

Mikrobielle Interaktionen und die Bildung von Mykotoxinen
bei Schimmelpilzen der Matrix Weizen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu

Bonn

vorgelegt von

Judith Milles

aus

Andernach

Bonn 2007

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Bereich Lebensmittelmikrobiologie und Hygiene, Landwirtschaftlichen Fakultät durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. Johannes Krämer

Korreferent: Prof. Dr. Erwin A. Galinski

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 10.2007

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

Erscheinungsjahr: 2007

1 EINLEITUNG.....	VI
2 MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1 Material	10
2.1.1 Verwendete Geräte	10
2.1.2 Chemikalien	11
2.1.3 Enzyme	12
2.1.4 Kits	12
2.1.5 Software	12
2.1.6 Sonstiges	13
2.2 Verwendete Mikroorganismen	13
2.2.1 Bakterienstämme	13
2.2.2 Pilzstämme.....	13
2.3 Verwendete Plasmide und Oligonukleotide	15
2.4 Kultivierung von Mikroorganismen	17
2.4.1 Anzucht von Bakterien	17
2.4.2 Stammhaltung von Bakterien	17
2.4.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α	18
2.4.4 Herstellung elektrokompenter <i>B. subtilis</i>	18
2.4.5 Anzucht von Schimmelpilzen	19
2.4.6 Anzucht von Schimmelpilzen bei verschiedenen a_w -Werten.....	19
2.4.7 Stammhaltung von Schimmelpilzen	20
2.4.8 Konidiengewinnung von Schimmelpilzen	20
2.4.9 Herstellung pilzlicher Protoplasten.....	20
2.4.10 Dekontamination von bakteriell oder pilzlich verseuchtem Material.....	21
2.4.11 <i>In vitro</i> - Interaktionsversuche	21
2.4.12 <i>In vivo</i> - Interaktionsversuche	22
2.4.12.1 Lagerung von Weizenkörnern ohne natürliche mikrobielle Flora	22
2.4.12.2 Lagerung von Weizenkörnern mit natürlicher mikrobieller Flora	23
2.4.12.3 Ausgewählte Interaktionsmodelle für die <i>in vivo</i> -Versuche	23
2.5 Klassische Methoden zur Analyse der Interaktionsmodellen.....	24
2.5.1 Trockenmassebestimmung	24
2.5.2 Bestimmung der Wasseraktivität.....	25
2.5.3 Analyse des Körnerbefalls	25
2.5.4 Artbestimmung von Fusarien	26
2.5.5 Extraktion von Deoxynivalenol aus Probenmaterial	26
2.5.6 Extraktion von Zearalenon aus Probenmaterial	26
2.5.7 Extraktion von Ochratoxin A aus Probenmaterial.....	26
2.5.8 Immunologische Quantifizierung von Deoxynivalenol, Zearalenon und Ochratoxin A	27
2.6 Molekulargenetische Methoden	28
2.6.1 Isolierung chromosomaler DNA aus pilzlichem Myzel	28
2.6.2 Quantitative Isolierung von DNA aus geringen Mengen pilzlichen Myzels	28
2.6.3 Isolierung pilzlicher DNA aus Weizenkörner-Proben	28
2.6.4 Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	29
2.6.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	29
2.6.6 Reinigung von DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion	29
2.6.7 DNA-Fällung.....	30
2.6.8 Fotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	30
2.6.9 Amplifizierung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion	30
2.6.9.1 Auswahl der Oligonukleotide.....	30
2.6.9.2 Schmelztemperatur von Oligonukleotiden.....	31
2.6.9.3 PCR im Thermocycler	31
2.6.9.4 PCR aus Kolonien.....	31

2.6.9.5 PCR zur Fusionierung zweier DNA-Fragmente	32
2.5.9.6 Quantitative PCR im LightCycler™	32
2.6.10.1 Restriktionsverdau	34
2.6.10.2 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	34
2.6.10.3 Ligation.....	34
2.6.11 Qualitative Analyse von DNA mittels Agarosegelelektrophorese.....	34
2.6.12 Detektion von DNA in Agarosegelen.....	35
2.6.13 Transformation von DNA.....	35
2.6.13.1 Transformation von <i>E.coli</i> DH5α	35
2.6.13.2 Elektrotransformation von <i>B. subtilis</i>	36
2.6.13.3 Transformation von <i>F. graminearum</i>	36
2.7 Detektion der Fluoreszenz von GFP, ECFP und DsRed bei Bakterien und Pilze... ..	37
2.7.1 Fluoreszenzmikroskopie	37
2.7.2 Aufnahme von Emissionsspektren von fluoreszierenden Bakterien	37
2.8 Methoden zur Proteinanalyse	37
2.8.1 Gewinnung von Pilzmyzel zur Proteinextraktion	37
2.8.2 Proteinextraktion aus Schimmelpilzen	38
2.8.3 Proteinquantifizierung	38
2.8.4 Proteinreinigung	39
2.8.5 2D-Gelelektrophorese	39
2.8.5.1 Isoelektrische Fokussierung.....	39
2.8.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese als zweite Dimension	40
2.8.6 Visualisierung von Proteinen mit Coomassie.....	42
2.8.7 Visualisierung von Proteinen mit Silbernitrat.....	42
2.8.8 Konservierung von Polyacrylamidgelen	43
3 ERGEBNISSE.....	44
3.1 Verifizierung der Identität von <i>P. verrucosum</i>	44
3.2 Einfluss physiologischer Parameter auf das Wachstum von <i>F. graminearum</i> und die Produktion von DON und ZEA	46
3.2.1 pH-Wert und Temperatur	46
3.2.2 Wasseraktivität.....	47
3.3 Molekularbiologisch basierender spezifischer Nachweis von Schimmelpilzen in Mischkulturen	52
3.3.1 Isolierung pilzlicher DNA aus verschiedengearteten Proben	52
3.3.2 Spezifischer sowie quantitativer Nachweis pilzlicher DNA mittels realtime-PCR	53
3.4 <i>In vitro</i> Interaktionen von Schimmelpilzen.....	54
3.4.1 Interaktionen von <i>F. graminearum</i> CBS110250 mit <i>A. ochraceus</i> und <i>P.</i> <i>verrucosum</i>	54
3.4.2 Interaktionen von <i>F. graminearum</i> Z3639 mit <i>A. alternata</i> , <i>P. verrucosum</i> und <i>A. ochraceus</i>	56
3.4.3 Interaktionen von <i>F. graminearum</i> GZT-33 mit <i>P. verrucosum</i> und <i>A. ochraceus</i>	58
3.4.4 Interaktionen von <i>F. graminearum</i> GZT-40 mit <i>A. alternata</i> , <i>P. verrucosum</i> und <i>A. ochraceus</i>	60
3.4.5 Interaktionen von <i>A. alternata</i> mit <i>F. graminearum</i> GZT-40 und <i>F.</i> <i>graminearum</i> Z3639.....	62
3.4.6 Interaktionen von <i>P. verrucosum</i> mit <i>F. graminearum</i> CBS 110250, <i>F.</i> <i>graminearum</i> GZT-33, <i>F. graminearum</i> GZT-40 und <i>F. graminearum</i> Z3639	63
3.4.7 Interaktionen von <i>A. ochraceus</i> mit <i>F. graminearum</i> CBS 110250, <i>F.</i> <i>graminearum</i> GZT-33, <i>F. graminearum</i> GZT-40 und <i>F. graminearum</i> Z3639	65
3.5 <i>In vivo</i> Interaktion von Schimmelpilzen auf Weizenkörnern ohne natürliche mikrobielle Flora.....	67

3.5.1 Mikrobiologische Qualität des zu lagernden Getreides vor Sterilisierung	67
3.5.2 Befallsentwicklung des suboptimalgelagerten Getreides ohne natürliche mikrobielle Flora	68
Die Befallsentwicklung des unter suboptimalen Bedingungen gelagerten Getreides wurde anhand der im Abstand von zwei Wochen über die Lagerdauer genommenen Proben zum einen durch Auslegen von Körnern und zum anderen durch Quantifizierung der von den Körnern isolierten DNA unter Verwendung von art- bzw. gattungsspezifischen Primern verfolgt.	68
3.5.2.1 Analyse mittels mikrobiologisch-kultureller Methode.....	68
3.5.2.2 Analyse mittels DNA-Quantifizierung	71
3.5.3 Entwicklung der Mykotoxingehalte während der suboptimalen Lagerung von Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora	74
3.5.3.1 DON	74
3.5.3.2 ZEA	76
3.5.3.3 OTA.....	79
3.6 <i>In vivo</i> Interaktion von Schimmelpilzen auf Weizenkörnern mit natürlicher mikrobieller Flora.....	81
3.6.1 Mikrobiologische Qualität des zu lagernden Getreides	81
3.6.2 Befallsentwicklung des suboptimalgelagerten Getreides mit natürlicher mikrobieller Flora.....	82
3.6.2.1 Analyse mittels mikrobiologisch-kultureller Methode.....	83
3.6.2.2 Verteilung der <i>Fusarium</i> -Arten im ermittelten Pilzspektrum	86
3.6.2.3 Auswertung der <i>Fusarium</i> -Artenspektren hinsichtlich der Mykotoxinbildungsfähigkeit	90
3.6.2.4 Analyse mittels DNA-Quantifizierung	91
3.6.3 Entwicklung der Mykotoxingehalte während der suboptimalen Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora	93
3.6.3.1 DON	93
3.6.3.2 ZEA	95
3.6.3.3 OTA.....	97
3.7 Molekularbiologische Arbeiten an <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> und <i>F. graminearum</i>	100
3.7.1 Strategien zur Fluoreszenzmarkierung von <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i>	100
3.7.2 Klonierung der Vektoren zur Fluoreszenzmarkierung von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i> mit ECFP und DsRed.....	101
3.7.2 Klonierung der Vektoren zur Fluoreszenzmarkierung von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i> mit GFP	102
3.7.3 Expression der Fluoreszenz in <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	104
3.7.4 Strategie zur Fluoreszenzmarkierung von <i>F. graminearum</i>	106
3.7.5 Klonierung der Vektoren zur Fluoreszenzmarkierung von <i>F. graminearum</i> mit ECFP und DsRed.....	107
3.7.6 Präparation von pilzlichen Protoplasten zur PEG-vermittelten Transformation.....	107
3.7.7 Expression der Fluoreszenz in <i>F. graminearum</i>	109
3.7.8 Kurioses um GFP und Co	109
3.8 Proteinanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese.....	111
3.8.1 Präparation von Proteinextrakten aus <i>F. graminearum</i>	111
3.8.1.1 Zellaufschluss	111
3.8.1.2 Reinigung der Proteinprobe	114
3.8.2 Auftrennung von Proteinproben mittels 2D-Gelelektrophorese.....	115
3.8.2.1 Optimierung des Verfahrens	115
3.8.2.2 Die 2D-Gelelektrophorese in der Anwendung.....	116
3.8.3 Ausweitung der Methode auf weitere filamentöse Schimmelpilze	125
4 DISKUSSION	128

4.1 Speziesbestimmung eines mit <i>P. verrucosum</i> bezeichneten Schimmelpilzes	128
4.2 Einfluss physiologischer Parameter auf die Bildung von DON und ZEA bei <i>F. graminearum</i>	129
4.3 <i>In vitro</i> Interaktionen von Schimmelpilzen.....	132
4.4 <i>In vivo</i> Interaktionen von Schimmelpilzen auf Weizenkörnern mit und ohne natürliche mikrobielle Flora	136
4.5 Molekularbiologische Arbeiten an <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>F. graminearum</i>	142
4.6 Proteinanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese	146
5 ZUSAMMENFASSUNG	151
6 LITERATUR	153

Abkürzungsverzeichnis

μ A	Mikroampere
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
A	Absorption
<i>A. dest.</i>	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
a_w	Wasseraktivität
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CZID	Czapek Dox Iprodione Dichloran
d	Tag
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DON	Deoxynivalenol
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molarität
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
OTA	Ochratoxin A
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Kartoffel Glucose Agar
PEG	Polyethylenglykol
rcf	relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNA	Synthetischer Nährstoffmangelagar
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylen-diamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ÜN	über Nacht
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZEA	Zearalenon

1 Einleitung

In der landwirtschaftlichen Produktion sowie im Verbraucherschutz kommt einigen ubiquitär verbreiteten Schimmelpilzgattungen besondere Bedeutung zu. Zum einen führt der Befall von Nutzpflanzen mit phytopathogenen Pilzen zu erheblichen Ertragseinbußen, zum anderen verlieren die Produkte an Qualität, da viele Arten Stoffwechselprodukte bilden können, die für Mensch und Tier toxisch sind. Diese Mykotoxine sind Auslöser von teilweise epidemieartigen Lebensmittelvergiftungen oder Krankheiten. Zu den Pilzen, die Getreide befallen, zählen die Gattungen *Epicoccum*, *Rhizopus* und *Cladosporium* sowie die Gattungen *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* und *Aspergillus* mit toxischen Arten (Reiß, 1998). Die beiden letztgenannten sind saprophytische Pilze, die die Mykoflora des Getreides im Nachernteverlauf dominieren und deshalb auch als Lagerpilze bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den anderen Pilzen um Phytopathogene, die sich auf dem Feld auf abreifenden Nutzpflanzen entwickeln und daher auch Feldpilze genannt werden. Die für die vorliegende Arbeit bedeutsamen Pilze und ihre Mykotoxine werden im folgenden näher vorgestellt.

Die Gattung *Fusarium* und Fusariumtoxine

Die Gattung *Fusarium* infiziert ein breites Spektrum von Nutzpflanzen wie z.B. Getreide, Mais, Tomaten, Bananen und Spargel (Jarvis, 1988; Moore *et al.*, 2001; Elmer, 2001). Von den heimischen Getreidepflanzen werden hauptsächlich Weizen, Mais und Hafer durch *Fusarium graminearum* und *F. culmorum* befallen. Die Infektion erfolgt vom Boden aus und breitet sich auf den unteren Blätter und den Halmen der Pflanzen aus. Der Befall der Ähre wird sichtbar an der sogenannten Ährenbleiche und hat kümmerliche Körner zur Folge, die in ihrem Tausendkorngewicht stark reduziert sind. Dies beruht auf der Zerstörung von Zellwänden, Speicherstärke und -proteinen durch die in das Korn eindringenden Pilze (Snijders, 1990; Jackowiak *et al.*, 2005). Zusätzlich zu diesem Aspekt kontaminieren Fusarien Getreide mit einer Vielzahl von Mykotoxinen wie den Trichothecenen sowie Zearalenon und Fumonisin.

Die Trichothecene werden in vier verschiedene Gruppen unterteilt, wobei Gruppen A und B die bedeutenden sind. Die Toxine der Gruppe A, zu denen Diacetoxyscirpenol und das T-2 – sowie das HT-2 Toxin zählen, sind toxischer als die der Gruppe B. Zur Gruppe B gehören Nivalenol, Deoxynivalenol (DON) und acetylierte Derivate. Die Synthese dieser zwei Typen von Trichothecenen scheint charakteristisch zu sein für verschiedene *Fusarium*-Arten. So bilden *F. sporotrichioides* und *F. poae* Typ A-Toxine, während *F.*

culmorum und *F. graminearum* Typ B-Produzenten sind (Placinta *et al.*, 1999). Darüberhinaus können für *F. graminearum* drei Chemotypen unterschieden werden. Ein Typ bildet Nivalenol und Derivate, der zweite Typ bildet DON und 3-Acetyl-DON, der letzte synthetisiert außer DON das 15-Acetylderivat (Ward *et al.*, 2002). Innerhalb der Arten von *F. graminearum* korrelieren Verwandtschaften und unterschiedliche Chemotypen nicht, was andeutet, dass jeder Chemotyp seinen eigenen evolutionären Ursprung hat (Ward *et al.*, 2002). Im allgemeinen wird DON auch als Leittoxin der Fusarien bezeichnet und ist das am häufigsten nachgewiesene Trichothecen (Krämer, 2002). Es hemmt die Proteinbiosynthese und wirkt immunsuppressiv. Chronische Aufnahme kontaminierter Nahrung führt zu Übelkeit, Erbrechen und wie aus der Tierzucht häufig beschrieben auch zu Nahrungsverweigerung und in Folge zu reduzierte Gewichtszunahmen (D'Mello *et al.*, 1999). Andere B-Trichothecene wirken ähnlich. Akut toxische Verbindungen der A-Gruppe wirken vor allem cytotoxisch, indem sie die Membranen schädigen (Miller *et al.*, 2001). Fütterungsstudien ergaben für das T-2-Toxin auch Unfruchtbarkeit und eine erhöhte Rate von Fehlgeburten bei Schweinen. Allerdings sind Fütterungsstudien mit auf natürliche Weise kontaminiertem Futter schwierig zu bewerten, da meist mehr als ein Toxin nachgewiesen wird und die Exposition mit mehreren Toxinen synergistische Effekte zur Folge hat (Harvey *et al.*, 1996, D'Mello *et al.*, 1997).

In Bezug auf die Phytopathogenität der Trichothecen bildenden Arten scheinen diese Mykotoxine einen Virulenzfaktor darzustellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass während des Infektionsprozesses Trichothecene im Wirtsgewebe präsent waren, bevor der pathogene Pilz invasierte (Kang und Buchenauer, 2002). In Weizenpflanzen wurde mittels Immunogold-Labeling gezeigt, dass die Toxine apikal in Xylem und Phloem transportiert werden und so in uninfilzierte Bereiche gelangen (Jansen *et al.*, 2005). Mutanten von *F. graminearum*, die aufgrund eines ausgeschalteten Gens nicht mehr in der Lage sind, Trichothecene zu bilden, zeigen eine reduzierte Virulenz (Proctor *et al.*, 1995 a). In Gewächshaus- und Feldversuchen konnte detaillierter unterschieden werden zwischen der initialen Infektion und der Verbreitung über die Ährchen. Die Mutante war nicht in der Lage vom inokulierten Ährchen ausgehend nicht inokulierte Ährchen zu befallen (Bai *et al.*, 2001). Möglicherweise beruht die höhere Virulenz Trichothecen produzierender Arten auf dem inhibitorischen Effekt der Toxine auf die Proteinbiosynthese der Pflanze (Proctor *et al.*, 2002). Neuere Untersuchungen zeigten, dass Weizenpflanzen Zellwände verstärken und dass diese Abwehrreaktion von Trichothecenen gehemmt wird (Jansen *et al.*, 2005).

Der Name „Trichothecen“ beruht im übrigen auf *Trichothecium roseum*, aus dem 1948 die erste Verbindung isoliert wurde (Desjardins *et al.*, 1993). Chemisch gesehen handelt es sich bei den Trichothecenen um zyklische Sesquiterpenoide mit einem für die Toxizität

verantwortlichen Epoxidring (Desjardins *et al.*, 1993), wobei die verschiedenen Oxygenierungs- und Acetylierungsmuster die Bioaktivität und Toxizität der Trichothecene verändern. Alle bisher bekannten Gene zur Synthese der Trichothecene liegen bis auf *tri101* (eine Acetyltransferase) in einem Cluster. Diese Genorganisation entspricht nicht der typischen Anordnung anderer pilzlicher Biosynthesegene, wobei interessanterweise die Gene zur Synthese von Aflatoxin in *Aspergillus parasiticus* als auch die Gene zur β -Lactamsynthese ebenfalls geclustert vorliegen (Desjardins *et al.*, 1993). Das Schlüsselenzym der Trichothecenbildung, die Trichodiensynthase, zyklisiert als erste Reaktion ein Farnesylpyrophosphat zum Trichodiene. Nachfolgende Oxygenierungen und Veresterungen werden durch Mono- und Dioxygenasen katalysiert. Ein regulatives Element stellt das *tri6*-Gen dar. Es codiert für einen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor mit drei Zinkfingermotiven, der die Expression von *tri*-Genen aktiviert (Proctor *et al.*, 1995 b). *Tri102* codiert für eine Effluxpumpe mit 14 membrandurchspannenden Domänen. Es gibt Hinweise, dass diese Pumpe spezifisch ist für Trichothecene und Teil des Selbstschutzes der Toxinproduzenten (Wuchiyama *et al.*, 2000).

Außer drei Pilzgattungen (*Fusarium*, *Trichothecium*, *Myrothecium*) sind keine weiteren Mikroorganismen bekannt, die Trichothecene bilden können. Interessanterweise gibt es zwei Vertreter der Pflanzengattung *Baccharis* (höhere Pflanzen aus der Familie der *Asteraceae*), die vermutlich über horizontalen Gentransfer die *tri*-Gene erworben haben und Trichothecene produzieren.

Als zweites wichtiges Mykotoxin der Fusarien muss Zearalenon (ZEA), ein β -Resorcylsäurelaktone, erwähnt werden. Viele Fusarienarten sind in der Lage, ZEA zu bilden. Aus diesem Grund wird dieses Toxin bei vielen Getreidearten, aber auch bei Reis, Sojabohnen und Bananen etc. nachgewiesen (Hagler *et al.*, 2001). Der Verbindung kommt besondere Bedeutung zu, da sie zwar nur gering toxisch ist (LD_{50} (Maus, orale Aufnahme) > 20000 mg/kg), sie aber östrogenen Charakter hat (Reiß, 1998). Die hormonähnliche Wirkung beruht darauf, dass der offene Lactonring eine Affinität zu der Bindungsstelle von Östrogen-Rezeptoren besitzt (Fink-Gremmels, 2005). Symptome sind meist mit Bezug auf Nutztiere beschrieben, wobei insbesondere weibliche Nutztiere wie z.B. Schweine betroffen sind. Als Symptome chronischer Aufnahme kommt es zu reproduktiven Disfunktionen wie Uterusschwellungen, Fehl- und Frühgeburten, bei Kühen reduziert sich die Milchleistung (D'Mello *et al.*, 1999). Nutztiere sind unterschiedlich sensitiv gegenüber ZEA. So zeigen sich Hühner recht unempfindlich, was durch eine geringe Konzentration an Östrogen-Rezeptoren im Organismus bedingt ist (Hagler *et al.*, 2001). Im tierischen Stoffwechsel wird ZEA konjugiert mit Glucuronsäure. Die Eliminierung allerdings wird durch einen entero-hepatischen Kreislauf verzögert. Zusätzlich kann es in der intestinalen Mucosa zu einer Umsetzung zu α -Zearalenol

kommen, einem 3-4fach östrogenem Derivat (D'Mello *et al.*, 1999). Interessanterweise werden ZEA bei niedriger Dosierung durchaus positive Wirkungen auf Zellproliferation, Knochen und Lipidstoffwechsel zugeschrieben, die sich bei höheren Dosen in negative Effekte umkehren (Fink-Gremmels, 2005).

Gelegentlich wurden in der Geschichte Mykotoxikosen beschrieben, die sehr wahrscheinlich auf Fusarientoxine zurückgehen. So löste das T-2-Toxin die alimentäre toxische Aleukie aus, eine Blutkrankheit, die schon über die Athenern 430 v.Chr. berichtet wurde (Thukydides, Geschichte des Peloponnessischen Krieges 2. Buch, Verse 48 und 49) und in neuerer Zeit häufiger in Russland und Sibirien auftrat. Der letzte Ausbruch betraf die Kriegs- und Nachkriegszeit um 1945, in der auf dem Feld überwintertes Getreide aufgrund von Nahrungsknappheit verzehrt wurde (Reiß, 1998). Fusarien können jedoch auch zur Humanernährung beitragen. So ist ein Produkt unter dem Namen Quorn oder Cornatur als vegetarischer Fleischersatz auf dem Markt erhältlich, welches aus fermentiertem Myzel von *Fusarium venenatum* hergestellt wird und als sehr proteinreich, cholesterinfrei und auch frei von Mykotoxinen gilt (Carlile und Watkinson, 1994; O'Donnell *et al.*, 1998).

Nichts desto trotz kommt der Prävention und Bekämpfung von Fusarien in der Landwirtschaft eine hohe Bedeutung zu. Für die Praxis sind Aspekte wie Bodenbearbeitung, Fruchtfolge, Sortenwahl, Fungizideinsatz und Lagerungsbedingungen relevant. Reinigung und Vermahlung des Getreides können die Belastung des Getreides sogar reduzieren. Entscheidend für den Verbraucher ist die Konzentration an Mykotoxinen im Endprodukt. Hier ist zu berücksichtigen, dass viele Mykotoxine sehr hitzestabil sind und hohe Temperaturen wie etwa beim Backen kaum die Konzentration an Toxinen reduzieren (Berleth, 1997). Wenn kontaminiertes Getreide als Futtermittel eingesetzt wird, kann es zu einem „carry over“ in Eier, Fleisch und Milch kommen (D'Mello *et al.*, 1999; Krämer, 2002). Geregelt sind die Gehalte an Fusarientoxinen für Lebensmittel in einer Verordnung der Europäischen Union (EU-VO 856/2005), die seit Juli 2006 gültig ist. So wurde beispielsweise ein DON-Höchstgehalt von 1750 µg/kg für Weizen festgelegt. Mehl darf nur mit 750 µg DON/kg belastet sein. Für Brot und Backwaren gelten 500 µg/kg als Grenzwert, während für Teigwaren (z.B. Nudeln) 750 µg/kg angesetzt wurden. Säuglings- und Kindernahrung darf mit nur 200 µg DON/kg kontaminiert sein. Bezüglich ZEA gelten die Grenzwerte von 100 µg/kg für Weizen, 75 µg/kg für Mehl und 50 µg/kg für Brot und Backwaren. In Säuglings- und Kindernahrung darf ZEA in einer Konzentration von 20 µg/kg enthalten sein. Die aktuelle EU-Verordnung ersetzt nationale Regelungen wie z.B. die deutsche Mykotoxinhöchstmengen-Verordnung, die teilweise niedrigere Grenzwerte vorschrieb. So durften laut deutscher Gesetzgebung in Brot und Backwaren lediglich 350

µg DON/kg enthalten sein. Für Säuglings- und Kindernahrung waren 100 µg DON/kg festgelegt.

Die Gattung *Alternaria*

Alternarien sind weit verbreitete Lebensmittel verderbende und Material zerstörende Pilze (Reiß, 1998), die mit etwa 30 verschiedenen Stoffwechselprodukten eine beachtliche Zahl an Toxinen bilden können (Weidenbörner, 1999). Man bezeichnet Alternarien auch als Schwärzepilze, was Aufschluss über ihre Koloniefärbung gibt. Sie leben entweder saprophytisch auf organischem Material oder parasitär auf lebenden Pflanzen (Rotem, 1994). In Bezug auf Getreide wird am häufigsten die Art *A. alternata* identifiziert (Christensen, 1987). Relevante Toxine sind Alternariol, Alternariolmethylether und Tenuazonensäure, wobei letzteres die höchste Toxizität der *Alternaria*-Metaboliten aufweist (Davis und Diener, 1987).

