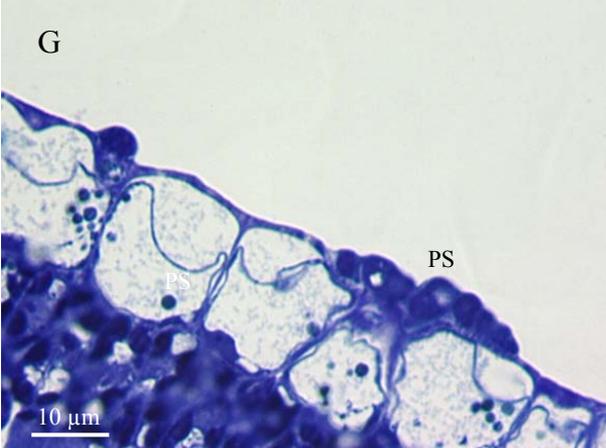
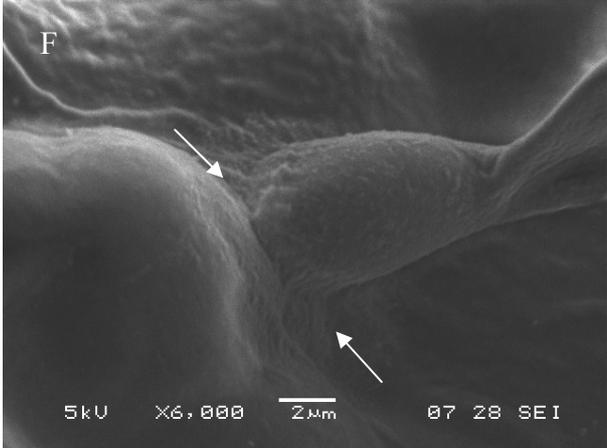
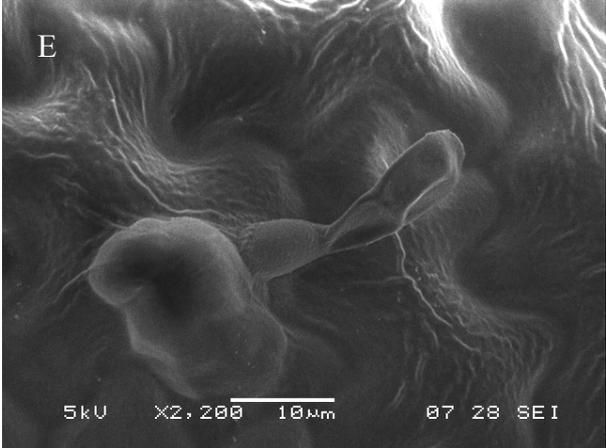
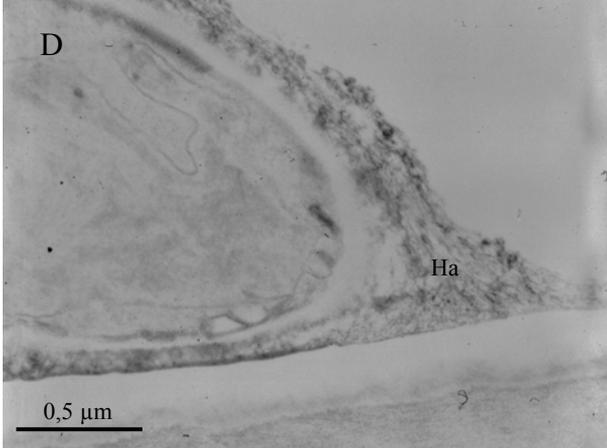
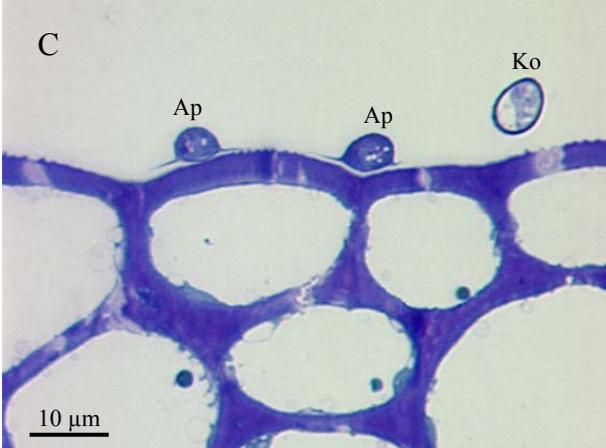
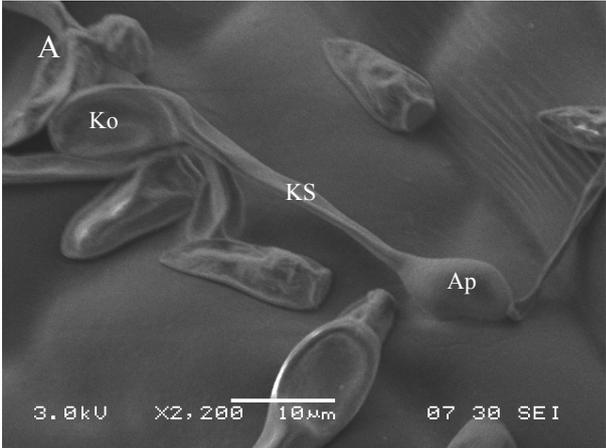


Abb. 31: Einfluss des Lektins auf die Anfärbbarkeit der Konidien von *V. inaequalis* mit Keimschläuchen und Appressorien 24 Stunden nach Applikation auf Glas. GS-II (A), PNA (B), Con A (C), WGA (D) (Lasermikroskopie).

Folgende Seite:

Abb. 32: Infektionsstrukturen und appressoriale Haftsubstanz von Konidien von *V. inaequalis* 16 bis 48 Stunden nach Inokulation. Konidie (Ko) mit Keimschlauch (KS) und Appressorium (Ap) 16 Stunden nach Inokulation (A), unterschiedlich stark ausgeprägte Ausscheidungen (Pfeile) am Appressorium 24 Stunden nach Inokulation (B - D, F), Bildung von Primärstromata (PS) mit Aufwölbung der Blattoberfläche 48 Stunden nach Inokulation (E, G), sich mit zunehmender Entfernung abflachende Haftsubstanz (Ha) am Appressorium (H) (Blattinsertion „oben-2“, A, B, E, F: SEM, C, G: Hellfeld, D, H: TEM) (D: 50 kV, H: 80 kV) (Anmerkung zu den TEM-Bildern: bedingt durch den Entwässerungsprozess während der Präparation kam es zu einer Ablösung der Infektionsstrukturen von der Blattoberfläche, so dass ein Zwischenraum entstand).



3.5.3 Ablösbarkeit der appressorialen Haftsubstanz

Die durch kräftiges mechanisches Abschaben mit einem Glasobjektträger auf Polystyrol nicht entfernbare Haftsubstanz konnte durch die Färbung mit Coomassie nachgewiesen werden (Abb. 33). Während die Appressorien zum größten Teil entfernt worden waren oder nur noch einzelne Zellreste zu sehen waren, waren die das Appressorium umgebenden Substanzen noch erhalten. Auch von *V. inaequalis* gebildete Melaninringe waren nach der mechanischen Behandlung noch sichtbar. Um die Haftsubstanz genauer zu charakterisieren, wurden die Überreste mit verschiedenen Lösungen behandelt und untersucht, ob sie sich ablösen ließen. Keine der verwendeten Substanzen war in der Lage, die appressoriale Haftsubstanz von der Oberfläche zu entfernen (Tab. 16). Auch längeres Einwirken von 12 Stunden und die Behandlung im Ultraschallbad brachte keinen Erfolg.

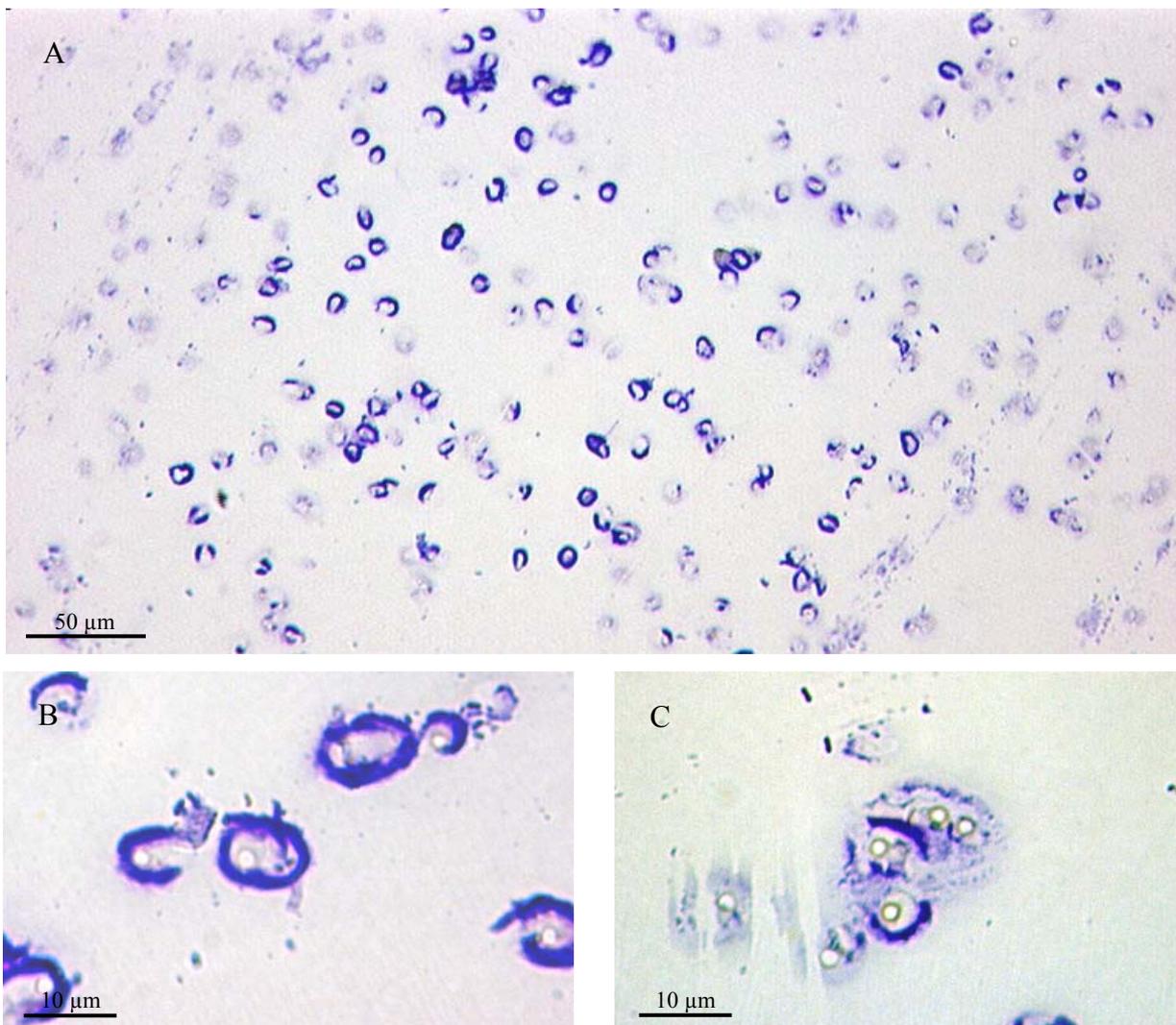


Abb. 33: Nachweis der Haftsubstanzen von entfernten Appressorien von *V. inaequalis* auf Polystyrol mittels Coomassie (A). Haftsubstanzen (B), zurückgebliebene Melaninringe (C) (Durchlichtmikroskopie).

Tab. 16: Einfluss der Lösung auf die Entfernbarekeit der Appressorien-Haftsubstanz von *V. inaequalis* 18 Stunden nach Applikation der Konidinsuspension auf Polystyrol.

Lösung	Inkubation		Ultraschall
	5 min	12 h	1 min
Extraktionspuffer (MANKEL 2001)	Negativ	Negativ	Negativ
TFA ¹	Negativ	Negativ	Negativ
60 % Ethanol	Negativ	Negativ	Negativ
98 % Ethanol	Negativ	Negativ	Negativ
Proteinase K	k. A. ²	Negativ	k. A.
10 % SDS	k. A.	Negativ	k. A.
A. demin.	k. A.	Negativ	k. A.

¹ TFA = Trifluoressigsäure; ² k. A. = keine Angabe

3.6 Verlagerung von Lipiden während der Entwicklung von *V. inaequalis*

Speicherlipide wurden durch die Verwendung der beiden Farbstoffe Nilrot und Sudan Rot B sichtbar gemacht. Haftsubstanzen waren mittels dieser Farbstoffe weder an der Konidie noch am Keimschlauch oder dem Appressorium erkennbar. Die Verteilung der intrazellulären Lipide konnte allerdings deutlich in der Entwicklung des Pathogens verfolgt werden. In ungekeimten Konidien waren in der Regel wenige große Lipidtropfen vorhanden. Meistens waren sie als ein großer Tropfen im basalen Teil und wenige mittelgroße Tropfen im apikalen Teil der Konidie lokalisiert (Abb. 34 A, E). Mit beginnender Keimung nach etwa zwei Stunden verkleinerten sich die Lipidtropfen und waren dann in der gesamten Konidie verteilt (Abb. 34 B). Konidien, die einen Keimschlauch ausgebildet hatten, enthielten viele kleine Lipidtropfen. Sie waren vor allem im Keimschlauch, und immer weniger in der Konidie zu finden (Abb. 34 C, F). Nach der Ausbildung eines Appressoriums waren die meisten, zum Teil sehr kleinen Tropfen, bei der Nilrotfärbung im Appressorium bzw. bei der Färbung mit Sudan Rot B im Keimschlauch zu erkennen (Abb. 34 D, G).

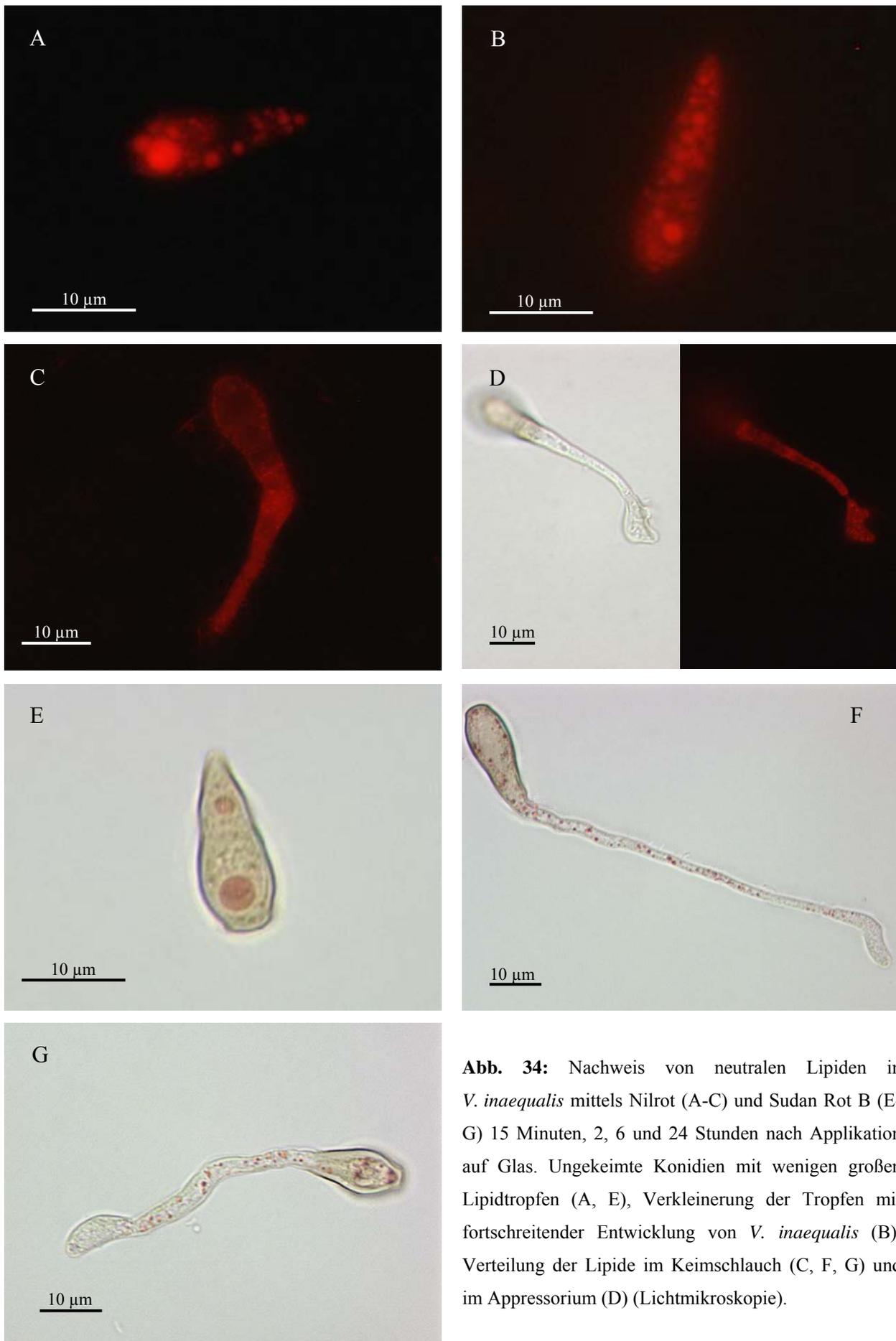


Abb. 34: Nachweis von neutralen Lipiden in *V. inaequalis* mittels Nilrot (A-C) und Sudan Rot B (E-G) 15 Minuten, 2, 6 und 24 Stunden nach Applikation auf Glas. Ungekeimte Konidien mit wenigen großen Lipidtröpfchen (A, E), Verkleinerung der Tröpfchen mit fortschreitender Entwicklung von *V. inaequalis* (B), Verteilung der Lipide im Keimschlauch (C, F, G) und im Appressorium (D) (Lichtmikroskopie).

3.7 Einfluss der Oberfläche auf die Entwicklung von *V. inaequalis*

Konidien suspensionen von *V. inaequalis* wurden auf verschiedene Oberflächen aufgebracht, um zu untersuchen, wie sich das Pathogen nach vier, sechs, acht und 24 Stunden auf der jeweiligen Oberfläche entwickelte. Um zu untersuchen, ob das Blattalter einen Einfluss auf die Entwicklung von *V. inaequalis* auf der Blattoberfläche hat, wurden 48 Stunden nach der Inokulation, einem Zeitpunkt, zu dem alle vitalen Konidien erfolgreich Infektionsstrukturen gebildet haben, Keimrate, Keimschlauchwachstum und Appressorienbildung auf vier verschiedenen Blattinsertionen erfasst. Außerdem wurde die Stärke des Melaninringes im Appressorium sowie der Ort der Eindringung in Abhängigkeit von der Blattinsertion untersucht. Die Entwicklung der weiteren Strukturen im Blatt sowie der Symptome wurden ebenfalls erfasst.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich das Pathogen nach 48 Stunden entwickelt hat, wenn es auf Modelloberflächen unterschiedlicher Hydrophobizität bzw. auf Apfelblattwachse, die vorher auf eine Glasoberfläche aufgebracht worden waren, appliziert wird.

3.7.1 Keimung

3.7.1.1 Zeitlicher Verlauf

Die Geschwindigkeit der Keimung der Konidien unterschied sich auf den verschiedenen Oberflächen (Abb. 35). Auf Glas waren nach vier Stunden erst 35 % der Konidien von *V. inaequalis* gekeimt, auf den beiden untersuchten Blattinsertionen von Apfelsämlingen und Polystyrol waren es bereits ca. 63 %. Auf Parafilm lag die Keimrate mit knapp 50 % dazwischen. Außer auf Glas war auf allen anderen Oberflächen ein rasche Erhöhung der Keimrate festzustellen. Innerhalb von vier Stunden kam es zu einem Anstieg auf 90 % (Blattinsertion „oben“) bzw. 83 % (Parafilm[®]). Auf Glas hingegen waren auch nach acht Stunden erst knapp 50 % der Konidien gekeimt. Erst 24 Stunden nach der Inokulation von *V. inaequalis* konnten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den unterschiedlichen Oberflächen festgestellt werden. Auf allen Oberflächen waren 87 % bis 94 % der Konidien ausgekeimt.

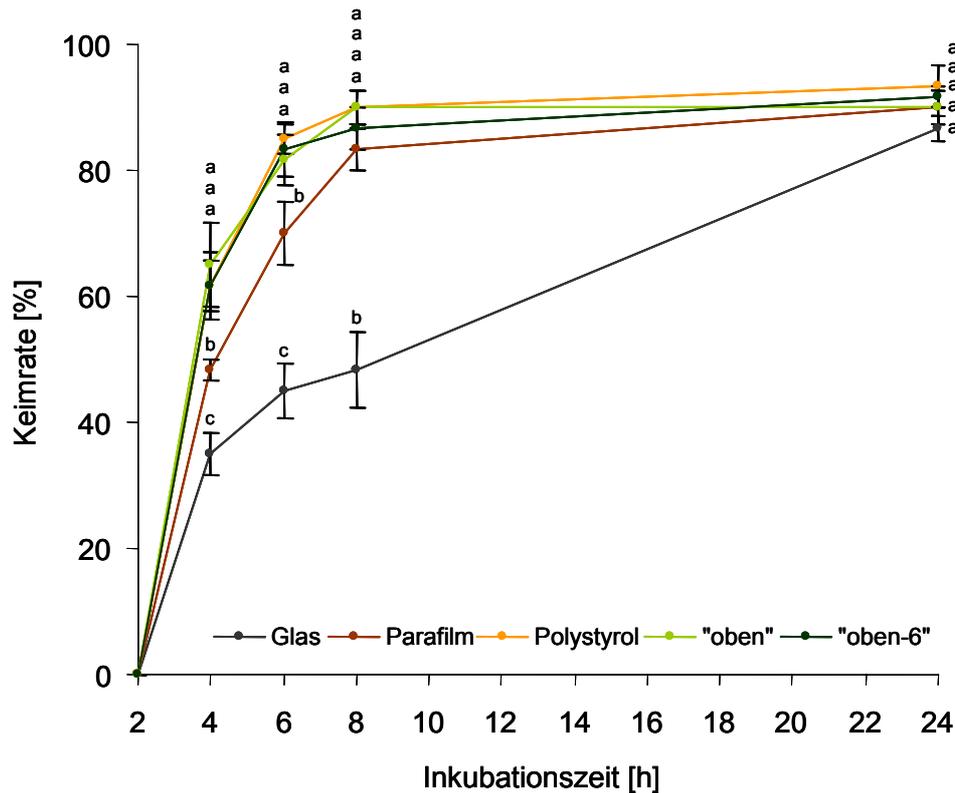


Abb. 35: Einfluss der Kontaktfläche auf die Keimung der Konidien von *V. inaequalis* vier bis 24 Stunden nach Inokulation (MW \pm SE, unterschiedliche Buchstaben zu jedem Boniturtermin kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$).

Stelle der Keimschlauchausbildung

V. inaequalis wies, unabhängig von der Blattinsertion, eine bevorzugte Stelle an der Konidie auf, an der der Keimschlauch generiert wurde (Tab. 17). Bei ca. 90 % der Konidien kam es an der apikalen Seite zur Ausbildung des Keimschlauches. Mit maximal 7,3 % war ein Auskeimen im oberen Drittel der Konidie zu beobachten. Selten wurde der Keimschlauch seitlich (max. 4 %) bzw. in der Nähe der Basis der Konidien (max. 1,5 %) ausgebildet (Abb. 36). Auch auf Modelloberflächen inkubierte Konidien keimten hauptsächlich an der Spitze aus.

Tab. 17: Stelle der Keimschlauchausbildung an Konidien von *V. inaequalis* vier Stunden nach Inokulation auf verschiedene Blattinsertionen (MW \pm SE, $n = 4 \times 40$ Konidien, Angaben in %).

	Konidienspitze	oberes Drittel	seitlich	basal
oben	90,1 \pm 3,1	7,1 \pm 1,2	2,8 \pm 2,8	0,0 \pm 0,0
oben-2	90,2 \pm 3,7	5,9 \pm 2,6	3,9 \pm 1,5	0,0 \pm 0,0
oben-4	89,2 \pm 1,9	7,3 \pm 1,8	3,6 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0
oben-6	92,5 \pm 2,4	4,0 \pm 1,6	2,4 \pm 1,5	1,1 \pm 1,1

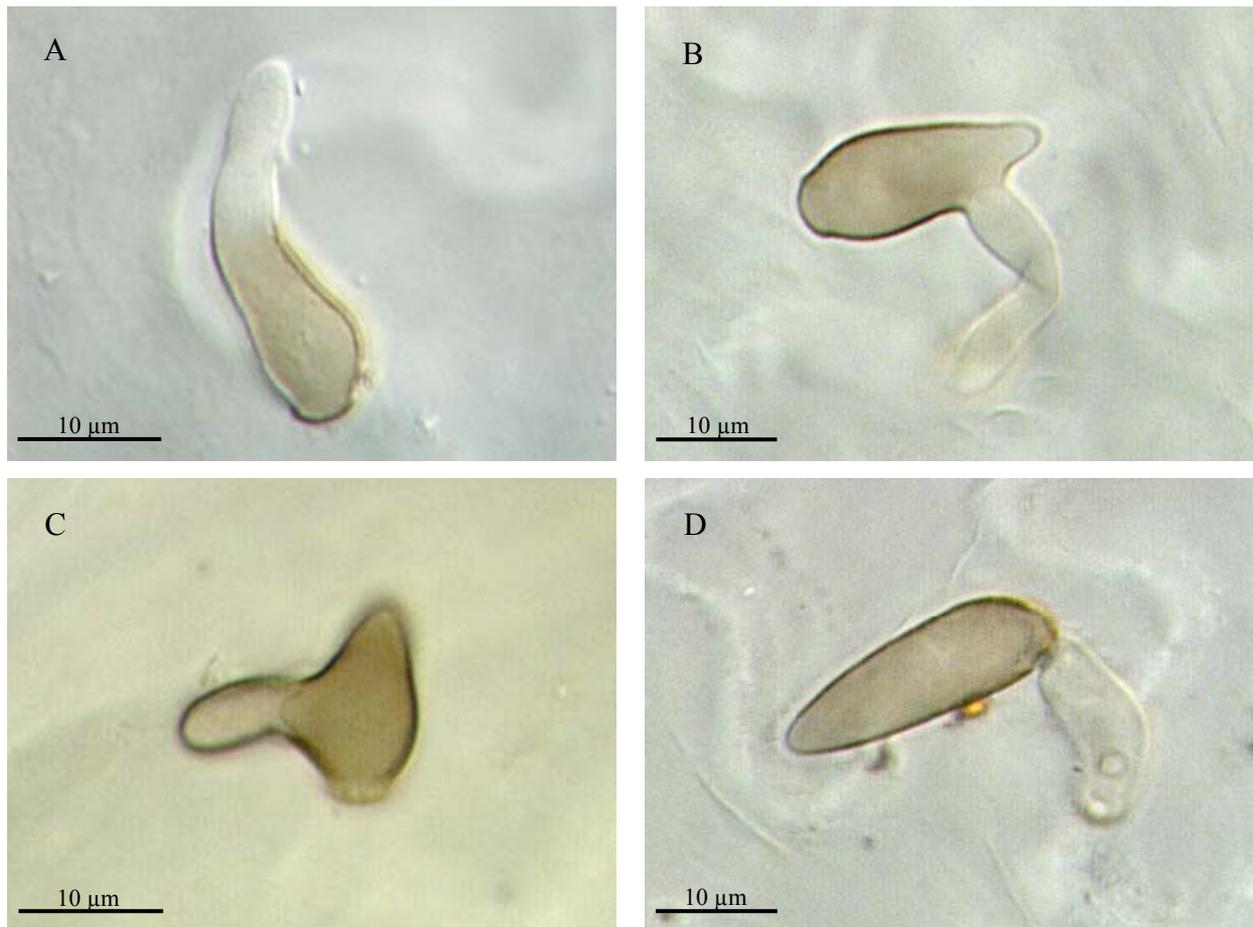


Abb. 36: Stellen der Keimschlauchausbildung an Konidien von *V. inaequalis*. Keimung der Konidie an der Konidienspitze (A), im oberen Drittel der Konidie (B), am mittleren Teil der Konidie (C), am basalen Teil der Konidie (D) (Aufnahmen vier (A), acht (C) und 48 Stunden (B, D) nach der Inokulation auf der Blattinsertion „oben-2“ (B, D), „oben-4“ (A) und „oben-6“ (C), Durchlichtmikroskopie).