Die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* und Ochratoxin A

Die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* zählen im Gegensatz zu Fusarien und Alternarien zu den Lagerpilzen. Dies berücksichtigt, dass diese Pilze erst im Nachernteverlauf bei der Lagerung von Getreide relevant werden. Sie sind an niedrigere a_w -Werte im Bereich von 0,8 adaptiert (Christensen, 1987), welche mehr den Lager- als den Feldbedingungen entsprechen. Weiterhin weisen sie eine große Temperaturtoleranz von ca. 5-30 °C auf, was ihre ubiquitäre Verbreitung begünstigt.

Aspergillen und Penicillien bilden eine Reihe von Mykotoxinen wie Aflatoxine und Ochratoxine. Von den bekannten Ochratoxinen wird in relevanten Konzentrationen nur Ochratoxin A (OTA) isoliert (Weidenbörner, 1999). Es wurde erstmals von Van der Merwe *et al.* (1965) aus *Aspergillus ochraceus* isoliert, der infolge namensgebend war. OTA kontaminiert eine Vielzahl von Nahrungs- und Genussmitteln wie Leguminosen (u.a. Soja), getrocknete Früchte, Bier, Wein, Kaffee, Kakao, Trauben und auch Getreide (Bayman *et al.*, 2002). In der Literatur wurden viele Spezies beschrieben, die OTA bilden können, die meisten jedoch wurden falsch identifiziert (Frisvad, 1989). In kühleren bis gemäßigten Klimaten gilt *Penicillium verrucosum* als Hauptproduzent, während die Aspergillen, meist *Aspergillus ochraceus*, mehr den wärmeren Klimazonen zugeordnet werden (Weidenbörner, 1999; Niessen, 2006). OTA ist im Serum der europäischen Bevölkerung mit einer Konzentration von 0,4 ng/ml nachweisbar, verantwortet durch die Aufnahme aus belasteten Produkten, vor allem aus Getreide (50 % Anteil) (Krämer, 2002). Bei vielen Spezies, auch beim Menschen zeichnet sich OTA durch lange Serum-

Halbwertszeiten aus (Walker und Larsen, 2005). OTA gilt vor allem als nephrotoxisch (Scudamore, 2005; Pardo *et al.*, 2006;), wobei es Zellnekrose und Apoptose auslöst (Fink-Gremmels, 2005). In Bezug auf den Menschen wird die Aufnahme von OTA in Zusammenhang mit der „Balkan endemic Nephropathie“ (BEN) gebracht (Krämer, 2002; Walker und Larsen, 2005). In Tierversuchen mit Ratten wurde gezeigt, dass OTA weiterhin kanzerogen, teratogen und embryotoxisch wirkt (Scudamore, 2005). Allgemein hemmt OTA die Proteinbiosynthese, induziert Disfunktionen der Mitochondrien und greift in Zell-Zell-Interaktionen ein (Fink-Gremmels, 2005). In *in vitro* und teilweise auch in *in vivo* Experimenten sind DNA-Addukte nachgewiesen (Mally und Dekant, 2005). Diskutiert wird neben der alimentären Exposition auch die inhalative Aufnahme OTA-belasteter Sporen (Weidenböner, 1999; Amman, 2005; Mayer *et al.*, 2006). Durch OTA kontaminierte Futtermittel kann es zu einem „carry over“ in tierisches Gewebe kommen, wobei die Nieren am stärksten akkumulieren. Bei Wiederkäuern allerdings findet eine Detoxifikation im Rumen durch bakterielle Hydrolyse statt, was die Belastung um das Zehnfache im Vergleich zu Schweinen senkt (Weidenböner, 1999).

Präventionsmaßnahmen, um eine OTA-Kontamination zu verhindern, setzen bei Getreide hauptsächlich bei der Trocknung der Körner an. Ausgehend von einer möglichst geringen pilzlichen Belastung des Getreides ist die Absenkung des Wassergehaltes auf Werte unter 15 % für eine optimale Lagerung wichtig. Jedoch gelingt dies nicht immer bzw. nicht schnell genug, abhängig von Regenfällen in der Erntezeit oder Ausstattung und Effizienz von Trocknungsanlagen (Scudamore, 2005). Eine Reduzierung des OTA-Gehaltes kann auch bei der Verarbeitung von Getreide durch physikalische, chemische und biologische Methoden erzielt werden, wobei Reinigung und Sortierung am effizientesten sind (Scudamore, 2005).

Auch für OTA gilt eine EU-Verordnung (EG 123/2005), die Höchstmengen für relevante Lebensmittel festlegt. So gelten für Getreide 5 µg/kg und für Getreideerzeugnisse 3 µg/kg als Grenzwerte. Röstkaffee darf mit 5 µg/kg belastet sein. Traubensaft und Wein können 2 µg OTA/kg enthalten, während Rosinen mit 10 µg/kg kontaminiert sein dürfen. Säuglings- und Kindernahrung dürfen lediglich 0,5 µg/kg enthalten.

Pilzliche Interaktionen und Mykotoxine

Die Erforschung der Mykotoxine hat in den letzten Jahrzehnten zum Teil aufklären können, über welche Stoffwechselwege verschiedene Mykotoxine synthetisiert werden. Auch über die Auswirkungen auf den tierischen und menschlichen Organismus ist viel bekannt geworden. Jedoch die Frage, warum Pilze solche Verbindungen bilden, kann bisher kaum beantwortet werden. Viele Arbeiten beschäftigen sich mit der Frage, unter

welchen Bedingungen Mykotoxine gebildet werden (Magan *et al.*, 1984; Schwabe und Krämer, 1995; Ryu und Bullerman, 1999; Ramirez *et al.*, 2006). Abgesehen von spezifischen Eigenschaften jeder Spezies, die sich in unterschiedlichen Optima oder Minima der Mykotoxinbildung bezüglich Temperatur oder Wasseraktivität etc. niederschlagen, konnte meist beobachtet werden, dass Parameter für optimales Wachstum nicht identisch sind mit denen für maximale Toxinsynthese.

Aus verschiedenen Arbeiten geht hervor, dass die Trichothecene einen Virulenzfaktor der phytopathogenen Pilze darstellen und die Infektion der Pflanze unterstützen. So konnten Jansen *et al.* (2005) zeigen, dass Trichothecene die Verdickung der pflanzlichen Zellwand, eine Abwehrreaktion der Pflanze, hemmen. Proctor *et al.* (1995) und Desjardins *et al.* (1996) berichteten über eine verminderte Virulenz der Mutanten von *F. graminearum*, die keine Trichothecene bilden können. Da die Mutanten nicht völlig apathogen waren, scheinen aber weitere Faktoren bei der Virulenz eine Rolle zu spielen.

Mykotoxine werden vermutlich nicht nur bei der Interaktion zwischen Pilz und Pflanze gebildet, sondern auch bei der Interaktion zwischen Pilz und Pilz wie z.B. bei der Lagerung von Getreide. So diskutiert Birzele (2001) die fehlende Korrelation zwischen Pilzvorkommen und Mykotoxingehalt. Von einer hohen Pilzbelastung konnte nicht gleichzeitig auf eine hohe Mykotoxinbelastung geschlossen werden, umgekehrt konnte bei geringer pilzlicher Belastung durchaus eine hohe Kontamination mit Mykotoxinen beobachtet werden. Möglicherweise beruht diese Beobachtung auf dem Einfluss mikrobieller Interaktionen. Zu dieser Fragestellung wurden bisher nur wenige Arbeiten veröffentlicht. So berichteten Simpson *et al.* (2004) über die Interaktion zwischen *Microdochium nivale* und *F. culmorum*. Saß (2005) untersuchte -ebenfalls *in vitro*- die Interaktion zwischen *F. graminearum* und *A. alternata*. Beide Arbeiten berücksichtigten quantitative Aspekte. Dies fehlt bei früheren Untersuchungen (Ramakrishna *et al.*, 1996 b; Marin *et al.*, 1998 c; Etcheverry *et al.*, 1998, Cooney *et al.*, 2001) aufgrund der erst in letzter Zeit entwickelten passenden Nachweisreaktionen und der stärkeren Verbreitung der quantitativen PCR.

Fluoreszenzproteine

Die mikroskopische Differenzierung von Pilzen erfolgt in der Regel anhand ihrer Sporen oder Sporangien, jedoch nicht anhand ihrer Hauptbiomasse, den Hyphen, da sich diese nicht unterscheiden. Im Zusammenhang mit pilzlichen Interaktionen könnte aber gerade die mikroskopische Analyse, wie ein gemeinsamer Lebensraum besiedelt wird, interessante Rückschlüsse ermöglichen. Dazu ist eine Methode ohne hohen präparativen Aufwand, der häufig mit einer Beeinträchtigung der natürlichen Gegebenheiten verbunden

ist, und möglichst ohne Abtötung der Pilze erforderlich. Die Expression des Green Fluorescent Proteins (GFP) bietet diese Möglichkeiten. Bei diesem Protein handelt es sich um ein natürlicherweise fluoreszierendes Protein, welches ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde. Bei Anregung mit kurzwelligem Licht (395 oder 470 nm) emittiert das Protein ohne weitere Cofaktoren grünliches Licht der Wellenlänge 509 nm. Seit der erstmaligen Isolierung 1962 durch Shimomura *et al.* und der Expression in Bakterien und Nematoden (Chalfie *et al.*, 1994) sind zahlreiche Derivate des GFPs kommerziell erhältlich. So wurde über den Codongebrauch die Expression in verschiedene Organismen oder Gruppen optimiert. Aminosäuresubstitutionen verbesserten Löslichkeit und Fluoreszenzintensität. Weiterhin sind Derivate erhältlich, die sich in ihrer Emissionswellenlänge unterscheiden, so dass verschiedenfarbige Markierungen möglich sind. Die Anwendung des GFPs wird eingeschränkt durch den Bedarf an molekularem Sauerstoff zur Chromophorbildung.

Ein weiteres fluoreszierendes Protein ist DsRed, welches natürlicherweise in gefärbten Teilen der Koralle *Discosoma* spp. vorkommt (Matz *et al.*, 1999). Ähnlich wie GFP benötigt auch dieses Fluoreszenzprotein keine Cofaktoren oder Substrate zur Emission seines roten Fluoreszenzlichts. Das Emissionsmaximum liegt mit 583 nm relativ weit entfernt vom Emissionsmaximum des GFP, so dass sich diese beiden Proteine als ideale Partner für ein Dual-labeling System anbieten. Da die Chromophore des natürlichen DsRed-Protein nur langsam gebildet wird und das Protein dazu tendiert, unlösliche Aggregate zu bilden, wurde wie bei GFP durch Mutagenese optimiert (Bevis und Glick, 2002). DsRed2 reift schneller, löst sich besser und fluoresziert intensiver als der Wildtyp.

Zielsetzungen der Arbeit

Zunächst wurde der Einfluss physiologischer Parameter auf die Mykotoxin-Bildung mehrerer Stämme von *F. graminearum* getestet. Dazu wurden die Stämme unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich Temperatur, pH-Wert und a_w -Wert angezogen. DON- und ZEA-Gehalte der Kulturüberstände wurden mit kommerziell erhältlichen kompetitiven ELISA-Kits ermittelt. Ein Bezug zum pilzlichen Wachstum stellte die Bestimmung der Trockenmasse her.

Der Einfluss von Interaktionen verschiedener Getreide assoziierter Schimmelpilze mit *F. graminearum* wurde in *in vitro* Modellen untersucht. Einbezogen wurden dabei als zweiter Feldpilz *A. alternata* und als OTA-produzierende Lagerpilze *A. ochraceus* und *P. verrucosum*. Es wurden auch Mutanten von *F. graminearum* eingesetzt, denen aufgrund eines knockouts das Gen für die Trichodiensynthese fehlt. Mit diesen Mutanten, die keine Trichothecene produzieren können, wurden die DON-Synthese als möglicher Vorteil bei

Wechselwirkungen mit anderen Schimmelpilzen näher untersucht. Die Anzucht erfolgte in Cokulturen mit je zwei Pilzen. Die Mykotoxinanalyse wurde auf OTA ausgedehnt. Das Wachstum wurde mittels DNA-Quantifizierung ermittelt, wobei spezies- und genuspezifische Primer als Nachweissysteme verwendet wurden.

Als *in vivo* Modell wurden schließlich Weizenkörner gelagert, um pilzliche Interaktionen im Zusammenhang mit Mykotoxinproduktion zu untersuchen. Dabei wurden zum einen sterile Körner analog zu den *in vitro* Modellen mit je zwei Pilzen beimpft. Zum anderen wurde zusätzlich zur natürlichen mikrobiellen Flora der Körner ein Pilz zugemischt. Im zeitlichen Verlauf der Lagerung wurden die Konzentrationen der Mykotoxine DON, ZEA und OTA aus zermahlene Körnern bestimmt. Das Wachstum der Pilze wurde über DNA-Quantifizierung und über eine kulturelle Methode verfolgt.

Zusätzlich zu dem Komplex der Interaktionen wurden zwei Projekte mit vorbereitendem Charakter bearbeitet. Eine Untersuchungsmethode für Pilze *in situ* z.B. auf Körnern stellt die Mikroskopie dar. Da Hyphen verschiedener Pilze mikroskopisch nicht ohne weiteres zu differenzieren sind, erscheint eine Fluoreszenzmarkierung vorteilhaft. Die Expression des „Green Fluorescent Proteins“ oder seinen Derivaten ermöglicht eine schnelle und hinsichtlich der Präparation einfache Lokalisation der Hyphen des exprimierenden Pilzes. *F. graminearum* wurde hierzu im Rahmen dieser Arbeit gentechnisch verändert. Weiterhin wurde *Bacillus subtilis* fluoreszenzmarkiert. Diesem Bakterium wird fungizide Wirkung zugesprochen (Czaczyk *et al.*, 2002) und ist aus diesem Grund ein sehr interessanter Kandidat, um in weiterführenden Untersuchungen mikrobielle Interaktionen in Bezug auf Bakterien zu erweitern.

Zur Identifizierung möglicher Proteine, die im Zusammenhang mit Mykotoxinen stehen und Aufschluss über eventuelle Hintergründe der Produktion der Toxine geben könnten, wurde für die im Rahmen dieser Arbeit involvierten Schimmelpilze eine Probenaufbereitung sowie eine Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese etabliert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Agarosegelkammern	Typ Horizon 58 und Typ Horizon 11.14, Biometra, Göttingen
Autoklav	Varioklav Typ 500E, H + P Labortechnik GmbH, München
Brutschränke	MIR-553, Sanyo Incubator Memmert GmbH, Schwabach Feuchtebrutschrank: Typ Rumed 3401, Rubarth Apparate GmbH, Seelze Schwarzlichtschrank: Eigenkonstruktion mit Natriumdampf-Leuchtröhren SGR 140, Phillips, NL
Elektrogetreidemühle	Modell 874, Jupiter Küchenmaschinenfabrik GmbH + Co., Schorndorf
Elektroporationsgerät	Micropulser™, Biorad, München
Fluoreszenzscanner	Molecular Imager FX, Biorad, München
Fotometer	Typ Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, England
French Press	ThermoSpectronic, Cambridge
Gefriertrocknungsanlage	Alpha I-6, Christ, Osterode
Geldokumentationsanlage	Gel Imager, Intas
Geltrocknung	Aldo-Xer-Geltrockner, Schütt Labortechnik, Göttingen
Hygroskop	AW-DIO, Rotronic Messgeräte GmbH, Ettlingen
IEF-Zelle	Protean IEF Cell, Biorad, München
Kühlzentrifuge	Typ J2-21, Beckman Instruments, California, USA
Laborwaagen	Typ 3736, Typ BP 221 S, Sartorius Werke, Göttingen
LightCycler™	Roche Diagnostics, Mannheim
Mikroskope	Typ BH2, Olympus Optical Co., Hamburg Leica DMRP Photomikroskop, Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotiterplatten- fotometer	Typ SLT Easy Reader EAR 340 AT, SLT Labinstruments, Götting, AU
Proteingelkammern	Typ Mini Protean 3 und Protean II Xi, Biorad, München
Sicherheitswerkbänke	Typ Class 100 und Typ BSB4, Gelaire, Opera, I
Thermoblock	Typ TB1, Biometra, Göttingen

Thermocycler	Typ Eppendorf Mastercycler 5330, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Typ 5415 und 5417R, Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Sonifier Cell disrupter B15, Branson, USA
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex, Bandelin electronics, Berlin
Ultraturrax	Typ T25 basic, IKA-Labortechnik, Staufen

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid-Gellösung	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Carrier Ampholyte	Biorad, München
CHAPS	Roth, Karlsruhe
Dichloran	Riedel de Haen, Seelze
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
d-NTPs	Promega, Madison, USA
DNA-Leitern	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Hygromycin B	Sigma, Deisenhofen
Iodoacetamid	Merck, Darmstadt
IPTG	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl	Biorad, München
Phenol/Chloroform/Iso-Amylalkohol	Roth, Karlsruhe
Roval 50 WP	Agro Chemie, Lyon, F
TEMED	Roth, Karlsruhe
X-Gal	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Alle weiteren eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Deisenhofen), Sigma (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) bezogen. Des Weiteren wurden Fertignährmedien der Firmen Oxoid und Merck verwendet.

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Invitrogen, Karlsruhe
Driselase	Sigma, Deisenhofen
Klenow-Polymerase	Promega,, Heidelberg
Lyticase	Fluka, Deisenhofen
Lysing Enzymes	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Merck, Darmstadt
Restriktionsenzyme	Invitrogen, Karlsruhe und MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase	Merck, Darmstadt
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase mit Puffer und Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Kits

QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Dneasy® Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Dneasy ®Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification	Qiagen, Hilden
Lightcycler™FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR®Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
Ridascreen® DON	R-Biopharm AG, Darmstadt
Ridascreen® ZEA	R-Biopharm AG, Darmstadt
Ridacreen® OTA	R-Biopharm AG. Darmstadt
2-D Clean up Kit	Amersham Biosciences, USA
Protein Assay	Biorad, München

2.1.5 Software

BLAST zur vergleichenden Analyse von DNA- oder Proteinsequenzen
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

LightCycler™ Software 2, Roche Diagnostics, Mannheim

BioDocAnalyze 4.1, Biometra, Göttingen zur Dokumentation von Gelbildern

UV winlab 1.1 (Steuerung von Spektralfotometern)

MS-Office, Microsoft 2000

2.1.6 Sonstiges

Desinfektionsmittel	Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen
Helipur und Meliseptol	
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Eppi-Pistill	Schütt Labortechnik, Göttingen
Fuchs-Rosenthal-Kammer	Assistent, Sondheim
Glaskörnchen, 212-300 µm	Sigma, Steinheim
IPG-Streifen	Biorad, München
Kulturschalen	Techno Plastic Products, Trasadingen, CH
LightCycler™ Kapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim
Papierfilter 595 ½	Schleicher und Schuell, Dassel
Pipettenspitzen, gestopft	Continental Lab Products, USA
Quarzküvette	Hellma, Müllheim
Rovral 50WP	Bayer Cropscience, Langenfeld
Spezialtüten	SACO ₂ , Gent, B
Sterilfilter, 0,22 µm	Schleicher und Schuell, Dassel
Verbandsmulltuch	Hartmann, Heidenheim
Zentrifugenröhrchen	Typ Oak Ridge 3119, Nalgene, USA

2.2 Verwendete Mikroorganismen

2.2.1 Bakterienstämme

Für die gentechnischen Arbeiten wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien eingesetzt.

2.2.2 Pilzstämme

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Pilzstämme wurden hauptsächlich für Interaktionsversuche und nur zum Teil für gentechnische Experimente verwendet. Die *F. graminearum*-Stämme Nr. 1 bis 3 unterscheiden sich bezüglich der produzierten Mykotoxine. *F. graminearum*

CBS 110250 ist ein starker DON- und ZEA-Bildner, *F. graminearum* CBS 110263 bildet vergleichbar viel ZEA, jedoch wenig DON. Umgekehrt produziert *F. graminearum* CBS 110264 wenig ZEA, aber viel DON (O'Donnell *et al.*, 2000). Die angegebenen *F. graminearum* GZT-Stämme stellen knockout-Mutanten dar, deren *tri5*-Gen ausgeschaltet ist. Sie sind aus dem Wildtyp *F. graminearum* Z3639 hervorgegangen und können keine Trichothecene produzieren.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Nr.	Stamm	Herkunft / Referenz
1	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Hanahan, 1983
2	<i>Bacillus subtilis</i> NRS 624	Nakamura, 1989
3	<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 10 ^T	Typenstamm, Fahmy <i>et al.</i> , 1985
4	<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 402	Nakamura <i>et al.</i> , 1999
5	<i>Bacillus subtilis</i>	Eigenisolat aus der Stammsammlung der Abteil. Lebensmittelmikrobiologie und Hygiene, IEL, Bonn

Tabelle 2: Verwendete Pilzstämme

Nr.	Stamm	Herkunft / Referenz
1	<i>Fusarium graminearum</i> CBS 110250	CBS/ O' Donnell <i>et al.</i> , 2000
2	<i>Fusarium graminearum</i> CBS 110263	CBS/ O' Donnell <i>et al.</i> , 2000
3	<i>Fusarium graminearum</i> CBS 110264	CBS/ O' Donnell <i>et al.</i> , 2000
4	<i>Fusarium graminearum</i> Z3639	Proctor <i>et al.</i> , 1995
5	<i>Fusarium graminearum</i> GZT-33	Proctor <i>et al.</i> , 1995
6	<i>Fusarium graminearum</i> GZT-40	Proctor <i>et al.</i> , 1995
7	<i>Fusarium avenaceum</i>	Eigenisolat*
8	<i>Fusarium culmorum</i>	Eigenisolat*
9	<i>Fusarium equiseti</i>	Eigenisolat*
10	<i>Fusarium moniliforme</i>	Eigenisolat*
11	<i>Fusarium poae</i>	Eigenisolat*
12	<i>Fusarium tricinctum</i>	Eigenisolat*
13	<i>Microdochium nivale</i>	Eigenisolat*
14	<i>Alternaria alternata</i> CBS 795.72	CBS
15	<i>Penicillium verrucosum</i>	Eigenisolat *
16	<i>Aspergillus ochraceus</i> DSMZ 824	DSMZ

*Eigenisolat: aus der Stammsammlung des Bereichs Lebensmittelmikrobiologie und Hygiene, IEL, Bonn

2.3 Verwendete Plasmide und Oligonukleotide

Die zu Klonierungen sowie Transformationen verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die zur Amplifikation von DNA eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 3: Eingesetzte Plasmide

Plasmid	Genetische Charakteristika	Herkunft / Referenz
PGEM-T	lacZ (EcoRV, 3'-T-Überhang), Amp ^R	Promega, Mannheim
pTSK29	Temperatursensitiver origine of replication, Kn ^R	Phillips, 1999
pKSV7	Temperatursensitiver origine of replication, <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> -shuttle-Vektor, Amp ^R in <i>E. coli</i> , Chl ^R in <i>B. subtilis</i>	Yakhnin <i>et al.</i> , 2004
pAN7-1	Amp ^R , HygromB ^R unter Kontrolle von P _{gpd} und T _{trpC}	Punt <i>et al.</i> , 1987
pECFP	P _{lac} , ecfp, amp ^R	BD Bioscience Clontech
pDsRed2	P _{lac} , dsred2, amp ^R	BD Bioscience Clontech
pGFPuv	P _{lac} , gfpuv, amp ^R	BD Bioscience Clontech

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5'-3' Richtung)	Zielsequenz / Zielorganismus	Länge des PCR-Amplifikates	Referenz
UBC 85 F	GCA GGG TTT GAA TCC GAG AC	<i>F. graminearum</i>	332 bp	Schilling <i>et al.</i> , 1996
UBC 85 R	AGA ATG GAG CTA CCA ACG GC			
Tox 5.1	GCTGCTCATCACTTTGCTCAG	Trichothecen bildende Fusarien		Niessen und Vogel, 1998
Tox 5.2	CTGATCTGGTCACGCTCATC			
Aalt F	GGC GGG CTG GAA CCT CTG GG	<i>A. alternata</i>	450 bp	Zur <i>et al.</i> , 2002
Aalt R	AAT GGA TGC TAG ACG TTT GC			

PenAs p F	CGG AAG GAT CAT TAC TGA GTG	<i>Penicillium spp.</i> und <i>Aspergillus</i> <i>spp.</i>	81 bp	Haugland <i>et al.</i> , 2004
PenAs p R	GCC CGC CGA AGC AAC			
ITS1-F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A		zwischen 450 und 600 bp variabel	
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC			
necfp	GGTCGC CAC CAT GGT GAG CAA	<i>ecfp</i> aus pECFP	835 bp	diese Arbeit
cecfp	CGA AAG GGC CCG TAC GGC CG			
nampr o	GAT GTC GAC GGT TTC TTA GAC GTC A	P _{ampR} aus pECFP	160 bp	diese Arbeit
campr o	GAA TAC TCA TAC TCT TCC TTT TTC			
nara	AAT GCG CGC ATG CCG ATC G	<i>araA</i> aus <i>B.</i> <i>subtilis</i>	560 bp	diese Arbeit
cara	CGC TGA ATT CAG ATC TCC TT			
nfus	GTA TGA GTA TTC GGT CGC CAC C	<i>ecfp</i> - und P _{ampR} - Amplifikat	1000 bp	diese Arbeit
nred	GGT CGC CAC CAT GGC CTC CT	<i>dsred2</i> aus pDsred2	790 bp	diese Arbeit
ngfp	AGTATGAGTAAAGGAGAAGAAC TTTTTC	(als Paar mit <i>cecfp</i>) <i>gfp</i> aus pGFP _{uv}	810 bp	diese Arbeit
naraE	AAC GGC CTG ACC ATG CTC AA	<i>araA</i> aus <i>E. coli</i>	620 bp	diese Arbeit
caraE	ATC AGA CGC TGT ACG GCC AG			

2.4 Kultivierung von Mikroorganismen

2.4.1 Anzucht von Bakterien

Nährmedien:

- Luria-Bertani (LB): 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl bei Platten bzw. 10 g bei Bouillon, 15 g Agar bei Platten, ad 1000 ml *A. dest.*, pH 7,5
- 2 x YT: 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1000 ml *A. dest.*, pH 7,0

Zusätze:

- Antibiotika als wässrige, sterilfiltrierte Stammlösungen, gelagert bei – 20 °C
- IPTG: 0,1 M IPTG, gelagert bei –20 °C
- X-Gal: 4% X-Gal in N,N-Dimethylformamid, gelagert bei –20 °C

Die Anzucht von Bakterien erfolgte sowohl in flüssigen als auch auf festen Nährmedien bei 30 oder 37 °C über Nacht oder unter Umständen bei Flüssigmedien bis zum Erreichen einer gewünschten OD₆₀₀ unter Schütteln mit 150 rpm. In der Regel wurden die oben aufgeführten Nährmedien verwendet, es sei denn, die Anzucht erfolgte im Rahmen einer speziellen Methode.