3.7.1.2 Blattinsertion

Die Keimung der Konidien von *V. inaequalis* erfolgte 48 Stunden nach der Inokulation unabhängig von der Hydrophobizität der Blattoberfläche. Auf allen vier Blattinsertionen lag die Keimrate zwischen 91 % und 94 % (Abb. 37).

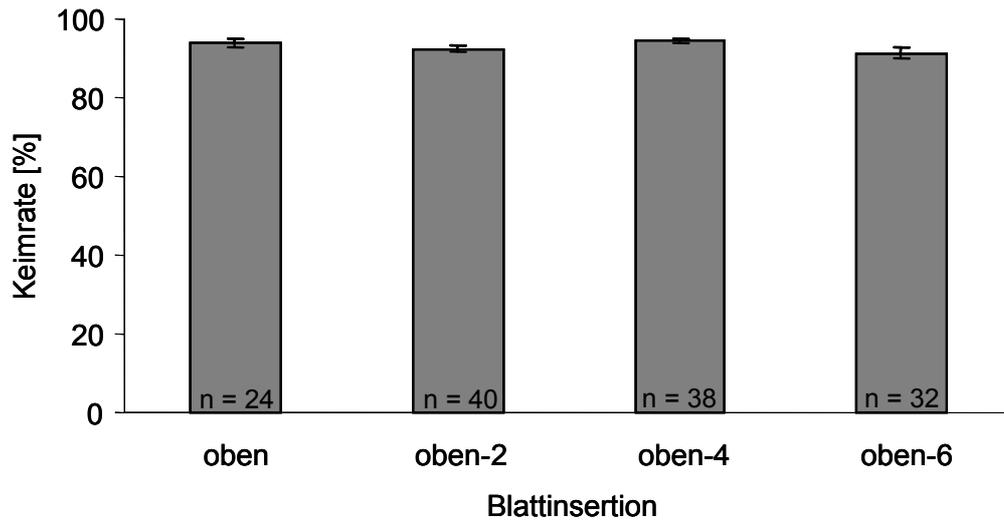


Abb. 37: Einfluss der Blattinsertion auf die Keimrate der Konidien von *V. inaequalis* 48 Stunden nach Inokulation (MW \pm SE, n = 24/40/38/32 x 10 Konidien, keine Signifikanz nach Kruskal-Wallis bei $p \leq 0,05$).

3.7.1.3 Mit Apfelblattwachs beschichtete Glasoberflächen

Die Beschichtung von Glas mit Blattwachsen verschiedener Blattinsertionen hatte auf die Keimung einen schwachen, jedoch signifikanten Einfluss (Abb. 38). Auf den Oberflächen mit den Wachsen der Blattinsertionen „oben“ und „oben-4“ war die Keimrate 48 Stunden nach der Applikation der Konidiensuspension mit ca. 85 % am höchsten. Auf den Wachsen der anderen Blattinsertionen keimten 78 % der Konidien aus.

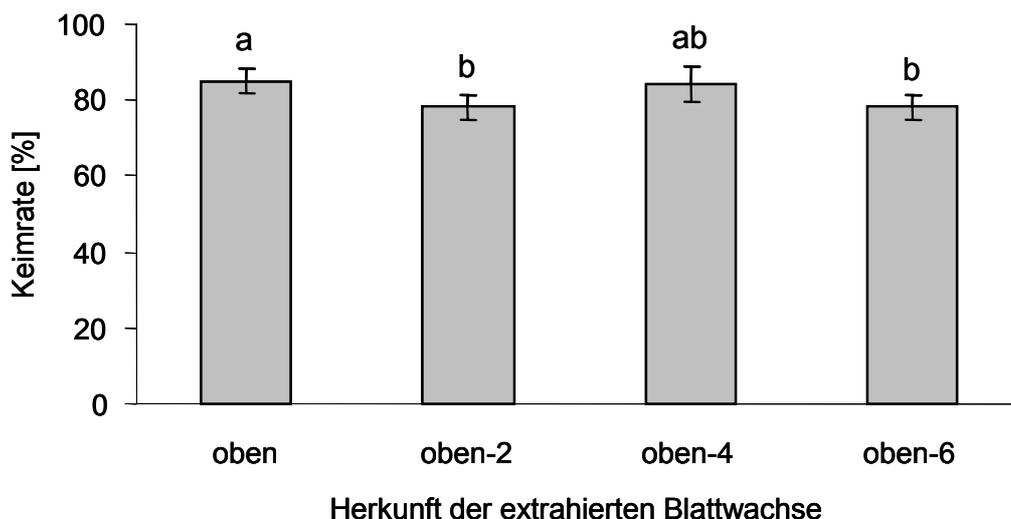


Abb. 38: Einfluss der Beschichtung von Glasoberflächen mit Apfelblattwachsen verschiedener Blattinsertionen auf die Keimrate von *V. inaequalis* 48 Stunden nach Applikation (MW \pm SE, n = 8 x 10 Konidien, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$).

3.7.1.4 Modelloberflächen

Auch auf den Referenz-Oberflächen Glas und Parafilm[®] keimten 48 Stunden nach Applikation und Inkubation ca. 90 % aller Konidien aus. Die unterschiedliche Hydrophobizität der Modelloberflächen hatte keinen Einfluss auf die Keimrate.

3.7.2 Keimschlauchwachstum

3.7.2.1 Zeitlicher Verlauf

Die Keimschläuche wurden sowohl von Konidien mit Appressorium als auch von denen ohne Appressorienbildung untersucht. Nach vier Stunden wiesen die Konidien in Abhängigkeit von der Oberfläche Unterschiede in der Keimschlauchlänge auf (Abb. 39). Die Keimschläuche waren auf der Blattinsertion „oben-6“ sowie auf den hydrophoben Modelloberflächen Parafilm[®] und Polystyrol mit 16 µm am längsten. Signifikant geringer waren sie auf der Blattinsertion „oben“ und auf der Glasoberfläche. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden waren diese Unterschiede nicht mehr signifikant. Die Keimschläuche waren im Durchschnitt innerhalb von zwei Stunden um 3 µm gewachsen. Nach acht Stunden zeigten sich zwischen den Oberflächen wieder Unterschiede. Die längsten Keimschläuche mit einer Länge von 32 µm wurden wiederum auf der Blattinsertion „oben-6“ gemessen. Die Keimschläuche von Konidien, die sich auf der Blattinsertion „oben“ sowie auf Polystyrol und Parafilm[®] entwickelt hatten, waren im Durchschnitt 21-28 µm lang. Auf Glas waren die Keimschläuche der Konidien, die kein Appressorium ausgebildet hatten, mit nur 15 µm am kürzesten.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei den Keimschläuchen von Konidien, die ein Appressorium gebildet hatten (Abb. 40). Nach acht Stunden waren die Keimschläuche auf der Blattinsertion „oben-6“ mit 21 µm am längsten, die Keimschläuche auf den anderen Oberflächen signifikant kürzer. Aufgrund der geringen Wiederholungszahl konnte auf der Glasoberfläche nach acht Stunden keine Aussage über die Keimschlauchlänge gemacht werden. Wurden die Konidien 24 Stunden auf der jeweiligen Oberfläche inkubiert, bildeten sie auf Parafilm[®] und der Blattinsertion „oben-6“ die längsten Keimschläuche von 28 µm aus. Signifikant kürzer blieben die Keimschläuche auf Polystyrol und der Blattinsertion „oben“. Die Keimschläuche hatten nur eine Länge von 22 µm bzw. 19 µm. Auf Glas wurden nach 24 Stunden in etwa so lange Keimschläuche ausgebildet wie auf Polystyrol.

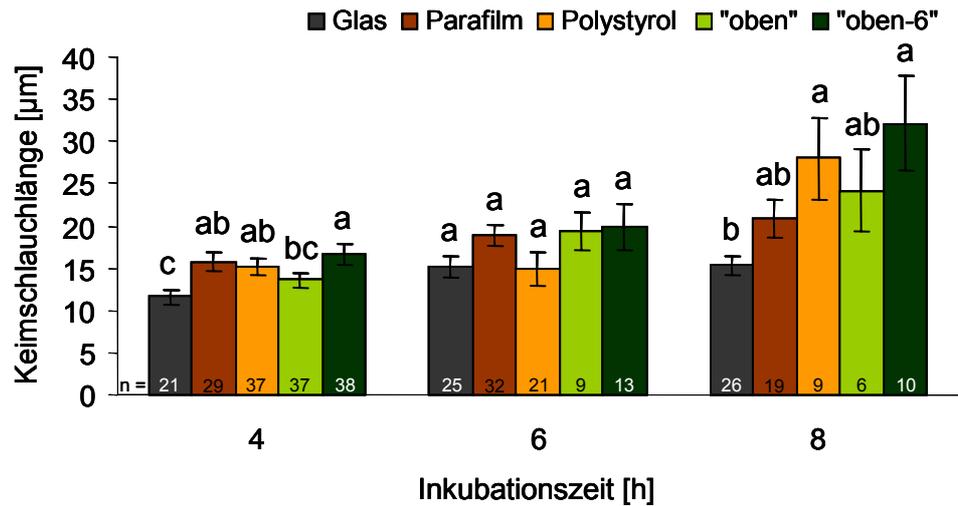


Abb. 39: Einfluss der Kontaktfläche auf die Keimschlauchlänge von Konidien, die kein Appressorium gebildet haben (MW ± SE, unterschiedliche Buchstaben zu jedem Boniturtermin kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$).

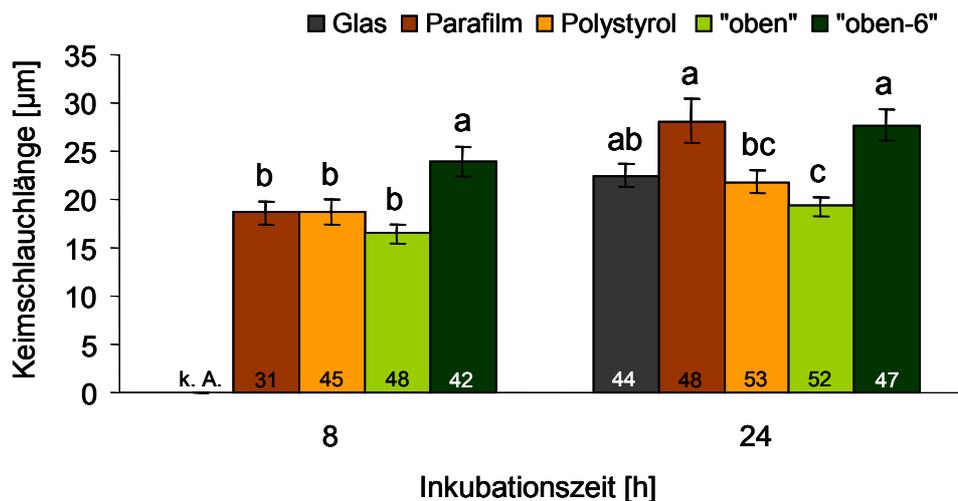


Abb. 40: Einfluss der Kontaktfläche auf die Keimschlauchlänge von Konidien, die ein Appressorium gebildet haben (MW ± SE, k. A. = keine Angabe, die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl an Wiederholungen, unterschiedliche Buchstaben zu jedem Boniturtermin kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$).

3.7.2.2 Blattinsertion

Die Länge der Keimschläuche von *V. inaequalis* wurde 48 Stunden nach der Inokulation der Apfelblätter in Abhängigkeit des Blattalters verglichen. Zum einen wurden die Keimschläuche von Konidien gemessen, die ein Appressorium ausgebildet hatten, zum anderen von Konidien ohne Appressorium. Das Blattalter hatte einen signifikanten Einfluss auf die Keimschlauchlänge

(Abb. 41). Mit zunehmendem Blattalter nahm die Keimschlauchlänge sowohl bei Konidien mit als auch bei denen ohne Appressorium zu. Auf jungen Blättern waren die Keimschläuche mit Längen von 15,9 μm bzw. 16,9 μm am kürzesten. Die längsten Keimschläuche von 28,0 μm bzw. 32,5 μm wurden auf der ältesten Blattinsertion „oben-6“ gemessen; sie waren 43-48 % länger als auf der Blattinsertion „oben“.

Auf den mittleren Blattinsertionen „oben-2“ und „oben-4“ waren die Keimschläuche von Konidien, die nach 48 Stunden kein Appressorium ausgebildet hatten, signifikant länger als bei Konidien, die in der Lage waren Appressorien zu bilden. Auf dem jüngsten und dem ältesten Blatt waren diese Unterschiede in der Keimschlauchlänge nicht feststellbar.

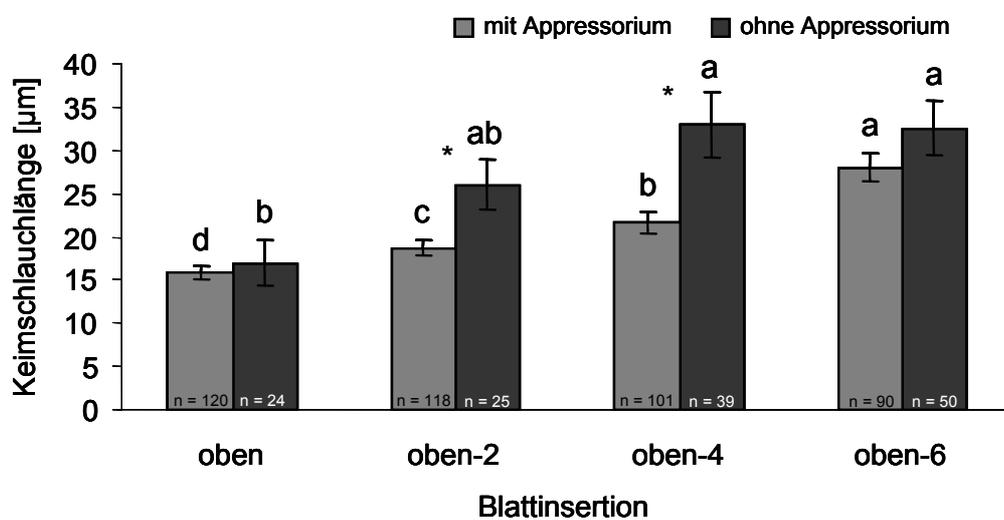


Abb. 41: Einfluss der Blattinsertion auf die Keimschlauchlänge von *V. inaequalis* 48 Stunden nach Inokulation (MW \pm SE, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz zwischen den Blattinsertionen nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$, * kennzeichnet Signifikanz innerhalb einer Blattinsertion nach t-Test bei $p \leq 0,05$).

3.7.2.3 Mit Apfelblattwachs beschichtete Glasoberflächen

Auf mit Wachs der verschiedenen Blattinsertionen beschichtetem Glas wurden die Keimschläuche von Konidien berücksichtigt, bei denen nach 48 Stunden ein Appressorium ausgebildet worden war. Die auf Glas aufgebrachten Blattwachse hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Keimschlauchlänge (Abb. 42). Die Längen variierten zwischen 36 μm und 44 μm , waren aber nicht signifikant verschieden.

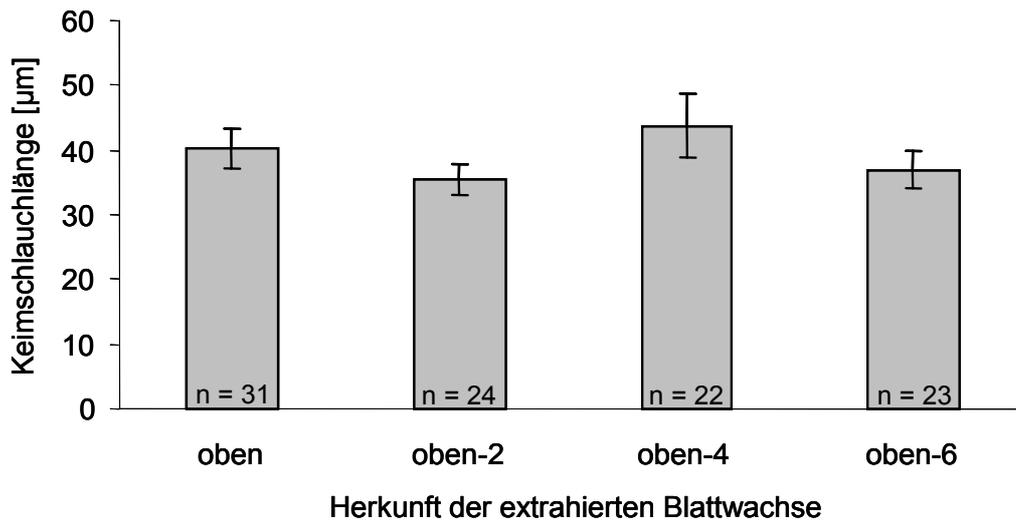


Abb. 42: Einfluss der Beschichtung von Glasoberflächen mit Apfelblattwachsen verschiedener Blattinsertionen auf die Keimschlauchlänge von *V. inaequalis* 48 Stunden nach Applikation (berücksichtigt wurden nur gekeimte Konidien mit Appressorium, MW \pm SE, keine Signifikanz nach Kruskal-Wallis bei $p \leq 0,05$).

3.7.2.4 Modelloberflächen

Auf Polystyrol betrug die durchschnittliche Keimschlauchlänge von Konidien mit Appressorien 24 Stunden nach der Inokulation 26 μm (Abb. 43). Diese waren damit nur wenig länger als die auf Glas gebildeten Keimschläuche, welche Längen von ca. 22 μm aufwiesen.

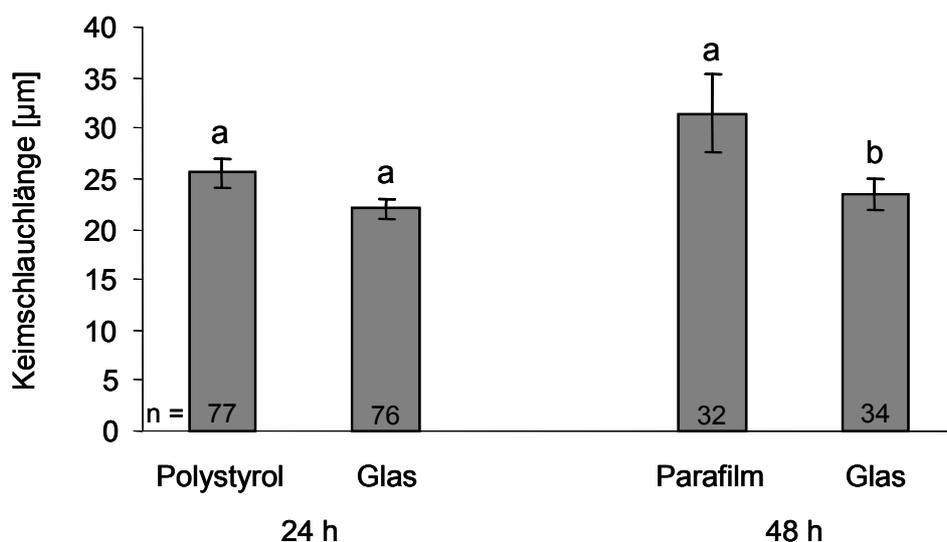


Abb. 43: Einfluss der Kontaktoberfläche auf die Keimschlauchlänge von *V. inaequalis* 24 und 48 Stunden nach Applikation (MW \pm SE, berücksichtigt wurden nur gekeimte Konidien mit Appressorium, unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Inkubationszeitpunktes kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$).

Die Länge der Keimschläuche von Konidien, die nach 48 Stunden ein Appressorium gebildet hatten, waren auf den Referenzoberflächen Glas und Parafilm[®] signifikant verschieden (Abb. 43). Die Längen variierten zwischen 23,5 µm und 31,5 µm, wobei auf der hydrophilen Glasoberfläche die Keimschläuche kürzer blieben.

3.7.3 Appressorienbildung

3.7.3.1 Zeitlicher Verlauf

Die Kontaktoberfläche hatte einen deutlichen Einfluss auf die Appressorienbildung von *V. inaequalis* (Abb. 44). Der größte Effekt wurde auf Glas beobachtet, auf dem bis 8 Stunden nach der Applikation der Konidiensuspension die Appressorienbildung gering blieb. Außer auf der Blattinsertion „oben“ war nach vier Stunden noch keine Bildung von Appressorien feststellbar. Sechs Stunden nach Applikation der Konidiensuspension war die höchste Appressorienbildungsrate mit ca. 80 % auf der Blattinsertion „oben“ zu verzeichnen. Auf den

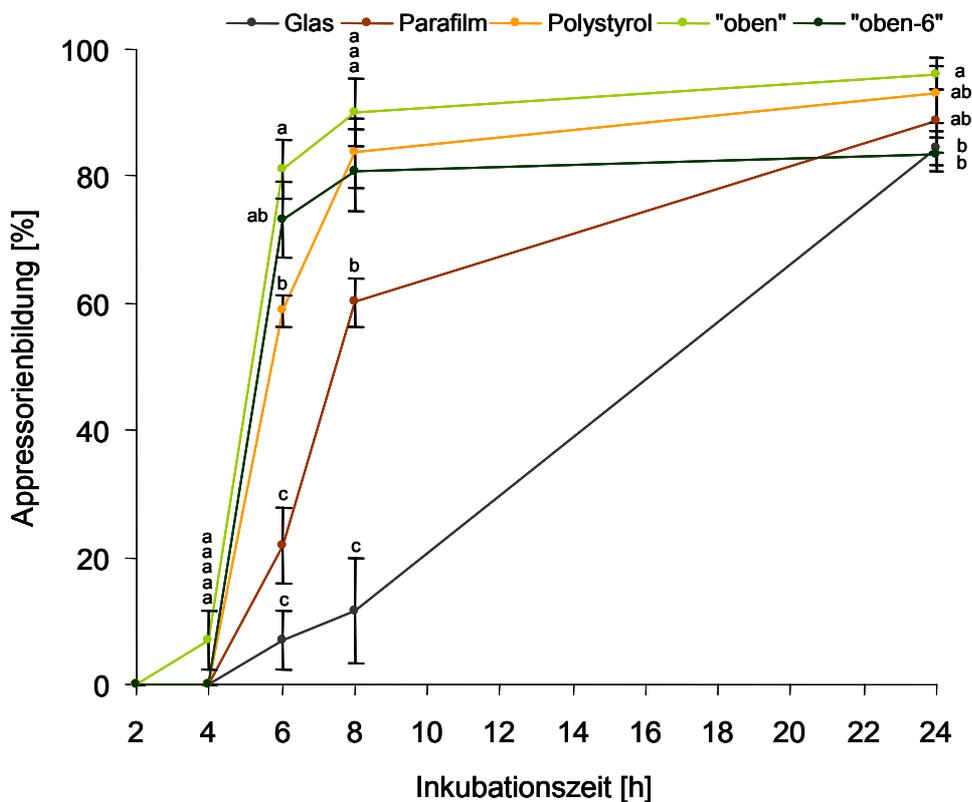


Abb. 44: Einfluss der Kontaktoberfläche auf die Appressorienbildung der gekeimten Konidien von *V. inaequalis* (MW ± SE, unterschiedliche Buchstaben zu jedem Boniturtermin kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$).

übrigen Oberflächen war sie signifikant geringer. Auf Polystyrol bildeten nach sechs Stunden ca. 60 % der Konidien ein Appressorium, auf Parafilm[®] war dies erst nach acht Stunden der Fall. Der Anteil an Konidien mit Appressorien lag auf Glas auch nach acht Stunden bei nur 12 %, während auf Apfelblättern und Polystyrol bereits ein Anteil von 81-90 % beobachtet wurde. 24 Stunden nach der Inokulation war die Appressorienrate auf der Blattinsertion „oben“ mit einem Anteil von 96 % um 12 % signifikant höher als auf der Blattinsertion „oben-6“ sowie auf Glas. Auf Polystyrol und Parafilm[®] waren 90 % der Konidien in der Lage, Appressorien zu bilden.

3.7.3.2 Blattinsertion

Die Anzahl gekeimter Konidien, die Appressorien ausbildeten, veränderte sich in Abhängigkeit von der Blattinsertion. Die höchste Appressorienbildungsrate wurde mit 79 % auf der Blattinsertion „oben“ beobachtet (Abb. 45). Mit zunehmendem Blattalter war bei den gekeimten Konidien eine signifikante Abnahme festzustellen. Auf der Blattinsertion „oben-6“ wurde nur noch von 57 % der gekeimten Konidien ein Appressorium gebildet.