Zur Selektion von Klonen mit Antibiotikaresistenz wurden dem autoklavierten, höchstens ca. 50 °C warmen LB-Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt, wobei sterilfiltrierte wässrige Stammlösungen der Antibiotika verwendet wurden. Zur Blau/Weiß-Selektion wurden IPTG (3 ml/1000 ml Medium) und X-Gal (4 ml/1000 ml Medium) in autoklaviertes, abgekühltes LB-Medium gemischt. Zur Vorratshaltung solcher Platten wurden diese lichtgeschützt bei 8 °C aufbewahrt.

2.4.2 Stammhaltung von Bakterien

- Stammhaltungslösung: 65 % Glycerin, 0,1 M MgSO₄*7H₂O, 0,025 M Tris-HCl

Die Stammhaltung von Bakterien erfolgte durch Lagerung bei –70°C in glycerinhaltiger Lösung, wobei dieses zu gleichen Teilen mit ÜN gewachsenen bakterieller Flüssigkultur vermischt in Kryo-Röhrchen aufbewahrt wurde. Zur Reanimation der so gelagerten Stämme wurde mit ausgeglühter, noch heißer Impföse aus der gefrorenen Kultur Material entnommen und auf Vollmedium ausgestrichen.

2.4.3 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α

- CaCl₂/MgSO₄-Lösung: 70 mM CaCl₂, 20 mM MgSO₄ frisch hergestellt durch Zugabe von 7 ml einer 1 M CaCl₂-Lösung und 2 ml einer 1 M MgSO₄-Lösung zu 91 ml sterilem *A. dest.*

Herstellung kompetenter *E. coli* erfolgte nach Dagert und Ehrlich (1974). Eine Vorkultur in 2 x YT-Medium wurde ÜN inkubiert. Die Hauptkultur von 70 ml 2 x YT-Medium wurde mit der Vorkultur 1:100 beimpft. Die Hauptkultur wurde unter Kontrolle der OD₆₀₀ in einem Schüttelwasserbad bei 30 °C angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 wurde die Kultur auf zwei sterile Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 4 °C mit 2500 rcf für 10 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden in je 10 ml eiskalter CaCl₂/MgSO₄-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis gehalten. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Sedimente in 3,5 ml CaCl₂/MgSO₄-Lösung aufgenommen und nochmals für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von je 875 μ l sterilem Glycerin und gründlichem Durchmischen wurden Aliquots von 250 μ l und 450 μ l bei -70 °C gelagert.

2.4.4 Herstellung elektrokompetenter *B. subtilis*

- Anzuchtmedium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1000 ml *A. dest.*, pH 7,5 (= LB-Medium) + 0,5 M Sorbit
- Elektroporationsmedium: 0,5 M Sorbit, 0,5 M Mannit, 10 % Glycerin
- Recovery-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1000 ml *A. dest.*, pH 7,5 (= LB-Medium) + 0,5 M Sorbit, 0,38 M Mannit

Die Herstellung von elektrokompetenten *B. subtilis* - Zellen entspricht der Hyperosmolaritätselektroporationsmethode von Xue *et al.* (1999). Als Vorkultur dienten ÜN gewachsene LB-Kulturen. 100 ml Anzuchtmedium wurden mit 6 ml der Vorkultur angeimpft. Diese Hauptkultur wurde im Schüttelwasserbad bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 min wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 rcf in 10 min sedimentiert. Das Pellet wurde in vier Durchgängen in eiskaltem Elektroporationsmedium gewaschen, um möglichst viele Ionen zu entfernen, die sich bei der Elektrotransformation negativ auswirken können. Die Zellen wurden schließlich in Elektroporationsmedium aufgenommen und aliquotiert bei -70 °C gelagert.

2.4.5 Anzucht von Schimmelpilzen

- Kartoffel-Glucose-Medium (PDA, PDB): 4 g Kartoffelextrakt, 20 g Glucose, 15 g Agar (bei PDA), ad 1000 ml *A. dest.*; pH 5,6 +/- 0,1
- Synthetischer Nährstoffmangelagar (SNA) nach Nirenberg (1976): 0,2 g Glucose, 0,2 g Saccharose, 1 g KH_2PO_4 , 1 g KNO_3 , 0,5 g KCl, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 20 g Agar, ad 1000 ml *A. dest.*
- Hefeextrakt-Saccharose-Agar (YES): 20 g Hefeextrakt, 150 g Saccharose, 20 g Agar, ad 1000 ml *A. dest.*
- V8-Medium (modifiziert): 200 ml Orangensaft (z.B. Hohes C ohne Fruchtfleisch und Calciumzusatz), 3 g CaCO_3 , 20 g Agar ad 1000 ml *A. dest.*
- Czapek Dox Iprodione Dichloran Agar zur Isolierung von *Fusarium* spp. (Abildgren *et al.*, 1993): 17,5 g Czapek-Dox-Agar, 5 g Agar, 1 ml CZID-Stammlösung, 0,5 ml Dichloranlösung, 0,025 mg Chloramphenicol, ad 500 ml *A. dest.*
Dichloranlösung: 0,02 g Dichloran ad 10 ml Ethanol, zu lagern bei -20°C
CZID-Stammlösung: 0,25 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ad 100 ml *A. dest.*, zu lagern bei 8°C
Nach Autoklavieren wurden dem temperierten Medium je 25 mg/500 ml in sterilem *A. dest.* gelöstes Penicillin G, Aureomycin und Streptomycin sowie 1 ml einer Rovallösung (0,06 g ad 20 ml *A. dest.*) zugesetzt.

Für die Anzucht der Mutanten *F. graminearum* GZT-33 und GZT-40 wurde dem autoklavierten Medium nach Abkühlen auf ca. 50°C Hygromycin B in einer Endkonzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt.

Die Kultivierung der Schimmelpilze auf Agarplatten erfolgte bei Raumtemperatur in diffusem Tageslicht oder zur besseren Pigmentbildung unter 12 h Schwarzlicht pro Tag. Flüssigkulturen wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 100 rpm in Tageslicht inkubiert.

2.4.6 Anzucht von Schimmelpilzen bei verschiedenen a_w -Werten

Die Anzucht von Schimmelpilzen bei verschiedenen Wasseraktivitäten erfolgte in halbkonzentrierter PDB mit unterschiedlichem a_w -Werten. Dazu wurden autoklavierte 1x PDB und verschieden hoch konzentrierten autoklavierte Glycerinlösungen zu gleichen Teilen gemischt. Die Glycerinendkonzentrationen lagen bei 235, 260, 300, 390 und 450 g/l. Die Inokulation erfolgte mit Sporensuspensionen durch Zusatz von 0,01 Vol

Suspension mit 10^5 - 10^6 Sporen/ml. Während der Inkubation bei 20 °C im Brutschrank wurden die Kulturen mit 100 rpm geschüttelt.

2.4.7 Stammhaltung von Schimmelpilzen

Die Stammhaltung von Schimmelpilzen erfolgte auf Schrägagar in Schraubdeckelröhrchen mit folgenden Medien: PDA, V8 und V8 mit 150 µg Hygromycin B / ml Medium. Mit nicht fest verschlossenem Deckel wurden die Kulturen nach Beimpfen der Schrägfläche bei Raumtemperatur und Tageslicht bebrütet und nach guter Entwicklung des Myzels anschließend mit ebenfalls nicht fest verschlossenem Deckel bei 8 °C gelagert. Die auf diese Weise angelegte Stammsammlung wurde jährlich überimpft.

2.4.8 Konidiengewinnung von Schimmelpilzen

- Mungbohnenmedium: 20 g Mungbohnen ad 1000 ml *A. dest.* für 20 min gekocht und anschließend filtriert und autoklaviert

Mungbohnenmedium wurde für die Konidiengewinnung bei *F. graminearum* eingesetzt. Als Inokulum diente Myzel von PDA-Platten. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 5-7 Tage auf einem Schüttler bei 100 rpm. Geringe Myzelmengen, die sich in diesem Mangelmedium dennoch bildeten, wurden bei der Ernte der Sporen abgetrennt, indem die Kultur durch ein steriles Mulltuch filtriert wurde.

Sporen von *A. alternata*, *P. verrucosum* und *A. ochraceus* wurden abgeerntet, indem Kolonien der Pilze auf PDA mit 0,01 % Tween20 in *A. dest.* mit Hilfe eines Spatels abgerieben wurden. Pro Platte wurden etwa 5 ml Tweenwasser eingesetzt. Die sporenhaltige Suspension konnte abpipettiert werden.

Die so gewonnenen Sporensuspensionen waren nicht lagerfähig. Die jeweilige Konzentration der Suspensionen konnte mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer mikroskopisch bestimmt werden.

2.4.9 Herstellung pilzlicher Protoplasten

- KCl/CaCl₂-Lösung: 1,2 M KCl, 50 mM CaCl₂, pH 5,5

- Enzymlösung: 60 mg Lysing Enzyme, 60 mg Driselase, 5 mg Lyticase, 4 mg BSA ad 10 ml KCl/CaCl₂-Lösung, sterilfiltriert
- 1 x STC: 1,33 M Sorbit, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Eine für 4-5 Tage angezogene Kultur von *F. graminearum* in PDB wurde über einen sterilen Büchnertrichter, der mit einem sterilen Filterpapier ausgelegt war, abfiltriert. Das Myzel wurde mit sterilem *A. dest.* und dann mit steriler KCl/CaCl₂-Lösung gewaschen. 0,5 g Myzefeuchtmasse wurden in einem sterilen 100ml-Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 10 ml der Enzymlösung bei 28 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Bildung von Protoplasten wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach ca. 3 h konnten die Protoplasten geerntet werden. Dazu wurde die Suspension zunächst über eine mit KCl/CaCl₂-Lösung gespülte Filternutsche mit der Porengröße 1 filtriert. Der Durchfluss wurde in einem sterilen Erlenmeyerkolben aufgefangen und dann über eine ebenfalls gespülte Filternutsche mit der Porengröße 2 gegeben. Das Protoplasten enthaltende Filtrat wurde in einem sterilen Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 1090 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten in KCl/CaCl₂-Lösung gewaschen. Die sedimentierte Protoplasten wurden für Transformationszwecke schließlich in 1 x STC aufgenommen und direkt in eine Transformation eingesetzt. Zur Extraktion von Proteinen wurden die Protoplasten in *A. dest.* mit 50 % Glycerin resuspendiert.

2.4.10 Dekontamination von bakteriell oder pilzlich verseuchtem Material

Alle Medien, Gerätschaften und sonstige Materialien, die Kontakt mit Mikroorganismen hatten, wurden vor ihrer Entsorgung oder Reinigung durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) dekontaminiert. Wieder zu verwendende Gerätschaften, die nicht autoklavierbar waren, wurden mit 1,5 % Helipur desinfiziert. Die Reinigung von Arbeitsflächen und Sterilbänken erfolgte durch Sprühdesinfektion mit Meliseptol.

2.4.11 *In vitro* - Interaktionsversuche

Zur Analyse von pilzlichen Interaktionen *in vitro* wurden ausgewählte Schimmelpilze in halbkonzentrierter Potatoe Dextrose Bouillon angezogen. Als Inokulum dienten Sporensuspensionen, wobei mit $1 - 5 \cdot 10^4$ Sporen / ml Medium von jedem Interaktionspartner angeimpft wurde. Die Experimente wurden als Doppelansatz im 2 ml-Maßstab in Kulturschalen durchgeführt. Die Schalen wurden während der Inkubation auf einem

Taumler bei 20 °C geschwenkt. Die Bebrütung erstreckt sich über ein bis vierzehn Tage. Zum Abernten wurde die Kultur in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und Myzel und Medium durch Zentrifugation voneinander separiert. Die Überstände wurden zunächst bei -20 °C gelagert und schließlich für die Mykotoxinanalyse eingesetzt. Die Myzelien wurden gefriergetrocknet und dann luftdicht verschlossen bei Raumtemperatur gelagert, bis die DNA-Extraktion erfolgte.

2.4.12 *In vivo* - Interaktionsversuche

Als *in vivo* - Interaktionsmodell wurde Winterweizen suboptimal, d.h. bei 20 °C und 20 % Feuchte gelagert. Diese Bedingungen simulieren Situationen in der Praxis z.B. nach feuchten Vegetationsperioden bzw. bei nicht ausreichender Trocknungskapazität für Getreide in landwirtschaftlichen Kleinbetrieben (Skriegan, 1989; Scudamore, 2005).

2.4.12.1 Lagerung von Weizenkörnern ohne natürliche mikrobielle Flora

Hierbei wurde Weizen (Sorte Drifter) aus integriertem Anbau des Erntejahres 2001 von dem Versuchsgut Frankenforst der Universität Bonn verwendet. Das Getreide war gereinigt, d.h. von Spreu und Samen der Begleitflora befreit. Um über genügend einheitliches Material für den gesamten Lagerversuch zu verfügen, musste das Getreide zu gleichen Gewichtsanteilen gemischt werden aus Weizen mit der Vorfrucht Weizen und aus Weizen mit der Vorfrucht Mais. 200 Körner wurden in CZID-Agar ausgelegt, um den Ausgangsbefall zu ermitteln (s. 2.5.3). Auftretende Fusarien wurden weiter differenziert (s. 2.5.4). Die Körner, die für den Lagerversuch eingesetzt werden sollten, wurden zunächst in 1,5 kg-Portionen (entspricht dem Volumen eines Ansatzes) autoklaviert, um die natürliche Flora zu beseitigen. Als Inokulationquelle der einzelnen Ansätze wurden Sporensuspensionen gewählt. Zuvor wurde von jedem Ansatz der Feuchtegehalt über die Trockenmasse bestimmt und die entsprechende Menge an sterilem Wasser bis zum Erreichen eines Feuchtegehalts von 20 % zugegeben. Einkalkuliert wurden hierbei auch die Mengen an Sporensuspensionen, mit denen die Körner inokuliert wurden. Jeder Schimmelpilz wurde mit 10^4 Sporen / 100 g Körner eingepflegt. Die Lagerung erfolgte in autoklavierten Spezialtüten, die lediglich gasdurchlässig, ansonsten jedoch undurchlässig sind.

Während der zwölfwöchigen Lagerung im Feuchtebrutschrank bei ca. 80 % Luftfeuchtigkeit und 20 °C wurden die Körner jeder Tüte wöchentlich gründlich

durchmischt. Alle zwei Wochen erfolgte unter sterilen Bedingungen die Probennahme zwecks Trockenmassebestimmung, Analyse des Körnerbefalls, Mykotoxinanalyse und DNA-Extraktion. Die Proben wurden in sterile Flüssigprobenbeutel abgefüllt und nach Entnahme des Materials zur Trockenmassebestimmung zunächst bei -20 °C gelagert.

2.4.12.2 Lagerung von Weizenkörnern mit natürlicher mikrobieller Flora

Der Weizen (Sorte Drifter) für diesen Lagerversuch stammt aus dem Erntejahr 2004 ebenfalls von dem Versuchsgut Frankenforst. Zur Bestimmung des Ausgangsbesatzes wurden 200 Körner in CZID-Agar ausgelegt und alle dabei gefundenen Fusarien bis zu ihrer Art bestimmt. Bei der Lagerung von Getreide mit natürlicher Flora wurden inokuliert, indem jeweils 25 % Körner untergemischt, die zuvor mit Sporen eines gewünschten Schimmelpilz inokuliert und zwei Wochen gelagert worden waren. Die Einstellung des Feuchtegehaltes erfolgt in der gleichen Weise wie zuvor beschrieben. Als Vergleichsansatz wurde auch Getreide gelagert mit natürlichem Feuchtegehalt, als Kontrollansatz wurde ein befeuchteter Ansatz nicht inokuliert. Die eigentliche Lagerung und Probennahme des Getreides wurde wie unter 2.4.12.1 beschrieben durchgeführt.

2.4.12.3 Ausgewählte Interaktionsmodelle für die *in vivo*-Versuche

Für die Lagerversuche mit Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora wurden die in Tabelle 5 dargestellten Kombinationen von jeweils zwei Getreide relevanten Schimmelpilzen ausgewählt, um den Einfluss mikrobieller Interaktionen auf die Mykotoxinbildung zu untersuchen.

Für die Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen und Schimmelpilze zur Inokulation ausgewählt.

Tabelle 5: Zusammenstellung der verschiedenen Interaktionsmodelle für die Lagerung von Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora

Interaktionsmodell	<i>F. graminearum</i> -Stamm	Interagierender Schimmelpilz
CBS	<i>F. graminearum</i> CBS 110250	/
Asp	/	<i>A. ochraceus</i> DSMZ 824
CBS/Alt	<i>F. graminearum</i> CBS 110250	<i>A. alternata</i> CBS 792.72
CBS/Pen	<i>F. graminearum</i> CBS 110250	<i>P. verrucosum</i>
CBS/Asp	<i>F. graminearum</i> CBS 110250	<i>A. ochraceus</i> DSMZ 824
Z3639/Alt	<i>F. graminearum</i> Z3639	<i>A. alternata</i> CBS 792.72
Z3639/Pen	<i>F. graminearum</i> Z3639	<i>P. verrucosum</i>
Z3639/Asp	<i>F. graminearum</i> Z3639	<i>A. ochraceus</i> DSMZ 824
GZT-33/Alt	<i>F. graminearum</i> GZT-33	<i>A. alternata</i> CBS 792.72
GZT-33/Pen	<i>F. graminearum</i> GZT-33	<i>P. verrucosum</i>
GZT-33/Asp	<i>F. graminearum</i> GZT-33	<i>A. ochraceus</i> DSMZ 824
GZT-40/Alt	<i>F. graminearum</i> GZT-40	<i>A. alternata</i> CBS 792.72
GZT-40/Pen	<i>F. graminearum</i> GZT-40	<i>P. verrucosum</i>
GZT-40/Asp	<i>F. graminearum</i> GZT-40	<i>A. ochraceus</i> DSMZ 824

Tabelle 6: Bedingungen und Schimmelpilze zur Inokulation für die Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora

Interaktionsmodell	Feuchtegehalt von 20 %	Inokulierter Schimmelpilz
oF	-	/
F	+	/
F+Z3639	+	<i>F. graminearum</i> Z3639
F+GZT-40	+	<i>F. graminearum</i> GZT-40
F+Alt	+	<i>A. alternata</i> CBS 795.72
F+Pen	+	<i>P. verrucosum</i>
F+Asp	+	<i>A. ochraceus</i> DSMZ 824

Legende zu Tabelle 6: - = ohne künstliche Befeuchtung ; + = Feuchtegehalt von 20 %

2.5 Klassische Methoden zur Analyse der Interaktionsmodellen

2.5.1 Trockenmassebestimmung

Um die Trockenmasse von Getreidekörnern zu bestimmen, wurden 10 bis 15 g Material in tarierte Glasschälchen eingewogen und diese für 4 h bei 133 °C getrocknet. Zum

Abkühlen wurden die Schälchen in einen Exsikkator gestellt, um die Aufnahme von Luftfeuchtigkeit zu verhindern. Die Trockenmasse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[\text{Rückwaage (g)} - \text{Masse der Glasschale (g)}] / \text{Einwaage (g)} = \text{TM (\%)}$$

In manchen Versuchen war es erforderlich, die Trockenmasse von Myzel aus Flüssigkulturen zu bestimmen. Als Vorbereitung wurden Papierfilter (595; Schleicher & Schuell) vorgetrocknet und vorgewogen. Die Myzelien wurden mittels dieser Filter vom Kulturmedium getrennt und auf den Filtern ÜN bei 80 °C getrocknet. In den Fällen, in denen das Kulturmedium Glycerin enthielt, wurde vor dem Trocknen mit 100 ml *A.dest* gewaschen, um in Myzel und Filter zurückgehaltenes Glycerin zu entfernen. Aus der Differenz des getrockneten Myzels zusammen mit dem Filter und dem Filter vor seinem Einsatz wurde die Trockenmasse des Myzels ermittelt.

2.5.2 Bestimmung der Wasseraktivität

Die Wasseraktivität wurde mit Hilfe eines Hygroskopes bestimmt. Die zu messende Probe wurde in einen speziellen Probenbecher bis zu einer Markierung gefüllt, wobei auf eine möglichst gleichmäßige Füllung und eine ebene Oberfläche geachtet wurde. Die Probe wurde für 2-3 h bei 19 °C in einem Schrank, in dem auch das Hygroskop platziert war, vortemperiert. Danach wurde der gefüllte Probenbecher in die Messzelle gestellt und die Messung mit dem Modus „aw-quick“ innerhalb von 6 Minuten durchgeführt.

2.5.3 Analyse des Körnerbefalls

Der Befall der Körner wurde durch Auslegen in CZID-Agar (s. 2.4.5) ermittelt. CZID-Agar enthält eine Reihe von Antibiotika zur Hemmung von bakterieller Begleitflora.

Um Mikroorganismen, die an der Oberfläche der Körner haften, abzutöten, wurde eine Oberflächendesinfektion in 3 %iger Na-Hypochloritlösung durchgeführt. Dazu wurden ca. 15 g einer homogenen Weizenprobe für 3 min in der Hypochloritlösung gebadet und anschließend zweimal für je 1 min in sterilem *A.dest.* gewaschen. Eine Benetzung der Körner konnte durch Rühren mit Hilfe eines Glasstabes erzielt werden.

Die so vorbehandelten Körner wurden schließlich in den auf Petrischalen verteilten, noch flüssigen CZID-Agar gesetzt, wobei 5 Körner / Platte ausgelegt wurden. Die Bebrütung

erfolgt mit der Oberseite nach oben bei Raumtemperatur für 7 bis 10 Tagen. Zur besseren Pigmentausbildung kann für 12 h / Tag mit Schwarzlicht inkubiert werden.

2.5.4 Artbestimmung von Fusarien

Alle Fusarien, die sich nach Auslegen von Körnern entwickelten, wurden mikroskopisch anhand ihrer Makrokonidien bis zu ihrer Art bestimmt. Dazu wurden sie auf PDA und SNA überimpft. Nach 14 Tagen Bebrütung bei Raumtemperatur zeigten die Schimmelpilze auf PDA ihre arttypische Pigmentierung. Die bei Wachstum auf SNA gebildeten Sporen wurden mikroskopiert. Anhand ihrer Ausprägung und der Pigmentierung der Pilzkolonien konnten die Arten bestimmt werden.

2.5.5 Extraktion von Deoxynivalenol aus Probenmaterial

Überstände aus Flüssigkulturen konnten direkt in den ELISA-Test eingesetzt werden. Aus Körnerproben musste DON extrahiert werden. Dazu wurde 5 g Mehl aus den Körnern mit 25 ml *A. dest.* versetzt und 3 min auf einem Schüttler in horizontaler Position kräftig geschüttelt. Der Extrakt wurde durch einen Faltenfilter (595 ½, Schleicher & Schuell) filtriert. Das Filtrat wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

2.5.6 Extraktion von Zearalenon aus Probenmaterial

Angelehnt an die dem Zearalenon-ELISA beiliegenden Vorschrift zur Vorbereitung von Bier wurden die Überstände aus Flüssigkulturen 1:5 mit Probenverdünnungspuffer des Zearalenon-ELISAs verdünnt. Für die Extraktion aus Getreideproben wurden 5 g Mehl mit 25 ml eines 70:30 Methanol/Wasser-Gemisches versetzt und 3 min in horizontaler Lage kräftig geschüttelt. Der Ansatz wurde über einen Faltenfilter (595 ½, Schleicher & Schuell) filtriert. Das Filtrat wurde 1:7 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt.

2.5.7 Extraktion von Ochratoxin A aus Probenmaterial

Die Extraktion von Ochratoxin A aus Kulturüberständen erfolgte nach der für Bier vorgesehenen Vorschrift des Ochratoxin A-ELISAs. 2 ml Überstand wurden mit 2,5 ml 1 N HCl und 4 ml Dichlormethan versetzt und 5 min in horizontaler Lage geschüttelt. Eine

Phasentrennung wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 3500 rcf erreicht. Nach Entfernen der oberen wässrigen Phase wurde die untere Phase und der intermediäre Probenkuchen über einen Faltenfilter (595 ½, Schleicher & Schuell) filtriert. Die Dichlormethanphase wurde aufgefangen und mit 2 ml 0,13 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (pH 8,1) für 5 min ausgeschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase abgenommen. Das Ausschütteln wurde wiederholt und beide wässrige Phasen wurden vereint. Nach Zugabe von 0,75 ml 1 N HCl und 2 ml Dichlormethan wurde der Ansatz 10 min geschüttelt, anschließend erneut zentrifugiert und die untere Dichlormethanphase bei 60 °C bis zur Trockene eingengt. Die Rückstände wurden in 1 ml 0,13 M Natriumhydrogencarbonatpuffer gelöst.

Für die Extraktion von Ochratoxin A aus Getreide wurden 2 g Mehl mit 5 ml 1 N HCl für 5 min und nach Zugabe von 10 ml Dichlormethan nochmals für 15 min in horizontaler Lage geschüttelt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 3500 rcf konnte die obere wässrige Phase verworfen werden. Die untere Phase wurde mit dem Probenkuchen über einen Faltenfilter (595 ½, Schleicher & Schuell) filtriert. Zum Durchfluss wurde das gleiche Volumen 0,13 M Natriumhydrogencarbonatpuffer pH 8,1 hinzugefügt und der Ansatz für 15 min geschüttelt. Nach Zentrifugation wurden 100 µl der oberen Phase mit 400 µl Natriumhydrogencarbonatpuffer verdünnt.

2.5.8 Immunologische Quantifizierung von Deoxynivalenol, Zearalenon und Ochratoxin A

Die Gehalte an Deoxynivalenol, Zearalenon und Ochratoxin A von Kulturüberständen oder von Getreideproben wurde mit kompetitiven ELISAs (Fa. R-biopharm) bestimmt. Bei einem kompetitiven ELISA konkurriert das Antigen der Probe mit einem hinzugefügten freien, enzymmarkierten Antigen (Enzymkonjugat) um die Antikörper-Bindungsstellen. Das Enzymkonjugat setzt ein im weiteren Testverlauf zugegebenes Chromogen zu einem bestimmten Farbstoff um. Die Menge des gebildeten Farbstoffes ist dabei abhängig von der Menge des gebundenen Enzymkonjugates und wird photometrisch über die Extinktion bestimmt. Die Extinktion ist umgekehrt proportional zur Toxin-Konzentration der Probe (R-Biopharm AG, 2002).

Die Durchführung entsprach den Anweisungen des Herstellers. Sofern erforderlich wurden bestimmte Proben zur Analyse des ZEA-Gehaltes mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Die Absorptionsmessung der Mikrotiterplatten erfolgte in einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm. Bei jedem ELISA-Test wurden mitgelieferte Standards, teilweise in Doppelbestimmung, mitgeführt, deren Absorptionswerten der Erstellung einer Eichgeraden dienen.

2.6 Molekulargenetische Methoden

2.6.1 Isolierung chromosomaler DNA aus pilzlichem Myzel

Ca. 50 mg lyophilisiertes Myzel aus einer Reinkultur wurden mit sterilen Glaskügelchen in flüssigem Stickstoff mittels eines Mörsers pulverisiert. Das Pulver wurde in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und in 1 ml Lysispuffer ATL (aus DNeasy®Tissue Kit, Fa. Qiagen) aufgenommen. Nach gründlichem Durchmischen wurde der Ansatz für 1,5 h bei 68 °C im Heizblock inkubiert. Die DNA wurde in einer anschließenden Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt.