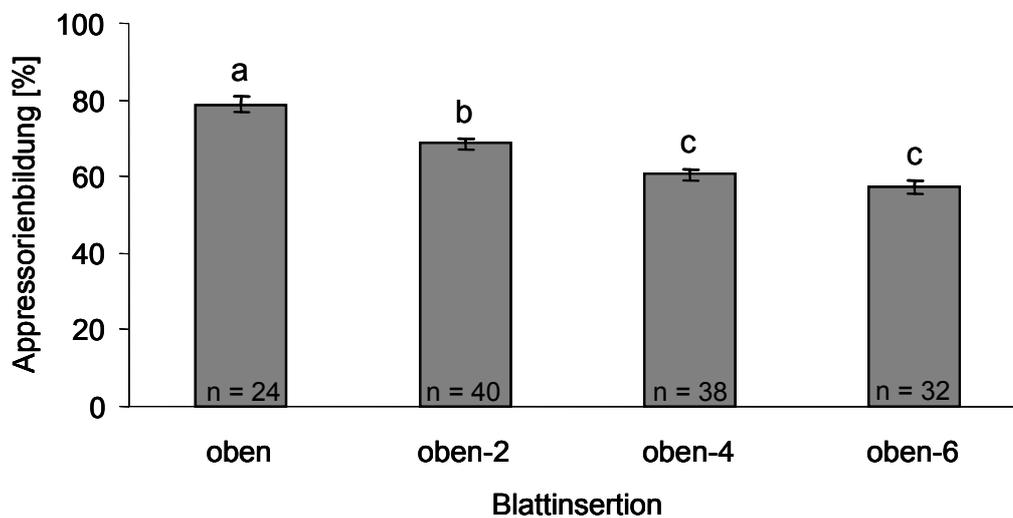


Abb. 45: Einfluss der Blattinsertion auf die Appressorienbildung von gekeimten Konidien von *V. inaequalis* 48 Stunden nach Inokulation (MW \pm SE, n = 24/40/38/32 x 10 Konidien, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

Ausprägung des Melaninringes

Die Ausprägung des an der Kontaktfläche Appressorium-Unterlage gebildeten Melaninringes wurde 48 Stunden nach der Inokulation auf vier verschiedenen Blattinsertionen untersucht. Es wurden vier Klassen aufgestellt, durch die die Melaninringe charakterisiert werden sollten.

Zwischen den Blattinsertionen wurden deutliche Unterschiede in der Melaninringausprägung des Appressoriums sichtbar (Abb. 46). Auf jungen Blättern konnten die Ringe zu fast 60 % in die Klasse 1 eingeordnet werden. Die Melaninringe waren teilweise nur schwer zu erkennen (Abb. 47 A). Dieser Anteil nahm mit dem Blattalter ab, gleichzeitig nahm der Anteil an Melaninringen der Intensitätsklasse 3 zu (Abb. 47 C). Auf alten Blättern war der Anteil an mittelstark ausgeprägten Melaninringen (Klasse 3) mit fast 45 % am höchsten. Keine Unterschiede zwischen den Blattinsertionen „oben-2“, „oben-4“ und „oben-6“ gab es beim Anteil von dünn ausgeprägten Melaninringen (Klasse 2), die einen Anteil von 44-55 % ausmachten (Abb. 47 B). Auf den jüngsten Blättern waren nur 36 % der Melaninringe dünn ausgeprägt. Melaninringe der Klasse 4 mit einer sehr dicken Ausprägung wurden nur auf den älteren Blattinsertionen „oben-4“ und „oben-6“ beobachtet (Abb. 47 D).

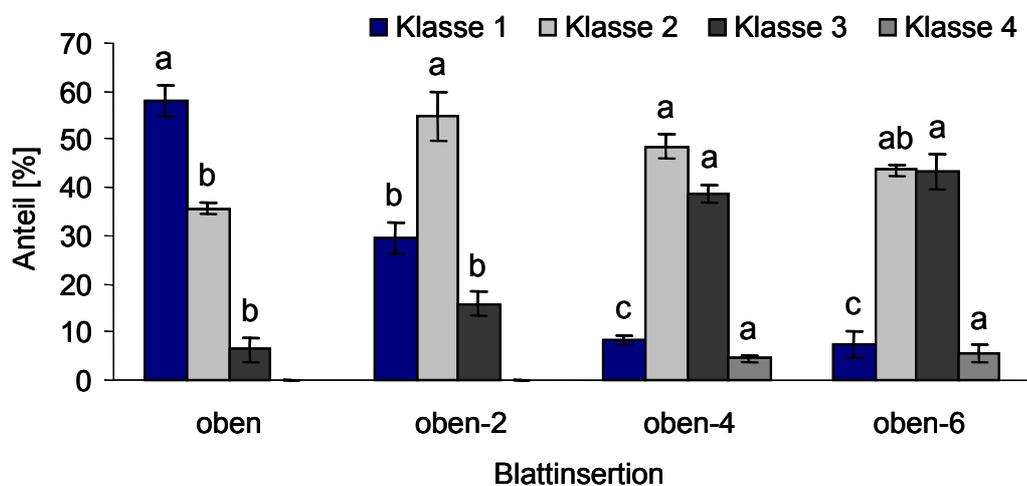


Abb. 46: Einfluss der Blattinsertion auf die Melaninringausprägung der Appressorien von *V. inaequalis* 48 Stunden nach Inokulation (MW \pm SE, n =4, Anzahl Appressorien pro Wiederholung: oben = 30, oben-2 = 30, oben-4 = 25, oben-6 = 23, Klasse 1 = sehr dünn/schwach, Klasse 2 = dünn, Klasse 3 = mittelkräftig, Klasse 4 = sehr kräftig ausgeprägte Melaninringe, Säulen mit dem Ergebnis „null“ wurden in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Klasse kennzeichnen zwischen den Blattinsertionen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).



Abb. 47: Einfluss der Blattinsertion auf die Melaninringausprägung des Appressoriums von *V. inaequalis*. Schwache Ausprägung (Klasse 1) auf jungem Blatt (A, Pfeil), dünne Ausprägung (Klasse 2) auf jungem Blatt (B), mittelkräftige Ausprägung (Klasse 3) auf altem Blatt (C), kräftige Ausprägung (Klasse 4) auf altem Blatt (D) (Lichtmikroskopie).

Ort der Eindringungsstelle

Wie bei der Bestimmung der Ausprägung des Melaninringes wurde bei der Beurteilung der Eindringungsstelle eine Klassifizierung in vier Klassen vorgenommen.

Das Blattalter hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Ort der Eindringung und somit auf die Lage des Appressoriums auf dem Blatt (Abb. 48). Zu 35-45 % kam es auf allen Blattinsertionen zu einer Eindringung über den antiklinen Zellwänden. Auch direkt neben diesen, in einer Entfernung $< 3 \mu\text{m}$, wurden etwa 31 % der Appressorien mit Melaninring gefunden. Seltener, mit insgesamt maximal 33 %, befanden sich die Appressorien in einem Bereich von $3 \mu\text{m}$ bis $\leq 10 \mu\text{m}$ zu den antiklinen Zellwänden bzw. mitten auf der Zelle ($> 10 \mu\text{m}$). Demnach konnte das Pathogen auf allen Blattinsertionen am häufigsten (mit maximal 75 %) über und direkt neben den antiklinen Zellwänden penetrieren bzw. ein Appressorium mit Melaninring ausbilden.

Tendenziell war allerdings eine Zunahme des Anteils Appressorien, die auf einer Zelle einen Melaninring gebildet hatten, mit zunehmenden Blattalter zu vermerken, bei gleichzeitiger leichter Abnahme der über den antiklinen Zellwänden gebildeten Appressorien.

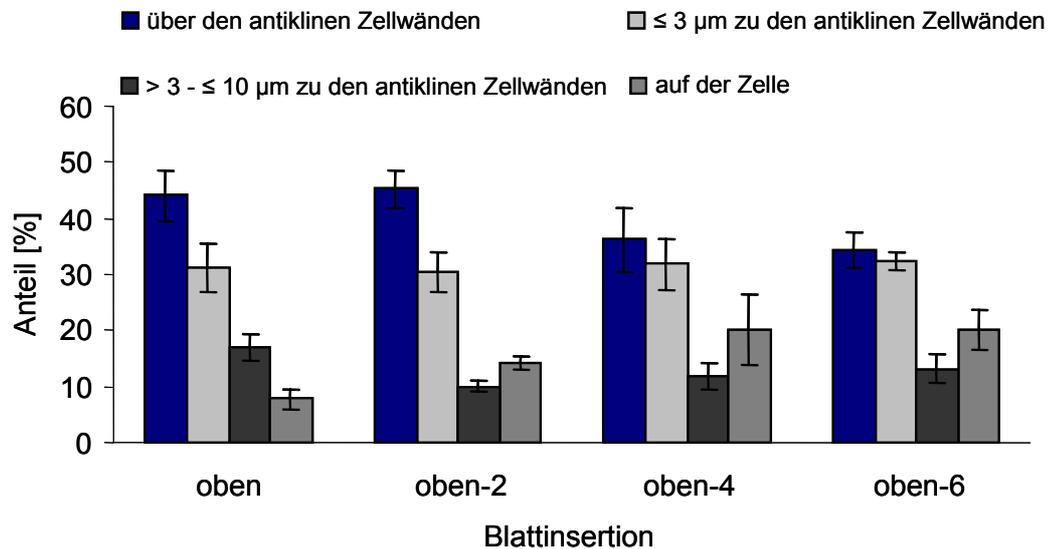


Abb. 48: Einfluss der Blattinsertion auf den Ort der Eindringung von *V. inaequalis* in das Blatt 48 Stunden nach Inokulation (MW \pm SE, n=4, Anzahl Appressorien pro Wiederholung: oben = 30, oben-2 = 30, oben-4 = 25, oben-6 = 23, innerhalb einer Klasse keine Signifikanz zwischen den Blattinsertionen nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

3.7.3.3 Mit Apfelblattwachs beschichtete Glasoberflächen

Auf beschichteten Glasoberflächen wurde die Appressorienbildung in Abhängigkeit der Wachse von verschiedenen Blattinsertionen statistisch nicht beeinflusst (Abb. 49). Die Appressorienbildungsrate lag unabhängig von der Herkunft der extrahierten Blattwache zwischen 82 % und 96 %.

Auf Glas entwickelten sich 48 Stunden nach der Applikation Konidien, die vermehrt kräftig ausgebildete Melaninringe im Appressorium aufwiesen (Abb. 50 A), ganz im Gegensatz zu Konidien, die auf Parafilm gewachsen waren. Diese hatten längere Keimschläuche und deutlich schwächer ausgebildete Melaninringe (Abb. 50 B). Auf mit Apfelwachsen beschichtetem Glas waren Melaninringe schlechter zu erkennen. Viele Konidien schienen sich in das aufgebrachte Wachs einzubetten (Abb. 50 C). Bei den gebildeten Infektionsstrukturen sah es so aus, als ob sie in die aufgebrachte Wachsschicht einwachsen würden (Abb. 50 D).

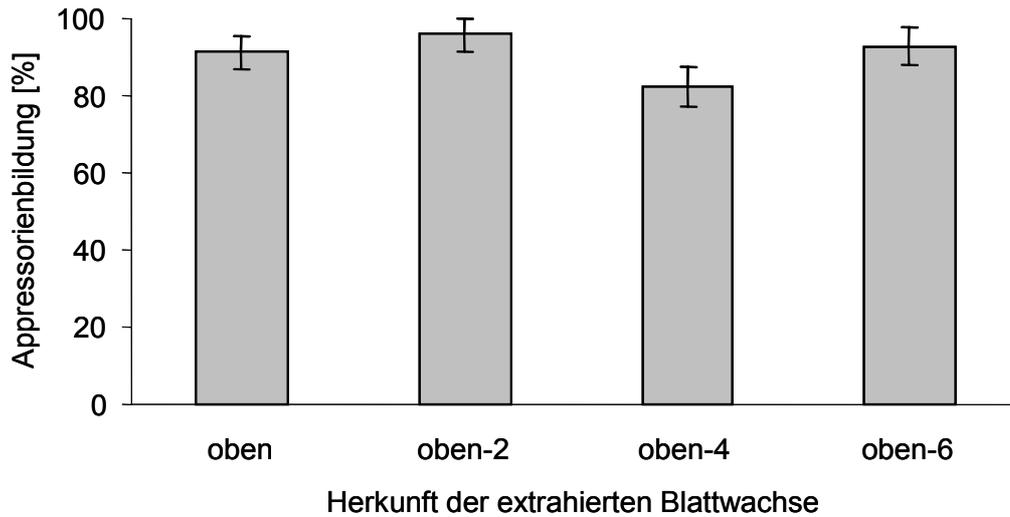


Abb. 49: Einfluss der Beschichtung von Glasoberflächen mit Apfelblattwachsen verschiedener Blattinsertionen auf die Appressorienbildung von *V. inaequalis* 48 Stunden nach Applikation (MW \pm SE, n = 8 x 10 Konidien, keine Signifikanz nach Kruskal-Wallis bei $p \leq 0,05$).



Abb. 50: Entwicklung der Konidien von *V. inaequalis* auf Glas (A) bzw. Parafilm (B) sowie auf wachsbeschichtetem Glas (C, D) 48 Stunden nach Applikation (das Wachs stammte von den Blattinsertionen „oben“ (C) bzw. „oben-4“ (D), Durchlichtmikroskopie).

3.7.3.4 Modelloberflächen

Auf Glas und Parafilm[®] wurde die Appressorienbildung nicht durch die unterschiedliche Hydrophobizität der beiden Modelloberflächen beeinflusst. Der Anteil lag unabhängig von der Kontaktoberfläche 48 Stunden nach der Applikation der Suspension bei ca. 90 %. Auch auf Polystyrol bildeten über 90 % der Konidien 24 Stunden nach der Applikation ein Appressorium aus.

Ausprägung des Melaninringes

Hingegen wurden zwischen den beiden Modelloberflächen Glas und Parafilm[®] deutliche Unterschiede in der Ausprägung des Melaninringes der Appressorien festgestellt (Abb. 51). Auf dem hydrophoben Parafilm[®] waren fast 35 % der Melaninringe der Intensitätsklasse 1 zuzuordnen, wohingegen nur ca. 10 % der Klasse 3 zugeordnet werden konnten. Auf der hydrophilen Glasoberfläche wurden deutlich mehr Melaninringe der Klasse 3 als der Klasse 1 zugeordnet. Die Klasse 4, Melaninringe mit einer sehr kräftigen Ausprägung, war auf keiner der Oberflächen sichtbar. In 55 % bis 58 % aller untersuchten Appressorien waren, unabhängig von der Oberfläche, die Melaninringe dünn ausgeprägt (Klasse 2).

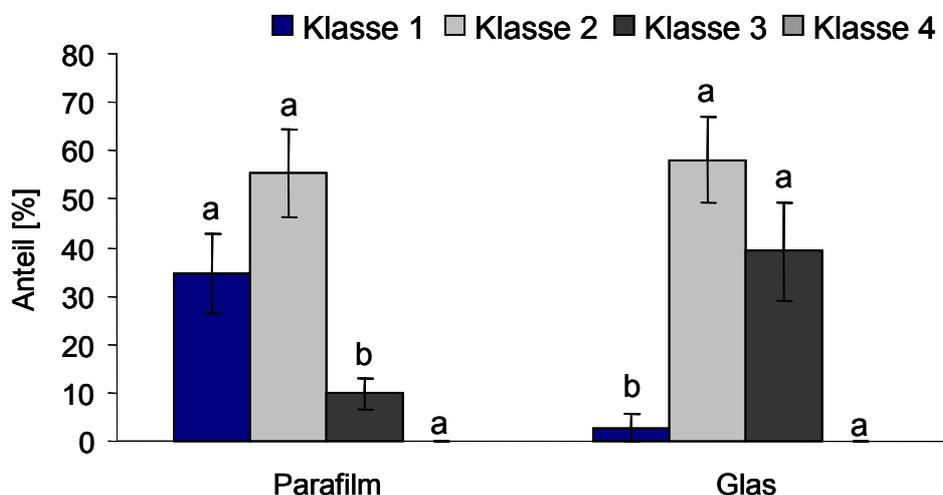


Abb. 51: Einfluss der Kontaktoberfläche auf die Melaninringausprägung der Appressorien von *V. inaequalis* 48 Stunden nach Applikation (MW ± SE, Parafilm n = 32, Glas n = 34, Klasse 1 = sehr dünn/schwach, Klasse 2 = dünn, Klasse 3 = mittelkräftig, Klasse 4 = sehr kräftig ausgeprägte Melaninringe, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Klasse kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$).

Das Boniturschema wich bei der Untersuchung der Melaninringausprägung 24 Stunden nach der Applikation der Suspension auf Glas und Polystyrol von dem Vorherigen etwas ab, da in

diesem Fall nur drei Klassen gebildet wurden (Abb. 52). Auf Polystyrol wurden signifikant mehr dünn ausgeprägte Melaninringe (Klasse 1) gebildet als auf Glas. Gleichzeitig war der Anteil an mittelstark ausgebildeten Melaninringen (Klasse 2) geringer. Sehr kräftige Melaninringe (Klasse 3) wurden zu nur 2 % auf der Glasoberfläche und auf Polystyrol gar nicht beobachtet.

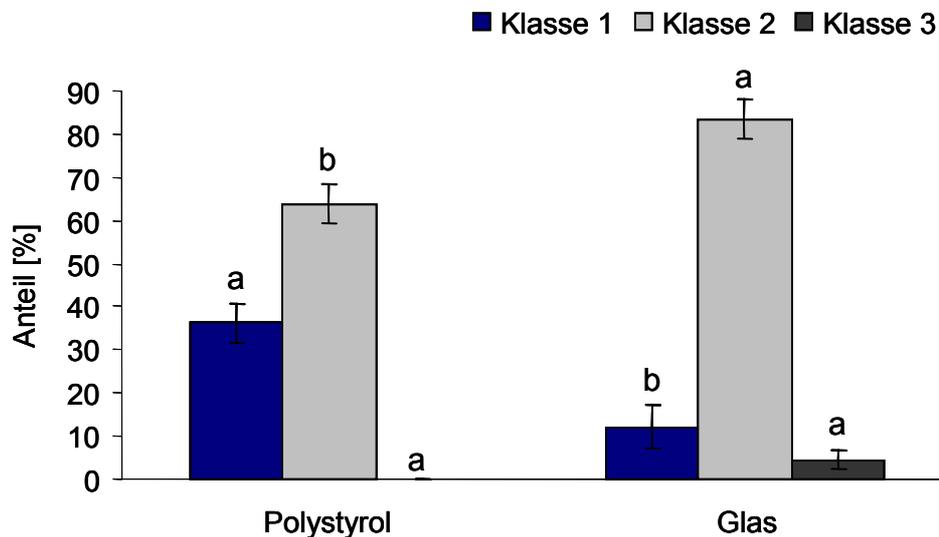


Abb. 52: Einfluss der Kontaktoberfläche auf die Melaninringausprägung der Appressorien von *V. inaequalis* 24 Stunden nach Applikation (MW \pm SE, n = 8 x 9 Konidien, Klasse 1 = dünn/schwach, Klasse 2 = mittelkräftig, Klasse 3 = sehr kräftig ausgeprägte Melaninringe, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Klasse kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$).

3.7.4 Primärstroma- und Laufhyphenbildung auf Apfelblättern

Der Anteil an Primärstromata, die von Konidien mit Appressorien gebildet wurden, nahm mit zunehmendem Blattalter signifikant ab (Tab. 18). Das Pathogen war auf alten Blättern kaum in der Lage, eine Infektion erfolgreich abzuschließen. Zwischen den Blattinsertionen „oben-2“ und „oben-4“ war eine Reduktion der Primärstromabildung um mehr als 60 % feststellbar. Aber auch auf dem jüngsten Blatt war die Appressorienbildung nach 48 Stunden nicht bei allen Konidien mit der Ausbildung eines Primärstromas verbunden.

Weiterhin wurde untersucht, ob von den ausgebildeten Primärstromata Laufhyphen differenziert wurden. Nur auf den jüngeren Blattinsertionen „oben“ und „oben-2“ kam es 48 Stunden nach der Inokulation zur Differenzierung von Laufhyphen, wobei der Anteil zwischen diesen Blattinsertionen bereits um knapp 43 % reduziert war. Auf alten Blättern wurden von *V. inaequalis* keine Laufhyphen ausgebildet (Tab. 18).

Tab. 18: Einfluss der Blattinsertion auf die Bildung von Primärstromata und Laufhyphen durch *V. inaequalis* 48 Stunden nach Inokulation auf Apfelblätter (MW \pm SE, n = 4 Wdh.).

	Blattinsertion			
	oben	oben-2	oben-4	oben-6
Primärstroma [%] ¹	86,0 \pm 2,0 a ³	69,1 \pm 11,6 a	5,9 \pm 1,7 b	4,1 \pm 2,3 b
Laufhyphen [%] ²	49,8 \pm 10,1 a	7,1 \pm 4,6 b	0,0 \pm 0,0 b	0,0 \pm 0,0 b
Anzahl Appr. je Wdh	36	34	34	31

¹ prozentualer Anteil von gekeimten Konidien mit Appressorium, ² prozentualer Anteil von gekeimten Konidien mit Primärstroma, ³ unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$

Neben dem Anteil der von gekeimten Konidien gebildeten Primärstromata und Laufhyphen wurde weiterhin deren Ausbildung im Blatt erfasst. Während sich auf den jüngsten Blättern nach 48 Stunden bereits Laufhyphen differenzierten (Abb. 53 A), war auf der Blattinsertion „oben-2“ nur ein gut ausgebildetes Primärstroma zu sehen (Abb. 53 B). Auf den älteren Blattinsertionen „oben-4“ und „oben-6“ hingegen waren nach 48 Stunden nicht einmal Primärstromata erkennbar (Abb. 53 C und D).

3.7.5 Symptomentwicklung auf Apfelblättern

Es wurde untersucht, ob das Blattalter, repräsentiert durch vier verschiedene Blattinsertionen von Apfelsämlingen, einen Einfluss auf die Pathogenese von *V. inaequalis* hat. Dazu wurde zu drei Boniturterminen für die vier Blattinsertionen die makroskopisch sichtbare befallene Blattfläche ermittelt (Abb. 54). Sechs Tage nach der Inokulation waren auf der Blattinsertion „oben“ bereits 33 % der Blattfläche befallen. Auf den anderen Blattinsertionen war der Befall signifikant geringer, auf der ältesten Blattinsertion („oben-6“) kam es sechs Tage nach der Inokulation noch zu keinem sichtbaren Befall. Erst zehn Tage nach der Inokulation war auf dieser Blattinsertion in geringem Maße ein Befall feststellbar. Während auf der Blattinsertion „oben“ innerhalb von acht Tagen der Anteil der befallenen Blattfläche auf ca. 60 % anstieg, kam es auf den anderen Blattinsertionen zu weitaus geringeren Zunahmen. 14 Tage nach der Inokulation waren auf der Blattinsertion „oben-2“ etwa 19 % der Blattfläche mit *V. inaequalis* befallen, auf den älteren Blattinsertionen „oben-4“ und „oben-6“ hingegen nur ca. 6 % bzw. 2 % der Blattfläche.

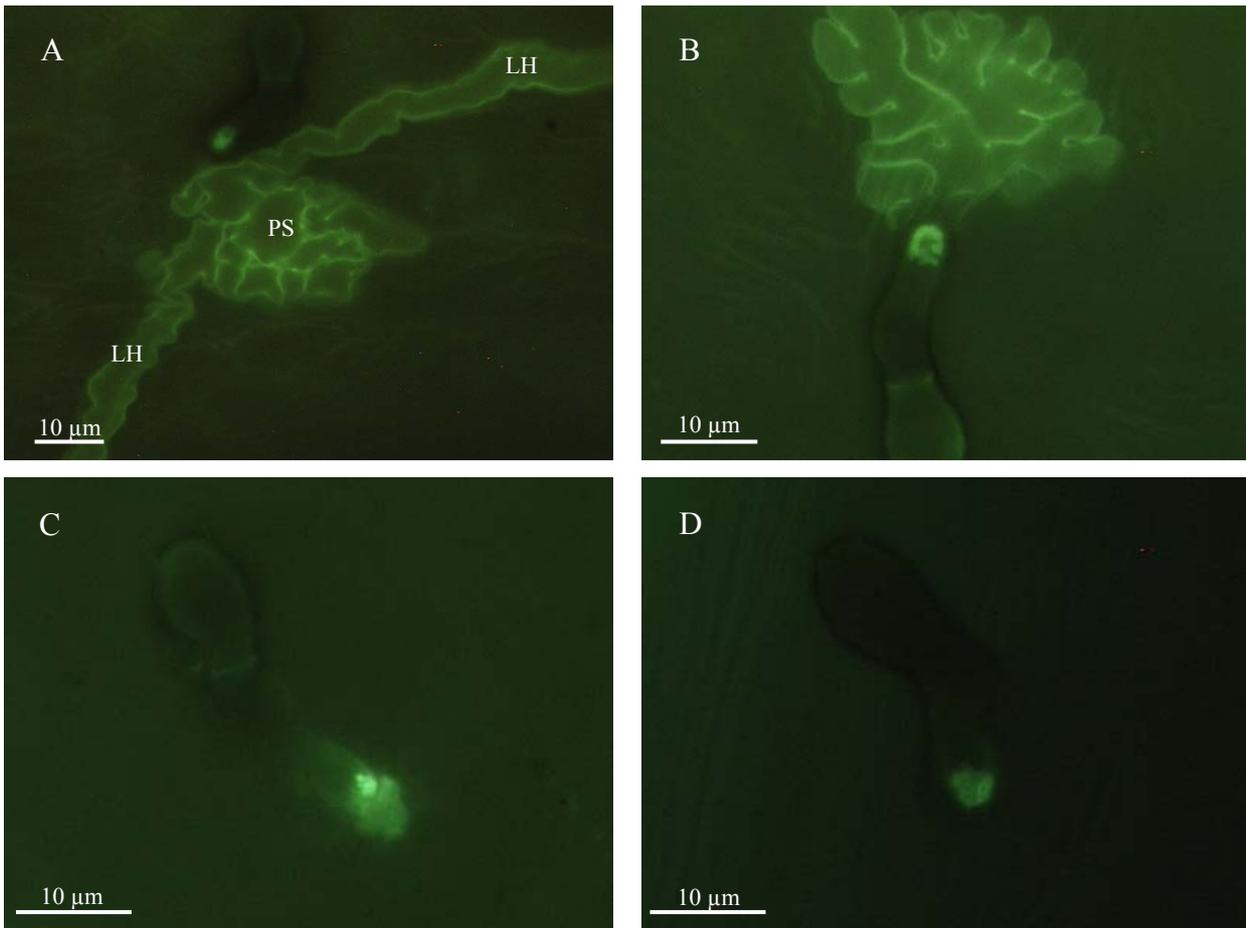


Abb. 53: Einfluss der Blattinsertion auf die Primärstroma (PS)- und Laufhyphenbildung (LH) von *V. inaequalis* auf Apfelblättern 48 Stunden nach Inokulation (A: Blattinsertion „oben“, B: „oben-2“, C: „oben-4“, D: „oben-6“, Anilinblau-Färbung, Fluoreszenzmikroskopie).

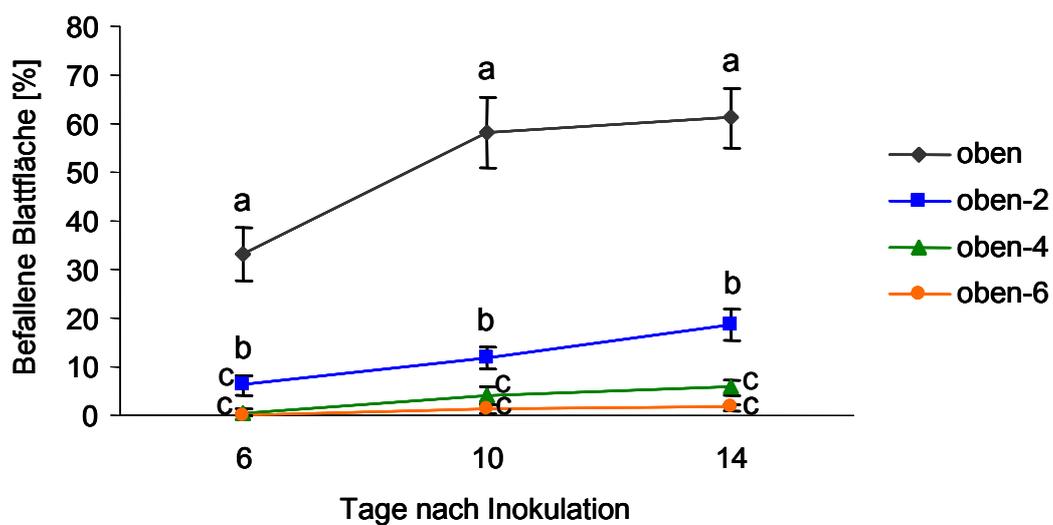


Abb. 54: Einfluss der Blattinsertion auf die Befallsentwicklung von *V. inaequalis* auf Apfelsämlingen (MW \pm SE, unterschiedliche Buchstaben zu einem Boniturtermin kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney bei $p \leq 0,05$).

3.8 Isolierung und Analyse von hydrophoben Proteinen

Konidien von *V. inaequalis* wurden auf das Vorhandensein von Hydrophobinen oder anderen, an der Adhäsion beteiligten Proteinen untersucht. Zur Reinigung von sekretierten Proteinen nach MANKEL (2001) wurden die Konidien für 18 Stunden in Reinstwasser inkubiert und die Proteine isoliert. Untersucht wurden sowohl die Konidien als auch das Medium, in dem die Konidien inkubiert worden waren. Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE konnten durch Coomassie-Färbung verschiedene Banden festgestellt werden. Es waren nur im Medium Proteine nachweisbar. Mittels Größenstandard konnten die molekularen Massen der stärksten Banden in der Coomassie-Färbung mit ~ 16 bzw. ~ 10 kDa bestimmt werden (Abb. 55). Neben diesen beiden Banden waren noch weitere erkennbar, die allerdings schwächer waren bzw. eine größere molekulare Masse aufwiesen und daher nicht weiter berücksichtigt wurden.

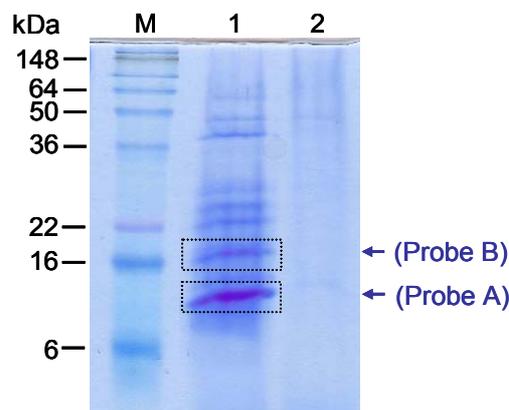


Abb. 55: SDS-PAGE der Trifluoressigsäure-löslichen Fraktion des mit Luft durchsetzten Mediums sowie der Fraktion aus Konidien von *V. inaequalis* (1 = gereinigte Proteine aus dem Medium, 2 = gereinigte Proteine aus den Konidien, M = Größenstandard 4 - 250 kDa, Coomassie-Färbung).

Die Ergebnisse der Sequenzierung der beiden ausgewählten Banden sind in Tab. 19 und Tab. 20 dargestellt. Die Sequenzierung erbrachte für beide Proteine nur eine geringe Anzahl an Peptiden. Für das Protein mit einer molekularen Masse von ~ 10 kDa (Probe A) wurden der Verdau mit Trypsin bzw. mit Thermolysin und eine chemische Aufspaltung mit HCl durchgeführt. Durch den Verdau wurden jeweils zwei Peptide bzw. Peptidfragmente nachgewiesen, die chemische Aufspaltung mit HCl erbrachte keine sinnvolle Sequenz. Aufgrund der geringen Signalstärke waren die Peptidsequenzen schwer auszuwerten, und die Kürze der Sequenzabschnitte führte zu keinem signifikanten Treffer bei der Datenbanksuche (UniProtKB und UniRef100 unter <http://www.expasy.org>). Für diese Probe konnte infolgedessen kein Hydrophobin oder ein anderes bekanntes Protein nachgewiesen werden.

Tab. 19: Sequenzen der detektierten Peptide des Proteins von *V. inaequalis* mit einer molekularen Masse von 10 kDa nach dem Verdau mit Trypsin bzw. Thermolysin.

Probe A (~ 10 kDa):	Peptidsequenz
Trypsin-Verdau:	
Peptid 1 (7 AS ¹)	PLTDVFK
Peptid 2 (11 AS)	NGAGDTSLTGR
Thermolysin-Verdau	
Peptidfragment 1 (5 AS)	(SD)NYG...
Peptidfragment 2 (7 AS)	FSVDPY(A?)...

¹ AS = Aminosäure

Tab. 20: Sequenzen der detektierten Peptide des Proteins von *V. inaequalis* mit einer molekularen Masse von 16 kDa nach dem Verdau mit Trypsin.

Probe B (~ 16 kDa):	Peptidsequenz
Peptid 1 (26 AS ¹)	FLGQGPQDNESALEQAKDEQISDFIR
Peptid 2 (10 AS)	VGTGEFAQGK
Peptid 3 (25 AS)	QGQ-TSGSGLT-DDSESGSGNSGGSAK
Peptid 4 (18 AS)	ALSTAVTAFSVALQNLLK
Peptid 5 (16 AS)	(av/va)DPTALVAALNALTK

¹ AS = Aminosäure

Das Protein mit einer molekularen Masse von ~ 16 kDa (Probe B) lieferte beim tryptischen Verdau mehrere Peptide. Von den fünf analysierten Peptiden konnten zwei (Peptid 4 und 5) keinem bekannten Protein zugewiesen werden. Peptid 1 hingegen wies eine große Ähnlichkeit mit einem Protein aus dem Ascomyceten *Coccidioides immitis* RS auf (Tab. 21, Tab. 22). Die Peptide 2 und 3 wiesen Übereinstimmungen mit einem Protein aus *Phaeosphaeria nodorum* SN 15, ebenfalls einem Ascomycet, auf (Tab. 21, Tab. 22). Beide Proteine sind allerdings nicht näher beschrieben, so dass keine genauere Aussage über die in *V. inaequalis* gefundenen Proteine gemacht werden konnte.

Tab. 21: Ergebnis der Datenbanksuche für die Peptide 1 – 3 des Proteins von *V. inaequalis* mit der molekularen Masse von 16 kDa.

Peptid	Score (bits)	Übereinstimmungen	Organismus
Peptid 1	73,6	23/26 (88 %)	<i>Coccidioides immitis</i> RS
Peptid 2	32,9	10/10 (100 %)	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15
Peptid 3	40,5	18/25 (72 %)	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15

Quelle: ExPASy Blast 2 (<http://www.expasy.org>)

Tab. 22: Vergleich der detektierten Peptidsequenzen des Proteins mit der molekularen Masse von 16 kDa aus *V. inaequalis* mit den Proteinsequenzen der Erreger *C. immitis* und *P. nodorum* aus der Datenbank.

Coccidioides immitis RS: 108 AS

MDFVNKLAGQ GKSENQGGSS GGEGGMFSGI GDKLNAAAGG GRESEKSEDM
LDKGVDFLQE R **F M G Q G K Q D N E S A V E Q A K D E Q I S D F I R** G Q Y K S V A G S D L P I
KDKDTKLG

Phaeosphaeria nodorum SN15: 85 AS

MADQYKPTEH GGLKQDGTPD KR **V G T G E F A Q G K** VDPHEAGK **Q G G H T S G S G S**
AS **DDSSSGNS GGS AK** GQFAH GKVDPVEAGK KGGNS

Die markierten Bereiche geben die Übereinstimmungen in den Sequenzen von *C. immitis* und *P. nodorum* mit denen von *V. inaequalis* aus Tab. 20 an: blau = Peptid 1, hellgrün = Peptid 2, dunkelgrün = Peptid 3, Quelle der Sequenzen von *C. immitis* und *P. nodorum*: ExPASy Blast 2 (<http://www.expasy.org>)

Die Aminosäuren wurden anhand ihrer biochemischen Eigenschaften in vier Gruppen unterteilt (Tab. 23, Tab. 24). Die Häufigkeiten der Aminosäuren in den Peptidsequenzen beider Proteine waren sehr unterschiedlich. Aminosäuren, die mit einem Anteil von über 10 % in einer oder mehreren der fünf Peptide aus dem Protein mit der molekularen Masse von 16 kDa vorkamen, waren Alanin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Serin, Threonin und Valin. Einen geringen Anteil in allen Peptiden nahmen Arginin, Asparagin, Isoleucin und Prolin ein. Aufgrund der kurzen Peptidsequenzen des Proteins mit einer molekularen Masse von 10 kDa kamen alle in den Sequenzen gefundenen Aminosäuren mit einem Anteil von mindestens 9 % vor. Die für Hydrophobine typische Aminosäure Cystein wurden in den kurzen Sequenzen beider Proteine von *V. inaequalis* nicht gefunden.

Tab. 23: Häufigkeiten der Aminosäuren in den Peptiden des Proteins von *V. inaequalis* mit einer molekularen Masse von 16 kDa (Probe B) (Angaben in %).

Aminosäure	Peptid 1	Peptid 2	Peptid 3	Peptid 4	Peptid 5
Asparaginsäure (D)	11,5	0,0	8,0	0,0	6,3
Glutaminsäure (E)	11,5	10,0	4,0	0,0	0,0
Arginin (R)	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Lysin (K)	3,8	10,0	4,0	5,6	6,3
Asparagin (N)	3,8	0,0	4,0	5,6	6,3
Glutamin (Q)	15,4	10,0	8,0	5,6	0,0
Serin (S)	7,7	0,0	28,0	11,1	0,0
Threonin (T)	0,0	10,0	8,0	11,1	12,5
Alanin (A)	7,7	10,0	4,0	22,2	31,3
Glycin (G)	7,7	30,0	28,0	0,0	0,0
Isoleucin (I)	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0
Leucin (L)	7,7	0,0	4,0	22,2	18,8
Phenylalanin (F)	7,7	10,0	0,0	5,6	0,0
Prolin (P)	3,8	0,0	0,0	0,0	6,3
Valin (V)	0,0	10,0	0,0	11,1	12,5

Die Aminosäuren (AS) sind nach ihren biochemischen Eigenschaften gruppiert: hellgrün: negativ geladene, hydrophile AS, orange: positiv geladene, hydrophile AS, hellblau: neutrale hydrophile AS, hellgelb: hydrophobe AS.

Tab. 24: Häufigkeiten der Aminosäuren in den Peptiden und Peptidfragmenten des Proteins von *V. inaequalis* mit einer molekularen Masse von 10 kDa (Probe A) (Angaben in %).

Aminosäure	Peptid 1	Peptid 2	Peptidfragment 1	Peptidfragment 2
Asparaginsäure (D)	14,3	9,1	20,0	14,3
Arginin (R)	0,0	9,1	0,0	0,0
Lysin (K)	14,3	0,0	0,0	0,0
Asparagin (N)	0,0	9,1	20,0	0,0
Serin (S)	0,0	9,1	20,0	14,3
Threonin (T)	14,3	18,2	0,0	0,0
Tyrosin (Y)	0,0	0,0	20,0	14,3
Alanin (A)	0,0	9,1	0,0	14,3
Glycin (G)	0,0	27,3	20,0	0,0
Leucin (L)	14,3	9,1	0,0	0,0
Phenylalanin (F)	14,3	0,0	0,0	14,3
Prolin (P)	14,3	0,0	0,0	14,3
Valin (V)	14,3	0,0	0,0	14,3

Die Aminosäuren (AS) sind nach ihren biochemischen Eigenschaften gruppiert: hellgrün: negativ geladene, hydrophile AS, orange: positiv geladene, hydrophile AS, hellblau: neutrale hydrophile AS, hellgelb: hydrophobe AS.

4 DISKUSSION

Während der frühen Pathogenese steht ein phytopathogener Pilz in engem Kontakt mit der Wirtsoberfläche. In den ersten Stunden des Zusammentreffens entscheidet sich, ob das Pflanzengewebe besiedelt und zur eigenen Ernährung genutzt werden kann. Viele Faktoren sind in dieser frühen Phase der Pathogenentwicklung auf der Wirtsoberfläche von Bedeutung: Im ersten Teil dieser Arbeit wurden physikalische und chemische Eigenschaften der Kutikula während der ontogenetischen Entwicklung von Apfelsämlingen vor dem Zusammentreffen mit dem Pathogen untersucht. Es wurden verschiedene Blattinsertionen untersucht, da sie Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber dem Erreger des Apfelschorfs *Venturia inaequalis* gezeigt hatten. Im zweiten Teil folgen die Untersuchungen zur Charakterisierung der Konidien von *V. inaequalis* sowie zur Adhäsion und Entwicklung der Konidien auf Apfel- und Modelloberflächen, die sich hinsichtlich ihrer Hydrophobizität voneinander unterschieden. Zudem wurden der Prozess und die Art der Haftung von Konidien und Infektionsstrukturen von *V. inaequalis* untersucht.

Junge Blätter von Apfelsämlingen der Sorte „Golden Delicious“ zeigten zu Beginn ihrer Entwicklung ein deutliches Größenwachstum, denn innerhalb von vier bis fünf Tagen verdoppelte sich nahezu ihre Fläche. Mit zunehmendem Alter nahm die Wachstumsrate kontinuierlich ab, bis das Blatt nach ca. 20 Tagen seine endgültige Größe erreicht hatte. Ähnliche Angaben liegen von HELLMANN und STÖSSER (1994) vor, die ihre Untersuchungen allerdings im Freiland durchgeführt hatten. Die Kutikuladicke nahm von ca. 0,8 µm bei sehr jungen Blättern auf maximal 2 µm bei ausgewachsenen Blättern zu (HELLMANN und STÖSSER 1992a). Auch in den eigenen Untersuchungen wurde eine Dickenzunahme der Kutikula und der Zellwand der adaxialen Blattseite bei Apfelblättern der Sorte „Golden Delicious“ festgestellt. Für den Infektionserfolg von *V. inaequalis* schien die Dicke der Kutikula, als ein Faktor der ontogenetischen Resistenz, ein limitierender Faktor zu sein, da auf alten Blättern weniger Primärstromata gebildet wurden als auf jungen Blättern. Trotz erfolgreicher Appressorienbildung schien der Pilz die Kutikula von alten Blättern nicht durchdringen zu können.

Die Blattfläche vergrößerte sich während der Entwicklung der Apfelsämlinge. Allerdings waren die alten bereits ausgereiften Blätter kleiner als Blätter, die zu einem späteren Zeitpunkt gebildet wurden. Die Entwicklung der Zellfläche von Epidermiszellen der Blattoberseite vollzog sich in ähnlicher Weise: Junge Blätter wiesen die kleinsten, ausgereifte Blätter die größten Epidermiszellen auf. Alte Blätter hatten allerdings wieder etwas kleinere Zellen. Eine

Vergrößerung der Blattfläche scheint größtenteils von der Ausdehnung der bereits vorhandenen Zellen abhängig zu sein. Die Anzahl an Epidermiszellen war in Untersuchungen von BRINGE et al. (2006) bei alten Blättern geringer als bei ausgereiften Blättern, die erst später entwickelt wurden. Dies hatte dementsprechend eine kleinere Blattfläche im Vergleich zu später entwickelten Blättern der gleichen Pflanze zur Folge.

Die Oberseite von Apfelblättern wies im Rasterelektronenmikroskop eine amorphe, glatte Oberflächenstruktur auf. Epikutikulare Wachskristalle waren nicht vorhanden. Amorphe Wachsfilm bzw. strukturarme Wachse sind neben *Malus*-Arten auch bei anderen Rosaceen zu finden (JEFFREE 2006, BAKER und HUNT 1981). Die Anordnung von Wachsen hat einen Einfluss auf die Mikromorphologie von Blättern und Früchten. Diese wiederum beeinflusst die Benetzbarkeit z. B. mit Wasser, und damit die Besiedlungsfähigkeit durch Mikroorganismen. Der Grad der Benetzbarkeit der Kutikula unterscheidet sich in Abhängigkeit von dem Vorhandensein von kristallinen epikutikularen Wachsen, ihrer chemischen Zusammensetzung sowie der Mikrostruktur der Wachse bzw. der Orientierung der Moleküle der Wachskomponenten (JUNIPER und JEFFREE 1983, HOLLOWAY 1970, HOLLOWAY 1969). Auch die aufzubringende Flüssigkeit hat einen Einfluss auf die Benetzbarkeit (HALLAM und JUNIPER 1971). Ausgedrückt wird der Grad der Benetzbarkeit eines Festkörpers durch den Kontaktwinkel, der Winkel, den eine Flüssigkeit mit einer festen Oberfläche bildet (JUNIPER und JEFFREE 1983, JUNIPER 1959). Die Kontaktwinkel von Wassertropfen auf der Oberfläche von Apfelsämlingen nahmen mit zunehmendem Blattalter ab, lagen aber bei keiner Blattinsertion über 110°. Die gemessenen Werte deuten auf eine hydrophobe Blattoberfläche hin, wie sie bei einer Vielzahl von Pflanzenspezies zu finden ist. Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen ergänzen Beobachtungen am Rasterelektronenmikroskop, denn nach HOLLOWAY (1970) sowie BARTHLOTT und NEINHUIS (1997) wiesen Blattoberflächen mit flachen Wachsbelägen ohne markante Oberflächenstruktur Kontaktwinkel zwischen 80 und 110° auf. Für die Pilzentwicklung müsste eine zunehmende Benetzbarkeit der Oberfläche vorteilhaft sein; bei *V. inaequalis* schien dies allerdings nicht der Fall zu sein, da auf alten Blättern, trotz einer besseren Benetzbarkeit, eine schlechtere Entwicklung festzustellen war. Demnach haben neben den Benetzungseigenschaften einer Oberfläche noch weitere Faktoren einen Einfluss auf die Entwicklung von Pathogenen.

Die adaxiale Seite von jungen Apfelblättern wies eine Oberfläche auf, die ausgeprägte kutikuläre Erhöhungen bzw. Rippen zeigte. Diese Rippen waren besonders auf dem Lumen, weniger am Rand der Epidermiszellen vorhanden. Die Kutikulamembran von Pflanzen ist oft mit Papillen oder Rippen versehen (JEFFREE 1996). Querschnitte der Blätter deuteten an, dass die

Rippen neben Wachsen auch Cutin und Zellwandbestandteile aufwiesen. Aus den Bildern wurde aber nicht ersichtlich, wo sich die verschiedenen Bereiche voneinander abgrenzten. Genaue Studien zum Aufbau der Kutikula von Pflanzen gibt es unter anderem von JEFFREE (1996), HOLLOWAY (1982b) sowie MARTIN und JUNIPER (1970). Auf alten Apfelblättern waren diese Aufwölbungen der Kutikula flacher und traten zudem seltener auf. Dies kann auf eine Vergrößerung der Zellfläche zurückgeführt werden, so dass es zu einer Art Streckung der Kutikula über den Zellen kommt (BRINGE et al. 2006). Durch die Auffaltungen der Kutikula kann es zu einer vielfachen Vergrößerung der Oberfläche im Vergleich zu der darunter liegenden Epidermis kommen (JEFFREE 1996, ROSENQUIST und MORRISON 1988, CONSIDINE und KNOX 1979). Dadurch kann sich die Kutikula an eine Ausdehnung der Epidermisfläche in späteren Stadien der Blatt- oder Fruchtentwicklung anpassen. Für phytopathogene Pilze, die auf Wasser oder eine hohe relative Luftfeuchtigkeit angewiesen sind, ist die Struktur der Blattoberfläche von Bedeutung. Junge Blätter stellen aufgrund ihrer Struktur vermutlich einen geeigneten Ort zur Besiedelung dar: In den tiefen Furchen zwischen den stark gewölbten Epidermiszellen und den Kutikularleisten kann sich das Oberflächenwasser länger halten. Dadurch wird ein günstiges Mikroklima für Pathogene erreicht. Auf alten Blättern, die eine flachere Oberfläche aufwiesen, müsste der Abtrocknungsprozess wesentlich schneller erfolgen, was eine ungünstigere Bedingung für den Infektionsbeginn zur Folge haben könnte. Durch *V. inaequalis* verursachte Läsionen waren meistens von der Mittelrippe und den seitlichen Hauptadern ausgehend auf der Blattoberseite zu sehen (MACHARDY 1995). Der Thigmotropismus oder Kontaktotropismus, der bei Rostpilze das Wachstum von Keimschläuchen und die Bildung von Appressorien bestimmt (HOCH und STAPLES 1991, HOCH et al. 1987), könnte ebenfalls im Zusammenhang mit der Entwicklung von *V. inaequalis* stehen. Auf alten Apfelblättern waren die Kutikularleisten flacher und in reduzierter Anzahl vorhanden, gleichzeitig war ein verringerter Anteil an Appressorien bei Konidien von *V. inaequalis* zu verzeichnen.

Die Gesamtwachsmenge der untersuchten Apfelblätter variierte in Abhängigkeit von der Blattinsertion zwischen 1,9 und 3,6 $\mu\text{g cm}^{-2}$ und betrug damit nur ein Zehntel der von HELLMANN (1992) sowie BAKER und HUNT (1981) gemessenen Werte an Freilandbäumen. DARNELL und FERREE (1983) sowie HOLLOWAY und BAKER (1970) beschrieben ebenfalls deutlich höhere Mengen im Gesamtwachs von Blättern verschiedener *Malus*-Arten. Die Wachsmenge der adaxialen Blattseite von *Malus hupehensis* verringerte sich analog zu der von *M. domestica*, bedingt durch geringe Wachssyntheseraten, mit fortschreitender Entwicklung (BAKER und HUNT 1981). Unterschiede in der Gesamtwachsmenge auf Apfelblättern können nicht nur während der Ontogenese der Pflanzen auftreten, sondern auch in Abhängigkeit von der

Jahreszeit und der Sorte (HELLMANN und STÖSSER 1992b). Außerdem konnten andere Faktoren, wie die relative Luftfeuchtigkeit, die Menge am epikutikularem Gesamtwachs pro Flächeneinheit z. B. bei Porree beeinflussen (MAIER und POST-BEITTENMILLER 1998). In den eigenen Untersuchungen wurden die Pflanzen in Klimakammern angezogen; dies könnte einen Einfluss auf die Wachsauflagerung haben, da umweltbedingte Faktoren weitgehend ausgeschlossen waren.

Das untersuchte Oberflächenwachs setzte sich aus sechs Substanzklassen zusammen. Triterpene, primäre Alkohole und Ester gehörten auf jungen Blättern der Apfelsorte „Golden Delicious“ zu den Hauptsubstanzklassen. Weitere Substanzklassen waren Alkane, Säuren und Sterole. Untersuchungen von HELLMANN (1992) ergaben einen hohen Anteil an Triterpenen von ca. 60 % des gesamten Oberflächenwachses; ein doppelt so hoher Anteil wie auf den jungen Blättern in den eigenen Untersuchungen gemessen wurden. Nach BAKER (1982) kommt die Ursolsäure als vorherrschendes Triterpen in den Blatt- und Fruchtwachsen von vielen *Malus*- und *Prunus*-Arten vor, und war in großen Mengen auch in den untersuchten Apfelblättern zu finden. Der Triterpengehalt nahm im Laufe der Blattentwicklung ab. Ähnliche Ergebnisse über das Vorhandensein von Triterpenen in Blattwachsen wurden auch bei anderen Rosaceen beschrieben, wie z. B. *Prunus laurocerasus* (JETTER und SCHÄFFER 2001, JETTER et al. 2000), *Prunus persica* (BAKER et al. 1979), *M. hupehensis* sowie *Prunus cerasus* (BAKER und HUNT 1981).

Durch die Extraktion mit Chloroform wurden vermutlich, vor allem bei jungen bzw. im Gewächshaus gebildeten Blättern mit einer dünnen Wachsschicht, nicht nur die epikutikularen Wachse herausgelöst, sondern auch die intrakutikularen. Die gleiche Vermutung hatten auch HAAS und RENTSCHLER (1984) und wählten eine Methode mit Kollodium, um die epikutikularen Wachse mechanisch von der Blattoberfläche abzuziehen. Bei *Rubus fruticosus* wiesen die intrakutikularen Wachse, ähnlich wie bei von HELLMANN (1992) untersuchten Apfelblättern, einen hohen Anteil an Oleanol- und Ursolsäure auf, während im epikutikularen Wachs keine bzw. nur geringe Anteile an Triterpenen detektiert wurden (HAAS und RENTSCHLER 1984). Die detektierten Triterpene haben demnach für die Eigenschaften auf der Wachsoberfläche und somit für die Pilzentwicklung nur eine geringe Bedeutung.

Hentriacontan war die vorherrschende Komponente bei den Alkanen, Hexacosanol und Dotriacontanol bei den primären Alkoholen. Der Alkangehalt blieb unabhängig vom Blattalter auf etwa dem gleichen Niveau, der Anteil primärer Alkohole nahm indes zu. Innerhalb der Einzelkomponenten kam Hexacosanol in jungen Blättern am häufigsten vor, während

Dotriacontanol vor allem in alten Blättern in höherem Maße zu finden war. Hexacosanol und Octacosanol sind unter anderem dominante Komponenten in den Blattwachsen von Getreidearten sowie von *Beta vulgaris*, *Phaseolus vulgaris*, *Eucalyptus*- und *Acacia*-Arten (BAKER 1982). Ein Anstieg im Alkoholanteil sowie eine Zunahme der längerkettigen Alkohole wurde an Apfelblättern und -früchten anderer Sorten festgestellt (BELDING et al. 1998, HELLMANN 1992). Das Oberflächenwachs von Avocadofrüchten beinhaltet einen hohen Anteil an langkettigen primären Alkoholen. Diese Wachskomponente löste als ein chemisches Signal die Appressorienbildung bei *Colletotrichum gloeosporioides* aus (PODILA et al. 1993). Auch bei *Erysiphe pisi* induzierte ein hoher Gehalt an primären Alkoholen im epikutikularen Wachs von Erbsenblättern die Keimschlauch- und Appressorienbildung (GNIWOTTA et al. 2005). Bei Konidien von *V. inaequalis* hingegen scheinen hohe Alkoholgehalte im Wachs hemmend zu wirken, da mit zunehmendem Blattalter der Gehalt an primären Alkoholen zunahm und sich gleichzeitig die Appressorienbildung reduzierte. Die Keimung blieb hingegen unbeeinflusst.