2.6.2 Quantitative Isolierung von DNA aus geringen Mengen pilzlichen Myzels

Das lyophilisierte Myzel wurde in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe einer Spatelspitze steriler Glaskügelchen wurde der Ansatz mit Hilfe des Eppi-Pistills pulverisiert, wobei das Reaktionsgefäß immer wieder in Flüssigstickstoff getaucht wurde. Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem DNeasy®PlantMini-Kit (Fa. Qiagen). Nach gründlicher Pulverisierung des Myzels wurden dem Ansatz 400 µl AP1-Puffer (aus dem Kit) zugegeben. Zur Vermeidung von Verlusten wurde der Pistill in der Suspension abgespült. Im weiteren wurde nach dem Protokoll des Kits vorgegangen. Die Elution der DNA erfolgte in einem ersten Schritt mit 200 µl des Elutionspuffers und in einem zweiten Schritt mit 100 µl Elutionspuffer. Die vorliegende DNA wurde bei –20 °C gelagert.

2.6.3 Isolierung pilzlicher DNA aus Weizenkörner-Proben

Die Isolierung von Pilz-DNA aus Weizenkörner-Proben erfolgte nach Niessen und Vogel (1998) mit Hilfe des DNeasy®Tissue-Kit (Fa. Qiagen). Dazu wurden 10 g Körnermaterial in sterile 50 ml-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 15 ml Lysispuffer ATL versetzt. Mit einer dreiminütigen Ultraschallbehandlung mit dem Ultraschallstab auf Eis wurden Pilzzellen von den Weizenkörnern abgelöst und lysiert. 5 ml des Überstandes wurden in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 100 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) bei 55 °C für 45 min inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 ml eiskaltem 96%igem Ethanol wurde der Ansatz gründlich gevortext. Ein QIASpin-Säulchen des Kits wurde zweimal mit 500 µl des Ansatzes beschickt, wobei es jeweils 1 min bei 5800 rcf in einem Sammelgefäß zentrifugiert wurde. Das Säulchen mit der gebundenen DNA wurde in ein

frisches Sammelgefäß übertragen und mit 500 µl des Puffer AW1 bei 5800 rcf 1 min sowie anschließend mit 500 µl des Puffers AW2 bei 16100 rcf 3 min gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß durch zweimaliges Durchzentrifugieren (5800 rcf, 1 min) von je 100 µl Puffer AE nach jeweils einminütiger Inkubation. Die DNA-Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.6.4 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Um Plasmide aus *E.coli* zu gewinnen, wurden 5 ml-Flüssigkulturen in LB-Medium mit evt. Zusatz erforderlicher Antibiotika ÜN bei 37 bzw. 30 °C angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 16100 rcf in einem 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde nach der Protokollvorschrift des QIAprep®Spin Miniprep-Kits zur Plasmidisolierung eingesetzt. Die Elution erfolgte immer mit 30-50 µl sterilem Reinstwasser.

2.6.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die betreffenden Fragmente mit einer Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht, mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein vorgewogenes 2ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Elution der DNA aus dem Gelstückchen erfolgte mit Hilfe des QIAquick®Gel Extraction-Kits (Fa. Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA von den zu verwendenden Säulchen erfolgte immer mit 30-50 µl Reinstwasser.

2.6.6 Reinigung von DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion

Um Protein- und RNA-Verunreinigungen aus einem DNA-Ansatz zu entfernen, wurde dieser mit 1 Vol Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und kräftig gevortext. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz 5 min bei 16100 rcf zentrifugiert und die obere wässrige Phase abgenommen ohne die Phasengrenze, wo sich Proteine sammeln, zu stören. Mit der oberen Phase wurde die Extraktion zweimal wiederholt. Zur Entfernung von Phenolresten wurde der Ansatz mit 1 Vol Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Es schloss sich eine DNA-Fällung an.

2.6.7 DNA-Fällung

- Na-Acetat: 3 M Na-Acetat, pH 5,2

Zur Fällung von DNA wurde der Ansatz mit 2,5 Vol eiskaltem Ethanol und 0,1 Vol Na-Acetat vermischt und ÜN bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Danach wurde der Ansatz für 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 20800 rcf zur Sedimentation der DNA zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und bei RT für 20 min bei 16100 rcf sedimentiert. Nach Trocknung bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ für max. 5 min wurde die DNA in einem geeigneten Puffer aufgenommen.

2.6.8 Fotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die gelöste DNA wurde 1:100 verdünnt in einer Quarzküvette in dem Fotometer bei 260 nm sowie 280 nm bezüglich ihrer Absorption gemessen. Der Reinheitsgrad ergibt sich aus dem Verhältnis von A_{260} zu A_{280} , wobei ein Wert von 1,8 optimal ist. Ein Wert von >2 deutet auf RNA-Verunreinigungen hin, ein Wert von $< 1,5$ auf Proteinverunreinigungen. Bei einem Absorptionswert von 1 bei 260 nm gilt eine Konzentration von $50\text{ }\mu\text{g}$ doppelsträngige DNA/ml. Die Konzentration wurde anhand folgender Formel berechnet (Sambrook *et al.*, 2001):

$$C [\text{ng}/\mu\text{l}] = E_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.6.9 Amplifizierung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

2.6.9.1 Auswahl der Oligonukleotide

Für den Einsatz in die Polymerasekettenreaktion vorgesehene Oligonukleotide sollten in ihrem GC-Gehalt der Ziel-DNA angepasst sein und keine Polypyrimidine- oder purine enthalten, damit die Bildung von Sekundärstrukturen vermieden wird (Innis und Gelfand, 1990). Die Länge der Oligonukleotide sollte zwischen 18 und 28 Basen liegen. Primerpaare sollten hinsichtlich ihrer Schmelztemperatur ähnlich sein.

2.6.9.2 Schmelztemperatur von Oligonukleotiden

Die Schmelztemperatur ist abhängig von der Länge und der Basenzusammensetzung des Oligonukleotids. Eine Abschätzung kann mit folgender Formel erzielt werden:

$$\text{Schmelztemperatur } T_m (\text{°C}) = 2 \times (N_A + N_T) + 4 \times (N_G + N_C)$$

wobei N die Anzahl der jeweiligen Base in dem Oligonukleotid ist (Papandrikopoulou, 1991). Anhand der Schmelztemperaturen eines Primerpaares wird die Anlagerungstemperatur während der Polymerasekettenreaktion um 2-5 °C niedriger gewählt.

2.6.9.3 PCR im Thermocycler

Zur Amplifizierung von Regionen plasmidcodierter DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) im Thermocycler (Mastercycler 5330, Eppendorf) durchgeführt. Die Ansätze hatten ein Endvolumen von 50 µl und enthielten 0,1-0,5 µg DNA, je 50 pmol der Oligonukleotide, die Desoxynukleotide dATP, dTTP, dCTP und dGTP in einer Endkonzentration von 200 µM, MgCl₂ in Konzentrationen zwischen 1-5 mM, 5 µl eines 10xPuffers und 2,5 Einheiten *Taq*-Polymerase. Um Verdunstungsverluste zu vermeiden, wurden alle Ansätze mit sterilem Mineralöl überschichtet. Eine typische PCR verlief nach folgendem Programm:

- Initialdenaturierung bei 95 °C für 5 min
- 35 Zyklen Amplifikation mit Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primeranlagerung für 30 s bei variabler Temperatur in Abhängigkeit der eingesetzten Oligonukleotide, Synthese bei 72 °C für 1 min/kb
- verlängerte Synthesephase bei 72 °C für 5 min
- Kühlphase bei 4°C evt. ÜN

2.6.9.4 PCR aus Kolonien

- TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Zur Amplifizierung von Regionen chromosomal codierter DNA aus Bakterien wurde eine einfache Zellyse durchgeführt. Das Zellmaterial eines 0,5 cm langen Impfstriches von einer Agarplatte wurde in 20 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 16100 rcf für 1 min wurde das gereingte Pellet erneut in 20 µl TE-Puffer aufgenommen. Durch 5 minütige Inkubation bei 100 °C im Heizblock lysierten die Zellen und DNasen wurden

denaturiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 16100 rcf konnte der klare Überstand in die unter 2.5.9.3 beschriebene PCR mit 1 µl eingesetzt oder bei –20 °C gelagert werden.

2.6.9.5 PCR zur Fusionierung zweier DNA-Fragmente

Für die Fluoreszenzmarkierung von *E. coli* und *B. subtilis* war es erforderlich, die Fluoreszenz vermittelnden Gene *ecfp*, *dsred* bzw. *gfp* mit einer Promotorstruktur zu verknüpfen. Zu diesem Zweck wurden die beiden Fragmente, Fluoreszenzgen und Promotor, über komplementäre überlappende Sequenzen am Ende des Promotorfragmentes und am Anfang des Fluoreszenzgenes in einer speziellen PCR verbunden. Beide Fragmente wurden zusammen in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß für 10 min bei 95 °C denaturiert. Durch anschließende Inkubation auf Eis lagerten sich die beiden Fragmente an den überlappenden Sequenzen an. Nach Zugabe von Puffer, Desoxynukleotiden, MgCl₂ und *Taq*-Polymerase wurden in einem kurzen PCR-Programm die entstandenen teilweise noch einsträngigen DNA-Stücke in zweisträngige DNA-Moleküle überführt. Das PCR-Programm umfasste eine 3 min Synthesephase gefolgt von einem Zyklus von Denaturierung (1 min 95 °C), Annealing (1min 55 °C) und Synthese (1 min 72 °C), der siebenmal wiederholt wurde. Danach wurden Oligonukleotide zugegeben und zwar der 5'-Primer der Promotorstruktur und der 3'-Primer des Fluoreszenzgens, die die begrenzenden Primer des nun vorliegenden Fusionsproduktes aus Promotor und Fluoreszenzgen darstellen. In einer abschließenden PCR wurde das Fusionsprodukt amplifiziert, wobei es sich nun um eine übliche PCR wie unter 2.6.9.3 beschrieben handelte.

2.5.9.6 Quantitative PCR im LightCycler™

Die Quantifizierung von DNA erfolgte mittels realtime-PCR. Die während der PCR amplifizierte DNA wurde mit dem sich in doppelsträngige DNA einlagernden fluoreszierenden Farbstoff SYBRGreen I nach jedem Amplifikationszyklus detektiert. Die Ansätze hatten ein Endvolumen von 20 µl und enthielten außer DNA je 20 pmol der Primer sowie eine im verwendeten LightCycler®FastStart DNA Master^{PLUS} SYBRGreen I-Kit enthaltene Reagenzienmischung aus Puffer, MgCl₂, dNTPs und SYBRGreen I, die vor Gebrauch mit FastStart*Taq*-DNAPolymerase versetzt wurde. Die Ansätze wurden in Glaskapillaren in den LightCycler® eingesetzt, wodurch die Fluoreszenzmessung und schnelle Temperaturänderungen möglich sind. Mit der zum LightCycler® gehörigen

Software können PCR-Programme gestaltet werden. Die hier verwendeten Programme umfassten stets vier Stufen: Denaturierung, Amplifikation, Schmelzen und Kühlen.

Tabelle 7 stellt sie für die in der quantitativen PCR verwendeten Primer UBC-85 exemplarisch dar.

Tabelle 7: Protokoll der realtime PCR zur Quantifizierung genomischer DNA von *F. graminearum*

Denaturierung							
Zyklenzahl: 1							
Typ: keiner							
Segment-anzahl	Zieltemperatur [°C]	Halte-Zeit [s]	Neigung [°C/s]	2° Zieltemperatur [°C]	Schritt-Größe [°C]	Schritt-Verzögerung [Zyklen]	Annahmemodus
1	95	600	20	0	0	0	keiner
Amplifizierung							
Zyklenzahl: 45							
Typ: Quantifizierung							
Segment-anzahl	Zieltemperatur [°C]	Halte-Zeit [s]	Neigung [°C/s]	2° Zieltemperatur [°C]	Schritt-Größe [°C]	Schritt-Verzögerung [Zyklen]	Annahmemodus
1	95	5	20	0	0	0	keiner
2	60	5	20	0	0	0	keiner
3	72	20	20	0	0	0	einfach
Schmelzen							
Zyklenzahl: 1							
Typ: Schmelzkurven							
Segment-anzahl	Zieltemperatur [°C]	Halte-Zeit [s]	Neigung [°C/s]	2° Zieltemperatur [°C]	Schritt-Größe [°C]	Schritt-Verzögerung [Zyklen]	Annahmemodus
1	95	0	20	0	0	0	keiner
2	60	10	20	0	0	0	keiner
3	95	0	0,1	0	0	0	kontinuierlich
Kühlen							
Zyklenzahl: 1							
Typ: keiner							
Segment-anzahl	Zieltemperatur [°C]	Halte-Zeit [s]	Neigung [°C/s]	2° Zieltemperatur [°C]	Schritt-Größe [°C]	Schritt-Verzögerung [Zyklen]	Annahmemodus
1	40	30	20	0	0	0	keiner

2.6.10 Enzymatische Manipulation von DNA

2.6.10.1 Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurde mit den vom Hersteller dazugelieferten Puffern bei den empfohlenen Temperaturen durchgeführt. Bei gleichzeitigem Verdau mit zwei Enzymen wurde ein für beide verträglicher Puffer ausgewählt. Die Verdauzeiten erstreckten sich über 1 h bis ÜN je nach Aktivität des Enzyms und eingesetzter DNA-Menge. Falls erforderlich und möglich wurde die Enzymaktivität nach Abschluss des Verdau nach Herstellerangaben durch Hitze inaktiviert.

2.6.10.2 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Zur Vermeidung der Religation von Klonierungsvektoren wurden diese mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Das Enzym wurde mit zugehörigem Puffer direkt dem hitzeinaktivierten oder vorher aufgereinigten Verdau zugegeben und mindestens für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung der DNA erfolgte entweder durch Gelelektrophorese oder mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Fällung der DNA.

2.6.10.3 Ligation

Für die Ligation von DNA-Inserts in Klonierungsvektoren wurden 3 Einheiten Ligase eingesetzt. Das Ansatzvolumen variierte von 10-20 µl. Die Ligation erfolgte bei 6°C ÜN. Anschließend wurde der Ansatz in eine Transformation eingesetzt.

2.6.11 Qualitative Analyse von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

- TAE-Puffer (1x): 40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0
- Beschwererpuffer: 20 % Ficoll400, 0,1 M EDTA, 1 % SDS, 0,25 % Bromphenolblau, pH 8,0

Bei der Gelelektrophorese dient ein Agarosegel zur Auftrennung von DNA in einem elektrischen Feld, wobei die Wandergeschwindigkeit der DNA-Fragmente von ihrer Größe

und Gestalt sowie von der Porengröße des Gels abhängt. Es wurde 1%ige TAE-Gele hergestellt, für die eine entsprechende Menge an Agarose in 1xTAE-Puffer erhitzt wurde. Die homogene Gellösung wurde nach Abkühlen auf 50 °C in spezielle Gelkammern gegossen. Nach Erstarren und Überschichten mit 1xTAE-Puffer als Laufpuffer konnten in die Probenauftragstaschen die zu analysierenden DNA-Fragmente pipettiert werden. Dazu wurden die Proben mit 0,1 Vol Beschwererpuffer versetzt, der gleichzeitig als Marker für die Laufgeschwindigkeit der Elektrophorese diente. Zum späteren Längenvergleich der detektierten DNA-Banden wurde ein DNA-Längenstandard mit Fragmenten bekannter Größe mit in der Elektrophorese eingesetzt. Es wurde ein sogenannter 1kb-Marker oder ein 100 bp-Marker verwendet. Für die Elektrophorese wurden für ca. 1 h an das Gel 70-80 Volt Spannung angelegt. Die Sichtbarmachung der aufgetrennten DNA erfolgte mit einer Ethidiumbromidfärbung.

2.6.12 Detektion von DNA in Agarosegelen

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (10 mg Farbstoff/ml) für 3 min unter Lichtausschluss angefärbt. Nach 3 minütigem Waschen in Leitungswasser wurde das Gel auf einem Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt. Die von dem in der DNA interkalierten Ethidiumbromid ausgehende Fluoreszenz wurde über eine Videoanlage (Fa. INTAS) dokumentiert. Sollte die DNA für eine weitere Verwendung aus dem Gel extrahiert werden, so wurde nur UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm eingesetzt, um Mutationen der DNA einzudämmen.

2.6.13 Transformation von DNA

2.6.13.1 Transformation von *E.coli* DH5 α

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmiden erfolgte mittels Hitze bei Verwendung CaCl₂-kompetenter Zellen. 100 μ l der auf Eis aufgetauten Zellen wurden mit dem einzubringenden Plasmid z.B. in Form eines Ligationsansatzes vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die eigentliche Transformation erfolgte während eines 90 s dauernden Hitzepulses bei 42 °C. Die Zellen wurde anschließend sofort für 2 min auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 500 μ l 2xYT-Bouillion wurden die Zellen bei 37°C bzw. bei temperatursensitiven Plasmiden bei 30 °C für 1,5 h inkubiert, um sie zu regenerieren. Danach wurden Aliquots von 100 μ l auf Selektivnährböden ausplattiert. Falls möglich wurde eine Blau/Weiß-Selektion auf IPTG/X-Gal-haltigen Platten angewendet.

2.6.13.2 Elektrotransformation von *B. subtilis*

Die Transformation von *B. subtilis* mit Plasmiden erfolgte mittels Elektropuls, wobei elektrokompetente Zellen eingesetzt wurden. 30-80 µl Zellen wurden mit 2-4 µl Plasmid vermischt, für 1 min auf Eis inkubiert und dann in einer kalten Elektroporationsküvette einem Puls mit variabler Spannung und Dauer ausgesetzt. Unmittelbar nach dem Puls wurden die Zellen mit 1 ml vorgewärmten Recovery-Medium versetzt und zur Regeneration für 3 h bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Je 100 µl der Zellsuspension wurden auf antibiotikahaltigen Nährböden ausplattiert und bei 30 °C ÜN inkubiert.

2.6.13.3 Transformation von *F. graminearum*

- 1 x STC: 1,33 M Sorbit, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 2 x STC : 2,66 M Sorbit, 100 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
- PEG 6000 : 12,5 g Polyethylenglykol 6000, 10 mM Tris-HCl, 50 mM CaCl₂, pH 7,5
- Regenerationsmedium : 2 x Regenerationsmedium und 1,6 M Saccharose zu gleichen Teilen nach dem Autoklavieren mischen
- 2 x Regenerationsmedium: 2,0 g Hefeextrakt, 2,0 g Casein Hydrolysat, 32,0 g Agar ad 1000 ml *A. dest.*
- Overlay-Medium: Regenerationsmedium mit Hygromycin B in einer Konzentration von 450 µg/ml

Protoplastierte Pilzzellen wurden in eine Transformation mit Polyethylenglykol eingesetzt. Die in Lösung vorliegende einzuschleusende DNA wurde mit sterilem Reinstwasser auf ein Volumen von 50 µl gebracht und mit 50 µl 2 x STC versetzt. Dazu wurden 50 µl der in 1 x STC vorliegenden Protoplasten und 40 µl PEG 6000 pipettiert. Nach Mischen wurde der Ansatz für 25 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 1,6 ml PEG 6000 durch Vortexen untergemischt und der Ansatz abermals für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 3,2 ml 1 x STC und gründlichem Vortexen wurden 100 µl-Aliquots auf Regenerationsmedium (ca. 20 ml/Platte) ausplattiert. Nach ÜN-Inkubation bei RT wurden die Platten mit je 10 ml Overlay-medium überschichtet, so dass sich für Hygromycin B eine Endkonzentration von 150 µg/ml ergab. Die Inkubation der Platten erfolgte bei RT, wobei in der Regel 5 Tage bis zum Auftreten von Kolonien vergingen.

2.7 Detektion der Fluoreszenz von GFP, ECFP und DsRed bei Bakterien und Pilze

2.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an den Mikroskopen Olympus BH2 und Leica DMRP durchgeführt. Für die Detektion der Fluoreszenz von GFP und ECFP wurden UV-Filter verwendet. DsRed-Fluoreszenz wurde mit RG-Filtern detektiert. An dem Leica-Mikroskop bestand die Möglichkeit, Bilder über einen angeschlossenen Computer festzuhalten. Über die Software konnten Parameter wie Kontrast und Helligkeit manuell eingestellt werden. Die Eigenbewegung der Bakterienzellen erwies sich insofern als problematisch, als dass je nach Belichtungszeit bei der Aufnahme die Zellumrisse unscharf wurden. Besonders beweglich zeigte sich *B. subtilis*, so dass hier statt der sonst angefertigten Nativpräparate in Wasser Zellmaterial in Glycerin möglichst homogen verteilt wurde. Beide Mikroskope waren für die Mikroskopie von Pilzen nur begrenzt geeignet. Bei starker Vergrößerung konnten die Strukturen nicht scharf abgebildet werden.

2.7.2 Aufnahme von Emissionsspektren von fluoreszierenden Bakterien

Von fluoreszierenden *E. coli* - und *B. subtilis*-Mutanten, die ÜN auf Platten gewachsen waren, wurde Zellmaterial in Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, 600 mM NaCl pH 8,0) resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ zwischen 0,05 und 0,1 eingestellt. Die Proben wurden in einem Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer, LS 50B) entsprechend der Anregungswellenlänge für GFP mit einer Wellenlänge von 395 nm angeregt und die Emission über einen Bereich von 420 bis 800 nm aufgenommen. GFP emittiert bei 509 nm Fluoreszenzlicht.

2.8 Methoden zur Proteinanalyse

2.8.1 Gewinnung von Pilzmyzel zur Proteinextraktion

Pilzmyzel für die Proteinextraktion wurde in Flüssigkulturen gewonnen. Die Schimmelpilze wurden dazu in PDB für mehrere Tage kultiviert und dann über einen Faltenfilter (595 ½ Schleicher & Schuell) vom Medium getrennt. Das im Filter verbliebene Myzel wurde

zweimal mit sterilem *A. dest.* gewaschen und falls erforderlich, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Probenbechern gelagert.

2.8.2 Proteinextraktion aus Schimmelpilzen

- PBS-Puffer: 0,9 % NaCl in 0,1 M K_2HPO_4 , 0,1 M KH_2PO_4 pH 7,0
- Acetonlösung: 10 % TCA, 0,3 % DTT in Aceton
- Lysispuffer: 8-9 M Harnstoff, 4 % CHAPS, 1 % DTT; der Puffer kann nicht gelagert werden und darf nicht über $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt werden, unter $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kristallisiert der Harnstoff aus; statt 9M Harnstoff wurden auch 7 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff eingesetzt

Die Extraktion von Proteinen erfolgte durch Zellaufschluss und anschließende Proteinfällung und Reinigung. Für den Zellaufschluss mittels Ultraschall oder French Press mussten 3-7 g Pilzmyzel eingesetzt werden, um das Mindest-Probenvolumen zu erreichen. Für den Aufschluss durch Mörsern wurden lediglich 0,5-2 g (Nassgewicht) benötigt. Da die Extraktion von Proteinen aus pilzlichem Material in der vorliegenden Arbeit erarbeitet wurde, wird hier auf eine tiefer gehende Darstellung der Methode verzichtet, da dies als Ergebnis präsentiert wird.

2.8.3 Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung von gelösten Proteinen wurde mit Hilfe eines Proteinassays (Biorad) durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Methode von Bradford (1976). Dabei wird die Absorptionsänderung von Coomassie Brilliant Blue G250 aufgrund der Bindung an Proteine gemessen. Der Assay eignet sich als low concentration-Assay für Lösungen mit Proteinkonzentrationen im Bereich von 1,25-25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Hohe Konzentrationen an Harnstoff in der zu quantifizierenden Proteinlösung wurden durch Verdünnung auf eine für die Methode verträgliche Konzentration (6 M) abgesenkt. Jede Proteinlösung wurde in drei Verdünnungen (1:100, 1:200 und 1:500) eingesetzt. In Halbmikroküvetten wurden zu je 800 μl verdünnte Proteinlösung 200 μl Farbkonzentrat zugegeben und mit einem Rührspatel gut vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand von Standards (0, 5, 10, 15, 20 und 25 μg BSA/800 μl) konnten aus den gemessenen Absorptionen die Proteinkonzentrationen berechnet werden.

2.8.4 Proteinreinigung

- IEF-Puffer: 9,8 M Harnstoff, 4 % CHAPS, 1 % DTT, 0,2 % Carrier Ampholyte; der Puffer darf nicht über 30 °C erwärmt werden und nur einmal eingefroren und wieder aufgetaut werden, bei RT ist er nicht lagerfähig

Für den Einsatz in die isoelektrische Fokussierung müssen Proteinlösungen möglichst frei von Lipiden, DNA, RNA, Polysacchariden und vor allem Salzen sein. Um dies zu gewährleisten, wurden die Proteinproben mit einem 2D-Cleanup-Kit (Fa. Amersham) aufgereinigt. Vom Prinzip umfasst die Methode eine quantitativen Fällung mit anschließender schrittweiser Entfernung von Kontaminanten. Da in der Regel mehr als 100 µg Protein gereinigt wurden, wurde nach Protokoll B der Herstellerangaben vorgegangen. Die präzipitierten Proteine wurden in IEF-Puffer aufgenommen. Die Solubilisierung erfolgte über 1 h bei RT mit einer 3 minütigen Ultraschallbehandlung.

2.8.5 2D-Gelelektrophorese

2.8.5.1 Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrische Fokussierung wandert ein Protein in einem immobilisierten pH-Gradienten entsprechend seiner Nettoeigenladung in einem angelegten Spannungsfeld Richtung Anode oder Kathode. Dabei ändert sich seine Eigenladung in Abhängigkeit vom pH-Wert. Wird schließlich ein pH-Wert erreicht, an dem die Nettoladung neutral ist, bewegt sich das Protein nicht mehr. Es bleibt an seinem isoelektrischen Punkt liegen. Bei einer Auftrennung von Proteingemischen bleibt jedes Protein an seinem spezifischen isoelektrischen Punkt stehen. Die isoelektrische Fokussierung wurde in einer IEF-Cell der Fa. Biorad durchgeführt. Als Matrix für den pH-Gradienten wurden IPG-Streifen (Fa. Biorad) eingesetzt. Dies sind auf schmale Plastikstreifen aufgebrachte dehydrierte Gele mit eingearbeitetem pH-Gradienten (z.B. pH 3-10 oder pH 5-8). Die Länge der Streifen betrug 7 cm oder 17 cm. Die Proteinproben wurden durch aktive Rehydrierung aufgetragen. Dazu wurden in die Spuren einer IEF-Schale die vorgeschriebenen Volumina der entsprechenden Proteinproben pipettiert, gleichmäßig verteilt und die IPG-Streifen nach Entfernen der Schutzfolie mit der Gelseite nach unten aufgelegt. Um Verdunstungsverluste zu vermeiden, wurden die Streifen mit Mineralöl überschichtet. Die Rehydrierung erfolgte mit einer Stromstärke von 50 µA/Streifen bei einer konstanten Temperatur von 20 °C ÜN in der IEF-Cell. Im Anschluss an die Rehydrierung wurden

angefeuchtete Filterpapiere als Auffangmöglichkeit von Ionen an Anode und Kathode unter die IPG-Streifen gelegt und die isoelektrische Fokussierung gestartet. Dieser Prozess wurde über Programme gesteuert, die anhand von Standardprogrammen für die zu analysierenden Proteinproben optimiert wurden. Je nach Länge und pH-Wert der Streifen wurden die in Tabelle 8 dargestellten Programme gewählt.