Sterole nahmen im Wachs der untersuchten Apfelblätter mit deren Alter zu. Diese Substanzklasse, die bei BRINGE et al. (2006) nicht detektiert wurde, wurde auch im Wachs von Pflirsichblättern gefunden, und verhielt sich im Vergleich zum Wachs der Apfelblätter während der Blattentwicklung konform (BAKER et al. 1979, BUKOVAC et al. 1979). Während der Ontogenese verschiedener Pflanzenarten treten gegensätzliche Veränderungen in den Oberflächenwachsen von Blättern und Früchten auf. Die Veränderungen können die Menge der gebildeten Wachse sowie die Zusammensetzung der Substanzklassen und Einzelkomponenten betreffen. Je nach Pflanzenart und auch innerhalb von Pflanzenarten können die einzelnen Wachsbestandteile zu- oder abnehmen. Die Änderungen der Wachszusammensetzung mit dem Blattalter können als eine unterschiedlich starke Exkretion der einzelnen Wachskomponenten im Laufe der Zeit angesehen werden (BAKER und HUNT 1981). BAKER et al. (1979) nahmen an, dass eine nachlassende Stoffwechselaktivität der älter werdenden Blätter für diese Änderungen verantwortlich ist. Da die einzelnen Bestandteile, aus denen sich Oberflächenwachs zusammensetzen, unterschiedliche chemische Eigenschaften aufweisen, ergeben sich durch Änderung der Wachszusammensetzung somit auch Änderungen der chemischen Eigenschaften der Wachsschicht (HELLMANN 1992). Dies könnte einen Einfluss auf die Entwicklung von *V. inaequalis* haben.

Die Hydrophobizität von Apfelblattoberflächen verringerte sich im Lauf der Ontogenese der Blätter. Die verbesserte Benetzbarkeit von alten Blättern schien mit den oben genannten Veränderungen in der Zusammensetzung der Wachskomponenten verbunden zu sein. Diese

Annahme beruht auf dem Vorkommen von langkettigen Alkanen und primären Alkoholen, die eine hohe Apolarität in den Wachsen hervorrufen. Die Akkumulation von funktionalen OH-Gruppen bzw. die Zunahme längerer Wachskomponenten hat eine große Bedeutung für die Hydrophobizität, und bedingt eine zunehmende Benetzbarkeit der Blattoberfläche während der Ontogenese (HOLLOWAY 1969). Auf Blättern von *Prunus persica*, ebenfalls einem Vertreter der Rosengewächse, hingegen erhöhte sich der Kontaktwinkel aufgrund von Änderungen der Wachszusammensetzung mit der Blattentwicklung, was eine zunehmende Hydrophobie der adaxialen Blätter zur Folge hatte (BUKOVAC et al. 1979).

Die Aufbringung von extrahierten Blattwachsen auf Glasoberflächen erhöhte deren Hydrophobizität signifikant. Die auf Glas aufgetragene Wachse der verschiedenen Blattinsertionen bildeten nicht die Unterschiede in der Benetzbarkeit ab, die auf den Blättern festgestellt wurden. Bei der Extraktion der Wachse mittels Chloroform wurde davon ausgegangen, dass alle an der Oberfläche befindlichen Wachse herausgelöst wurden. Da sich der Kontaktwinkel grundlegend unterscheidet, ist davon auszugehen, dass neben der Zusammensetzung auch die Anordnung der einzelnen Wachskomponenten für die Benetzbarkeit der Oberfläche von Bedeutung ist. Komponenten, die sich in unteren Kutikulaschichten befinden, können durch die künstliche Aufbringung auf Glas an die Oberfläche kommen und somit den Kontaktwinkel verändern. Denn die Komponenten der Wachsschicht weisen unterschiedliche Hydrophobizitäten auf: Alkane sind am hydrophobsten, gefolgt von den Estern, Ketonen, sekundären und primären Alkoholen. Am wenigsten hydrophob sind Sterole, Diole und Triterpene (JUNIPER und COX 1973, HOLLOWAY 1970). Diese Änderungen in der Wachsanordnung und damit bedingten topographischen Unregelmäßigkeiten auf der Glasoberfläche könnten auch ein Grund dafür sein, dass die Entwicklung von *V. inaequalis* auf wachsbeschichtetem Glas nicht mit der auf Apfelblättern vergleichbar war. Trotz der gleichen Wachszusammensetzung (unter der Annahme, dass das gesamte Wachs extrahiert wurde) gab es Unterschiede in Form von verringerten Keimraten, längeren Keimschläuchen und vermehrt gebildeten Appressorien im Vergleich zur Entwicklung auf Apfelblättern.

Neben der Charakterisierung von Apfelblättern als Wirtsoberflächen erfolgte eine Beschreibung der Konidien von *V. inaequalis* sowie der frühen Interaktion zwischen Pathogen und Oberfläche. Von Befallsstellen abgeerntete Konidien waren deturgeszent. Sie wiesen nur einen sehr geringen Wassergehalt von ca. 9 % auf (STEINER und OERKE, persönliche Mitteilung). Es wird vermutet, dass ein geringer Wassergehalt die Konidien resistent gegenüber umweltbedingte Stressfaktoren macht und somit eine Überdauerung ungünstiger Entwicklungsbedingungen ermöglicht. Tropfbares Wasser führte sofort zu einer

Wasseraufnahme und damit bedingten Volumenzunahme der Konidien bis zur vollständigen Turgeszenz. Dies deutet auf einen hohen osmotischen Wert der Konidien hin. Die Konzentration von Stoffen in der Konidie muss so hoch sein, so dass das umgebende Wasser sofort aufgenommen werden kann. Die Aufnahme des Wassers erfolgte über die Konidienbasis, der Teil, der vermutlich nicht melanisiert ist. Der Nachweis von Chitin durch die Färbung mit Wheat Germ Agglutinin (WGA) und der Umstand, dass WGA nicht an melanisierte Teile binden kann, deuteten darauf hin, dass die Konidienbasis, mit der die Konidien am Konidiophoren verbunden sind, kein Melanin einlagert.

Zum ersten Mal wurde für *V. inaequalis* an der Konidienspitze eine globuläre Struktur beobachtet, die für die Anheftung ungekeimter Konidien von Bedeutung ist. Diese Struktur, die nur an trockenen Konidien zu sehen war, enthielt eine Haftsubstanz, die der „spore tip mucilage“ ähnlich ist, die für Konidien von *Magnaporthe grisea* beschrieben ist (HAMER et al. 1988). Anders als bei Konidien von *M. grisea* konnten bei *V. inaequalis* keine Hinweise auf das Vorhandensein einer Membran an der Konidienspitze nach Entlassen der Mucilage festgestellt werden. Daher scheint es sich bei der globulären Struktur um eine Art haftungsfähigen Tropfen zu handeln, der sich außerhalb der Konidie befindet. Da keine Membran vorhanden ist, die das Adhärens schützt, muss die Haftsubstanz von *V. inaequalis* Eigenschaften erfüllen, die es ihr ermöglicht, in Wasser stabil bzw. klebefähig zu bleiben und erst beim Kontakt mit einer festen Oberfläche mit dieser zu reagieren, d. h. festzukleben. Aufgrund ihrer Eigenschaft und der Lokalisation an der Konidienspitze wurde die Struktur *spore tip glue* (STG) genannt. Neben Konidien bilden wohl auch Ascosporen von *V. inaequalis* eine klebrige Matrix aus, welche die Ascosporen auf eine nasse und hydrophobe bewachste Oberfläche von Apfelblättern und –früchten anheftet (MACHARDY et al. 2001).

Neben *V. inaequalis* sind nur wenige Pathogene bekannt, von denen beschrieben ist, dass sie über eine derartige globuläre Struktur an der Konidienspitze verfügen, mit deren Hilfe sie sich an nasse Oberflächen anheften (BOUCIAS und PENDLAND 1991, HAMER et al. 1988). Die beiden entomopathogenen Zygomyceten *Neozygites fresenii* und *Zoophthora phalloides* wiesen an einem Ende der asexuell gebildeten sekundären Sporen einen sogenannten „attaching sac“ bzw. einen zähflüssigen Tropfen auf, der es ihnen ermöglichte, sich an Körperteile von Aphiden und Milben anzukleben (GLARE et al. 1985, SELHIME und MUMA 1966).

Die an der Konidienspitze befindliche Haftsubstanz wurde mit verschiedenen Färbetechniken sowohl auf hydrophoben als auch auf hydrophilen Oberflächen untersucht. Unterschiede in ihrem Aussehen und ihrer Zusammensetzung waren auf beiden Oberflächen

nicht erkennbar. Die Haftsubstanz besteht aus mehreren Komponenten, die mit Hilfe von Farbstoffen als Proteine und Kohlenhydrate identifiziert werden konnte. Die exakte chemische Zusammensetzung ist allerdings nicht bekannt, dazu wäre die Charakterisierung der Inhaltsstoffe der Haftsubstanz mit Hilfe von chemischen Methoden wie z. B. der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) nötig. Untersuchungen am Licht- und Transmissionsmikroskop zeigten eine räumliche Unterteilung der Haftsubstanz von dehydrierten Konidien. Die Verwendung der Lektine PNA und GS-II erbrachte eine Identifizierung von Galaktose- bzw. Acetylglucosaminylresten von Glykoproteinen, die sich im STG der Konidien von *V. inaequalis* befinden. Die Existenz von Glykoproteinen in der Haftsubstanz von Sporen und weiteren Infektionsstrukturen wurde bereits für andere pflanzenpathogene Pilze wie z. B. *Nectria haematococca*, *Colletotrichum graminicola* und *M. grisea* beschrieben (MERCURE et al. 1995, XIAO et al. 1994a, KWON und EPSTEIN 1993). BRAUN und HOWARD (1994b) färbten die Haftsubstanz an Konidien von *Cochliobolus heterostrophus* mit verschiedenen Farbstoffen, die auf das Vorhandensein von Proteinen und sauren Mucopolysacchariden hinwiesen. Die Matrix, welche die Pyknidiosporen von *Phyllosticta ampellicida* umgibt, besteht nach KUO und HOCH (1995) ebenso wie die Haftsubstanz der Konidien von *V. inaequalis* teilweise aus sauren Mucopolysacchariden, da sie sich unter anderem mit dem positiv geladenen Farbstoff Alcianblau anfärben ließ. Die Markierung der Haftsubstanz von *V. inaequalis* war mit Concanavalin A (Con A), einem Lektin, welches an α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin mit abnehmender Spezifität bindet, nicht möglich. Auch Chitin ließ sich in der Haftsubstanz nicht nachweisen. Bei *C. graminicola* und *M. grisea* hingegen konnte Con A sehr gut an das die ungekeimten Konidien umgebende Material binden (MERCURE et al. 1995). Bei *M. grisea* hatte außerdem die Zugabe von Con A zur Konidien suspension eine verminderte Adhäsion auf einer hydrophoben Oberfläche zur Folge (BOURETT et al. 1993, HAMER et al. 1988).

Ungekeimte Konidien von *V. inaequalis* zeigten Veränderungen in Form von kleinen Aufwölbungen an der Zellwand im oberen Drittel der Konidien. Diese Aufwölbungen waren nur an deturgeszenten Konidien sichtbar und befanden sich ausschließlich in der Nähe des STG. Möglicherweise weist die Zellwand Poren oder Durchlässe auf, die ermöglichen, dass die unter anderem in der Konidie befindliche Haftsubstanz bei der Aufnahme von Wasser in diesen Bereichen sekretiert wird. Eine Vergrößerung der globulären Struktur vor dem Kontakt zu einer Oberfläche war während der Wasseraufnahme beobachtet worden. Ob die Vergrößerung durch die Wasseraufnahme oder durch die Nachlieferung der Haftsubstanz aus der Konidie bedingt ist, muss noch geklärt werden. Der Ort der Produktion bzw. der Einlagerung der Haftsubstanz in der

Konidie ist bis dato noch nicht bekannt. Ebenso bleibt zu klären, wie es zu einer Akkumulation des Adhärens an der Konidienspitze kommt.

Eine Hydratation von trockenen Konidien vollzog sich unmittelbar nach dem Kontakt mit Wasser und war mit der Abgabe der Haftsubstanz auf die Kontaktfläche verbunden. Für beide Prozesse, Hydratation und Haftsubstanzabgabe, war flüssiges, tropfbares Wasser notwendig, eine hohe relative Luftfeuchtigkeit allein reichte nicht aus. Dies könnte damit zusammenhängen, dass auch für die Auslösung der Keimung und der Ausbildung weiterer Infektionsstrukturen sowie für die Penetration der Apfelkutikula eine ausreichende Blattnässe erforderlich ist (MACHARDY et al. 2001, MACHARDY 1995, TURNER et al. 1986). Würden die Konidien bereits bei einer hohen Luftfeuchtigkeit auskeimen, wären sie in den Phasen bis zur Eindringung in das Blatt für Trockenheit sehr anfällig und könnten mit größerer Wahrscheinlichkeit ihre Entwicklung nicht vollständig vollziehen.

Die Besonderheit für Konidien von *V. inaequalis* war, dass sie nur in einer nassen Umgebung auf einer Kontaktfläche anhaften konnten. Ein Beispiel außerhalb der Mykoflora stellen aquatische Lebewesen wie z. B. Muscheln dar, die mithilfe eines wasserresistenten Klebproteins an nassen bzw. unter Wasser befindlichen Oberflächen haften können (WAITE 1990). Bei *V. inaequalis* konnte das Adhärens in einer hydrophilen Umgebung wie Wasser nur auf hydrophoben Oberflächen haften, während die Adhäsion unter gleichen Bedingungen, trotz Abgabe der Haftsubstanz, auf hydrophilen Oberflächen nur sehr gering war. In einer hydrophoben Umgebung wie einem Öltropfen kam es allerdings weder auf einer hydrophoben noch einer hydrophilen Oberfläche zur Abgabe der Haftsubstanz und damit zur Anheftung der Konidien von *V. inaequalis*. Dies macht deutlich, dass der Mechanismus an das Vorhandensein von Wasser gebunden zu sein scheint.

Bei der vorläufigen Haftung von ungekeimten Konidien auf einer trockenen Oberfläche können hydrophobe Wechselwirkungen nicht ausgeschlossen werden. So nahmen DOSS et al. (1993) und APOGA et al. (2001) an, dass die unmittelbare Adhäsion von *Botrytis*- bzw. *Bipolaris*-Konidien auf einer Unterlage ein passiver Prozess ist und teilweise durch hydrophobe Wechselwirkungen bedingt ist. Konidien von *B. cinerea* sind, im Gegensatz zu *V. inaequalis*, in der Lage, auf trockenen Blättern zu keimen, wenn eine hohe relative Luftfeuchtigkeit gegeben ist (WILLIAMSON et al. 1995). APOGA et al. (2001) vermuteten, dass die hydrophobe Oberfläche der Konidien dabei eine Bedeutung hat, da bereits KUO und HOCH (1996a) und DOSS et al. (1993) einen Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität der Zelloberfläche und der Adhäsion auf Polystyrol beschrieben. Hydrophobe Wechselwirkungen scheinen für Konidien

von *V. inaequalis* nicht von Bedeutung zu sein, da die Konidien nur auf nassen und nicht auf trockenen Oberflächen haften und keimen konnten.

Konidien von *V. inaequalis*, die für 1-24 Stunden in Wasser geschüttelt worden waren, besaßen immer noch die Fähigkeit, auf einer hydrophoben Oberfläche zu haften. Daher scheint die Haftsubstanz auch noch in der Suspension intakt zu sein. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass nicht nur Wasser, sondern auch eine Kontaktfläche für die Abgabe der Haftsubstanz und damit für die Anheftung der Konidien von *V. inaequalis* vorhanden sein muss. Ein weiterer Anhaltspunkt für diese Vermutung zeigte sich durch eine verringerte Konidiendichte der Suspension mit zunehmender Schütteldauer. Es ist anzunehmen, dass sich Konidien während des Schüttelns beim Kontakt an die hydrophoben Wände des Kunststoffgefäßes an diese angeheftet haben, so dass sich der Anteil frei im Wasser schwimmender Konidien verringerte.

Die Haftsubstanz ermöglichte es Konidien von *V. inaequalis* nach ihrer Hydratation auf nassen hydrophoben Apfelblättern zu haften. Untersuchungen, bei denen Konidien suspensionen von Modelloberflächen abgewaschen worden waren, ergaben, dass die Hydrophobizität der Oberfläche für die Adhäsion ausschlaggebend war. Wie bei *V. inaequalis* war auch bei Konidien von *Bipolaris sorokiniana* und *M. grisea* die Adhäsion auf hydrophobem Polystyrol wesentlich besser als auf einer hydrophilen Oberfläche wie Glas (APOGA et al. 2001, HAMER et al. 1988). Ähnliche Ergebnisse über eine bessere Haftung auf hydrophoben als auf hydrophilen Oberflächen wurden von ungekeimten Konidien von *Phyllosticta* spp., *B. cinerea*, *Colletotrichum* spp. und *Uromyces viciae-fabae* beschrieben (SHAW et al. 2006, KUO und HOCH 1996a, CLEMENT et al. 1994, MERCURE et al. 1994, DOSS et al. 1993, SELABUURLAGE et al. 1991). Dass sich hydrophobe Modelloberflächen besser für die Adhäsion von Sporen eignen, liegt mutmaßlich daran, dass sie natürlichen Oberflächen ähnlicher sind als hydrophilen Modelloberflächen. Analogien konnten durch eine physikalische Charakterisierung gezeigt werden, bei der ähnliche Kontaktwinkel auf Apfelblättern und auf Parafilm[®] bzw. Polystyrol gemessen wurden. Die Festigkeit einer Oberfläche war indes für die Adhäsion von geringer Bedeutung. Auf Apfelblättern und Polystyrol konnte eine bessere Adhäsion der Konidien von *V. inaequalis* festgestellt werden als auf Glas, obwohl Glas härter ist als die untersuchten hydrophoben Oberflächen.

Auf jungen Rosenblättern war die Adhäsion von ungekeimten Konidien in den ersten vier Stunden nach der Inokulation, ähnlich wie auf Glas, sehr schlecht. Erst mit der Bildung von Infektionsstrukturen kam es zu einem Anstieg haftender Konidien. Die Oberfläche von Rosenblättern war hydrophob. Die Blätter scheinen ähnlich wie die von BARTHLOTT und

NEINHUIS (1997), BAKER (1982) sowie HOLLOWAY (1970) beschriebenen Blätter anderer Pflanzenarten mit ausgeprägten epikutikularen Wachskristallen, zu superhydrophoben Oberflächen mit hohen Kontaktwinkeln bis hin zur Wasserabstoßung zu gehören. Die geringe Haftfähigkeit der Konidien auf Rosenblättern lässt sich mit der sehr geringen Auflagefläche des Suspensionstropfens auf dem Blatt erklären, die durch einen hohen Kontaktwinkel bedingt ist. Nur wenige Konidien können daher mit der Pflanzenoberfläche in Kontakt kommen, um sich an diese anzuheften. Mit zunehmender Inkubation des Tropfens auf dem Blatt wird die Oberfläche leichter benetzbar, so dass die Auflagefläche des Tropfens vergrößert wird. MATZ (2003, unveröffentlicht) hatte gezeigt, dass betaute hydrophobe Oberflächen besser benetzbar waren als trockene. Durch die Vergrößerung der Auflagefläche erreichten demnach immer mehr Konidien die Oberfläche der Rosenblätter, auf der sie weitere Infektionsstrukturen bilden konnten. Dies erklärt die Tatsache, dass mit der Bildung von Keimschläuchen und Appressorien die Haftfähigkeit deutlich verbessert war. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich die Haftsubstanz der ungekeimten Konidien auf sehr hydrophoben Oberflächen schlechter anlagern kann als die später gebildete Haftsubstanz der Appressorien. Letztere wies eine größere Auflagefläche, und damit einen größeren Kontakt zur Rosenoberfläche, auf als die des STG.

Auf Apfelblättern und hydrophoben Modelloberflächen kam es ein bis zwei Stunden nach der Inokulation zu einer kurzfristigen, aber signifikanten Abnahme in der Adhäsion von Konidien von *V. inaequalis*. Sie war auf jungen Blättern bzw. hydrophoben Oberflächen stärker als auf älteren, weniger hydrophoben Blättern, und auf Glas sowie Rosenblättern gar nicht zu sehen. Diese Abnahme trifft zeitlich mit der sehr frühen Keimungsphase der Konidien zusammen, in der es zur Abrundung der Konidienspitze kommt. Die anfängliche Adhäsion zu einer Wirtsoberfläche ist auf die kegelförmige Spitze der Konidien beschränkt, die Stelle der Konidie an der diese überwiegend auskeimen. Die Zellwand der Konidienspitze scheint dünner zu sein als die übrigen, melanisierten Teile der Konidien, so dass sie vorzugsweise an der apikalen Seite auskeimen. Auch HERING et al. (1993) machten die Beobachtung, dass die Konidien von *V. inaequalis* zumeist direkt apikal oder seitlich von der Spitze auskeimten. Es sieht demnach so aus, dass es während der Schwellung der Keimpore sowie der beginnenden Keimung zu einer Abschwächung in der Haftfähigkeit des STG kommt. Die verschlechterte Haftung scheint durch die Tatsache gegeben zu sein, dass beide Prozesse, Adhäsion und Keimung, an der gleichen Stelle der Konidie stattfinden. Dieser Effekt der kurzfristigen Abnahme in der Haftfähigkeit trat auf Glas und Rosenblättern vermutlich deshalb nicht auf, da der Anteil haftender Konidien sowieso sehr gering war.

Bei der konidialen Haftsubstanz von *V. inaequalis* handelt es sich vermutlich um eine präformierte Substanz. Anhaltspunkte dafür stellen die Versuche mit Hemmstoffen und Detergenzien dar. Die Adhäsion von ungekeimten Konidien auf einer hydrophoben Oberfläche wurde nicht durch die Hemmstoffe Cycloheximid und Chloramphenicol – beide Substanzen wirken auf die Proteinbiosynthese – beeinflusst. Demnach enthalten die Konidien von *V. inaequalis* die Substanz bereits, wenn sie auf einer Oberfläche auftreffen. Diese muss nicht erst nach dem Kontakt auf einer Oberfläche gebildet werden, wie es z. B. für *Cochliobolus heterostrophus* beschrieben ist (BRAUN und HOWARD 1994b). Da es erst nach dem Oberflächenkontakt und kurz vor der Entstehung des Keimschlauches zur Bildung einer extrazellulären Matrix kommt, wird für die Anheftung ein aktiver Stoffwechsel benötigt, der z. B. durch Cycloheximid gehemmt werden kann. Cycloheximid verminderte auch die Anheftung von Konidien von *Colletotrichum graminicola* um 50 %. Die Zugabe von Natriumazid, einem Hemmstoff der mitochondrialen Atmung, hingegen hatte keinen sichtbaren Effekt auf die Adhäsion (MERCURE et al. 1994). Für die Adhäsion von Konidien von *Nectria haematococca* war ebenfalls eine aktive Stoffwechselleistung erforderlich, da sowohl Natriumazid als auch Cycloheximid in der Lage waren, die Anheftung zu unterbinden (JONES und EPSTEIN 1989). Bei diesen Pathogenen handelte es sich folglich um einen aktiven Prozess der Haftsubstanzabgabe. Da die Sporen erst nach dem Kontakt auf einer Oberfläche zur Bildung einer Haftsubstanz angeregt wurden, begann eine Haftung erst ca. 20-30 Minuten nach dem Auftreffen auf eine Oberfläche (BRAUN und HOWARD 1994b, MERCURE et al. 1994).

Bei Konidien von *M. grisea* funktionierte, ähnlich wie bei *V. inaequalis*, die Abgabe der „spore tip mucilage“ und die Anheftung der Sporen unmittelbar nach dem Oberflächenkontakt und unabhängig vom pilzlichen Metabolismus. Das Vorhandensein von Natriumazid und Cycloheximid führte nicht zu einer Hemmung der Konidienanheftung (BRAUN und HOWARD 1994a). Demnach handelt es sich wie bei *V. inaequalis* um einen passiven Prozess der Adhäsion. Die Festigkeit und Hydrophobizität einer Oberfläche scheinen keinen Einfluss auf die unmittelbare Mucilage-Abgabe zu haben.

Actinomycin D wirkt als Transkriptionshemmer auf die Nucleinsäuresynthese und schien auf die Haftfähigkeit von ungekeimten Konidien einen signifikanten Einfluss zu haben. Da durch die Zugabe von Methanol, welches als Lösungsmittel für Actinomycin D verwendet wurde, ein ähnliches Ergebnis erreicht wurde, ist anzunehmen, dass der Effekt eher auf das Methanol als auf den Hemmstoff zurückzuführen ist. Demzufolge hatte ein gestörter Stoffwechsel keinen Einfluss auf die Haftfähigkeit von ungekeimten Konidien.

Die Zugabe von Proteinase K und Natriumdodecylsulfat (SDS) – Substanzen, die Proteine abbauen bzw. denaturieren – sowie des oberflächenaktiven Tweens[®] reduzierte den Anteil auf Polystyrol haftender ungekeimter Konidien signifikant. Auch bei ungekeimten Konidien von *Colletotrichum musae* führte die Zugabe von SDS zu einer reduzierten Haftfähigkeit auf einer hydrophoben Oberfläche, ohne die Lebensfähigkeit der Konidien zu beeinflussen (SELA-BUURLAGE et al. 1991).

Drei Fungizide mit den Wirkstoffen Trifloxystrobin, Flusilazol und Kresoxim-methyl wurden auf ihre Fähigkeit der Inhibition der Anheftung von Konidien untersucht. Die beiden Strobilurine Kresoxim-methyl und Trifloxystrobin wirken durch die Bindung an Cytochrom b auf die mitochondriale Atmung (KÖLLER et al. 2004, ZHENG und KÖLLER 1997) und hemmen somit die Sporenkeimung und das Wachstum von *V. inaequalis*. Sie werden protektiv eingesetzt (HÄUSER-HAHN et al. 2003, GOLD et al. 1996). Flusilazol unterbindet die Ergosterol-Biosynthese, also die Produktion einer lebenswichtigen Membrankomponente von Pilzen. Bei ungekeimten sowie bei gekeimten Konidien, mit Ausnahme von Benocap[®] (Flusilazol), wurde der Anteil haftender Konidien deutlich reduziert. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Formulierhilfsstoffe einen größeren Einfluss auf die Haftfähigkeit hatten als die Wirkstoffe. Denn bei der Verwendung von Kresoxim-methyl und der entsprechenden Leerformulierung, war der negative Effekt auf die Haftfähigkeit bei ungekeimten Konidien signifikant größer als bei der Verwendung des Präparats Discus[®]. Bestandteile der Leerformulierung waren neben Aceton, welches auf Proteine denaturierend wirkt, NP15, ein oberflächenaktives Tensid.

Auch die Zugabe von SDS kurz vor dem Abwaschprozess führte zu einer verringerten Adhäsion der Konidien. Dies trat allerdings nur in der Phase auf, in der die Konidien noch keine Keimschläuche gebildet hatten. Nach vier Stunden reduzierte sich der Unterschied zur unbehandelten Variante und mit der Bildung von Appressorien waren keine Einschränkungen in der Haftung der Konidien durch SDS mehr feststellbar. Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *V. inaequalis* verschiedene Haftsubstanzen gebildet werden, da SDS nur einen Effekt auf die Haftsubstanz der ungekeimten Konidien zeigte.

Mikroskopische Betrachtungen von Konidien von *V. inaequalis* im Wasserstrom zeigten haftende Konidien, bei denen sich nur der basale Teil bewegte, während die Spitze an der Oberfläche fixiert war. HAMER et al. (1988) führten ähnliche Versuche mit Konidien von *M. grisea* durch, bei denen sich die an der Spitze anhaftenden Konidien mit ihrem basalen Teil immer nach der Flussrichtung des Wassers ausrichteten. Sie nahmen daraufhin an, dass sowohl

die Konidienform als auch eine Anheftung an der apikalen Seite der Konidie hydrodynamisch sehr günstig ist, um einem Wasserstrom standzuhalten. Diese Annahme könnte auch auf Konidien von *V. inaequalis* zutreffen, da sie eine ähnliche Form wie diejenigen von *M. grisea* aufweisen und ebenfalls mit ihrer Spitze an Oberflächen kleben. Durch lichtmikroskopische Aufnahmen konnte belegt werden, dass Konidien von *V. inaequalis* mit der an ihrer Spitze vorhandenen Substanz an Oberflächen festkleben können.

Konidien von *V. inaequalis* wurden auf ihre Entwicklungsfähigkeit in Abhängigkeit ihrer Haftfähigkeit auf einer hydrophoben Oberfläche untersucht. Konidien, die nach 24 Stunden noch nicht gekeimt waren, waren dennoch vorher in der Lage gewesen zu haften. Andererseits waren auch Konidien, die von der Oberfläche abgewaschen wurden, in der Lage, auszukeimen und, wenn auch nur im geringen Maße, Appressorien zu bilden. Es zeigte sich demnach, dass die Entwicklungsfähigkeit von Konidien von *V. inaequalis* nicht unbedingt mit ihrer Haftfähigkeit auf Oberflächen gleichgestellt werden kann. Allerdings schienen Konidien, die nicht hafteten, weil sie möglicherweise keinen STG besitzen, in ihrer Entwicklungsfähigkeit eingeschränkt zu sein. Einen Einfluss könnte zum einem das Alter der Konidien haben, denn es hatte sich in Untersuchungen gezeigt, dass länger gelagerte Konidien von *V. inaequalis* zwar noch haften konnten, dass der Anteil aber geringer war als bei frischen Konidien (Daten nicht gezeigt). Auch bei Ascosporen von *V. inaequalis* ist ein Altern der Sporen der Hauptfaktor für den Verlust der Lebensfähigkeit (MACHARDY 1995). Für *Phyllosticta ampellicida* hingegen ist die vorherige Adhäsion der Sporen Voraussetzung für die Keimung auf einer hydrophoben Oberfläche. Auf hydrophilen Oberflächen konnten sie nicht haften und dementsprechend auch nicht auskeimen (KUO und HOCH 1996a). Dieses Phänomen ist selten und wurde nach KUO und HOCH (1996a) bisher nur für zwei aquatische Hyphomyceten beschrieben, deren S-förmige Konidien signifikant besser keimen konnten, wenn sie auf einem Untergrund hafteten (WEBSTER und DAVEY 1984).

Für mehrere Stunden in Wasser bewegte Konidien hafteten fast so gut wie direkt applizierte Konidien der gleichen Suspension. Allerdings stellte sich heraus, dass die Keimung durch die vorherige Inkubation in Wasser auf einem Überkopfschüttler gehemmt wurde. Eine Hemmung der Keimung durch Sauerstoffmangel konnte ausgeschlossen werden, da das Gefäß regelmäßig während kurzer Schüttelpausen geöffnet wurde. Als mögliche Ursache für die Keimhemmung wird vermutet, dass erstens für die Keimung eine Orientierung der Konidien gegeben sein muss, die durch das Schwenken verhindert wird. Aufgrund der heftigen Bewegung der Konidien im Wasser wird der Orientierungsparameter Schwerkraft für die Konidien immer wieder verändert, so dass kein Keimungsreiz gegeben werden kann. Bei Pflanzen dient der

Gravitropismus dazu, dass Wurzeln nach unten in die Erde und Sprosse nach oben zum Licht wachsen (LÜTTGE et al. 1999, TAIZ und ZEIGER 1998). Räumlich gerichtete Reize konnten allerdings durch bestimmte Faktoren, wie das langsame Rotieren einer Pflanze in der Horizontale, aufgehoben werden (POHL 1954). Bei Pilzen findet ein gerichtetes Wachstum der Keimschläuche statt. Das polarisierte Wachstum kann durch externe Stimuli (Tropismen) (HOCH und STAPLES 1991) oder intern durch die Akkumulation von sogenannten Spitzenkörpern, die in der Keimschlauchspitze lokalisiert sind, bedingt sein (RIQUELME et al. 1998, LOPEZ-FRANCO und BRACKER 1996, GROVE und BRACKER 1970). Das Schütteln der Konidien im Wasser schien zu verhindern, dass sich die Spitzenkörper richtig positionieren konnten, um die Keimung einzuleiten. Zweitens scheint auch das Vorhandensein einer Oberfläche für die Keimung von Konidien von *V. inaequalis* von Bedeutung zu sein. Für *Colletotrichum graminicola* ist der Kontakt zu einer festen, hydrophoben Oberfläche für die Initiierung der Keimung notwendig. Allerdings war eine Keimung auch ohne Kontaktfläche möglich, wenn im Wasser eine Nährstoffquelle verfügbar war (CHAKY et al. 2001).

Die Adhäsion von Konidien von *V. inaequalis* nahm mit zunehmender Inkubationszeit auf natürlichen und Modelloberflächen generell zu. Mit der Bildung von Keimschläuchen nahm der Anteil haftender Konidien auch auf Glas zu, bis die Adhäsion schließlich mit der Generierung von Appressorien auf allen Oberflächen sehr ähnlich war. Somit war die Haftung von *V. inaequalis* nicht mehr nur auf die Konidie allein, sondern vielmehr auch auf den Keimschlauch bzw. das Appressorium zurückzuführen. Spätere Stadien von *V. inaequalis* scheinen demnach unabhängig von der Oberfläche zu haften. Der Anhaftungsprozess lässt sich folglich, wie auch von APOGA et al. (2001) und DOSS et al. (1993) für *Bipolaris sorokiniana* bzw. *Botrytis cinerea* beschrieben, in zwei Stadien teilen: In der ersten Phase erfolgt die Adhäsion durch ungekeimte Konidien nach deren Hydratation, in der zweiten Phase durch Konidien, die begonnen haben, Keimschläuche und Appressorien zu bilden. Die Steigerung im Anteil haftender Konidien während späterer Stadien des pilzlichen Wachstums erfolgte aufgrund der Sekretion einer extrazellulären Matrix, die zur Anheftung dieser Strukturen beizutragen scheint.

Nicht nur an ungekeimten Konidien waren mittels histochemischer Untersuchungen extrazelluläre Matrices detektierbar, sondern auch an Keimschläuchen und Appressorien von *V. inaequalis*. Es konnte an den Keimschläuchen eine proteinhaltige Matrix nachgewiesen werden, die allerdings sporadisch auftrat. Am Übergang zwischen Konidie und Keimschlauch konnten neben Proteinen auch Kohlenhydrate nachgewiesen werden - Komponenten, die auch Bestandteile der Haftsubstanz von ungekeimten Konidien sind. Aufgrund der gleichen

Lokalisierung ist nicht auszuschließen, dass es sich dabei um noch an der Konidie befindliche Reste dieser Haftsubstanz handeln könnte. An den Spitzen der Keimschläuche – Zellwandbereiche, an denen sich wachsendes Gewebe befindet – wurden unterdessen Chitin, Glycosaminyl- sowie Galaktosereste und Glukan-Verbindungen identifiziert. Diese Substanzen sind typische Bestandteile der pilzlichen Zellwand von Ascomyceten, Basidiomyceten und weiteren Pilzabteilungen mit Ausnahme der zu den Chromista zählenden Oomyceten, die Zellulose als Hauptzellwandbestandteil besitzen (CAVALIER-SMITH 2001, MÜLLER und LOEFFLER 1982).

Histochemische Untersuchungen der Appressorien führten zur Charakterisierung einer extrazellulären Matrix, die aus verschiedenen Komponenten - u. a. Proteinen, Kohlenhydraten, Glykoproteinen - bestand. Auch für diese Matrix konnte die genaue chemische Zusammensetzung nicht geklärt werden. Sie war, ebenfalls wie die Haftsubstanz der ungekeimten Konidien, in zwei Bereiche aufgeteilt. In licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen war die Matrix nur im Bereich der Appressorien, nicht an den Keimschläuchen, zu sehen. Sie verlor mit zunehmender Entfernung zum Appressorium an Stärke. Die Appressorien schienen regelrecht in der extrazellulären Matrix eingebettet zu sein, was eine gute Haftung bzw. Positionierung auf der Pflanzen- und auch Modelloberfläche gewährleistete. Die Ausbildung einer Matrix an Appressorien von *V. inaequalis* wurde bereits früh von NUSBAUM und KEIT (1938) beschrieben. Sie sahen die Funktion der schleimartigen Ummantelung darin, dass Appressorien an der Blattoberfläche festgehalten werden. Über die Ultrastruktur von Appressorien, die von keimten Konidien von *V. inaequalis* gebildet wurden, sowie das Auftreten einer klebrigen Substanz wurde auch bei CORLETT und CHONG (1977) berichtet. PARK et al. (2000) beschrieben eine polysaccharidhaltige Substanz an den Keimschläuchen und Appressorien von *Venturia nashicola*, die feine granuläre und fibrilläre Komponenten aufwies. Sie vermuteten, dass die Substanz in der Adhäsion von Keimschläuchen und Appressorien auf dem Blatt involviert sind. SMEREKA et al. (1987) führten Untersuchungen mit Ascosporen von *V. inaequalis* durch und entdeckten an der Kontaktfläche zwischen Ascospore und Blatt eine Substanz, die vor allem am Appressorium reichlich vorhanden war. Die Produktion der Mucilage, welche unter anderem aus Polysacchariden bestand, wurde genauer untersucht, und SMEREKA et al. (1987) vermuteten, dass die Substanz durch die „Auflösung“ der beiden äußeren Schichten der pilzlichen Wand gebildet wird. Ein ähnlicher Prozess der Matrixabgabe könnte ebenfalls für Appressorien von *V. inaequalis* gelten.

Des Weiteren zeigte sich, dass die von den Appressorien abgegebene Matrix sehr stabil und unempfindlich gegenüber Lösungen wie Trifluoressigsäure, SDS oder Ethanol war. Diese

Substanzen, die alle auf Proteine wirken, waren nicht in der Lage, die Haftsubstanz von einer hydrophoben Oberfläche abzuwaschen. Die Ergebnisse über die Haftfähigkeit von Konidien und Infektionsstrukturen von *V. inaequalis* machen deutlich, dass die Adhäsion ein Schritt der pilzlichen Entwicklung darstellt, und dass jedes Stadium im Entwicklungsprozess über unterschiedliche Adhäsionseigenschaften verfügt.

Die Hydrophobizität einer Oberfläche war für die anfängliche Entwicklung von *V. inaequalis* von Bedeutung. Die Keimung vollzog sich ebenfalls in Abhängigkeit von der Kontaktoberfläche. Auf hydrophilen Oberflächen wie Glas war die Keimrate in den ersten acht Stunden nach Applikation signifikant geringer als auf hydrophoben Modelloberflächen und Apfelblättern. Erst ein bis zwei Tage nach der Inokulation, zu Zeitpunkten, an denen alle vitalen Konidien ausgekeimt sind und Appressorien gebildet haben, konnten keine Unterschiede mehr zwischen den einzelnen Versuchsoberflächen festgestellt werden. Wie auch in den Versuchen zur Haftfähigkeit von Konidien hatte Glas als Unterlage auf die Keimung den größten negativen Effekt. Die Blattinsertion bzw. das Blattalter hatte auf die Keimung von *V. inaequalis* auf Apfelblättern keinen Einfluss. Unterschiede in der Morphologie und Wachszusammensetzung der Blätter wirkten sich nicht auf die Keimung aus.

Keimschläuche waren bei Konidien, die keine Appressorien gebildet hatten, signifikant länger als bei Konidien, die innerhalb der gleichen Zeit ein oder mehrere Appressorien ausgebildet hatten. Mit der Differenzierung eines Appressoriums wurde das Keimschlauchlängenwachstum zunächst beendet. Gekeimte Konidien verlängern demnach ihren Keimschlauch solange, bis sie eine Stelle auf der Oberfläche gefunden haben, die die Bildung des Appressoriums induziert oder bis alle Energiereserven aufgebraucht sind. SMEREKA et al. (1987) stellten fest, dass während der Keimung von Ascosporen Lipid- und Glykogenreserven aufgebraucht werden. Bei *M. grisea* bewegten sich die Lipidtropfen aus den Keimschläuchen in Richtung der Appressorien sobald deren Bildung begann. Eine Mobilisierung der Lipide war in Mutanten, die keine Appressorien ausbilden konnten, nicht feststellbar (THINES et al. 2000). Untersuchungen zur Ultrastruktur der Konidien von *Colletotrichum graminicola* zeigten, dass der Anteil an Lipidkörpern mit zunehmendem Alter der Konidien abnahm (MIMS et al. 1995b). Eine Verlagerung von Speicherstoffen konnte ebenfalls während der Entwicklung des Apfelschorferregers beobachtet werden. In ungekeimten Konidien von *V. inaequalis* lagen Speicherlipide in großer Menge vor. Mit Einsetzen des Keimungsprozesses teilten sich diese großen Lipidtropfen, und kleinere Tropfen verlagerten sich mit der Bildung der Infektionsstrukturen in den Keimschlauch und das Appressorium. Mit fortschreitendem Infektionsprozess auf der Oberfläche kam es neben einer Verkleinerung auch zu einer

Reduzierung der Lipidtropfen, was auf den Verbrauch durch den Pilz zurückzuführen war. Es wird vermutet, dass die bereits in der Konidie gespeicherten Energiestoffe das Pathogen solange versorgen, bis dieses neue Energie aus dem Wirtsgewebe aufnehmen kann. Bis zur Infektion des Wirtsgewebes lebt das Pathogen gewissermaßen autark. Da die Reserven nur in begrenzter Menge vorliegen, ist ein zügiger Infektionsprozess nötig. Durch den kontinuierlichen Verbrauch an limitierten Reservestoffen verringert sich vermutlich mit zunehmender Inkubationsdauer die Wahrscheinlichkeit, dass Konidien mit sehr langen Keimschläuchen überhaupt noch Appressorien bilden und einen Infektionserfolg erzielen. Gründe für die Unterlassung der Bildung von Appressorien bei gleichzeitiger Ausbildung von langen Keimschläuchen, können nicht auf fehlende chemische Signale für die Wirtserkennung zurückgeführt werden, da Konidien von *V. inaequalis* auch auf artifiziellen Oberflächen Appressorien entwickeln konnten und dafür nicht auf Wirtsgewebe angewiesen waren (eigene Untersuchungen, STEINER und OERKE 2007).

Die Härte der Kontaktoberfläche hatte einen Einfluss auf die Länge der Keimschläuche. Auf festen Oberflächen wie Glas und Polystyrol waren die Keimschläuche kürzer als auf dem weicheren Parafilm[®]. Bei Apfel und anderen Pflanzen nimmt die Härte der Blätter aufgrund vermehrter Cutin-Einlagerung in der Kutikula, der Auflagerung von Cellulose-Fibrillen und der Einlagerung von Lignin in die Zellwand im Laufe der Ontogenese zu (LÜTTGE et al. 1999, MARTIN und JUNIPER 1970). BAAS (1982) nahm an, dass Änderungen in der Wachszusammensetzung von Blättern von *Hoya*-Arten und *Ficus benjamina* als Anpassung der Lipidschicht an die Wachstums- und Umweltbedingungen der Pflanzen betrachtet werden können. Ihm nach benötigen junge, sich entwickelnde Blätter eine weiche, verformbare Wachsschicht, während ältere Blätter durch ein härteres Wachs geschützt würden. Allerdings wurden bei *V. inaequalis* auf den härteren, älteren Blättern längere Keimschläuche gebildet als auf jungen, noch weichen Blättern. Eine allgemein geltende Regel lässt sich daher nicht beschreiben. Auf Blättern müssen noch Faktoren mit berücksichtigt werden, die auf Modelloberflächen nicht vorkommen wie z. B. topographische Unterschiede auf dem Blatt, das Vorkommen keimhemmender Substanzen oder das Vorhandensein von Blatthaaren (MACHARDY 1995, HOCH und STAPLES 1991). Die zunehmende Länge der Keimschläuche kann unter anderem durch die größeren Zellen bei alten Blättern bedingt sein, so dass längere Strecken zu den bevorzugten Eindringungsstellen über den antiklinen Zellwänden überwunden werden müssen als auf jungen Blättern mit kleinen Zellen.

Für die Appressoriendifferenzierung von *M. grisea* ist die Festigkeit einer Oberfläche ausschlaggebend. Die Hydrophobizität und topographischen Eigenschaften einer Oberfläche sind

hingegen von untergeordneter Bedeutung (XIAO et al. 1994b). LEE und DEAN (1994) stellten allerdings fest, dass auch die Hydrophobizität einer Oberfläche die Bildung von Appressorien von *M. grisea* beeinflussen kann. Sie bezeichneten dieses Ergebnis als einen entscheidenden Faktor für die Initiierung der Appressorienbildung. Für die Generierung der Appressorien von *V. inaequalis* scheint die Festigkeit der Kontaktoberfläche ebenfalls relevant zu sein. Die Appressorien wurden sowohl auf jungen als auch auf alten Blättern hauptsächlich über und in unmittelbarer Nähe zu den antiklinen Zellwänden gebildet. Bereits ADERHOLD (1896) machte ähnliche Beobachtungen. Es ist anzunehmen, dass diese Bereiche der Blätter eine härtere Oberfläche bieten als das Zelllumen. Nach STEINER und OERKE (2007) waren sehr weiche Oberflächen, wie z. B. Wasseragar, ungünstig für die Generierung von Appressorien von *V. inaequalis*, und stattdessen wurden nur sehr lange Keimschläuche gebildet. Auch bei anderen phytopathogenen Pilzen wurde beobachtet, dass sie über den antiklinen Wänden der Epidemiszellen in die Wirtspflanzen eindringen (KUO und HOCH 1996b, HAU und RUSH 1979, LAPP und SKOROPAD 1978, CLARK und LORBEER 1976) Die Autoren deuteten dieses Phänomen mit Signalen, welche durch die Topographie der Wirtsoberfläche ausgelöst werden. HOCH und STAPLES (1991) sowie HAU und RUSH (1979) vermuteten, dass in der Region der antiklinen Zellwände aufgrund einer dünneren Schicht an kutikularen Wachsen vermehrt Exudate abgesondert werden (SCHÖNHERR und BUKOVAC 1970), die als chemisches Signal für die Bildung der Appressorien ausschlaggebend sind.

Die Ausbildung eines Appressoriums ging in der Regel mit der Bildung einer melanisierten Ringstruktur einher, die sich nach STEINER und OERKE (2007) nur an der zur Kutikula zugewandten Seite der Appressorien befindet. Die Appressorien selbst waren nicht melanisiert, wie es z. B. für *M. grisea*, *Colletotrichum* spp. und *P. ampellicida* beschrieben ist (SHAW et al. 1998, HOWARD und FERRARI 1989, KUBO und FURUSAWA 1986, WOLKOW 1983, EMMETT und PARBERY 1975). Die Melaninringausprägung war bei *V. inaequalis* auf alten Blättern und harten Modelloberflächen kräftiger als auf jungen Blättern und weicheren Modelloberflächen. Auf jungen Apfelblättern war der Anteil schwach ausgebildeter Melaninringe, trotz größtem Infektionserfolg, am höchsten. Auf alten Blättern wurden hingegen vermehrt kräftige Ringe gebildet, bei geringem Infektionserfolg. Demnach hat die Stärke des Ringes auf Apfelblättern nicht mit dem Infektionserfolg sondern vielmehr mit der Festigkeit und Dicke der Kutikula zu tun. Je härter die zu durchdringende Oberfläche ist, desto mehr Melanin wird in den Ring eingelagert. Auch pflanzenspezifische Signale schienen nach STEINER und OERKE (2007) nicht erforderlich zu sein, da die melanisierte Ringstruktur auf verschiedenen Oberflächen von Wirts- und Nichtwirtspflanzen sowie auf Modelloberflächen

vorkommt. Dies wurde ebenfalls in den eigenen Untersuchungen festgestellt. Weiterhin wird diese Struktur als Pathogenitätsfaktor beschrieben, da die Verhinderung der Pigmentierung der Ringstruktur mittels Melaninbiosynthesehemmer zu einer reduzierten Infektionsrate führte (STEINER und OERKE 2007). Melanin hat für die Penetration und damit für die Entwicklung verschiedener Pilze eine essentielle Bedeutung: Mutanten von *M. grisea* und *Colletotrichum lagenarium*, die chemisch an der Bildung von Melanin gehemmt wurden, waren nicht in der Lage, melanisierte Appressorien zu bilden und waren gleichzeitig apathogen (KUBO und FURUSAWA 1991, CHUMLEY und VALENT 1990). Mehrere mögliche Funktionen werden für *V. inaequalis* diskutiert, u. a. dient die Ringstruktur zur Anheftung an die pflanzliche Kutikula oder zur Lokalisierung von Exoenzymen für die Lyse der Zellwand bzw. als Schutz vor hydrolytischen Aktivitäten. Des Weiteren wird eine Funktion in der Stabilitätserhöhung der appressorialen Zellwände angenommen, die dem für eine Penetration erforderlichen Druck standhalten müssen (STEINER und OERKE 2007). Bei *M. grisea* konnten im melanisierten Appressorium durch die Aufnahme von Wasser sogar sehr hohe Turgordrücke von bis zu 8 MPa aufgebaut werden, melaninfreie Mutanten waren indes dazu nicht in der Lage (HOWARD et al. 1991).

Die Appressorienbildungsrate vollzog sich ähnlich wie die Keimrate in Abhängigkeit der zu besiedelnden Oberfläche. Auf hydrophilen Oberflächen war die Appressorienbildungsrate in den ersten acht Stunden nach Applikation signifikant geringer als auf hydrophoben. Erst ein bis zwei Tage nach der Inokulation konnten keine Unterschiede mehr zwischen den Oberflächen festgestellt werden. Auf Apfelblättern hingegen verringerte sich die Rate mit zunehmenden Blattalter. Alte Blätter von *V. inaequalis* blieben im untersuchten Zeitraum nahezu symptomfrei während junge Blätter eine starke Symptomausprägung zeigten. Die Entwicklung im Blatt, also die Primärstroma- und Laufhyphenbildung, war bei alten Blättern deutlich reduziert, obwohl sich auf dem Blatt die Keimung und Appressorienbildung vollziehen konnte. Dies bestätigt die Untersuchungen von BIEHN et al. (1966) sowie NUSBAUM und KEIT (1938), bei denen auf alten Blättern trotz geringerem Befall die Keimung normal war und Infektionshyphen und Appressorien gebildet wurden. Zudem waren in den eigenen Untersuchungen bei alten Blättern häufiger Abwehrreaktionen der Pflanze in Form von kreisförmigen Zellwandverstärkungen zu erkennen als bei jungen. Dies erschwerte oder verhinderte sogar die Eindringung des Pathogens. Papillenbildung wurde von GESSLER (1988) (zitiert in MACHARDY 1995) fünf Tage und länger nach der Inokulation auf Blättern von „Golden Delicious“ beobachtet. Diese traten nur auf, wenn sich kleine Stomata gebildet hatten; in den eigenen Untersuchungen war sie auch ohne erkennbares Stroma 48 Stunden nach der Inokulation zu sehen.

Als Ursache für die unterschiedliche Entwicklung auf und im Blatt und daraus resultierende Befallsunterschiede nannten GESSLER und STUMM (1984) die Altersresistenz, die auch als ontogenetische Resistenz bezeichnet wird. Dass junge, z. T. noch nicht vollständig entfaltete Apfelblätter gegenüber *V. inaequalis* anfälliger sind als alte, ausgereifte Blätter, ist bekannt (MACHARDY 1995, SCHWABE 1979, BIEHN et al. 1966, NUSBAUM und KEIT 1938). WYATT et al. (1991) nahmen an, dass die Zunahme an β -1,3-Glukanase, Chitinase und Peroxidase im Pflanzengewebe mit dem Alter der Pflanzen korreliert ist. Da viele pathogene Pilze Chitin und β -1,3-Glukan als Hauptkomponenten in ihrer Zellwand aufweisen, wird vermutet, dass die in der Pflanze gebildeten Enzyme eine Resistenz gegenüber Pilze verursachen können. RAA (1968) nannte als Ursache der Altersresistenz den niedrigeren pH-Wert älterer Blätter, welcher das Wachstum von *V. inaequalis* hemmen könnte. BIEHN et al. (1966) folgerten aus ihren Untersuchungen mit *V. inaequalis* und *Helminthosporium carbonum*, dass neben der Kutikuladicke andere Faktoren wie die zunehmende Dicke der Zellwand und das Vorhandensein hemmender Substanzen in der Kutikula für die Resistenz von alten Apfelblättern verantwortlich sind. VALSANGIACOMO und GESSLER (1988) hingegen zeigten, dass die Dicke der Kutikulamembran für die Penetration von *V. inaequalis* keine physikalische Barriere darstellte, da die Kutikulamembran der Blätter von schorfresistenten und anfälligen Sorten gleichermaßen penetriert wurde. Neben der Anzahl von Infektionsstellen wird durch die ontogenetische Resistenz auch die Zeit, die gebraucht wird, um Läsionen auszubilden sowie die Dauer, in der weitere Läsionen auftreten, beeinflusst (MACHARDY et al. 2001). Dies wurde mit den eigenen Versuchspflanzen bestätigt, bei denen die Symptomausprägung auf alten Blättern im Vergleich zu der auf jungen Blättern verzögert war und weniger Läsionen zu sehen waren.