Tabelle 8: Programme zur isoelektrischen Fokussierung von Proteinproben in immobilisierten pH-Gradienten

Ablauf	7 cm-IPG-Strip (pH 3-10, pH 4-7)	17 cm-IPG-Strip (pH 3-10, pH 5-8)	17 cm-IPG-Strip (pH 3-6)	17 cm-IPG-Strip (pH 4,7-5,9)
Schritt 1	250 V, 20 min	250 V, 20 min	250 V, 20 min	250 V, 15 min
Schritt 2	4000 V, 2 h	10000 V, 3 h	10000 V, 3 h	10000 V, 2 h
Schritt 3	4000 V, 18000 Vh	10000V, 60000 Vh	10000V, 35000 Vh	10000 V, 40000 Vh
Schritt 4	/	500 V, 15 h	500 V, 15 h	500 V, 15 h

Nach Beendigung der Fokussierung konnten die IPG-Streifen in einer Aufbewahrungsschale bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert werden oder aber sofort äquilibriert und in die zweite Dimension eingesetzt werden.

2.8.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese als zweite Dimension

- Äquilibrierungspuffer: 18 g Harnstoff, 15 g Glycerin, 1 g SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,8 ad 50 ml Reinstwasser; der Puffer ist bei RT zwei Wochen haltbar
- Äquilibrierungspuffer I: 100 mg DTT ad 10 ml Äquilibrierungspuffer; vor Gebrauch frisch anzusetzen
- Äquilibrierungspuffer II: 400 mg Iodacetamid ad 10 ml Äquilibrierungspuffer; vor Gebrauch frisch anzusetzen
- Laufpuffer: 3 g Tris-Base, 14,4 g Glycin, 1 g SDS ad 1000 ml *A. dest.*
- Overlayagarose: 0,5 % low melting point Agarose, 0,003% Bromphenolblau in Laufpuffer

Proteine in einem Gemisch können in einer Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrer Größe und ihrer Ladung aufgetrennt werden. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins von der Porengröße des Gels ab. Generell wandern kleine

Proteine schneller als große. Die Porengröße des Gels wird bestimmt durch den Prozentsatz an Acrylamid und Bisacrylamid im Gel, die sich quervernetzen und eine Siebstruktur ausbilden. Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine vorher denaturiert und durch Zusatz von SDS negativ geladen, so dass bei dieser Elektrophorese lediglich nach Größe getrennt wird. Ein gleichzeitig mit den Proben aufgetrennter Proteinmarker mit Proteinen bekannter Größe erlaubt die Größenbestimmung der Probenproteinen.

Zur Herstellung von 13 %igen Polyacrylamidgelen mit 1 mm Dicke wurden die Reagenzien wie in Tabelle 9 zu einer Gellösung vermischt, die unmittelbar anschließend zwischen die vertikal im Gießstand montierten Gelplatten bis knapp unter die Oberkante der kleineren Glasplatte gegossen wurde.

Tabelle 9: Gellösung zur Herstellung von zwei 13 %iger Polyacrylamidgelen

Gelkammer	Mini-Protean 3	Protean II xi Cell
Rotiphorese Gel 30 (Fa. Roth)	6,45 ml	26,4 ml
Reinstwasser	4,65 ml	33,6 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,75 ml	20 ml
10 % APS, frisch angesetzt	75 µl	400 µl
TEMED	7,5 µl	40 µl
Endvolumen	15 ml	80 ml

Das noch flüssige Gel wurde mit Butanol überschichtet, um eine gerade und glatte Gelkante zu erzeugen. Die Polymerisation dauerte 45-60 min. Nach Verfestigung des Gels wurde das Butanol dekantiert und mit Laufpuffer nachgespült. Das Gel wurde entweder direkt verwendet oder in Laufpuffer gelegt und ÜN bei 8 °C gekühlt. Um den in den IPG-Streifen enthaltenen Proteinen, die nach der Fokussierung alle an ihren isoelektrischen Punkten liegen und keine Eigenladung besitzen, eine Negativladung zu verleihen, wurden die IPG-Streifen vorher je 10 min in vorgeschriebenen Volumina (je nach Länge der Streifen) der SDS-haltigen Äquilibrationpuffer I und II äquilibriert und für wenige Sekunden in Laufpuffer gewaschen. Jeder Streifen wurde luftblasenfrei auf die obere Kante eines SDS-Polyacrylamidgels platziert und über Overlayagarose mit dem Gel verbunden. Danach wurden die Gelplatten in der Gelkammer verankert und obere und untere Pufferkammer mit Laufpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte durch Anlegen einer Spannung von zunächst 70 V für 15 min. Nach Eintritt aller Proteine in das Gel wurde die Spannung erhöht auf 120 V für das Mini Protean 3-System und auf 150 V für

das Protean II xi-System. Das in der Overlayagarose enthaltene Bromphenolblau diente als Farbmarker der Lauffront. Erreichte diese nahezu das untere Ende des Gels wurde die Elektrophorese beendet. Die Proteine wurden mit einer Coomassie- oder Silberfärbung detektiert.

2.8.6 Visualisierung von Proteinen mit Coomassie

- Coomassie-Färbelösung: 2,5 g Coomassie Blue R250, 500 ml Methanol, 500 ml *A.dest*, 100 ml Eisessig; vor Gebrauch filtrieren
- Entfärbelösung: 20 % Methanol, 10 % Eisessig, 70 % *A. dest*.

Für die Herstellung der benötigten Lösungen wurde Reinstwasser verwendet. Die Anfärbung von Polyacrylamidgelen erfolgte für mindestens 1h in Coomassie-Färbelösung, wobei die verschließbaren Färbewannen auf einem Taumler vorsichtig geschwenkt wurden. Danach wurde entfärbt, bis die Gele einen klaren Hintergrund aufwiesen. Die Färbelösung kann mehrfach wiederverwendet werden. Benutzte Entfärbelösung konnte durch Zusatz von gekörnter Aktivkohle wieder gebrauchsfertig gemacht werden. Die angefärbten Gele wurden gescannt und getrocknet.

2.8.7 Visualisierung von Proteinen mit Silbernitrat

- Fixierer: 40 % Methanol, 10 % Essigsäure
- Waschlösung: 30 % Ethanol
- Sensitizer: 0,02 % Natriumthiosulfat
- Silberlösung: 0,2 % Silbernitrat, 0,02 % Formaldehyd
- Entwickler: 3 % Natriumcarbonat, 0,05 % Formaldehyd, 0,0005% Natriumthiosulfat
- Stopplösung: 0,5% Glycin

Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt. Die Silberlösung wurde immer frisch hergestellt.

Es wurde eine modifizierte Silberfärbung nach Görg (2003) durchgeführt. Zur Färbung wurden die Gele in verschließbare Plastikwannen überführt. Die Färbung verlief nach folgendem Protokoll:

Fixierer	mind. 1h, max. ÜN	Fixierung der Proteine
Waschlösung	2 x 20 min	Waschen
Reinstwasser	20 min	Waschen
Sensitizer	1 min	Steigerung der Empfindlichkeit
Reinstwasser	3 x 20 s	Waschen
Silberlösung	20 min	Färbung der Proteine
Reinstwasser	3 x 20 s	Waschen
Entwickler	3 – 5 min	Entwicklung einer Farbreaktion
Reinstwasser	20 s	Waschen
Stopplösung	5 min	Abstoppen der Färbung
Reinstwasser	3 x 10 min	Waschen

Die Gele wurden im Anschluss gescannt und getrocknet.

2.8.8 Konservierung von Polyacrylamidgelen

Zur Haltbarmachung von Polyacrylamidgelen eignet sich die Trocknung derselbigen. Ein Gel wurde dazu auf zwei Lagen angefeuchtetes dickes 3MM-Papier (Whatman) luftblasenfrei aufgelegt, mit handelsüblicher Frischhaltefolie bedeckt und in einem Geltdrockner bei 50 °C unter Anlegen eines Vakuums für 1,5 h getrocknet.

3 Ergebnisse

3.1 Verifizierung der Identität von *P. verrucosum*

Da in den letzten Jahren die OTA produzierenden *Penicillium* spp. eine vielfältige Umgruppierung erfahren haben, wurde der in der Stammsammlung des Bereichs „Lebensmittelmikrobiologie und Hygiene“ des Instituts für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften der Universität Bonn kultivierte und als *P. verrucosum* bezeichnete Schimmelpilz bezüglich seiner korrekten Einordnung untersucht. Aus diesem Grund wurde DNA von diesem Pilz zusammen mit den Primern ITS-F1 und ITS-4 in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurde ein etwa 600 bp großes Fragment amplifiziert. Das aus dem PCR-Ansatz mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen) aufgereinigte Amplifikat wurde kommerziell sequenziert (W. Metzger, Vaternstetten). Eine Analyse der erhaltenen Sequenz wurde mit Hilfe von BLAST durchgeführt. Abbildung 1 gibt die Sequenz sowie das BLAST-Ergebnis wieder. Der E-Wert (expect value) gibt dabei die übereinstimmenden Treffer an. Je näher er bei null liegt, desto höher ist die Homologie der Sequenzen. Offensichtlich handelt es sich bei der amplifizierten ITS-Sequenz um eine innerhalb der Gattung *Penicillium* stark konservierte Region.

```
AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAG
GGCCCTTTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTACCTTGTTGCTTCGGCG
GCCCGCCTTTACTGGCCGCCGGGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCC
GAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTA
TTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGC
TGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCTCCGATTCCGGGGGACG
GGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTT
TGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTAT
CCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
AGCGGAGGA
```

Sequences producing significant alignments:		E-value
gi 3925744 emb AJ005482.1 PVA005482	Penicillium viridicatum	0.0
gi 3925738 emb AJ005481.1 PNA005481	Penicillium neoechinulatum	0.0
gi 3925741 emb AJ005493.1 PSA005493	Penicillium species 2	0.0
gi 3925740 emb AJ005492.1 PPA005492	Penicillium polonicum	0.0
gi 3925709 emb AJ005484.1 PAA005484	Penicillium allii	0.0
gi 3925739 emb AJ005483.1 PMA005483	Penicillium melanoconidium	0.0
gi 6715470 qb AF218787.1 AF218787	Penicillium allii	0.0
gi 3925737 emb AJ005480.1 PSA005480	Penicillium species 1	0.0
gi 3925748 emb AJ005489.1 PTA005489	Penicillium tricolor	0.0
gi 3925745 emb AJ005485.1 PVA005485	Penicillium venetum	0.0
gi 3925736 emb AJ005479.1 PFA005479	Penicillium freii	0.0
gi 3925710 emb AJ005488.1 PAA005488	Penicillium aurantiogriseum	0.0
gi 3925731 emb AJ004820.1 PSAJ4820	Penicillium sp. 3 DNA for 5.8	0.0
gi 3925712 emb AJ005491.1 PCA005491	Penicillium cyclopium	0.0
gi 3925711 emb AJ005490.1 PAA005490	Penicillium aurantioviren...	0.0
gi 34809419 qb AY373939.1 	Penicillium viridicatum	0.0
gi 3925726 emb AJ004814.1 PCAJ4814	Penicillium camemberti	0.0
gi 3925707 emb AJ004813.1 PCAJ4813	Penicillium commune	0.0
gi 7110571 qb AF236103.1 AF236103	Penicillium commune	0.0
gi 34809417 qb AY373937.1 	Penicillium verrucosum	0.0
gi 21666910 qb AF455477.1 	Penicillium commune	0.0
gi 21666904 qb AF455471.1 	Penicillium commune	0.0
gi 34809418 qb AY373938.1 	Penicillium verrucosum	0.0

Abbildung 1: Sequenz der ITS-Region von *P. verrucosum*, die mit Hilfe der Primer ITS-1F und ITS-4 amplifiziert wurde, sowie die durch BLAST-Analyse erhaltene Auflistung von *Penicillium* spp. mit in hohem Maß ähnlichen Sequenzen

Da innerhalb der Gattung *Penicillium* nur zwei Species als OTA-Produzenten bekannt sind, nämlich *P. verrucosum* und *P. nordicum*, sollte eine Abgrenzung zwischen diesen beiden Arten erfolgen. Zunächst wurde überprüft, ob die vorliegende *Penicillium* spp. OTA bilden kann. Nach Anzucht in PD-Bouillon wurde der Kulturüberstand in einem OTA-ELISA analysiert. Der ermittelte Wert lag bei 212 ng/kg, woraus ein deutlich über der unteren Nachweisgrenze (25 ng/kg) des ELISAs liegender OTA-Gehalt abgelesen werden kann. Im weiteren wurde der zu untersuchende Pilz auf YES-Medium überimpft. Nach den Angaben des CBS (2000) entwickelt *P. nordicum* auf diesem Medium eine hellgelbe Kolonieunterseite, wohingegen *P. verrucosum* eine braune Kolonieunterseite zeigt. Dies konnte für den vorliegenden Pilz ebenfalls beobachtet werden.

3.2 Einfluss physiologischer Parameter auf das Wachstum von *F. graminearum* und die Produktion von DON und ZEA

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde der Einfluss von Temperatur, pH-Wert und Wasseraktivität auf die Bildung von DON und ZEA bei verschiedenen Stämmen von *F. graminearum* geprüft.

3.2.1 pH-Wert und Temperatur

In einem 7tägigen Versuch wurden die Stämme von *F. graminearum* CBS 110250, CBS 110263, CBS 110264 und DSMZ 4527 in Flüssigmedium mit verschiedenen pH-Werten hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer DON-Bildung untersucht. Die Kulturen wurden bei zwei verschiedenen Temperaturen (17 und 20 °C) inkubiert. Als Maß für das Wachstum wurden nach Versuchsende die Trockenmassen bestimmt. Die Kulturüberstände wurden mittels ELISA auf ihren DON-Gehalt untersucht.

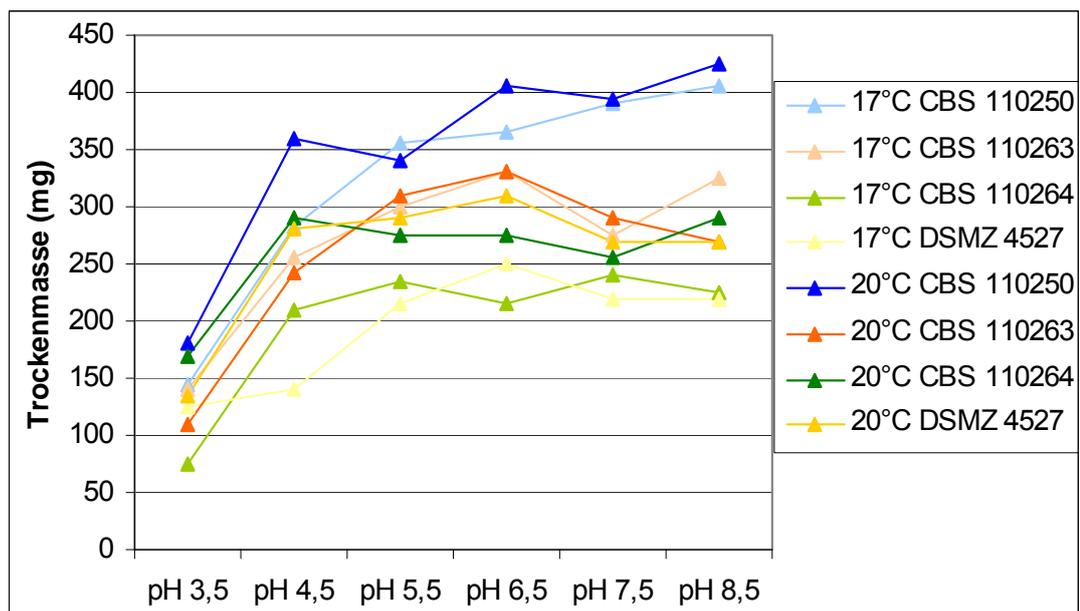


Abbildung 2: Trockenmassen der *F. graminearum* Stämme CBS 110250, CBS 110263, CBS 110264 und DSMZ 4527 in Abhängigkeit von dem pH-Wert des Mediums und der Inkubationstemperatur nach 7tägiger Anzucht

Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, wuchsen alle untersuchten Stämme bei beiden Inkubationstemperaturen in Medium mit pH 3,5 deutlich schlechter als in Medien mit pH 4,5 bis 8,5. Im Vergleich zu den Kulturen mit pH 3,5 wurden von den Kulturen mit pH 4,5 bei allen Stämmen (außer DSMZ 4527 bei 17°C) etwa doppelt soviel Trockenmasse

ermittelt. Bezüglich dem pH-Bereich von 4,5 bis 8,5 muss zwischen den Stämmen differenziert werden. So ergab sich für den Stamm CBS 110250 eine geringfügig ansteigende Tendenz für die Trockenmassen, je basischer der pH-Wert des Mediums eingestellt worden war. Bei 17°C Inkubationstemperatur erreichte die Kultur eine Trockenmasse von 280 mg bei pH 4,5 und 405 mg bei pH 8,5. Bei 20 °C Inkubationstemperatur wurden für pH 4,5 360 mg und für pH 8,5 425 mg ermittelt. Hinsichtlich des Parameters Temperatur kann für diesen Stamm festgestellt werden, dass bei 17 °C bis auf eine Ausnahme (pH 5,5) weniger Trockenmasse produziert wurde als bei 20 °C.

Die Stämme CBS 110263 und DSMZ 4527 produzierten zunächst mit von pH 4,5 an ansteigenden pH-Werten im Medium mehr Trockenmasse und erreichten bei pH 6,5 ihre jeweiligen Maxima. Mit weiter ansteigenden pH-Werten reduzierten sich die Trockenmassen wieder. Stamm CBS 110263 zeigte kaum Unterschiede bezüglich der Inkubationstemperatur. Die höchsten Trockenmassen, die erreicht wurden, lagen bei 330 mg. Stamm DSMZ 4527 produzierte bei 20 °C Inkubationstemperatur bei allen pH-Werten mindestens 50 mg Trockenmasse mehr als bei 17 °C. Die Maxima betragen 250 und 310 mg bei pH 6,5.

Der Stamm CBS 110264 bildete im pH-Bereich von 4,5 bis 8,5 sowohl bei 17 °C als auch bei 20 °C annähernd konstante Trockenmassen. Diese schwankten bei 20 °C zwischen 255 und 290 mg. Bei 17 °C wurden generell niedrigere Trockenmassen ermittelt, die zwischen 210 und 240 mg lagen.

Die Kulturüberständen wurden bezüglich der DON-Gehalte untersucht. Es ergaben sich - unabhängig von den Anzuchtbedingungen- für keinen Stamm Werte, die über der Nachweisgrenze von 3,7 µg/kg lagen.

3.2.2 Wasseraktivität

In einem 28tägigen Versuch zum Einfluss der Wasseraktivität auf die DON- und ZEA-Bildung wurden die Stämme von *F. graminearum* CBS 110250, CBS 110263, CBS 110264 und DSMZ 4527 untersucht. Die Anzucht erfolgte in halbkonzentrierter PD-Bouillon, wobei durch Zusatz von Glycerin verschiedene a_w -Werte eingestellt wurden (s. 2.4.6). Die a_w -Werte wurden vor Beginn und nach Abschluss des Versuchs kontrolliert. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, reichten die a_w -Werte von 0,998 bis 0,786 und blieben über die Versuchsdauer stabil.

Tabelle 10: Übersicht über die mit verschiedenen Glycerinkonzentrationen in PDB eingestellten a_w -Werte vor und nach dem Versuch (Dauer 28 Tage; Inkubation bei 20 °C)

Glycerinkonzentration (g/l)	0	235	260	300	370	450
a_w -Wert vor Versuchsbeginn	0,998	0,914	0,902	0,864	0,821	0,786
a_w -Wert nach Versuchsende	0,995	0,912	0,907	0,879	0,831	0,783

Als Maß für das pilzliche Wachstum wurden die Kulturen nach 28 Tagen abfiltriert und die Trockenmassen wie unter 2.5.1 erläutert bestimmt. Die Filtrate wurden zur Analyse der DON- und ZEA-Konzentrationen in ELISA-Tests eingesetzt. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die ermittelten Trockenmassen der verschiedenen Stämme von *F. graminearum* bei den eingestellten a_w -Werten.

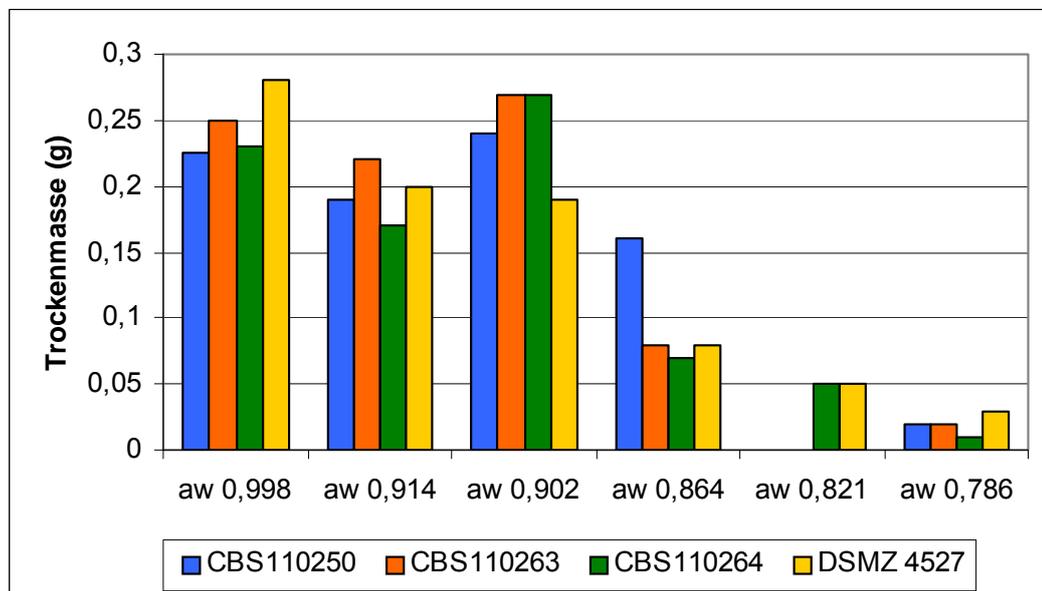


Abbildung 3: Trockenmassen verschiedener *F. graminearum* Stämme nach 28 Tagen Anzucht in Flüssigmedien mit verschiedenen a_w -Werten

Bei der 28tägigen Anzucht in Medium mit einem a_w -Wert von 0,914 wurden bei allen vier Stämmen niedrigere Trockenmassen erreicht als bei freier Wasserverfügbarkeit. Die maximalen Trockenmassen (0,24-0,27 g) wurden für die drei CBS-Stämme jedoch bei dem a_w -Wert von 0,902 erzielt. Bei zunehmend niedrigerem a_w -Wert kam es bei allen Stämmen zu teilweise stark reduzierten Trockenmassen. Bei einem a_w -Wert von 0,864 wurde für CBS 110250 noch eine Trockenmasse von 0,16 g ermittelt, für die anderen Stämme lagen die Werte lediglich zwischen 0,07 und 0,08 g. Der a_w -Wert von 0,821 unterband bei den Stämmen CBS 110250 und 110263 jegliches Wachstum, die anderen beiden Stämme erreichten 0,05 g Trockenmasse. Bei dem in diesem Versuch geringsten

a_w -Wert von 0,786 wurden Trockenmassen zwischen 0,01 und 0,03 g ermittelt. Hier konnte auch Wachstum der Stämme CBS 110250 und 110263 beobachtet werden.

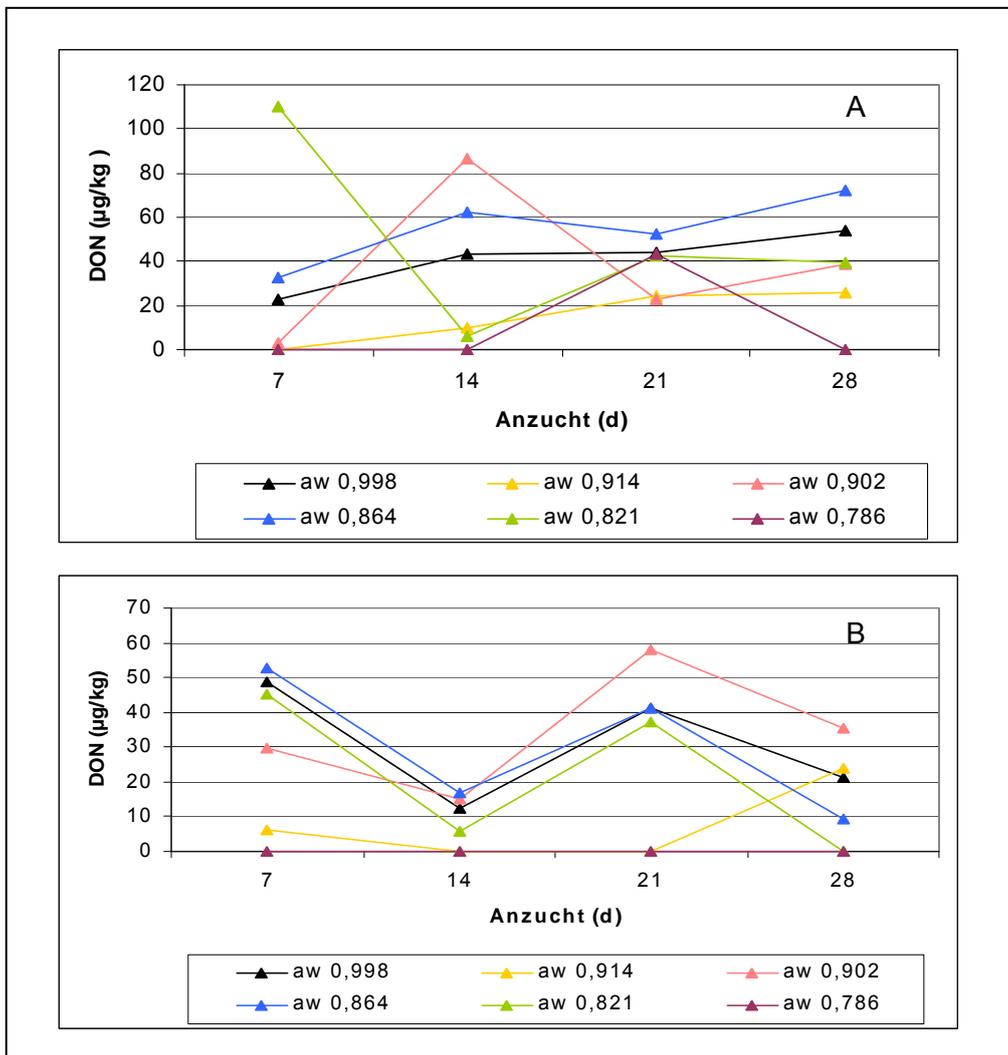


Abbildung 4: DON-Gehalte in Abhängigkeit von dem a_w -Wert des Mediums gemessen nach 7, 14, 21 und 28 Tagen bei *F. graminearum* CBS 110264 (A) und *F. graminearum* DSMZ 4527 (B)

Von den mittels ELISA bestimmten DON- und ZEA-Konzentrationen wurden die aus unbeimpftem Medium ermittelten Leerwerte abgezogen. Bezüglich DON entstanden dadurch für die Stämme CBS 110250 und CBS 110263 negative Werte, die Darstellung für diese Stämme entfällt somit. Die Werte für die Stämme CBS 110264 und DSMZ 4527 werden in Abbildung 4 A und B dargestellt.