Histochemische Untersuchungen zeigten, dass Proteine eine bedeutende Komponente in den Haftsubstanzen von *V. inaequalis* sind. Daher sollte geklärt werden, ob spezifische oberflächenaktive Proteine, sogenannte Hydrophobine, bei *V. inaequalis* vorhanden waren. Untersucht wurde neben den gekeimten Konidien auch das Medium, in dem die Konidien inkubiert worden waren. Nur im Medium waren Proteine nachweisbar. Während die Reinigung der Proteine A und B aus dem Medium Hinweise auf eine Klasse von pilzlichen Polypeptiden ergab, konnte dies nach der Sequenzierung der gereinigten Peptide nicht bestätigt werden. Pilzliche Hydrophobine sind kleine, sekretierte, hydrophobe Proteine, die ein konserviertes Aminosäuremotiv von acht Cysteinresten in einer charakteristischen Abfolge besitzen (KERSHAW und TALBOT 1998, WESSELS 1997). Die Proteine sind weit verbreitet und kommen unter anderem bei den Pilzspezies der Ascomyceten und Basidiomyceten sowie der Zygomyceten vor (WHITEFORD und SPANU 2002, TUCKER und TALBOT 2001, WESSELS

1997, DEVRIES et al. 1993). Ihre Eigenschaften lassen auf eine Beteiligung in der Präpenetrationsphase in der Entwicklung von pathogenen Pilzen schließen, was von TUCKER und TALBOT (2001) an Beispielen der Hydrophobine MPG1 von *M. grisea* und Ceratoulmin von *Ophiostoma ulmi*, sowie bereits früher von WESSELS (1994) am Hydrophobin SC3 von *Schizophyllum commune* gezeigt wurde. Die Hydrophobine werden entweder in das sie umgebende Medium abgegeben oder sie befinden sich in der Zellwand der Hyphen (WESSELS 1997). Sie besitzen verschiedene Funktionen auf der Oberfläche von Pilzsporen sowie bei der Bildung von Luftmyzel, Appressorien und Fruchtkörpern. Auch für die Sporulation sowie für die Anheftung von Hyphen auf hydrophoben Oberflächen sind Hydrophobine von Bedeutung (WHITEFORD et al. 2004, KERSHAW und TALBOT 1998, WESSELS 1997, WESSELS 1994, WESSELS et al. 1991). Die Fähigkeit der Proteine besteht darin, zu unlöslichen amphipathischen Schichten an einer hydrophoben-hydrophilen Grenzschicht zu aggregieren. Diese Schicht erhöht die Hydrophobizität der Hyphen und ermöglicht ihnen dadurch, in Wasser auf allen hydrophoben Oberflächen zu wachsen. Für die Adhäsion von pilzlichen Strukturen auf einer hydrophoben Wirtsoberfläche hat dies eine große Bedeutung (WÖSTEN et al. 1994).

Keimschläuche von *V. inaequalis* hafteten auf hydrophoben Oberflächen, obwohl mittels verschiedener Farbstoffe, mit Ausnahme eines Proteinfarbstoffes, keine Färbung einer Matrix möglich war. Die Haftung an eine Oberfläche könnte daher nicht nur von einer der von ungekeimten Konidien ähnlichen Haftsubstanz herrühren, sondern von der Sekretion von Hydrophobinen, die es dem hydrophilen Keimschlauch im Wasser ermöglicht, sich durch die Bildung des amphipathischen Films an eine hydrophobe Apfelblattoberfläche fest anzuheften.

Hydrophobine lassen sich anhand der Anordnung ihrer hydrophoben und hydrophilen Aminosäurereste sowie anhand der unterschiedlichen Löslichkeit in SDS in zwei Klassen aufteilen (WESSELS 1997, WESSELS 1994). Die sequenzierten Proteine A und B wiesen eine starke Unlöslichkeit auf, da sie nach einer Extraktion mit heißem SDS als fast einzige Proteine erhalten blieben. Dies deutet auf Klasse 1-Hydrophobine hin. Die anschließende Behandlung mit Trifluoressigsäure führte zu einer Aufspaltung der Proteine in Monomere, und in der SDS-PAGE wurden Banden mit molekularen Massen von 10 und 16 kDa sichtbar. Molekulare Massen ähnlicher Größe wurden auch für Hydrophobine der Ascomyceten *M. grisea* und *Cladosporium fulvum* sowie der Basidiomyceten *Pisolithus tinctorius* und *Tricholoma terreum* beschrieben (MANKEL 2001, TAGU et al. 2001, SPANU 1997, TALBOT et al. 1996). Die beiden Proteine von *V. inaequalis* wiesen hydrophobe Eigenschaften, allerdings keine Cysteine in den Sequenzen auf. Das Fehlen von Cysteinresten macht eine Zuordnung zu den Hydrophobinen

unwahrscheinlich. Deren Zugehörigkeit kann aber nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da die Peptidsequenzen für eine genauere Bestimmung eventuell zu kurz waren.

Auch die Untersuchung der Konidienoberfläche von *V. inaequalis* im Rasterelektronenmikroskop konnte keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Hydrophobinen geben. Die sogenannten „rodlet layer“, die sich auf der Oberfläche von Sporen und Hyphen von hydrophobinbildenden Pilzen wie z. B. *Schizophyllum commune*, *M. grisea*, *Aspergillus* spp. und *Neurospora crassa* befinden (PARIS et al. 2003, TALBOT et al. 1996, WÖSTEN et al. 1994, WÖSTEN et al. 1993, CLAVERIE-MARTIN et al. 1986, BEEVER et al. 1979, COLE et al. 1979), wurden nicht gefunden. Die Beteiligung von Hydrophobinen wurde nach WESSELS (1994) durch die Bildung von „rodlets“ an der Außenseite von Sporen bewiesen. Das Fehlen eines „rodlet layers“ erklärt auch die Tatsache, dass aus frischen, ungekeimten Konidien von *V. inaequalis* keine Proteine heraus gereinigt werden konnten.

Nur bei der Probe mit einer molekularen Masse von ~ 16 kDa wurden Peptide sequenziert. Diese wiesen Übereinstimmungen mit anderen Pilzspezies der Ascomyceten auf. Über die Proteine von *Coccidioides immitis* und *Phaeosphaeria nodorum*, die in Teilen der Peptidsequenzen 1, 2 und 3 von *V. inaequalis* entsprachen, ist bis dato keine Funktion beschrieben, so dass eine Zuordnung nicht möglich ist.

Die Aminosäure-Analyse der „spore tip mucilage“ von *M. grisea* erbrachte, dass sich diese vor allem aus hydrophoben und hydroxilierten Aminosäuren zusammensetzte (HOWARD et al. 1993). Einige Aminosäuren wie Alanin, Glycin, Leucin, Threonin und Valin machten jeweils einen Anteil von über 10 % am Gesamtgewicht der sequenzierten Aminosäuren aus, während die Aminosäuren Arginin, Histidin, Methionin und Tyrosin nur einen sehr geringen Anteil von unter 1 % aufwiesen. Mit der angewandten Methode konnte allerdings kein Cystein und Tryptophan detektiert werden (HOWARD et al. 1993). Für einige der oben genannten Aminosäuren zeigte *V. inaequalis* ein ähnliches Häufigkeitsmuster; dies galt vor allem für die Peptide 2, 4 und 5 des 16 kDa-Proteins. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es sich bei den Peptidsequenzen von *V. inaequalis* um Teile eines Proteins, welches für die Haftung der pilzlichen Infektionsstrukturen verantwortlich ist, handelt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen die Bedeutung einer hydrophoben Pflanzenoberfläche für deren Besiedlung mit phytopathogenen Erregern. Es wurde deutlich, dass sowohl für die Adhäsion der Konidien von *V. inaequalis* als auch für die weitere Entwicklung auf der Oberfläche neben der Hydrophobizität und Festigkeit auch die chemische Zusammensetzung der Oberfläche eine Bedeutung hat. Der Prozess der Anheftung von Konidien

von *V. inaequalis* wurde erstmals beschrieben. Die Untersuchungen zur Anheftung haben Einblicke in die erste, für den Infektionsbeginn entscheidende Phase des Zusammentreffens von Wirt und Pathogen gegeben und damit einen weiteren Schritt in der frühen Pathogenese des Apfelschorf-Erregers offen gelegt. Diese Ergebnisse tragen damit zu einem besseren Verständnis des Infektionsprozesses bei und erweitern das Wissen über die ablaufenden Mechanismen und deren Beeinflussbarkeit grundlegend.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die frühen Phasen der Pathogenese von *Venturia inaequalis* auf der Blattoberfläche von Apfelsämlingen erfasst und der Einfluss verschiedener Kontaktflächen auf die Pilzentwicklung untersucht. Die verwendeten Modelloberflächen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Hydrophobizität, die verschiedenen Blattinsertionen hinsichtlich ihrer Anfälligkeit gegenüber *V. inaequalis*. Mikroskopische Studien sollten Aufschluss über die Morphologie der Konidien und der weiteren Infektionsstrukturen des Pathogens geben. Erstmals wurde der Prozess der Anheftung für Konidien von *V. inaequalis* auf Oberflächen untersucht.

- Im Laufe der Ontogenese von Apfelblättern kam es zu einem deutlichen Größenwachstum. Die Fläche verdoppelte sich innerhalb von vier bis fünf Tagen. Die relative Wachstumsrate nahm mit zunehmenden Blattalter kontinuierlich ab.
- Die Oberfläche der adaxialen Apfelblätter wies eine amorphe Wachsschicht ohne markante epikutikularen Wachse auf, die sich in Abhängigkeit von der Blattinsertion in der Menge apolarer Wachse pro Flächeneinheit und in ihrer chemischen Zusammensetzung unterschied. Die Wachsmenge verringerte sich von $3,6 \mu\text{g cm}^{-2}$ bei jungen Blättern auf $1,9 \mu\text{g cm}^{-2}$ bei alten Blättern. Der Anteil an Triterpenen verminderte sich mit zunehmendem Blattalter, während der an primären Alkoholen zunahm.
- Die Kutikula der Epidermiszellen wies ausgeprägte Leisten auf, die sich mit zunehmenden Blattalter in der Anzahl verringerten und abflachten. Die Fläche der Epidermiszellen nahm zu, blieb auf den ältesten Blättern aber immer etwas kleiner als auf später gebildeten Blättern.
- Die Benetzbarkeit der adaxialen Blattoberfläche nahm mit zunehmendem Blattalter zu, was auf Veränderungen der Wachszusammensetzung zurückzuführen war. Auf mit Wachsen verschiedener Blattinsertionen beschichteten Glasoberflächen verschlechterte sich die Benetzbarkeit.
- Trockene Konidien von *V. inaequalis* weisen an ihrer Spitze einen Tropfen mit einer Haftsubstanz (spore tip glue, STG) auf, der es ihnen ermöglicht, auf einer feuchten Oberfläche zu haften. Die Präsenz einer klebefähigen Substanz an der Konidienspitze von Konidien von *V. inaequalis* wurde erstmals beschrieben. Diese Haftsubstanz besteht aus mehreren Komponenten und ist vor allem durch das Vorhandensein von Proteinen und Kohlenhydraten bzw. Glykoproteinen definiert.

- Eine Hydratation der Konidien von *V. inaequalis* führte zu einer signifikanten Volumenzunahme. Eine hohe relative Luftfeuchtigkeit allein reichte dazu allerdings nicht aus.
- Die Abgabe des STG vollzog sich als ein passiver Prozess unmittelbar nach Kontakt mit einer nassen Oberfläche. Der Anteil haftender Konidien nahm mit zunehmender Inkubationszeit der Konidien auf einer Oberfläche zu. Die Haftung war in der ersten Phase durch ungekeimte, in der zweiten Phase durch gekeimte Konidien mit und ohne Appressorium bedingt. Die Adhäsion war auf hydrophoben Oberflächen besser als auf hydrophilen. Die Härte einer Oberfläche hatte hingegen keinen Einfluss auf den Anteil haftender Konidien.
- Die Verwendung von Inhibitoren der Proteinbiosynthese führte zu keiner Beeinträchtigung der Adhäsion, was darauf hinweist, dass es sich bei dem STG um eine präformierte Substanz handelt. Oberflächenaktive Substanzen (Detergenzien) reduzierten hingegen den Anteil haftender Konidien auf hydrophoben Oberflächen.
- Die Keimung der Konidien vollzog sich unabhängig von der Blattinsertion und lag 48 Stunden nach der Inokulation bei ca. 90 %. Auf Modelloberflächen war die Keimrate ähnlich hoch. Auf hydrophilen Glasoberflächen wurde im Vergleich zu hydrophoben Oberflächen eine zeitlich verzögerte Keimung festgestellt.
- Die Keimschläuche von *V. inaequalis* blieben auf jungen Blättern kürzer als auf alten. Unabhängig von der Blattinsertion bildeten gekeimte Konidien, die ein oder mehrere Appressorien generiert hatten, kürzere Keimschläuche als Konidien ohne Appressorium. Auf wachsbeschichtetem Glas konnte keine Korrelation zwischen der Blattinsertion und der Keimschlauchlänge festgestellt werden. Keimschläuche waren auf einer weichen, hydrophoben Oberfläche signifikant länger als auf einer harten, hydrophilen bzw. hydrophoben Oberfläche.
- Mit zunehmender Inkubationszeit nahm der Anteil appressorienbildender Konidien zu. Auf Glas war die Appressorienbildung zeitlich verzögert, und deren Anteil war auf den hydrophoben Oberflächen in der Regel höher. Auf Apfelblättern verschiedener Insertion nahm die Appressorienbildung mit zunehmendem Blattalter ab. Der Anteil gekeimter Konidien mit Appressorien lag auf den Modelloberflächen unabhängig von der Hydrophobizität bei ca. 90 %.
- Die Bildung von Appressorien und einer melanisierten Ringstruktur wurde vor allem über und unmittelbar neben den antiklinen Zellwänden der Apfelepidermis beobachtet. Dies war auf

allen Blattinsertionen die bevorzugte Stelle der Eindringung. Die Ausprägung der im Appressorium lokalisierten Melaninringe nahm mit zunehmender Härte der Kontaktfläche zu.

- An den Appressorien war eine extrazelluläre Matrix sichtbar, die aus zwei Bereichen aufgebaut war und neben Proteinen Kohlenhydrate und saure Mucopolysaccharide beinhaltete. Diese Matrix, die unter anderem als Haftsubstanz diente, war sehr widerstandsfähig und ließ sich nicht von der Oberfläche ablösen.
- Die Primärstroma- und Laufhyphenbildung nahm mit zunehmendem Alter der Blätter ab. Die verringerte Bildung von Infektionsstrukturen im Blatt führte zu einer geringeren Symptomausprägung auf alten Blättern. Die ontogenetische Resistenz bei alten Blättern wurde als Ursache angenommen.
- Die Beteiligung von Hydrophobinen in der Adhäsion und Entwicklung von *V. inaequalis* konnte nicht nachgewiesen werden. Im Kulturmedium wurden Proteine detektiert, die hydrophobe Eigenschaften zeigten, ansonsten aber wenige Ähnlichkeiten mit den oberflächenaktiven Hydrophobinen aufwiesen. Das Vorkommen dieser speziellen Proteine konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Adhäsion und Entwicklung der Konidien von *V. inaequalis* tragen zur weiteren Charakterisierung der asexuellen Form des Pathogens sowie zum besseren Verständnis der frühesten Phasen in der Wirt-Pathogen-Interaktion bei. Dabei wurde der Einfluss einer durch das Altern veränderten Blattoberfläche auf das Pilzwachstum erfasst. Erstmals wurde die Präsenz einer globulären Struktur an der Konidienspitze und deren Beteiligung am Anheftungsprozess von Konidien von *V. inaequalis* beschrieben. Die Bedeutung des Vorhandenseins einer hydrophoben Kontaktfläche sowie von freiem Wasser für eine erfolgreiche Etablierung und Besiedlung des Pathogens auf seinem Wirt wurden in dieser Arbeit herausgestellt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ADERHOLD, R. (1896). Die Fusicladien unserer Obstbäume. 1. Teil. Landwirtschaftliche Jahrbücher **25**, 875-914.
- ADERHOLD, R. (1900). Die Fusicladien unserer Obstbäume. 2. Teil. Landwirtschaftliche Jahrbücher **29**, 541-588.
- APOGA, D., JANSSON, H. B. (2000). Visualization and characterization of the extracellular matrix of *Bipolaris sorokiniana*. Mycological Research **104**, 564-575.
- APOGA, D., JANSSON, H. B., TUNLID, A. (2001). Adhesion of conidia and germlings of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* to solid surfaces. Mycological Research **105**, 1251-1260.
- AUST, H. J. (1981). Über den Verlauf von Mehltau epidemien innerhalb des Agro-Ökosystems Gerstenfeld. Acta Phytomedica **7**.
- BAAS, W. J. (1982). Investigations on leaf waxes 3. Pentacyclic triterpenes, seco-triterpenes and non-volatile aliphatics of 4 *Hoya* species and *Ficus benjamina* in relation to leaf age. Acta Botanica Neerlandica **31**, 449-476.
- BAKER, E. A. (1982). Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: The Plant Cuticle. CUTLER, D. F., ALVIN, K. L., PRICE, C. E. (eds.). Academic Press, London, pp. 139-165.
- BAKER, E. A., BUKOVAC, M. J., FLORE, J. A. (1979). Ontogenetic variations in the composition of peach leaf wax. Phytochemistry **18**, 781-784.
- BAKER, E. A., HUNT, G. M. (1981). Developmental changes in leaf epicuticular waxes in relation to foliar penetration. New Phytologist **88** (4), 731-747.
- BANCROFT, J. D. (1975). Histochemical Techniques. Butterworths and Co. Ltd., London.
- BARTHLOTT, W., NEINHUIS, C. (1997). Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. Planta **202**, 1-8.
- BEEVER, R. E., REDGWELL, R. J., DEMPSEY, G. P. (1979). Purification and chemical characterization of the rodlet layer of *Neurospora crassa* conidia. Journal of Bacteriology **140** (3), 1063-1070.
- BELDING, R. D., BLANKENSHIP, S. M., YOUNG, E., LEIDY, R. B. (1998). Composition and variability of epicuticular waxes in apple cultivars. Journal of the American Society

- for Horticultural Science **123**, 348-356.
- BENAOUF, G., PARISI, L. (1998). Characterization of *Venturia inaequalis* pathogenicity on leaf discs of apple trees. European Journal of Plant Pathology **104**, 785-793.
- BIEHN, W. L., WILLIAMS, E. B., KUC, J. (1966). Resistance of mature leaves of *Malus atrosanguinea* 804 to *Venturia inaequalis* and *Helminthosporium carbonum*. Phytopathology **56**, 588-589.
- BOUCIAS, D. G., PENDLAND, J. C. (1991). Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event of mycoses in arthropod hosts. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. COLE, G. T., HOCH, H. C. (eds.). Plenum Press, New York, pp. 101-127.
- BOURETT, T., HOCH, H. C., STAPLES, R. C. (1987). Association of the microtubule cytoskeleton with the thigmotropic signal for appressorium formation in *Uromyces*. Mycologia **79**, 540-545.
- BOURETT, T. M., PICOLLELLI, M. A., HOWARD, R. J. (1993). Postembedding labeling of intracellular Concanavalin A-binding sites in freeze-substituted fungal cells. Experimental Mycology **17**, 223-235.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. Analytical Biochemistry **72**, 248-254.
- BRAUN, E. J., HOWARD, R. J. (1994a). Adhesion of fungal spores and germlings to host-plant surfaces. Protoplasma **181**, 202-212.
- BRAUN, E. J., HOWARD, R. J. (1994b). Adhesion of *Cochliobolus heterostrophus* conidia and germlings to leaves and artificial surfaces. Experimental Mycology **18**, 211-220.
- BRINGE, K., SCHUMACHER, C. F. A., SCHMITZ-EIBERGER, M., STEINER, U., OERKE, E. C. (2006). Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. Phytochemistry **67**, 161-170.
- BUKOVAC, M. J., FLORE, J. A., BAKER, E. A. (1979). Peach leaf surfaces - Changes in wettability, retention, cuticular permeability, and epicuticular wax chemistry during expansion with special reference to spray application. Journal of the American Society for Horticultural Science **104**, 611-617.
- BÖCK, P. (1989). Romeis-Mikroskopische Technik. Urban & Schwarzenberg, München.

- CARVER, T. L. W., KUNOH, H., THOMAS, B. J., NICHOLSON, R. L. (1999). Release and visualization of the extracellular matrix of conidia of *Blumeria graminis*. *Mycological Research* **103**, 547-560.
- CAVALIER-SMITH, T. (2001). What are fungi? In: *The Mycota. VII Part A*. McLAUGHLIN, McLAUGHLIN, LEMKE (eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 3-37.
- CHAKY, J., ANDERSON, K., MOSS, M., VAILLANCOURT, L. (2001). Surface hydrophobicity and surface rigidity induce spore germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **91**, 558-564.
- CHUMLEY, F. G., VALENT, B. (1990). Genetic analysis of melanin-deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **3**, 135-143.
- CLARK, C. A., LORBEER, J. W. (1976). Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* on onion leaves. *Phytopathology* **66**, 1279-1289.
- CLARK, J. B., LISTER, G. R. (1975). Photosynthetic action spectra of trees. 2. The relationship of cuticle structure to the visible and UV spectral properties of needles from four coniferous species. *Plant Physiology* **55** (2), 407-413.
- CLAVERIE-MARTIN, F., DIAZ-TORRES, M. R., GEOGHEGAN, M. J. (1986). Chemical composition and electron microscopy of the rodlet layer of *Aspergillus nidulans* conidia. *Current Microbiology* **14**, 221-225.
- CLEMENT, J. A., MARTIN, S. G., PORTER, R., BUTT, T. M., BECKETT, A. (1993). Germination and the role of extracellular matrix in adhesion of urediniospores of *Uromyces viciae fabae* to synthetic surfaces. *Mycological Research* **97**, 585-593.
- CLEMENT, J. A., PORTER, R., BUTT, T. M., BECKETT, A. (1994.) The Role of hydrophobicity in attachment of urediniospores and sporelings of *Uromyces viciae fabae*. *Mycological Research* **98**, 1217-1228.
- COLE, G. T., SEKIYA, T., KASAI, R., YOKOYAMA, T., NOZAWA, Y. (1979). Surface ultrastructure and chemical composition of the cell walls of conidial fungi. *Experimental Mycology* **3**, 132-156.
- CONSIDINE, J. A., KNOX, R. B. (1979). Development and histochemistry of the pistil of the grape, *Vitis vinifera*. *Annals of Botany* **43**, 11-22.
- CORLETT, M., CHONG, J. (1977). Ultrastructure of the appressorium of *Spilocaea pomi*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **55**, 5-7.

- CORLETT, M., CHONG, J., KOKKO, E. G. (1976). The ultrastructure of the *Spilocaea* state of *Venturia inaequalis in-vivo*. Canadian Journal of Microbiology **22** (2), 1144-1152.
- DALTON, A. J. (1955). A chrome-osmium fixative for electron microscopy. Anatomical Records **121**, 281.
- DARNELL, R. L., FERREE, D. C. (1983). The Influence of environment on apple tree growth, leaf wax formation, and foliar absorption. Journal of the American Society for Horticultural Science **108**, 506-511.
- DEISING, H., NICHOLSON, R. L., HAUG, M., HOWARD, R. J., MENDGEN, K. (1992). Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. The Plant Cell **4**, 1101-1111.
- DEVRIES, O. M. H., FEKKES, M. P., WÖSTEN, H. A. B., WESSELS, J. G. H. (1993). Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. Archives of Microbiology **159**, 330-335.
- DOSS, R. P., POTTER, S. W., CHASTAGNER, G. A., CHRISTIAN, J. K. (1993). Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. Applied and Environmental Microbiology **59**, 1786-1791.
- DRANDAREVSKI, C. A. (1969). Untersuchungen über den echten Rübenmehltau *Erysiphe betae* (Vanha) Weltzien. II. Biologie und Klimaabhängigkeit des Pilzes. Phytopathologische Zeitschrift **65**, 124-154.
- EDWARDS, M. C., BOWLING, D. J. F. (1986). The growth of rust germ tubes towards stomata in relation to pH gradients. Physiological and Molecular Plant Pathology **29**, 185-196.
- EIGENBRODE, S. D., ESPELIE, K. E. (1995). Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. Annual Review of Entomology **40**, 171-194.
- EMMETT, R. W., PARBERY, D. G. (1975). Appressoria. Annual Review of Phytopathology **13**, 147-167.
- EPSTEIN, L., NICHOLSON, R. L. (1997). Adhesion of spores and hyphae to plant surfaces. In: The Mycota V, Part A plant relationships. CARROLL, G., TUDZYNSKI, P. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 11-25.
- GAHAN, P. B. (1984). Plant Histochemistry and Cytochemistry: an introduction. Academic Press, London.
- GERLACH, D. (1969). Botanische Mikrotechnik. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, p. 266.

- 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. J., CARVER, T. L. W., THOMAS, B. J., NICHOLSON, R. L. (2001). Visualization and partial characterization of the ECM of *Pestalotia malicola* on artificial and natural substrata. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **58**, 277-285.
- GEYER, G. (1973). *Ultrahistochemie*. Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart.
- GLARE, T. R., CHILVERS, G. A., MILNER, R. J. (1985). Capilliconidia as infective spores in *Zoophthora phalloides* (Entomophthorales). *Transactions of the British Mycological Society* **85** (3), 463-470.
- GNIWOTTA, F., VOGG, G., GARTMANN, V., CARVER, T. L. W., RIEDERER, M., JETTER, R. (2005). What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cuticular waxes. *Plant Physiology* **139**, 519-530.
- GOLD, R. E., AMMERMANN, E., KÖHLE, H., LEINHOS, G. M. E., LORENZ, G., SPEAKMAN, J. B., STARK-URNAU, M., SAUTER, H. (1996). The synthetic strobilurin BAS 490 F: Profile of a modern fungicide. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. LYR, H., RUSSELL, P.E., SISLER, H.D. (eds.), Intercept Ltd., Andover, UK, pp. 79-92.
- GORDON, D. C., PERCY, K. E., RIDING, R. T. (1998). Effects of UV-B radiation on epicuticular wax production and chemical composition of four *Picea* species. *New Phytologist* **138**, 441-449.
- GREENSPAN, P., MAYER, E. P., FOWLER, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology* **100**, 965-973.
- GROVE, S. N., BRACKER, C. E. (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi - Vesicles and Spitzenkörper. *Journal of Bacteriology* **104**, 989-1009.
- GUPTA, G. K., LELE, V. C. (1980). Morphology, physiology and epidemiology of the apple-scab fungus, *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., in Kashmir Valley. *Indian Journal of Agricultural Science* **50** (1), 51-60.
- HAAS, K., RENTSCHLER, I. (1984). Discrimination between epicuticular and intracuticular wax in blackberry leaves: ultrastructural and chemical evidence. *Plant Science Letters* **36**, 143-147.

- HALLAM, N. D., JUNIPER, B. E. (1971). The anatomy of the leaf surface. In: Ecology of Leaf Surface Micro-Organism. PREECE, T. F., DICKINSON, C. H. (eds.), Academic Press, London, pp. 3-37.
- HAMER, J. E., HOWARD, R. J., CHUMLEY, F. G., VALENT, B. (1988). A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* **239**, 288-290.
- HAU, F. C., RUSH, M. C. (1979). Leaf surface interactions between *Cochliobolus miyabeanus* and susceptible and resistant rice cultivars. *Phytopathology* **69**, 527.
- 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.
- HÄUSER-HAHN, I., PONTZEN, R., BAUR, P. (2003). Mode of action of Flint WG 50 (R): Analysis of spray deposit, rain fastness, and systemic properties on apple seedlings. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **56** (2), 246-258.
- HELLMANN, M. (1992). Histologische und chemische Untersuchungen der Kutikula und des Oberflächenwachses von Apfelblättern (*Malus domestica*) in Abhängigkeit von Alter und Sorte. Dissertation der Universität Hohenheim
- HELLMANN, M., STÖSSER, R. (1992a). Development of cuticle thickness and epidermal cells of apple leaves. *Gartenbauwissenschaft* **57**, 223-227.
- HELLMANN, M., STÖSSER, R. (1992b). Saisonale, ontogenetische und sortentypische Veränderungen des Oberflächenwachses von Apfelblättern. *Angewandte Botanik* **66**, 109-114.
- HELLMANN, M., STÖSSER, R. (1994). Development of leaf area and cuticle thickness of apple leaves. *Erwerbsobstbau* **36** (3), 60-63.
- HERING, O., ZINKERNAGEL, V., BARTSCHERER, H. C. (1993). SEM investigations of infection patterns of *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. on leaves of differently resistant apple cultivars. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz - Journal of Plant Diseases and Protection* **100**, 379-388.
- HOCH, H. C., STAPLES, R. C. (1991). Signaling for infection structure formation in fungi. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. COLE, G. T., HOCH, H. C. (eds.), Plenum Press, New York.
- HOCH, H. C., STAPLES, R. C., WHITEHEAD, B., COMEAU, J., WOLF, E. D. (1987).

- Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science* **235**, 1659-1662.
- HOLLOWAY, P. J. (1969). Chemistry of leaf waxes in relation to wetting. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **20**, 124-128.
- HOLLOWAY, P. J. (1970). Surface factors affecting the wetting of leaves. *Pesticide Science* **1**, 156-163.
- HOLLOWAY, P. J. (1982a). The chemical constitution of plant cutins. In: *The Plant Cuticle*. CUTLER, D. F., ALVIN, K. L., PRICE, C. E. (eds.), Academic Press, London, pp. 45-85.
- HOLLOWAY, P. J. (1982b). Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. In: *The Plant Cuticle*. CUTLER, D. F., ALVIN, K. L., PRICE, C. E. (eds.), Academic Press, London, pp. 1-32.
- HOLLOWAY, P. J. (1993). Structure and chemistry of plant cuticles. *Pesticide Science* **37**, 203-232.
- HOLLOWAY, P. J., BAKER, E. A. (1970). The cuticles of some Angiosperm leaves and fruits. *Annals of Applied Biology* **66**, 145-154.
- HOOD, M. E., SHEW, H. D. (1996). Applications of KOH-Aniline Blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathology* **86**, 704-708.
- HOWARD, R. J. (1994). Cell biology of pathogenesis. In: *Rice Blast Disease*. ZEIGLER, R. S., LEONG, S. A., TENG, P. S. (eds.), CAB International, Wallingford, UK, pp. 3-22.
- HOWARD, R. J., FERRARI, M. A. (1989). Role of melanin in appressorium function. *Experimental Mycology* **13**, 403-418.
- HOWARD, R. J., FERRARI, M. A., ROACH, D. H., MONEY, N. P. (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 11281-11284.
- HOWARD, R. J., SWEIGARD, J. A., HITZ, W. D., CHUMLEY, F. G., VALENT, B. S. (1993). Purified fungal spore tip mucilage. US-Patentschrift Nr. 5264569. www.freepatentsonline.com/5264569.html.
- HUNT, R. (1982). *Plant Growth Curves*. Edward Arnold Publishers Ltd, London.
- JACKSON, D. M., DANEHOWER, D. A. (1996). Integrated case study: *Nicotiana* leaf surface components and their effects on insect pests and diseases. In: *Plant Cuticles - an*

- integrated functional approach. Kerstiens, G. (ed.), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, pp. 231-254.
- JEFFREE, C. E. (1996). Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Plant Cuticles - an integrated functional approach. Kerstiens, G. (ed.), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, pp. 33-82.
- JEFFREE, C. E. (2006). The fine structure of the plant cuticle. In: Biology of the Plant Cuticle. RIEDERER, M., MÜLLER, C. (eds.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 11-125.
- JETTER, R., RIEDERER, M. (1994). Epicuticular crystals of Nonacosan-10-ol - *in-vitro* reconstitution and factors influencing crystal habits. *Planta* **195**, 257-270.
- JETTER, R., SCHÄFFER, S. (2001). Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology* **126**, 1725-1737.
- JETTER, R., SCHÄFFER, S., RIEDERER, M. (2000). Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: Evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant Cell and Environment* **23**, 619-628.
- JOHNSON, T. (1934). A tropic response in germ tubes of urediospores of *Puccinia graminis tritici*. *Phytopathology* **24**, 80-82.
- JONES, E. B. G. (1994). Fungal adhesion. *Mycological Research* **98**, 961-981.
- JONES, M. J., EPSTEIN, L. (1989). Adhesion of *Nectria haematococca* macroconidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **35**, 354-461.
- JUNIPER, B. E. (1959). Die Oberflächen von Pflanzen. *Endeavour* **18**, 20-25.
- JUNIPER, B. E., COX, G. C. (1973). The anatomy of the leaf surface: the first line of defence. *Pesticide Science* **4**, 543-561.
- JUNIPER, B. E., JEFFREE, C. E. (1983). *Plant Surfaces*. Edward Arnold Ltd., London.
- KARNOVSKY, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology* **27**, 137-138.
- KERSHAW, M. J., TALBOT, N. J. (1998). Hydrophobins and Repellents: Proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology* **23**, 18-33.
- KLINCARE, A. A., KRESLINA, D. J., MISHKE, I. (1971). V. Composition and activity of the

- epiphytic microflora of some agricultural plants. In: Ecology of Leaf Surface Micro-Organism. PREECE, T.F., DICKINSON, C.H. (eds.), Academic Press, London, pp. 192-201.
- KNOLL, D., SCHREIBER, L. (2000). Plant-Microbe Interactions: Wetting of ivy (*Hedera helix* L.) leaf surfaces in relation to colonization by epiphytic microorganisms. *Microbial Ecology* **40**, 33-42.
- KOLATTUKUDY, P. E. (1985). Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **23**, 223-250.
- KOLLAR, A. (1996). Evidence for loss of ontogenetic resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 773-778.
- KÖLLER, W., PARKER, D. M., TURECHEK, W. W., AVILA-ADAME, C., CRONSHAW, K. (2004). A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. *Plant Disease* **88**, 537-544.
- KUBO, Y., FURUSAWA, I. (1986). Localization of melanin in appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *Canadian Journal of Microbiology* **32**, 280-282.
- KUBO, Y., FURUSAWA, I. (1991). Melanin biosynthesis. Prerequisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. COLE, G. T., HOCH, H. C. (eds.), Plenum Press, New York, pp. 205-218.
- KUO, K. C., HOCH, H. C. (1995). Visualization of the extracellular matrix surrounding pycnidiospores, germlings, and appressoria of *Phyllosticta ampellicida*. *Mycologia* **87**, 759-771.
- KUO, K. C., HOCH, H. C. (1996a). Germination of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores: Prerequisite of adhesion to the substratum and the relationship of substratum wettability. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 18-29.
- KUO, K. C., HOCH, H. C. (1996b). The parasitic relationship between *Phyllosticta ampellicida* and *Vitis vinifera*. *Mycologia* **88**, 626-634.
- KWON, Y. H., EPSTEIN, L. (1993). A 90 kDa glycoprotein associated with adhesion of *Nectria haematococca* macro-conidia to substrata. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 481-487.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAPP, M. S., SKOROPAD, W. P. (1978). Location of appressoria of *Colletotrichum graminicola* on natural and artificial barley leaf surfaces. *Transactions of the British Mycological Society* **70**, 225-228.
- LEE, Y. H., DEAN, R. A. (1993). CAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic Fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**, 693-700.
- LEE, Y. H., DEAN, R. A. (1994). Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters* **115**, 71-75.
- LEITE, B., NICHOLSON, R. L. (1992). Mycosporine Alanine - a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Experimental Mycology* **16**, 76-86.
- LI, B., XU, X. (2002). Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. *Journal of Phytopathology - Phytopathologische Zeitschrift* **150**, 687-691.
- LOPEZ-FRANCO, R., BRACKER, C. E. (1996). Diversity and dynamics of the Spitzenkörper in growing hyphal tips of higher fungi. *Protoplasma* **195**, 90-111.
- LÜTTGE, U., KLUGE, M., BAUER, G. (1999). Die Zellwand. In: *Botanik*. 3. Auflage, Wiley-vch Verlag, Weinheim, p. 155 ff.
- MACHARDY, W. E., GADOURY, D. M., GESSLER, C. (2001). Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to disease management strategies. *Plant Disease* **85**, 1036-1051.
- MACHARDY, W. E. (1995). *Apple Scab: Biology, Epidemiology, and Management*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- MAIER, C. G. A., POST-BEITTENMILLER, D. (1998). Epicuticular wax on leek *in-vitro* developmental stages and seedlings under varied growth conditions. *Plant Science* **134**, 53-67.
- MANKEL, A. (2001). *Spezifische Genexpression in der Ektomykorrhizabildung durch den Pilz Tricholoma terreum*. Dissertation der Philipps-Universität Marburg.
- MARSHALL, D. S., RUSH, M. C. (1980). Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **70**, 947-950.
- MARTIN, J. T., JUNIPER, B. E. (1970). *The Cuticles of Plants*. Edward Arnold Ltd., London.

- MATZ, C. (2003). Beurteilung von Spritzbelägen auf ausgewählten Zielorganismen: Einfluss von Formulierung und Applikationstechnik. Diplomarbeit des Instituts für Pflanzenkrankheiten der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (unveröffentlicht).
- MCWHORTER, C. G., PAUL, R. N., BARRENTINE, W. L. (1990). Morphology, development, and recrystallization of epicuticular waxes of Johnsongrass (*Sorghum halepense*). *Weed Science* **38**, 22-33.
- MERCURE, E. W., KUNOH, H., NICHOLSON, R. L. (1995). Visualization of materials released from adhered, ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **46**, 121-135.
- MERCURE, E. W., LEITE, B., NICHOLSON, R. L. (1994). Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **45**, 421-440.
- MIMS, C. W., LILJEBJELKE, K. A., RICHARDSON, E. A. (1995a). Surface morphology, wall structure, and initial adhesion of conidia of the Powdery Mildew fungus *Uncinuliella australiana*. *Phytopathology* **85**, 352-358.
- MIMS, C. W., RICHARDSON, E. A., CLAY, R. P., NICHOLSON, R. L. (1995b). Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. *International Journal of Plant Sciences* **156**, 9-18.
- MÜLLER, E., LOEFFLER, W. (1982). *Mykologie: Grundriss für Naturwissenschaftler und Mediziner*. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 81 ff.
- NICHOLSON, R. L., MORAES, W. B. C. (1980). Survival of *Colletotrichum graminicola* - Importance of the spore matrix. *Phytopathology* **70**, 255-261.
- NICHOLSON, R. L., EPSTEIN, L. (1991). Adhesion of fungi to the plant surface. In: *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plant and Animals*. COLE, G. T., HOCH, H. C. (eds.), Plenum Press, New York, pp. 3-23.
- NICHOLSON, R. L., BUTLER, L. G., ASQUITH, T. N. (1986). Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols - Implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. *Phytopathology* **76**, 1315-1318.
- NICHOLSON, R. L., HIPSKIND, J., HANAU, R. M. (1989). Protection against phenol toxicity by the spore mucilage of *Colletotrichum graminicola*, an aid to secondary spread.

- Physiological and Molecular Plant Pathology **35**, 243-252.
- NICHOLSON, R. L., KUNOH, H., SHIRAIISHI, T., YAMADA, T. (1993). Initiation of the infection process by *Erysiphe graminis* - Conversion of the conidial surface from hydrophobicity to hydrophilicity and influence of the conidial exudate on the hydrophobicity of the barley leaf surface. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **43**, 307-318.
- NUSBAUM, C. J., KEIT, G. W. (1938). A cytological study of host-parasite relations of *Venturia inaequalis* on apple leaves. *Journal of Agricultural Research* **56** (8), 595-618.
- PARIS, S., DEBEAUPUIS, J. P., CRAMERI, R., CAREY, M., CHARLES, F., PREVOST, M. C., SCHMITT, C., PHILIPPE, B., LATGE, J. P. (2003). Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1581-1588.
- PARK, P., ISHII, H., ADACHI, Y., KANEMATSU, S., IEKI, H., UMEMOTO, S. (2000). Infection behavior of *Venturia nashicola*, the cause of scab on Asian pears. *Phytopathology* **90**, 1209-1216.
- PASCHOLATI, S. F., DEISING, H., LEITE, B., ANDERSON, D., NICHOLSON, R. L. (1993). Cutinase and nonspecific esterase-activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**, 37-51.
- PASCHOLATI, S. F., YOSHIOKA, H., KUNOH, H., NICHOLSON, R. L. (1992). Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* - Cutinase is a component of the conidial exudate. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **41**, 53-59.
- PAUL, V. H., BRANDES, W. (1983). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Pathogenese des Apfelschorfs und dessen Bekämpfung mit Baycor. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **36** (1), 21-37.
- PLATTNER, H. (1981). Chemische Fixierung. Methodensammlung Elektronenmikroskopie. Wissenschaftlicher Verlag, Stuttgart.
- PODILA, G. K., ROGERS, L. M., KOLATTUKUDY, P. E. (1993). Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiology* **103**, 267-272.
- POHL, R. (1954). 25 Jahre Wuchsstoffforschung - Eine kritische Betrachtung des augenblicklichen Standes der Wuchsstoffforschung. *Naturwissenschaften* **41**, 414-420.
- POST-BEITTENMILLER, D. (1996). Biochemistry and molecular biology of wax production in

- plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **47**, 405-430.
- PREECE, T. F., BARNES, G., BAYLEY, J. M. (1967). Junctions between epidermal cells as sites of appressorium formation by plant pathogenic fungi. Plant Pathology **16**, 117-118.
- RAA, J. (1968). Polyphenols and natural resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. Netherland Journal of Plant Pathology **74**, suppl. 1, 37-45.
- RATHAIAH, Y. (1977). Stomatal tropism of *Cercospora beticola* in sugarbeet. Phytopathology **67**, 358-362.
- REISNER, A. H., NEMES, P., BUCHHOLTZ, C. (1975). The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry **64**, 509-516.
- REYNOLDS, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. Journal of Cellular Biology **17**, 208-212.
- RIQUELME, M., REYNAGA-PENA; C. G.; GIERZ, G., BARTNICKI-GARCIA, S. (1998). What determines growth direction in fungal hyphae? Fungal Genetics and Biology **24**, 101-109.
- RONCERO, C., DURAN, A. (1985). Effect of calcofluor white and congo red on fungal cell-wall morphogenesis – *In-vivo* activation of chitin polymerization. Journal of Bacteriology **163**, 1180-1185.
- ROSENQUIST, J. K., MORRISON, J. C. (1988). The development of the cuticle and epicuticular wax of the grape berry. Vitis **27**, 63-70.
- ROSENQUIST, J. K., MORRISON, J. C. (1989). Some factors affecting cuticle and wax accumulation on grape berries. American Journal of Enology and Viticulture **40**, 241-244.
- SCHÖNHERR, J. (1982). Resistance of plant surfaces to water loss: transport properties of cutin, suberin and associated lipids. In: Encyclopedia of Plant Physiology. LANGE, O. L., NOBEL, P. S., OSMOND, C. B. (eds.), 12 B Physiological Plant Ecology, Springer-Verlag, Berlin, pp. 153-179.
- SCHÖNHERR, J., BUKOVAC, M. J. (1970). Preferential polar pathways in the cuticle and their relationship to ectodesmata. Planta **92**, 189-201.
- SCHREIBER, L., KRIMM, U., KNOLL, D., SAYED, M., AULING, G., KROPPESTEDT, R. M. (2005). Plant-microbe interactions: Identification of epiphytic bacteria and their

- ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist* **166**, 589-594.
- SCHWABE, W. F. S. (1979). Changes in scab susceptibility of apple leaves as influenced by age. *Phytophylactica* **11**, 53-56.
- SCHWABE, W. F. S. (1980). Wetting and temperature requirements for apple leaf infection by *Venturia inaequalis* in South Africa. *Phytophylactica* **12**, 69-80.
- SELA-BUURLAGE, M. B., EPSTEIN, L., RODRIGUEZ, R. J. (1991). Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**, 345-352.
- SELHIME, A. G., MUMA, M. H. (1966). Biology of *Entomophthora floridana* attacking *Eutetranychus banksi*. *The Florida Entomologist* **49**, 161-168.
- SHAW, B. D., CARROLL, G. C., HOCH, H. C. (2006). Generality of the prerequisite of conidium attachment to a hydrophobic substratum as a signal for germination among *Phyllosticta* species. *Mycologia* **98**, 186-194.
- SHAW, B. D., KUO, K. C.; HOCH, H. C. (1998). Germination and appressorium development of *Phyllosticta ampelicida* pycnidiospores. *Mycologia* **90**, 258-268.
- SMEREKA, K. J., MACHARDY, W. E., KAUSCH, A. P. (1987). Cellular differentiation in *Venturia inaequalis* ascospores during germination and penetration of apple leaves. *Canadian Journal of Botany - Revue Canadienne De Botanique* **65**:2549-2561.
- SPANNHOF, L. (1967). Einführung in die Praxis der Histochemie. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- SPANU, P. (1997). Hcf-1, a hydrophobin from the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Gene* **193**, 89-96.
- SPURR, A. R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**, 31-43.
- STEEDMAN, H. F. (1950). Alcian Blue 8GS: a new stain for mucin. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **91** (4), 477-479.
- STEINER, U., OERKE, E.-C. (2007). Localized melanization of appressoria is required for pathogenicity of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, akzeptiert.
- STOCKWELL, V., HANCHEY, P. (1984). The Role of the cuticle in resistance of beans to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **74**, 1640-1642.
- TAGU, D., DEBELLIS, R., BALESTRINI, R., DEVRIES, O. M. H., PICCOLI, G., STOCCHI,

- V., BONFANTE, P., MARTIN, F. (2001). Immunolocalization of hydrophobin Hydpt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. *New Phytologist* **149**, 127-135.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. (1998). *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- TALBOT, N. J., KERSHAW, M. J., WAKLEY, G. E., DEVRIES, O. M. H., WESSELS, J. G. H., HAMER, J. E. (1996). Mpg-1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**, 985-999.
- TERHUNE, B. T., HOCH, H. C. (1993). Substrate hydrophobicity and adhesion of *Uromyces* urediospores and germlings. *Experimental Mycology* **17**, 241-252.
- THINES, E., WEBER, R. W. S., TALBOT, N. J. (2000). MAP kinase and protein kinase a dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **12**, 1703-1718.
- TUCKER, S. L., TALBOT, N. J. (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **39**, 385-417.
- TUKEY, H. B. (1971). Leaching of substances from plants. In: *Ecology of Leaf Surface Micro-Organism*. PREECE, T. F., DICKINSON, C. H (eds.), Academic Press, London, pp. 67-80.
- TURNER, M. L., MACHARDY, W. E., GADOURY, D. M. (1986). Germination and appressorium formation by *Venturia inaequalis* during infection of apple seedling leaves. *Plant Disease* **70**, 658-661.
- VALSANGIACOMO, C., GESSLER, C. (1988). Role of the cuticular membrane in ontogenic and Vf-resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **78**, 1066-1069.
- WAITE, J. H. (1990). Marine adhesive proteins - Natural composite thermosets. *International Journal of Biological Macromolecules* **12**, 139-144.
- WATANABE, T., YAMAGUCHI, I. (1991). Wettability characteristics of crop leaf surfaces. *Journal of Pesticide Science (Japan)* **16**, 651-663.
- WEBSTER, J., DAVEY, R. A. (1984). Sigmoid conidial shape in aquatic fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **83** (1), 43-52.

- WESSELS, J. G. H. (1994). Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 413-437.
- WESSELS, J. G. H. (1997). Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface. *Advances in Microbial Physiology* **38**, 1-45.
- WESSELS, J. G. H., DEVRIES, O. M. H., ASGEIRSDOTTIR, S. A., SCHUREN, F. H. J. (1991). Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *The Plant Cell* **3**, 793-799.
- WHITEFORD, J. R., LACROIX, H., TALBOT, N. J., SPANU, P. D. (2004). Stage-specific cellular localisation of two hydrophobins during plant infection by the pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genetics and Biology* **41** (6), 624-634.
- WHITEFORD, J. R., SPANU, P. D. (2002). Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Molecular Plant Pathology* **3**, 391-400.
- WILLIAMSON, B., DUNCAN, G. H., HARRISON, J. G., HARDING, L. A., ELAD, Y., ZIMAND, G. (1995). Effect of humidity on infection of rose petals by dry inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **99**, 1303-1310.
- WOLKOW, P. M., SISLER, H. D., VIGIL, E. L. (1983). Effect of inhibitors of melanin biosynthesis on structure and function of appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology* **23**, 55-71.
- WÖSTEN, H. A. B. (2001). Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology* **55**, 625-646.
- WÖSTEN, H. A. B., DEVRIES, O. M. H., WESSELS, J. G. H. (1993). Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell* **5**, 1567-1574.
- WÖSTEN, H. A. B., SCHUREN, F. H. J., WESSELS, J. G. H. (1994). Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *The EMBO Journal* **13**, 5848-5854.
- WRIGHT, A. J., THOMAS, B. J., CARVER, T. L. W. (2002). Early adhesion of *Blumeria graminis* to plant and artificial surfaces demonstrated by centrifugation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**, 217-226.
- WYATT, S. E., PAN, S. Q., KUC, J. (1991). Beta-1,3-Glucanase, Chitinase, and Peroxidase-activities in tobacco tissues resistant and susceptible to blue mold as related to flowering, age and sucker development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**, 433-440.

- XIAO, J. Z., OHSHIMA, A., KAMAKURA, T., ISHIYAMA, T., YAMAGUCHI, I. (1994a). Extracellular glycoprotein(S) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 639-644.
- XIAO, J. Z., WATANABE, T., KAMAKURA, T., OHSHIMA, A., YAMAGUCHI, I. (1994b). Studies on cellular differentiation of *Magnaporthe grisea* - Physicochemical aspects of substratum surfaces in relation to appressorium formation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **44**, 227-236.
- ZHENG, D. S., KÖLLER, W. (1997). Characterization of the mitochondrial cytochrome *b* gene from *Venturia inaequalis*. *Current Genetics* **32**, 361-366.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass Teile dieser von mir angefertigten Doktorarbeit auszugsweise in BRINGE, K., SCHUMACHER, C. F. A., SCHMITZ-EIBERGER, M., STEINER, U., OERKE, E. C. (2006). Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. *Phytochemistry* **67**, 161-170 publiziert sind.

Folgende Ergebnisse, die in der Publikation aufgeführt sind, wurden meinerseits erzielt und sind in der vorliegenden Dissertation enthalten:

- Erfassung der Blattentwicklung von Apfelsämlingen durch Messung der Blattfläche und Bestimmung der relativen Wachstumsrate (Table 1),
- Betrachtung der Pflanzenoberfläche mittels Rasterelektronenmikroskopie (Fig. 1),
- Bestimmung der Hydrophobizität von Apfel- und Modelloberflächen durch Messung des Kontaktwinkels (Fig. 2),
- Bestimmung der Zellfläche und -höhe von Epidermiszellen von Apfelsämlingen (Table 2).

Die Untersuchungen über die chemische Analyse der Apfelblattwachse wurden von Frau Bringe und mir gemeinsam durchgeführt.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mir während der Erstellung meiner Dissertation mit Rat und Tat sowie Hilfestellungen, konstruktiver Kritik und Freundschaft zur Seite gestanden haben.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H.-W. Dehne für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Goldbach vom INRES, Pflanzenernährung, der Universität Bonn für sein Interesse und die Übernahme des Korreferates.

Ein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. U. Steiner und Herrn PD Dr. E.-C. Oerke für die freundliche Betreuung und für die unermüdliche Unterstützung bei Fragen und Problemen verbunden mit zahlreichen Diskussionen und vielfältigen Anregungen.

Herrn PD Dr. J. Hamacher, INRES, Phytomedizin sowie Herrn J. Bedorf, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Bonn danke ich herzlich für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft sowie für die Unterstützung bei den Untersuchungen am TEM und Frau I. Neukirchen, INRES, Phytomedizin für die Hilfe bei der Probenvorbereitung.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Pontzen und Herrn S. Teitscheid, Formulierteknik, Bayer CropScience AG, Monheim für die freundliche Unterstützung bei den Untersuchungen am SEM.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. L. Schreiber, Abteilung Ökophysiologie des IZMB der Universität Bonn danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Wachsanalysen, Herrn Z. Cerman, NEES-Institut der Universität Bonn, für die Möglichkeit der Durchführung der Kontaktwinkelmessungen.

Weiter danke ich Herrn Dr. B. Hoffmann und Frau S. Born, Institut für Bio- und Nanosysteme, Abteilung Biomechanik des Forschungszentrums Jülich für die Hilfestellung bei den Hydrophobin-Untersuchungen und die Aufnahme in die Labore des Forschungszentrums.

Ich danke allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die mir stets entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Peter Fröhling, Stefanie Schirmer und Kerstin Schäfer möchte ich für eine schöne gemeinsame Zeit am Institut mit intensiven und aufbauenden Gesprächen danken. Meiner Freundin Anne danke ich herzlich für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung in guten und schlechten Tagen.

Dem Forschungsprojekt „Prozesse und Interaktionen auf hydrophoben biologischen Oberflächen“ (PRIOR) und der Universität Bonn verdanke ich die finanzielle Unterstützung.

Meinen Eltern und Geschwistern sowie meiner Schwiegerfamilie danke ich vielmals für ihre vielfältige Unterstützung, die sie mir während der ganzen Zeit gegeben haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Peter, der immer an mich geglaubt und hinter mir gestanden hat und mir mit seiner herzlichen und aufmunternden Art immer wieder neue Kraft und Zuversicht gegeben hat!