Bei *F. graminearum* CBS 110264 konnte für die a_w -Werte 0,914 und 0,864 über den Inkubationszeitraum hinweg eine stetige Zunahme des DON-Gehalts im Medium nachgewiesen werden. Dabei waren die Werte aus der Kultur mit einem a_w -Wert von 0,914 stets niedriger als die aus der Kultur mit einem a_w -Wert von 0,864. Nach 28 Tagen Anzucht wurden 25 µg DON/kg bzw. 72 µg DON/kg gemessen. Bei den übrigen drei

abgesenkten a_w -Werten schwankten die Werte. Bei dem a_w -Wert von 0,902 wurde der Maximalwert mit 86 μg DON/kg nach 14 Tagen ermittelt, danach fiel die Konzentration ab auf 38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nach 28 Tagen. Der höchste DON-Gehalt in allen Kulturen von *F. graminearum* CBS 110264 wurde mit einem Wert von 110 μg DON/kg nach 7 Tagen Anzucht in Medium mit einem a_w -Wert von 0,821 gemessen. Einer starken Abnahme folgte in dieser Kultur wieder eine Zunahme, so dass bei Versuchsende eine Konzentration von 39 μg DON/kg vorlag. In der Kultur mit dem niedrigsten a_w -Wert (0,786) wurde lediglich nach 21 Tagen ein DON-Gehalt von 42 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ermittelt, zu den anderen Untersuchungszeitpunkten war DON nicht nachweisbar.

Für den Stamm DSMZ 4527 war bei Anzucht in Medium mit einem a_w -Wert von 0,786 zu keinem Zeitpunkt DON messbar. Bei allen übrigen a_w -Werten nahm der DON-Gehalt von Tag 7 zu Tag 14 ab. Die Konzentrationen, die an Tag 7 gemessen wurden, lagen in einem Bereich von 6-52 μg DON/kg. Nach Tag 14 stiegen die Konzentrationen bis zu Tag 28 auf Werte in einem Bereich von 9-35 μg DON/kg. In dem Kulturüberstand mit einem a_w -Wert von 0,821 war bei Versuchsende kein DON mehr nachweisbar.

Bezüglich ZEA konnte in den meisten Kulturüberständen der vier getesteten Stämme von *F. graminearum* ein Anstieg während der 28tägigen Anzucht beobachtet werden. Wie aus Abbildung 5 A ersichtlich stiegen die ZEA-Konzentrationen in den Kulturen von *F. graminearum* CBS 110250 bei allen a_w -Werten außer bei 0,864 nur bis zu Werten zwischen 2 und 16 μg ZEA/kg. In der Kultur mit einem a_w -Wert von 0,864 stieg die ZEA-Konzentration dagegen von Tag 14 zu Tag 21 auf 57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ an und blieb bis zum Versuchsende konstant.

Der Stamm CBS 110263 (Abbildung 5 B) produzierte bei den beiden niedrigsten a_w -Werten 0,786 und 0,821 kaum ZEA. Hier wurden maximal 2,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ erreicht. Bei den übrigen abgesenkten a_w -Werten wurden nach 28 Tagen Anzucht Konzentrationen von 50-60 μg ZEA/kg ermittelt, die mehr oder weniger schnell während der Inkubation erreicht wurden. Auch in der Kontrolle (a_w 0,998) stieg der ZEA-Gehalt an.

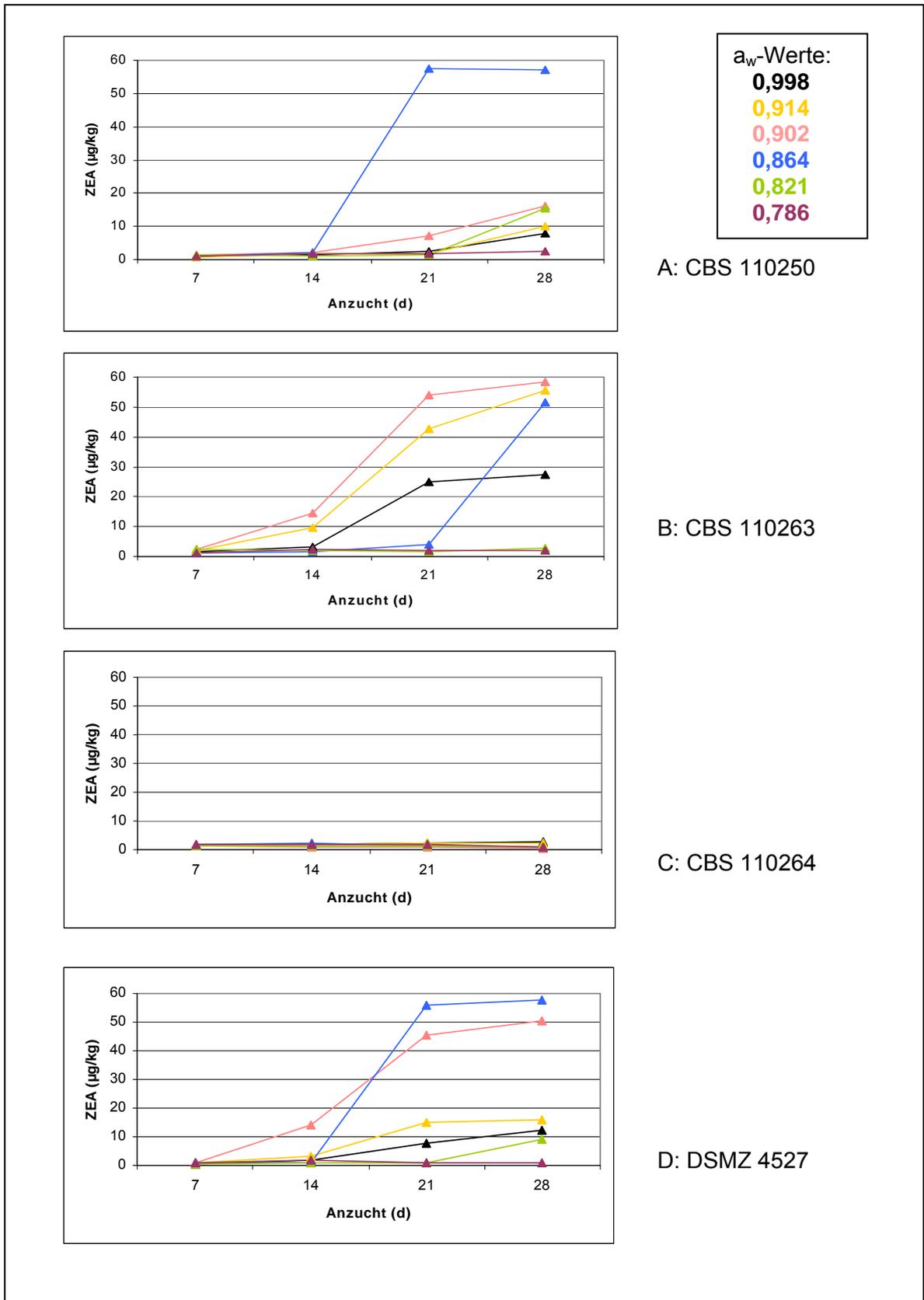


Abbildung 5: ZEA-Gehalte in Abhängigkeit von dem a_w-Wert des Mediums gemessen nach 7, 14, 21 und 28 Tagen bei *F. graminearum* CBS 110250 (A), *F. graminearum* CBS 110263 (B), *F. graminearum* 110264 (C) und *F. graminearum* DSMZ 4527 (D)

In den Kulturen von Stamm CBS 110264 (Abbildung 5 C) wurden zu keinem Zeitpunkt unabhängig von dem a_w -Wert des Mediums Konzentrationen über 2,5 μg ZEA/kg nachgewiesen. Dies korreliert mit den Angaben von O'Donnell *et al.* (2000), wo dieser Stamm als guter DON- aber schlechter ZEA-Bildner beschrieben wurde.

Der Stamm DSMZ 4527 (Abbildung 5 D) produzierte in den Kulturen mit den a_w -Werten 0,902 und 0,864 ZEA, so dass nach 28 Tagen Konzentrationen von 50-57 μg ZEA/kg erreicht wurden. Bei dem a_w -Wert von 0,914 konnten nach 28 Tagen lediglich 16 μg ZEA/kg nachgewiesen werden. Bei Wachstum mit dem niedrigsten a_w -Wert bildete der Stamm DSMZ 4527 kaum ZEA.

3.3 Molekularbiologisch basierender spezifischer Nachweis von Schimmelpilzen in Mischkulturen

3.3.1 Isolierung pilzlicher DNA aus verschiedengearteten Proben

DNA von *A. alternata*, *Fusarium* spp., *Aspergillus ochraceus* und spp. und *Penicillium verrucosum* und spp. konnte sowohl aus von Flüssigkulturen stammenden lyophilisierten Myzel als auch von Körnerproben mit den unter 2.5.1-2.5.3 beschriebenen Methoden in einer Qualität isoliert werden, die sich zum Einsatz in eine hinsichtlich Inhibitoren empfindliche realtime-PCR eignete.

Tabelle 11: Konzentrationen und Reinheitsgrade der aus Reinkulturen isolierten DNA

Pilz	Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Reinheitsgrad
<i>F. graminearum</i> CBS 110250	1,89	1,91
<i>A. alternata</i>	4,35	1,64
<i>A. ochraceus</i>	2,9	1,68
<i>P. verrucosum</i>	5,7	1,74

Die aus Reinkulturen von *F. graminearum* CBS 110250, *A. alternata*, *A. ochraceus* und *P. verrucosum* gewonnene DNA hatte die in Tabelle 11 dargestellten Konzentrationen und Reinheitsgrade.

3.3.2 Spezifischer sowie quantitativer Nachweis pilzlicher DNA mittels realtime-PCR

Die Quantifizierung von DNA mit gleichzeitigem art- bzw. gattungsspezifische Nachweis von verschiedenen Schimmelpilzen erfolgte unter Einsatz der realtime-PCR. Für *P. verrucosum* und *A. ochraceus* wurde ein gemeinsamer gattungsübergreifender Nachweis, der von Haugland *et al.* (2004) entwickelt wurde, für den hier verwendeten LightCycler etabliert. Die PCR-Reaktion wurde dazu zunächst für einen Thermocycler etabliert. Bei einer Annealingtemperatur von 61 °C zeigte sich in einem Agarosegel neben dem erwarteten Amplifikat von 81 bp lediglich für *P. verrucosum* ein Nebenprodukt mit ca. 2,5 kb. Dann wurde ein Programm für die realtime-PCR am LightCycler geschrieben und optimiert mit dem Ergebnis eines sehr zuverlässigen und schnellen Nachweises für *P. verrucosum* und *A. ochraceus*. Als Vorteil dieses Primerpaares erwies sich das mit 81 bp sehr kurze Amplifikat, welches eine schnelle PCR erlaubte, wodurch wiederum unspezifische Anlagerungen der Primer und die Bildung von Primerdimeren unterbunden werden konnte. *A. alternata* wurde mit den Primern Aalt-R und –F spezifisch nachgewiesen (Saß, 2005). Trichothecen bildenden Fusarien wurden mit den Primern tox5.1 und tox5.2 erfasst, die ein Teilstück des Gens der Trichodiensynthese amplifizieren. Eine für *F. graminearum* spezifische PCR konnte unter Einsatz der Primer UBC85-R und –F erzielt werden (Bünker, 2003).

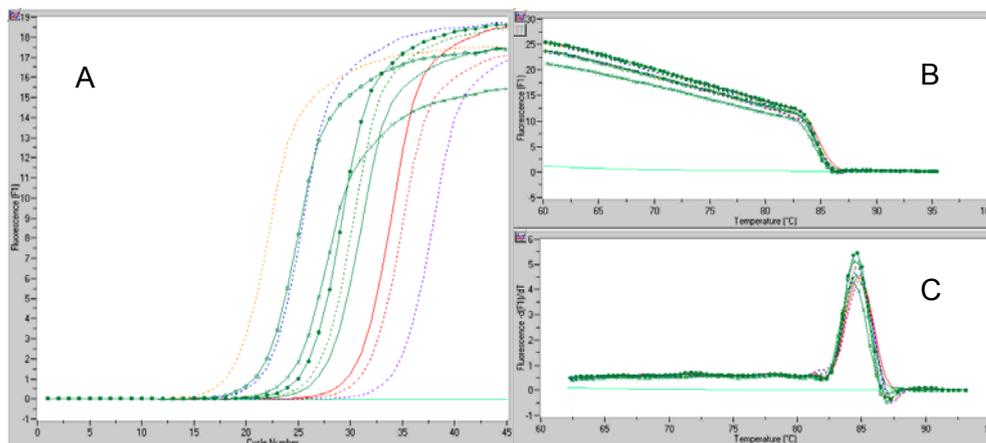


Abbildung 6: Quantifizierung und spezifischer Nachweis von *F. graminearum* mit dem UBC85-Assay im LightCycler A: Quantifizierung von DNA-Proben (durchgezogenen Linien) anhand von Standards (gestrichelte Linien); B: Schmelzkurven aller Ansätze; C: Schmelzpeaks aller Ansätze zur Überprüfung der Spezifität der PCR;

Abbildung 6 zeigt eine typische PCR mit anschließender Schmelzkurven-Analyse zur Kontrolle der spezifischen Amplifikation.

3.4 *In vitro* Interaktionen von Schimmelpilzen

Interaktionen von verschiedenen hinsichtlich Getreide relevanten Schimmelpilzen wurden *in vitro* in Flüssigkulturen in Einzel- und Cokulturrexperimenten bezüglich Wachstum und Mykotoxinbildung analysiert. Die Untersuchungen erfolgten einen, zwei (nur teilweise) sowie vier, sieben und vierzehn Tage nach Inokulation. Als Parameter für das Wachstum wurde die isolierte DNA quantifiziert, wobei der Einsatz spezifischer Nachweise eine Differenzierung der beteiligten Pilze einer Kultur ermöglichte. Mittels ELISA wurden DON- und ZEA-Gehalte bestimmt. Alle Werte (DNA und Toxine) wurden auf die Trockenmasse des abgeernteten Myzels bezogen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Werte aus Doppelansätzen wurden gemittelt.

3.4.1 Interaktionen von *F. graminearum* CBS110250 mit *A. ochraceus* und *P. verrucosum*

F. graminearum CBS 110250 wurde in Einzel- und Cokulturrexperimenten zusammen mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus* *in vitro* untersucht. Abbildung 7 stellt die an vier verschiedenen Erntetagen isolierten DNA-Mengen dar. Ein Vergleich der DNA-Gehalte von *F. graminearum* CBS 110250 zeigte, dass *F. graminearum* alleine deutlich besser wuchs als in Cokultur mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus*. Der Maximalwert der Einzelkultur mit 54 ng DNA/mgTM wurde sieben Tage nach Inokulierung erzielt. Die Maximalwerte der Cokulturen lagen nach vierzehn Tagen bei 16 ng DNA/mg TM für die Interaktion mit *P. verrucosum* und nach sieben Tagen bei 18 ng DNA/mg TM für die Interaktion mit *A. ochraceus*. Bezüglich möglicher Unterschiede zwischen den beiden Cokulturen konnten keine Aussagen getroffen werden. Die Maximalwerte lagen nahe beieinander, in der Cokultur mit *A. ochraceus* sank der DNA-Gehalt am Erntetag 14 im Vergleich zu Tag 7, während der DNA-Gehalt in der Cokultur mit *P. verrucosum* über den Untersuchungszeitraum stetig anstieg.

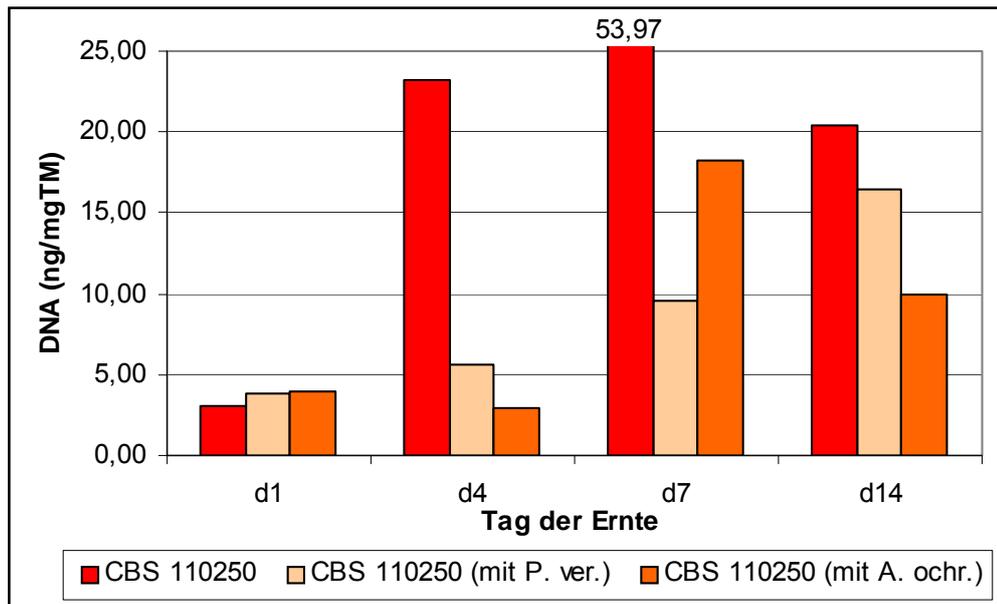


Abbildung 7: Als DNA gemessene Menge an *F. graminearum* CBS 110250 in Einzelkultur und in Cokulturen mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus* nach 1, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

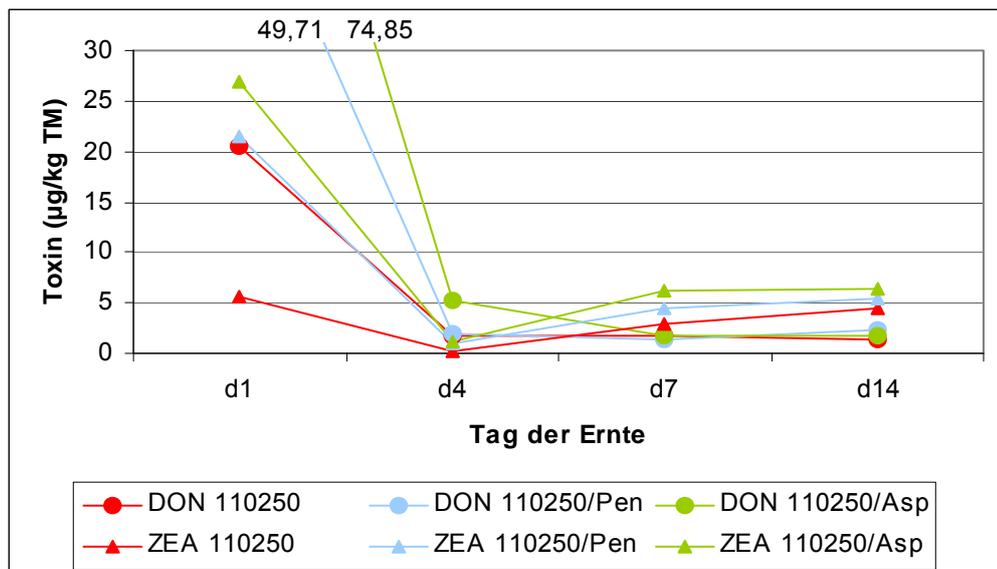


Abbildung 8: DON- und ZEA-Gehalte von *F. graminearum* CBS 110250 aus Einzel- und Cokulturen mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus* nach 1, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

Die zu diesem Experiment gehörigen Mykotoxinwerte werden in Abbildung 8 dargestellt. Alle Kulturen enthielten einen Tag nach Animpfen die höchsten Mengen an DON und ZEA. Aus einem Vergleich der Einzelkultur mit den beiden Cokulturen wurde ersichtlich, dass sowohl für ZEA (5,57 gegenüber 21 und 27 µg/kg TM) als auch für DON (21 gegenüber 49,7 und 74,9 µg/kg TM) die Toxingehalte in der Einzelkultur deutlich niedriger lagen. Die Produktion von DON und ZEA war erhöht, wenn *F. graminearum* CBS 110250

zusammen mit *P. verrucosum* oder *A. ochraceus* gewachsen ist. Die Gehalte an den nachfolgenden Erntetagen sanken in allen Fällen auf ein niedriges Niveau deutlich unter 10 µg/kg TM ab. Zwischen den Cokulturen und der Einzelkultur waren keine signifikanten Unterschiede mehr erkennbar.

3.4.2 Interaktionen von *F. graminearum* Z3639 mit *A. alternata*, *P. verrucosum* und *A. ochraceus*

Für den Stamm *F. graminearum* Z3639 wurden *in vitro* Interaktionsmodelle mit den Pilzen *A. alternata* (Stämme PK und CBS 795.72), *P. verrucosum* und *A. ochraceus* in gleicher Weise wie für den Stamm CBS 110250 durchgeführt. Der Feldpilz *A. alternata* wurde hier miteinbezogen, da für den Stamm Z3639 im Gegensatz zu dem Stamm CBS 110250 (Saß, 2005) dieser Interaktionspartner noch nicht getestet worden war. Da bei Saß (2005) die Ernten nach 1, 2, 4 und 7 Tagen erfolgten, wurden hier außer an den Tagen 1, 4, 7 und 14 auch an Tag 2 geerntet, um einen besseren Vergleich zwischen den Versuchen zu ermöglichen.

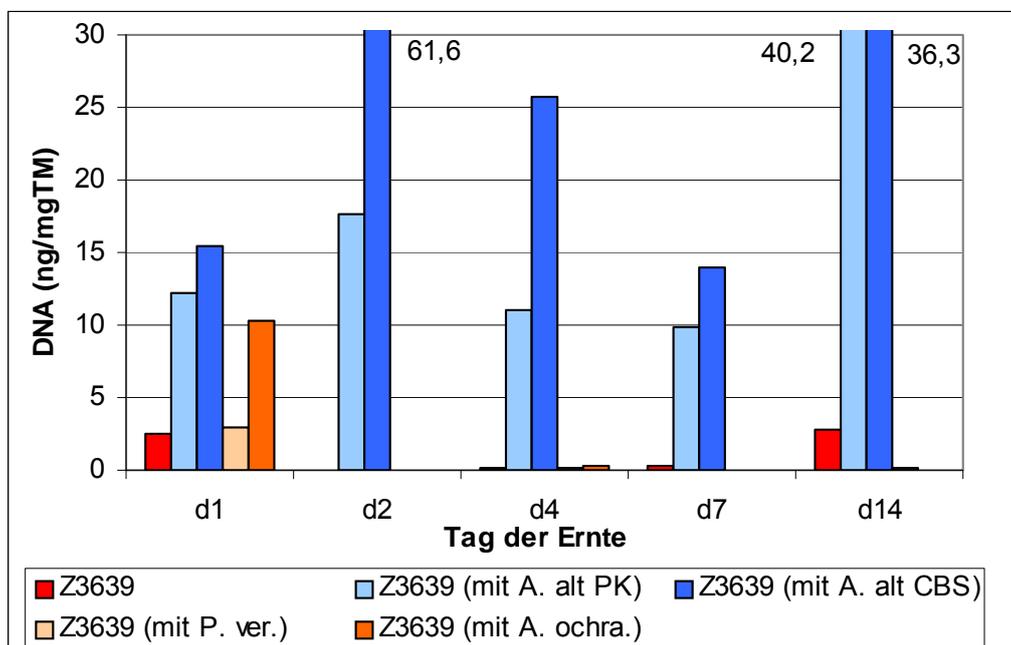


Abbildung 9: Als DNA gemessene Menge an *F. graminearum* Z3639 in Einzelkultur und in Cokulturen mit *A. alternata* CBS 795.72, *A. alternata* PK, *P. verrucosum* und *A. ochraceus* nach 1, 2 (nur für die Cokulturen mit *A. alternata*), 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

Abbildung 9 gibt die gemessenen DNA-Gehalte aus den verschiedenen Kulturen wieder. Für die Einzelkultur von *F. graminearum* Z3639 wurden einen Tag und vierzehn Tage nach Inokulation mit 2,5 und 2,7 ng DNA/mg TM nahezu die gleiche Menge an DNA

gemessen. Im Zwischenzeitraum kam es zu einem Rückgang der DNA-Menge. Für die Cokultur mit *P. verrucosum* lag der Gehalt an Fusarium-DNA nach einem Inkubationstag mit 2,9 ng DNA/mg TM in der gleichen Größenordnung wie der der Einzelkultur, an den anderen Erntetagen wurden Werte nahe bei null gemessen. Diese Entwicklung fand sich auch bei der Cokultur mit *A. ochraceus*. Hier wurde einen Tag nach Inokulation eine DNA-Menge von über 10 ng/mg TM für *F. graminearum*, also deutlich höher als die Menge in der Einzelkultur, bestimmt, danach sanken die Anteile an *Fusarium*-DNA auf nahezu null zurück. Die Cokulturen mit *A. alternata* unterschieden sich dahingehend, dass im Vergleich zu allen anderen Kulturen, sowohl der Einzelkultur, als auch den Cokulturen mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus*, an allen Tagen signifikant mehr *Fusarium*-DNA quantifiziert wurde. In Cokultur mit dem *Alternaria*-Stamm PK wurden am ersten Tag 12 ng DNA/mg TM gemessen, in der Kultur mit dem Stamm *A. alternata* CBS sogar 15 ng DNA/mg TM. Zwei Tage nach Inokulation erreichte diese Cokultur mit über 60 ng DNA/mg TM das Maximum im untersuchten Zeitraum, nach vier und sieben Tagen sanken die ermittelten Werte wieder und lagen an Tag 14 bei 36 ng DNA/mg TM. In der Cokultur mit *A. alternata* PK war eine vergleichbare Entwicklung zu beobachten. Am Tag 2 lag der DNA-Gehalt höher als an den Tagen vier und sieben. Mit einer deutlichen Steigerung von Tag 7 zu Tag 14 wurden schließlich 40 ng DNA/mg TM erreicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ähnlich wie bei *F. graminearum* CBS 110250 der Stamm Z3639 in Cokultur mit *P. verrucosum* sowie *A. ochraceus* weniger gut wuchs als alleine. Hingegen wurde mit den beiden getesteten Stämmen von *A. alternata* ein deutlich besseres Wachstum beobachtet.

Die Ergebnisse der Mykotoxinanalyse der Kulturüberstände werden in Abbildung 10 dargestellt. Für die beiden Cokulturen mit den Stämmen von *A. alternata* konnten über den gesamten Untersuchungszeitraum nur sehr geringe Konzentrationen an DON und ZEA festgestellt werden. Die Gehalte der Einzelkultur lag an allen untersuchten Zeitpunkten höher, an Tag 1 und Tag 14 sogar deutlich. Hier wurden für DON 33 und 24 µg/kg TM und für ZEA 8 und 9 µg/kg TM bestimmt. Im Zwischenzeitraum sanken die Gehalte beider Mykotoxine auf Werte unter 5 µg/kg TM ab. Für die Cokulturen mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus* wurden einen Tag nach Inokulation gegenüber der Einzelkultur deutlich erhöhte DON- und ZEA-Werte gemessen. Bei Wachstum zusammen mit *P. verrucosum* wurden 86 µg DON/kg TM bestimmt, zusammen mit *A. ochraceus* sogar 112 µg DON/kg TM. Das entspricht der doppelten bzw. dreifachen Menge verglichen mit der Einzelkultur. Bezüglich ZEA wurden in der Cokultur mit *P. verrucosum* mit 30 µg/kg TM das 3,5fache, in der Cokultur mit *A. ochraceus* mit 64 µg/kg TM sogar das 7,7fache der ZEA-Menge in der Einzelkultur produziert.

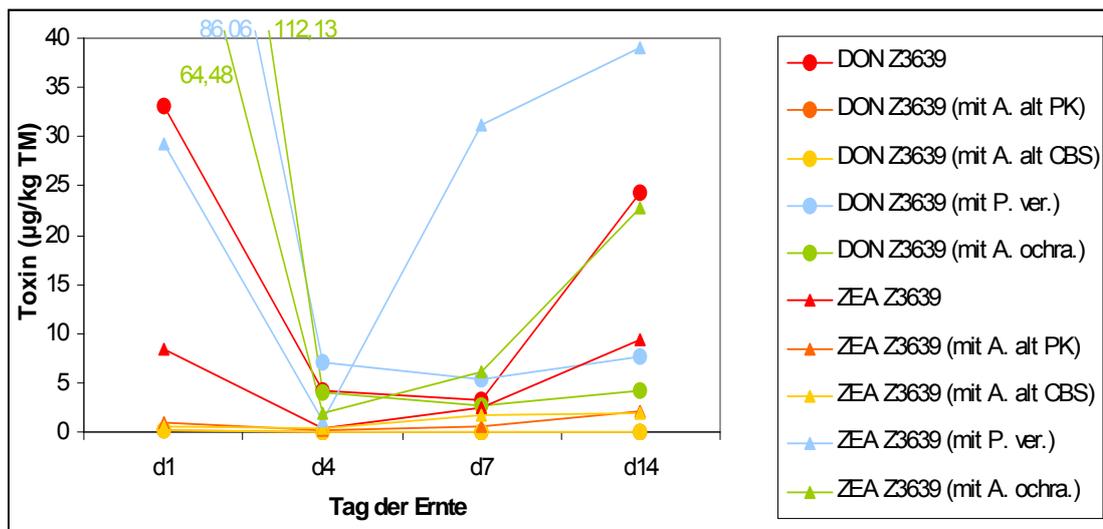


Abbildung 10: DON- und ZEA-Gehalte von *F. graminearum* Z3639 aus Einzel- und Cokulturen mit *A. alternata* CBS 795.72, *A. alternata* PK, *P. verrucosum* und *A. ochraceus* nach 1, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

Allen Kulturen gemeinsam waren abfallende Werte nach vier Tagen Inkubation. Während die DON-Gehalte in den Cokulturen mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus* -anders als in der Einzelkultur- im weiteren Verlauf nicht nennenswert anstiegen, konnte für ZEA bereits ab Tag 7 wieder eine Zunahme beobachtet werden. Diese war in der Einzelkultur am schwächsten ausgeprägt. Hier wurden nach zweiwöchiger Inkubation 10 µg ZEA/kg TM gemessen. In Cokultur mit *A. ochraceus* wurde der Gehalt an ZEA auf 23 µg/kg TM gesteigert, in der Kultur mit *P. verrucosum* fand die Hauptzunahme bereits von Tag 4 auf Tag 7 statt. An Tag 14 wurden schließlich 39 µg/kg TM, das vierfache im Vergleich zur Einzelkultur, erreicht.

3.4.3 Interaktionen von *F. graminearum* GZT-33 mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus*

Mikrobielle Interaktionen wurden ebenfalls mit dem Stamm *F. graminearum* GZT-33 und *P. verrucosum* sowie *A. ochraceus* untersucht. Die DNA-Gehalte der Einzel- und Cokulturen werden in Abbildung 11 wiedergegeben. Eine eindeutige Aussage, ob dieser *Fusarium*-Stamm besser alleine gewachsen ist oder in Interaktion mit *P. verrucosum*, ist kaum möglich. Am Endpunkt der Untersuchung lag der DNA-Gehalt der Einzelkultur mit 0,23 ng DNA/mg TM deutlich über denen der Cokulturen, jedoch wurde die maximale DNA-Menge (0,33 ng/mgTM) nach einem Tag Inkubation in Cokultur mit *P. verrucosum* ermittelt. In der Cokultur mit *A. ochraceus* konnten nur sehr geringe Mengen an *Fusarium*-DNA gemessen werden.

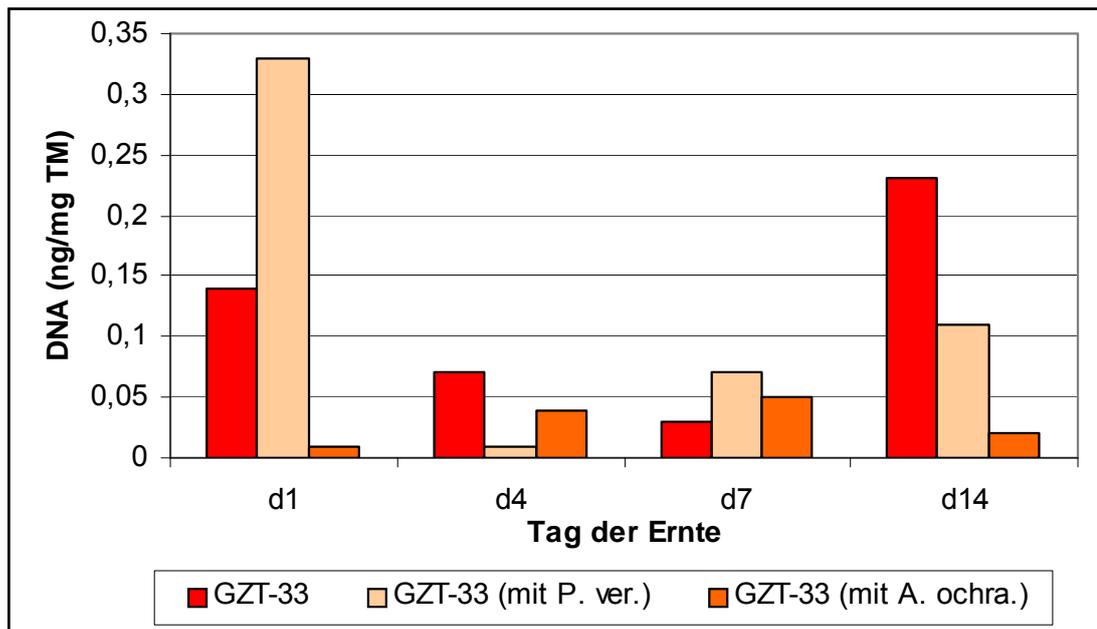


Abbildung 11: Als DNA gemessene Menge an *F. graminearum* GZT-33 in Einzelkultur und in Cokulturen mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus* nach 1, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

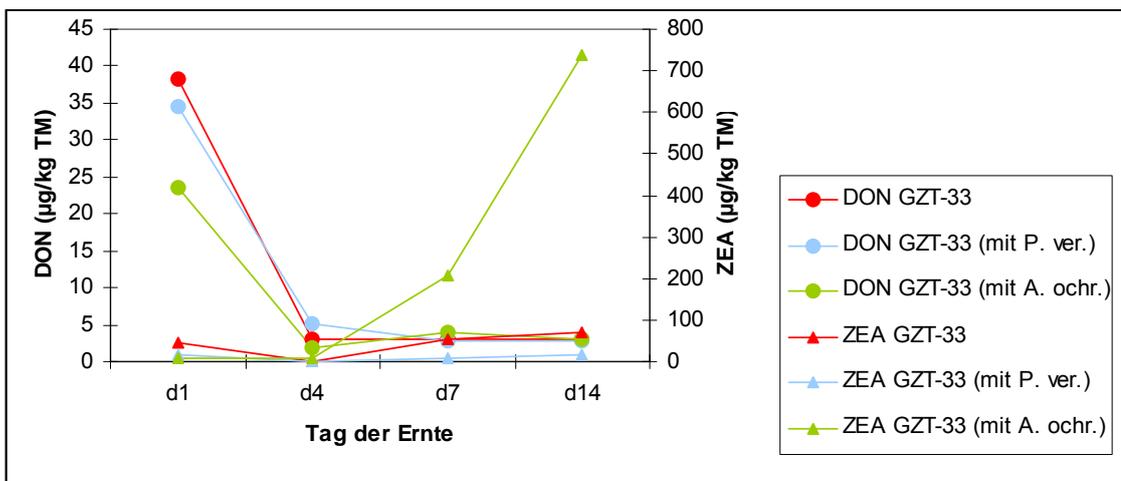


Abbildung 12: DON- und ZEA-Gehalte von *F. graminearum* GZT-33 aus Einzel- und Cokulturen mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus* nach 1, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

Die aus den Kulturüberständen bestimmten Werte für DON und ZEA werden in Abbildung 12 wiedergegeben. Obwohl der Stamm GZT-33 nicht in der Lage ist, Trichothecene zu bilden, wurde eine DON-Analyse durchgeführt. Die ermittelten Werte liegen im Vergleich zu CBS 110250 oder Z3639 nicht sehr viel niedriger. Wieder wurden an Tag 1 die höchsten Werte gemessen, in der nachfolgenden Inkubationszeit sanken die Werte in allen drei Kulturen stark und blieben dann konstant. Für ZEA konnte lediglich in der Cokultur mit *A. ochraceus* nach 7 Tagen ein signifikanter Anstieg verzeichnet werden, der

in einem Gehalt von über 700 µg ZEA/kg TM mündete. In den beiden anderen Kulturen wurden nur geringfügige Zunahmen gemessen.

3.4.4 Interaktionen von *F. graminearum* GZT-40 mit *A. alternata*, *P. verrucosum* und *A. ochraceus*

Parallel zu den Versuchen mit *F. graminearum* Z3639 wurden mit dem Stamm GZT-40 (*tri5*) mikrobielle Interaktionen mit den Schimmelpilzen *A. alternata* PK, *A. alternata* CBS 795.72, *P. verrucosum* und *A. ochraceus* untersucht. Abbildung 13 gibt die als Maß für das Wachstum von *F. graminearum* GZT-40 ermittelten DNA-Mengen wieder.

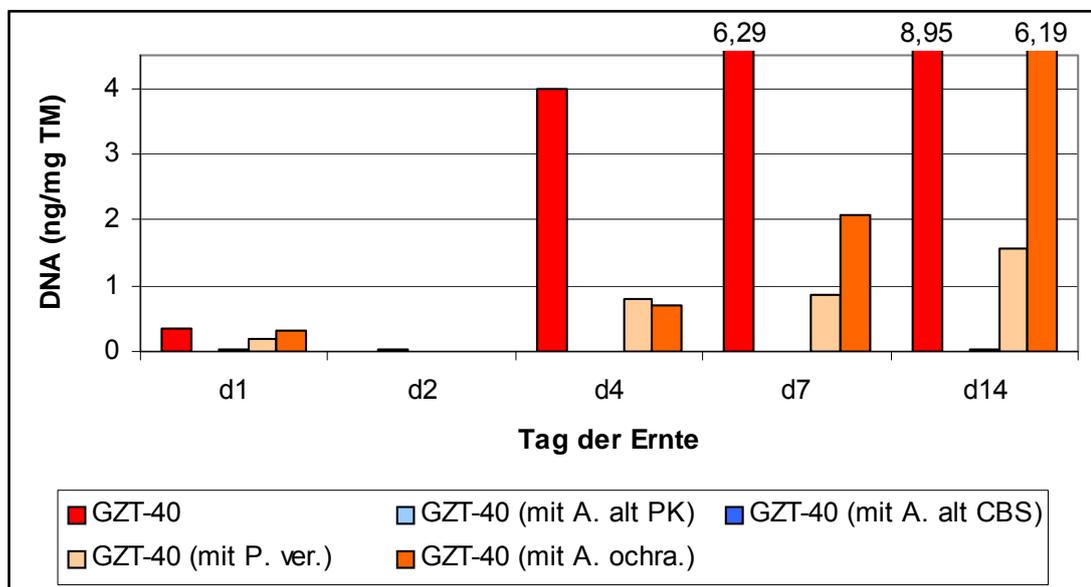


Abbildung 13: Als DNA gemessene Menge an *F. graminearum* GZT-40 in Einzelkultur und in Cokulturen mit *A. alternata* CBS 795.72, *A. alternata* PK, *P. verrucosum* und *A. ochraceus* nach 1, 2 (nur für die Cokulturen mit *A. alternata*), 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

Es ist aus Abbildung 13 ersichtlich, dass die Einzelkultur von *F. graminearum* GZT-40 an allen untersuchten Zeitpunkten besser gewachsen ist als die Cokulturen. Über den Untersuchungszeitraum nahm der DNA-Gehalt stetig zu, nach vierzehn Tagen Inkubation wurde ein DNA-Gehalt von 9 ng/mg TM bestimmt. Die Cokultur mit dem nächstniedrigeren DNA-Gehalt (6,2 ng/mg TM an Tag 14) war jene mit *A. ochraceus*. Hier war ebenfalls ein kontinuierliches Wachstum von *F. graminearum* von Tag 1 bis Tag 14 zu verzeichnen, wobei die DNA-Gehalte deutlich hinter denen der Einzelkultur zurückblieben. Dies trat noch stärker bei der Cokultur mit *P. verrucosum* auf. Der Maximalgehalt an *Fusarium*-DNA wurde nach zweiwöchiger Inkubation mit 1,6 ng/mg TM bestimmt. In

beiden Cokulturen mit *A. alternata* wurden zu allen Untersuchungszeitpunkten für die *Fusarium*-DNA Werte nahe bei null gemessen.

Die zu diesem Versuch gehörigen Mykotoxinwerte sind in Abbildung 14 dargestellt. Auch wenn der Stamm *F. graminearum* GZT-40 wegen des knockouts des Trichodiensynthese-Gens nicht in der Lage dazu ist, Trichothecene zu bilden, wurden die Kulturüberstände bezüglich DON untersucht. Wie schon bei *F. graminearum* Z3639 wurden auch für Stamm GZT-40 bei Wachstum zusammen mit *A. alternata* sowohl für ZEA als auch für DON über den untersuchten Zeitraum sehr niedrige Werte gemessen. Lediglich in der Cokultur mit *A. alternata* PK stieg der ZEA-Gehalt an Tag 14 auf 120 µg/kg TM an.

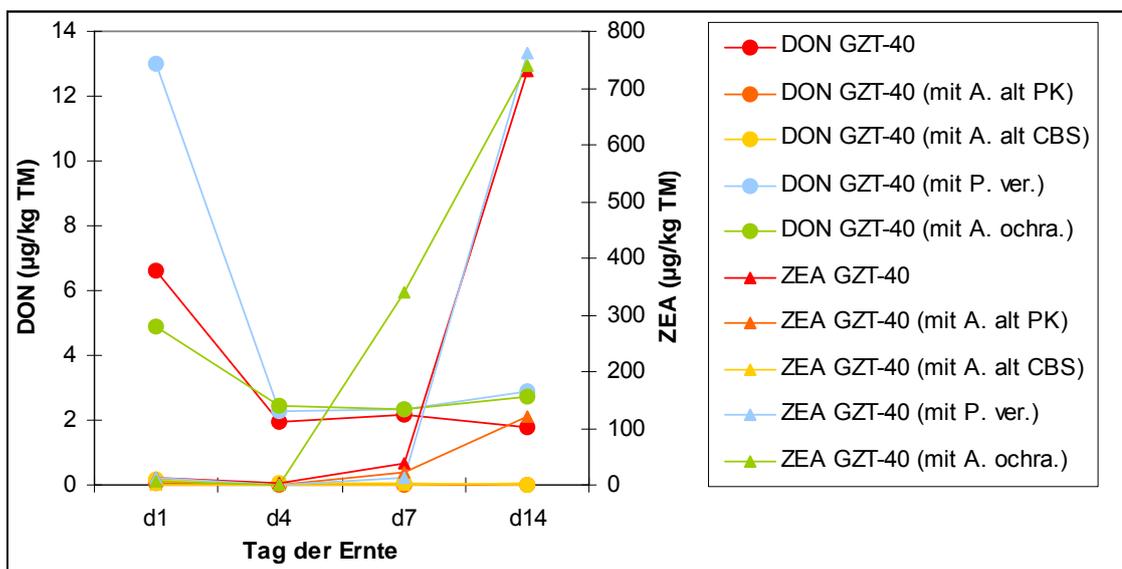


Abbildung 14: DON- und ZEA-Gehalte von *F. graminearum* GZT-40 aus Einzel- und Cokulturen mit *A. alternata* CBS 795.72, *A. alternata* PK, *P. verrucosum* und *A. ochraceus* nach 1, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

Verglichen mit der Einzelkultur und den anderen Cokulturen war dieser Wert jedoch noch niedrig. Hinsichtlich ZEA wurden in diesen Kulturen ähnliche Verläufe festgestellt. An den ersten drei Untersuchungszeitpunkten (Tage 1, 4 und 7) wurden abgesehen von der Cokultur mit *A. ochraceus* nur geringfügige Konzentrationen gemessen. An Tag 14 lagen sowohl für die Einzelkultur als auch für die Cokulturen mit *P. verrucosum* und *A. ochraceus* die gemessenen Werte sehr eng beieinander und zwar im Bereich von 730 und 760 µg/kg TM. Die starke Produktion von ZEA begann in der Cokultur mit *A. ochraceus* bereits von Tag 4 auf Tag 7 und wird zu Tag 14 hin fortgesetzt, während in der Einzelkultur und der Cokultur mit *P. verrucosum* der Anstieg erst zwischen Tag 7 und 14 vermerkt werden konnte.

Bezüglich DON wurden durchweg sehr niedrige Werte bestimmt, der höchste Wert lag bei 13 µg/kg TM gemessen am ersten Tag in der Cokultur mit *P. verrucosum*. Alle anderen Werte lagen unter 7 µg/kg TM.

3.4.5 Interaktionen von *A. alternata* mit *F. graminearum* GZT-40 und *F. graminearum* Z3639

Die Cokulturen von den Stämmen *F. graminearum* GZT-40 und Z3639 mit *A. alternata* PK und *A. alternata* CBS wurden bezüglich der DNA-Gehalte von *A. alternata* untersucht. Abbildung 15 gibt diese wieder.

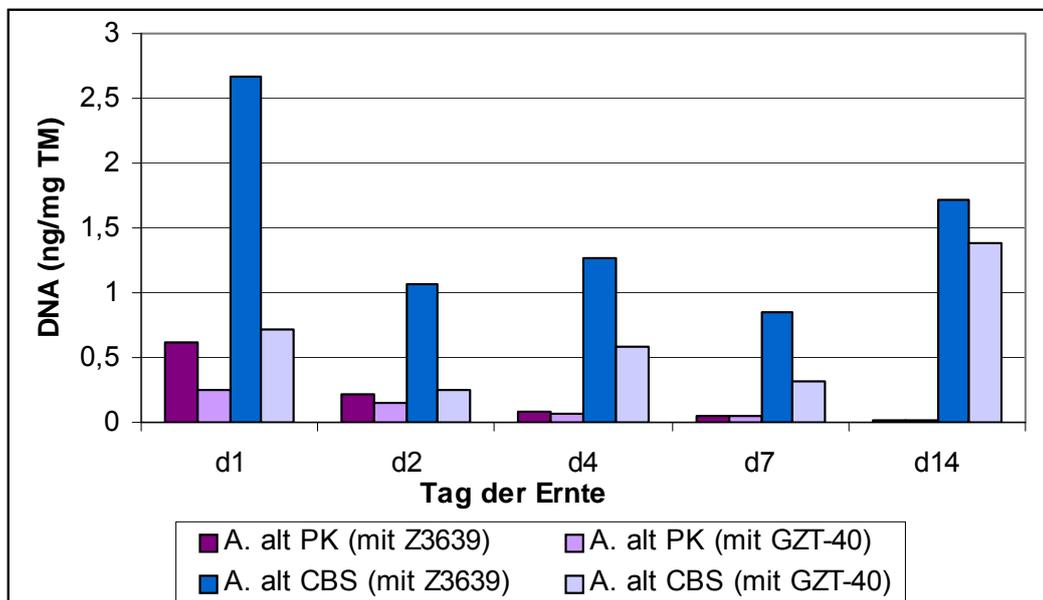


Abbildung 15: Als DNA gemessene Menge an *A. alternata* PK und *A. alternata* CBS in Cokulturen mit *F. graminearum* Z3639 und *F. graminearum* GZT-40 nach 1, 2, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

Für den Stamm *A. alternata* PK wurden in den Cokulturen mit *F. graminearum* Z3639 bzw. GZT-40 von Tag 1 bis Tag 14 abnehmende DNA-Mengen gemessen. Bei Wachstum zusammen mit Z3639 lag der Maximalwert bei 0,6 ng/mg TM einen Tag nach Inokulation. Danach sanken die Gehalte auf 0,02 ng/mg TM an Tag 14 ab. Die Werte für die Cokultur mit *F. graminearum* GZT-40 waren generell noch niedriger als die der Cokultur mit Z3639. So wurde an Tag 1 ein Gehalt von 0,3 ng/mg TM bestimmt. Über den weiteren Untersuchungsraum nahm der DNA-Gehalt ab, bis an Tag 14 nur noch 0,02 ng/mg TM gemessen werden. Für den Stamm *A. alternata* CBS wurden fast immer höhere DNA-Mengen gemessen als für den Stamm PK. Vergleichbar mit den Cokulturen von Stamm PK enthielt die Cokultur von *A. alternata* CBS mit *F. graminearum* Z3639 zu allen untersuchten Zeitpunkten mehr DNA als die mit *F. graminearum* GZT-40. Auch wurde der

höchste Gehalt an DNA mit 2,7 ng/mg TM ebenfalls an Tag 1 gemessen. An den nachfolgenden Untersuchungszeitpunkten wurden niedrigere Werte bestimmt, jedoch stieg der DNA-Gehalt an Tag 14 wieder an. Die Cokultur mit *F. graminearum* GZT-40 enthielt einen Tag nach Inokulation 0,7 ng DNA/mg TM. Mit weiterer Inkubation schwankten die Werte auf und ab, um schließlich an Tag 14 den höchsten Wert zu erreichen. Hier wurde mit 1,4 ng/mg TM im Vergleich zu Tag 1 das zweifache an DNA gemessen. Es lässt sich demnach zusammenfassend beobachten, dass die beiden untersuchten Stämme von *A. alternata* besser mit *F. graminearum* Z3639 gewachsen sind als mit der Mutante *F. graminearum* GZT-40. Weiterhin wuchs der Stamm *A. alternata* CBS in Cokultur mit *F. graminearum* besser als der Stamm PK.

3.4.6 Interaktionen von *P. verrucosum* mit *F. graminearum* CBS 110250, *F. graminearum* GZT-33, *F. graminearum* GZT-40 und *F. graminearum* Z3639

Die Cokulturen mit *P. verrucosum* und verschiedenen *F. graminearum* –Stämmen wurden hinsichtlich des Wachstums von *P. verrucosum* untersucht. Abbildung 16 gibt die DNA-Gehalte, die ermittelt wurden, wieder.

In der Einzelkultur von *P. verrucosum* war ein kontinuierliches Wachstum mit zunehmender DNA- Menge zu beobachten. Einen Tag nach Inokulation wurden bereits über 3,5 ng DNA/mg TM quantifiziert, so viel wie in keiner der Cokulturen während des gesamten untersuchten Zeitraums. Nach vierzehntägiger Inkubation wurden aus der Einzelkultur 181 ng DNA/mg TM isoliert. Ein Vergleich mit den Werten, die aus den Cokulturen gewonnen werden konnten, zeigte ein signifikant schlechteres Wachstum von *P. verrucosum* bei Wachstum zusammen mit den getesteten Stämmen von *F. graminearum*.

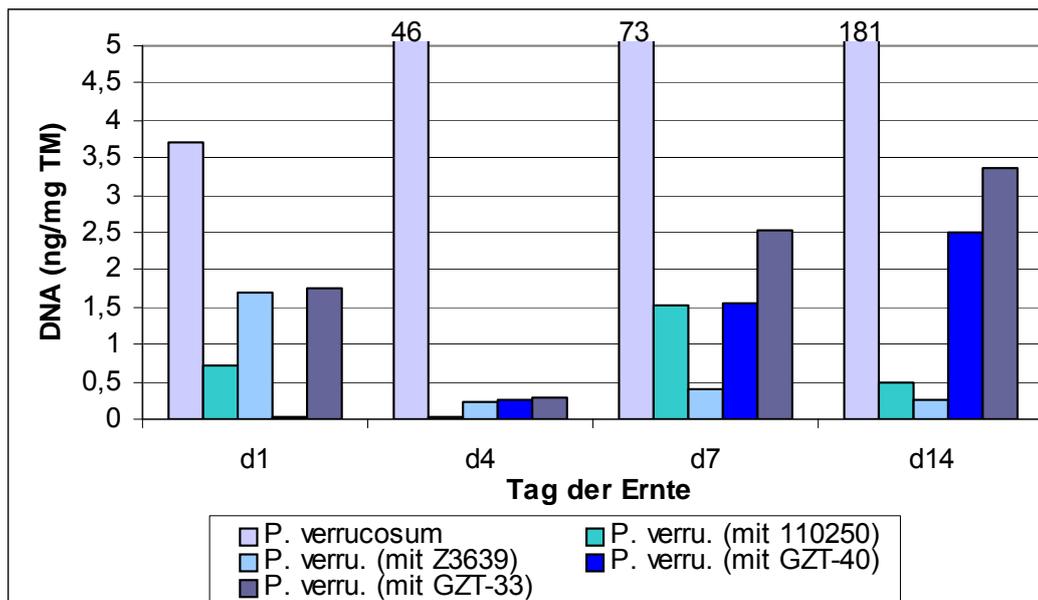


Abbildung 16: Als DNA gemessene Menge an *P. verrucosum* in Einzelkultur und in Cokulturen mit *F. graminearum* CBS 110250, Z3639, GZT-40 und GZT-33 nach 1, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

Für die Cokultur mit *F. graminearum* CBS 110250 wurden schwankende DNA-Gehalte gemessen. An Tag 1 wurden 0,7 ng DNA/mg TM bestimmt, an Tag 14 lediglich 0,49 ng/mg TM. Das Maximum fand sich an Tag 7 mit 1,5 ng DNA/mg TM, dem zweifachen des Werts von Tag 1. In Cokultur mit *F. graminearum* Z3639 wurden einen Tag nach Inokulation 1,7 ng DNA/ mg TM gemessen, danach sank der DNA-Gehalt auf Werte unter 0,4 ng/mg TM. Dazu entgegengesetzt verhielt es sich mit der Cokultur mit *F. graminearum* GZT-40. Hier war eine stetige Zunahme der DNA-Mengen zu verzeichnen. Während nach einem Tag Inkubation ein Wert nahe bei null gemessen wurde, konnte nach vierzehn Tagen Bebrütung ein DNA-Gehalt von 2,5 ng/mg TM bestimmt werden. In der Cokultur mit *F. graminearum* GZT-33 wurde an Tag 1 eine DNA-Menge von 1,8 ng/mg TM bestimmt. An Tag 4 lag der Wert nur noch bei 0,3 ng DNA/mg TM. Im Anschluss stieg die DNA-Menge wieder und erreichte nach 14 Tagen Inkubation einen Wert von 3,4 ng/mg TM.

Bezüglich der Cokulturen kann abschließend festgehalten werden, dass *P. verrucosum* zusammen mit den Stämmen *F. graminearum* GZT-40 und GZT-33 besser gewachsen ist als mit den Stämmen CBS 110250 und Z3639.

Die Ergebnisse der OTA-Analyse gibt Abbildung 17 wieder. In allen Kulturen außer der Cokultur mit *F. graminearum* GZT-40 konnte einen Tag nach Inokulation ein erhöhter OTA-Gehalt festgestellt werden. An den nachfolgenden Inkubationsabschnitten wurden in allen Kulturen sehr niedrige OTA-Werte bestimmt. Bemerkenswert war auch, dass der

Maximalwert von über 12 µg OTA/kg TM an Tag 1 in der Einzelkultur von *P. verrucosum* gemessen wurde. Die Werte der Cokulturen lagen mit einigem Abstand niedriger.

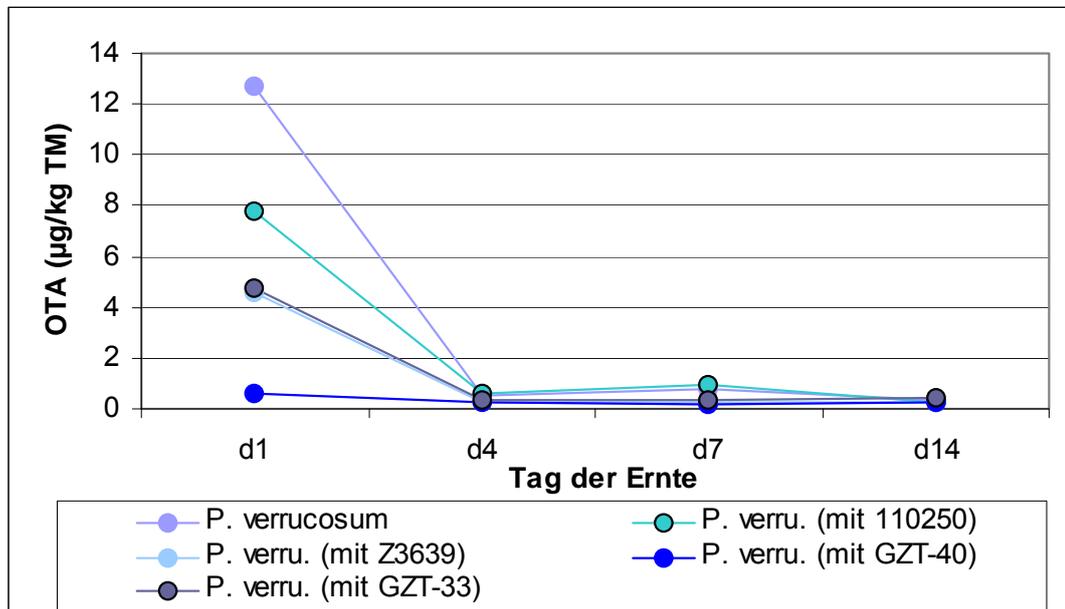


Abbildung 17: OTA-Gehalte von *P. verrucosum* aus Einzel- und Cokulturen mit *F. graminearum* CBS110250, Z3639, GZT-40 und GZT-33 nach 1, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

3.4.7 Interaktionen von *A. ochraceus* mit *F. graminearum* CBS 110250, *F. graminearum* GZT-33, *F. graminearum* GZT-40 und *F. graminearum* Z3639

Untersuchungen bezüglich Wachstum und OTA-Bildung wurden auch für *A. ochraceus* in Einzel- und Cokulturen durchgeführt. Die Gehalte an *Aspergillus*-DNA der verschiedenen Kulturen werden in Abbildung 18 dargestellt. Abgesehen von Tag 1 enthielt die Einzelkultur von *A. ochraceus* mehr DNA als die Cokulturen. Der höchste Wert lag bei 13 ng/mg TM an Tag 4, danach sanken die Werte auf bis 3,4 ng/mg TM an Tag 14. Knapp unter diesem Wert lag der DNA-Gehalt der Cokultur mit *F. graminearum* GZT-40 an Tag 14, der durch kontinuierliche Zunahme der DNA-Menge über den untersuchten Zeitraum hinweg erreicht wurde. In den anderen Cokulturen wurden durchweg an allen Erntetagen sehr niedrige Werte (unter 1 ng DNA/mg TM) gemessen mit einer Ausnahme für die Cokultur mit *F. graminearum* GZT-33 an Tag 7 (5,5 ng DNA/mg TM).

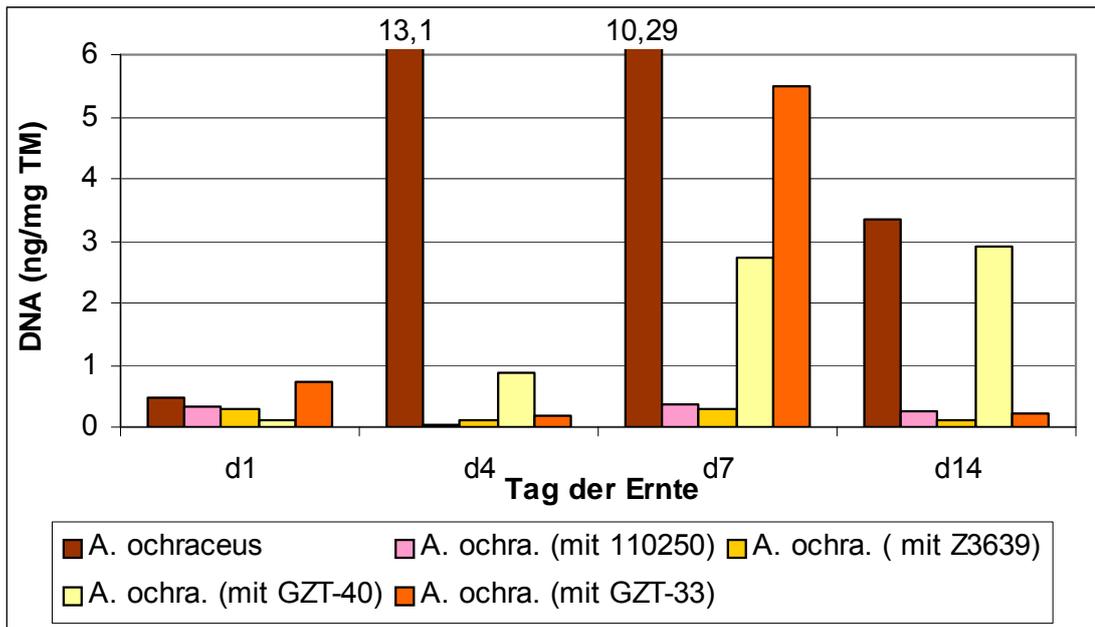


Abbildung 18: Als DNA gemessene Menge an *A. ochraceus* in Einzelkultur und in Cokulturen mit *F. graminearum* CBS 110250, Z3639, GZT-40 und GZT-33 nach 1, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

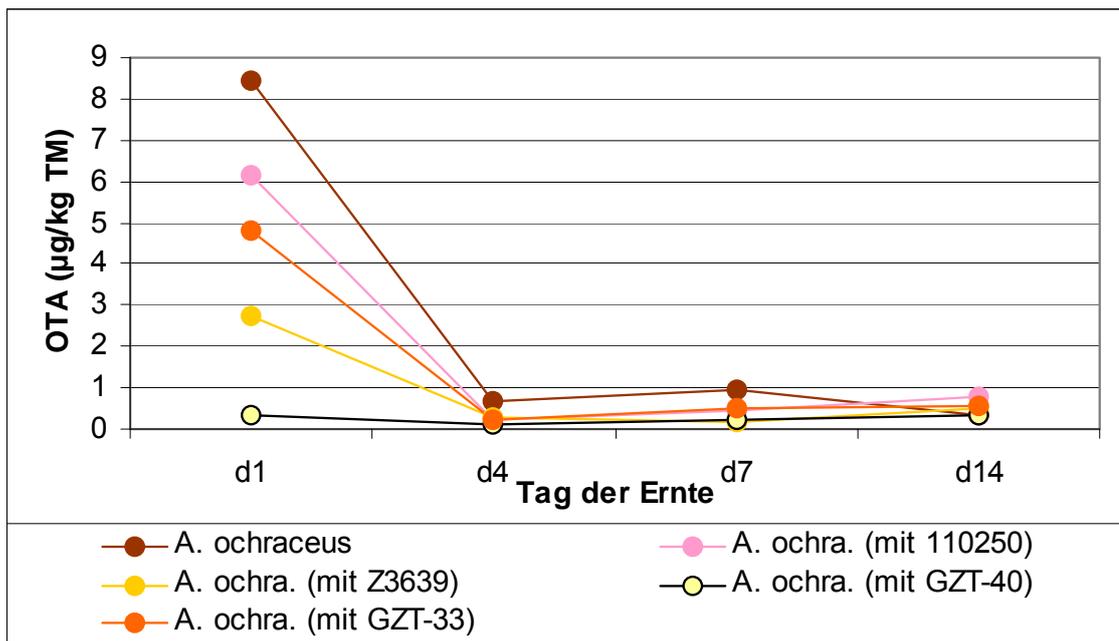


Abbildung 19: OTA-Gehalte von *A. ochraceus* aus Einzel- und Cokulturen mit *F. graminearum* CBS110250, Z3639, GZT-40 und GZT-33 nach 1, 4, 7 und 14 Tagen Inkubation

Abbildung 19 gibt die in den Kulturen gemessenen OTA-Werte bezogen auf die Trockenmasse wieder. Ähnlich wie in den Interaktionsmodellen mit *Penicillium verrucosum* lagen die Gehalte einen Tag nach Inokulation abgesehen von der Cokultur mit *F. graminearum* GZT-40 deutlich über denen der anderen Erntetage. Als weitere

Parallele konnte der Maximalwert wieder der Einzelkultur von *A. ochraceus* zugeordnet werden.

3.5 *In vivo* Interaktion von Schimmelpilzen auf Weizenkörnern ohne natürliche mikrobielle Flora

3.5.1 Mikrobiologische Qualität des zu lagernden Getreides vor Sterilisierung

Bei dem verwendeten Weizen handelte es sich zum einen um Winterweizen der Sorte Drifter mit der Vorfrucht Mais und zum anderen um die gleiche Sorte, jedoch mit der Vorfrucht Weizen aus dem Erntejahr 2001. Beide wurden durch Auslegen von je 200 Körnern in CZID-Agar hinsichtlich ihres Befalls durch Schimmelpilze untersucht. Abbildung 20 gibt das ermittelte Spektrum wieder.

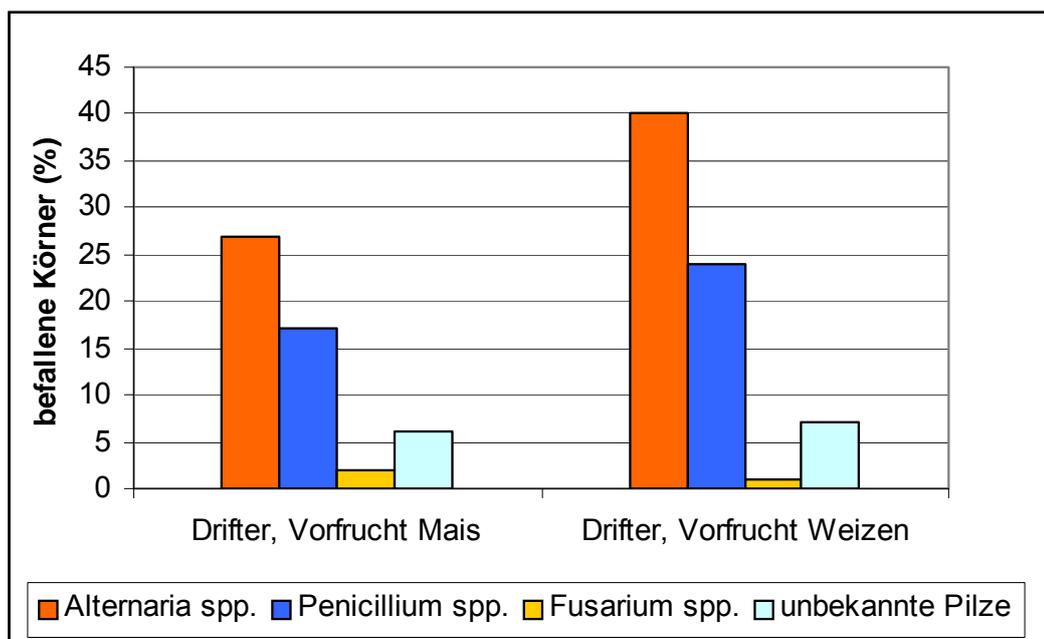


Abbildung 20: Spektrum der auf den beiden für den Lagerversuch ohne natürliche mikrobielle Flora verwendeten Weizenbestände vor Sterilisation vorkommenden Schimmelpilze

Beide Getreidebestände unterschieden sich nur geringfügig in ihrem Befall mit Schimmelpilzen. So waren 27 bzw. 40 % der Körner mit *Alternaria* spp. infiziert, welche unter den isolierten die häufigste Gattung darstellte. Als zweithäufigste Pilzgattung wurden *Penicillium* spp. mit 17 bzw. 24 % identifiziert. *Fusarium*-Arten hatten lediglich 1-2% der Körner befallen. Zwischen 6 und 7 % der sich aus den Körnern entwickelten Pilze konnten nicht weiter identifiziert werden. Die *Fusarium* spp. wurden mikroskopisch

anhand ihrer Makrokonidien artbestimmt. Es handelte sich um *F. culmorum* und *F. graminearum*, beides DON-Bildner.

Als weiteres Kriterium wurde die in dem Lagerversuch eingesetzte Mischung der beiden Getreidebestände hinsichtlich des DON- und ZEA-Gehaltes analysiert. Für DON konnte ein Wert von 10,3 µg/kg TM ermittelt werden, für ZEA lag der Gehalt unter der für Getreide angegebenen Nachweisgrenze des ELISA-Tests von 1,75 µg/kg.

3.5.2 Befallsentwicklung des suboptimalgelagerten Getreides ohne natürliche mikrobielle Flora

Die Befallsentwicklung des unter suboptimalen Bedingungen gelagerten Getreides wurde anhand der im Abstand von zwei Wochen über die Lagerdauer genommenen Proben zum einen durch Auslegen von Körnern und zum anderen durch Quantifizierung der von den Körnern isolierten DNA unter Verwendung von art- bzw. gattungsspezifischen Primern verfolgt.

3.5.2.1 Analyse mittels mikrobiologisch-kultureller Methode

Die nach 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Wochen Lagerung entnommenen Proben wurden wie unter 2.5.3 beschrieben ausgelegt. Eine Artbestimmung der Fusarien entfällt bei diesem Lagerversuch, da sterile Körner mit Sporensuspensionen bekannter Pilze, u.a. *F. graminearum* als einzige *Fusarium* spp., beimpft wurden. Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen die Infektionsraten der jeweiligen Schimmelpilze der verschiedenen Interaktionsmodelle, wobei Abbildung 21 die Werte für den jeweiligen Stamm von *F. graminearum* wiedergibt und Abbildung 22 die Werte des jeweiligen Interaktionspartners darstellt.

Wie aus Abbildung 21 ersichtlich ist, hing zum einen das Ausmaß und die Entwicklung des Befalls der Körner durch *F. graminearum* stark von dem zweiten Schimmelpilz in dem jeweiligen Interaktionsmodell ab. Zum anderen gestaltete sich der Verlauf der einzelnen Befallsentwicklungen bei gleichem Interaktionspartner unabhängig vom *F. graminearum* Stamm ähnlich.

Betrachtet man die Interaktionsmodelle *F. graminearum* / *A. alternata* (gelb-orange Kurven), so befahlen bereits nach zwei Wochen Lagerung alle untersuchten Stämmen von *F. graminearum* nahezu 100 % der Körner. Dieser starke Befall blieb über die Lagerung hinweg weitestgehend konstant.

Die beschriebene Entwicklung ist vergleichbar mit der des Modells ohne Interaktionspartner (grüne Kurve), welches also lediglich mit *F. graminearum* CBS 110250 inokuliert ist. Hier wurde zwar nach vier Wochen Lagerung eine reduzierte Infektionsrate von 64 % beobachtet, jedoch an allen anderen untersuchten Zeitpunkten Werte über 90 % ermittelt. Eine hoher prozentualer Befall der Körner mit *F. graminearum* in Woche 2 konnte auch in den Interaktionsmodelle *F. graminearum* / *A. ochraceus* verzeichnet werden (pink-lilafarbene Kurven). Allerdings reduzierte sich die Befallsrate bezüglich *F. graminearum* in allen Modellen, so dass nach sechs Wochen Lagerung ca. 60 % der Körner infiziert waren und am Ende der Lagerung lediglich 2-22 %. Dabei fällt auf, dass die Stämme CBS 110250 und Z3639, beide potentielle Trichotheceen Bildner, nur 2 und 7 % der Körner befielen, während die Mutanten GZT-33 und GZT-40 mit 18 und 22 % deutlich mehr Körner infizierten.

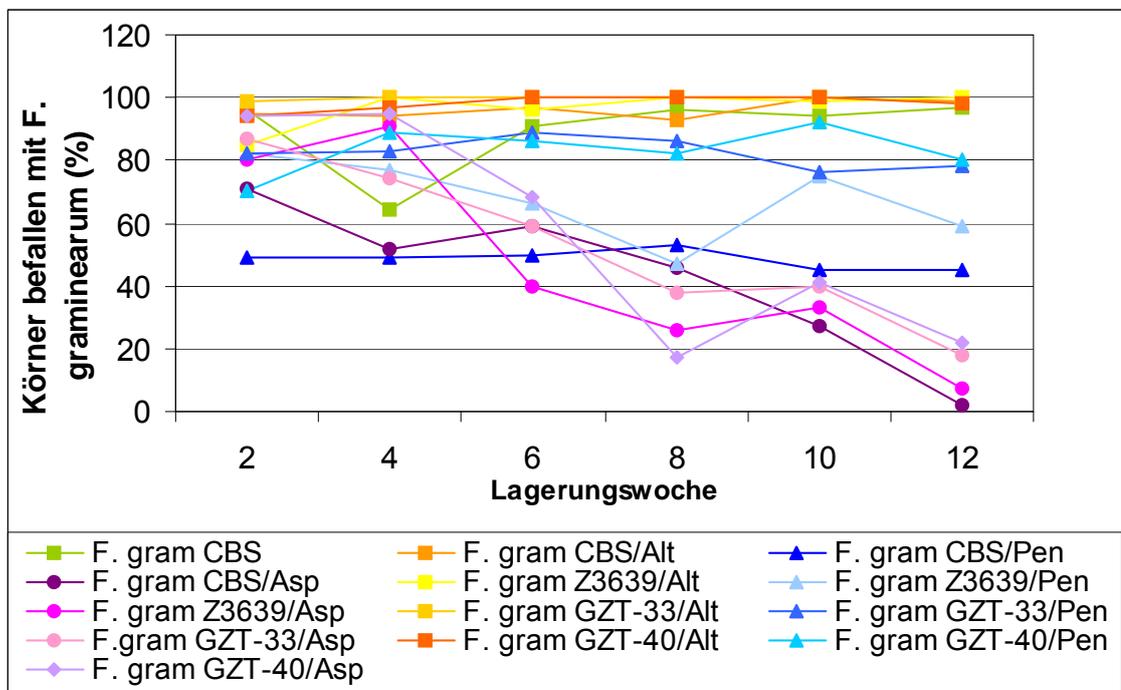


Abbildung 21: Entwicklung des Befalls durch *F. graminearum* in verschiedenen Interaktionsmodellen während der suboptimalen Lagerung von Weizenkörnern ohne natürliche mikrobielle Flora

Für die Interaktionsmodelle *F. graminearum* / *P. verrucosum* (blaue Kurven) konnte generell eine im Vergleich zu den anderen Modellen reduzierte Infektionsrate nach zwei Wochen Lagerung verzeichnet werden. Mit mehr oder weniger großen Schwankungen während der Lagerung blieben die Raten jedoch relativ konstant. So befiel der Stamm GZT-33 nach zwei Wochen 82 % und nach zwölf Wochen 78 % der Körner. Der Stamm CBS 110250 infizierte lediglich 49 % der Körner. Eine Abnahme des Befalls wurde lediglich bei dem Stamm Z3639 festgestellt, der jedoch nach Abschluss der Lagerung mit

59 % Infektionsrate im Vergleich zu den anderen *P. verrucosum*-Modellen im mittleren Wertebereich liegt. Vergleicht man die Endinfektionsraten, so können ähnlich wie bei den Interaktionsmodellen *F. graminearum* / *A. ochraceus* für die beiden Mutantenstämme höhere Raten verzeichnet werden als für die beiden Stämme mit intaktem *tri5*-Gen.

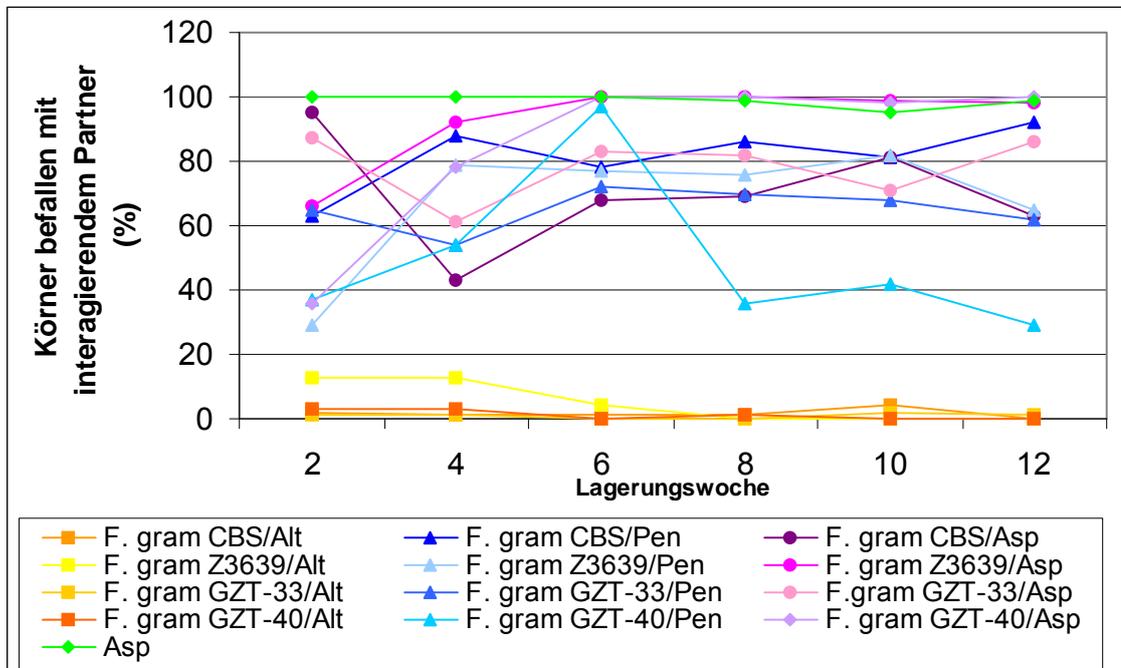


Abbildung 22: Entwicklung des Befalls durch den Interaktionspartner in verschiedenen Interaktionsmodellen während der suboptimalen Lagerung von Weizenkörnern ohne natürliche mikrobielle Flora

Die in Abbildung 22 dargestellten Befallsentwicklungen der interagierenden Schimmelpilze in den verschiedenen Interaktionsmodellen verhalten sich beinahe spiegelbildlich zu denen in Abbildung 21.

Für die Interaktionsmodelle *F. graminearum* / *A. alternata* wurden von Anfang an nur sehr geringe Befallsraten für *A. alternata* ermittelt. Die höchste Rate lag bei 13 % nach zwei Wochen für das Modell Z3639 / *A. alternata*, die aber bei weiterer Lagerung auf 0% sank. Bezüglich *A. ochraceus* zeigte sich in dem Kontrollmodell, welches nur mit *A. ochraceus* inokuliert wurde, ein 100 %iger Befall der Körner an allen untersuchten Zeitpunkten. Die Interaktionsmodelle zeigten dagegen eine zum Teil nur zu Beginn reduzierte Infektionsrate für *A. ochraceus*. So lag der Befall im Modell mit *F. graminearum* GZT-40 nach zwei Wochen Lagerung unter 40 %, erhöhte sich jedoch bis zu Woche 6 auf 100 %. Ähnlich verhielt es sich für das Modell mit *F. graminearum* Z3639, wobei hier der Befall zu Beginn bereits über 60 % lag. Für die Modelle mit den Stämmen GZT-33 und CBS 110250 konnte nach zwei Wochen eine ca. 90%ige Infektion der Körnern mit *A. ochraceus* festgestellt werden, die jedoch während der Lagerung teilweise starken

Schwankungen unterlag und schließlich nach zwölf Wochen Lagerung für GZT-33 bei 86 % und für CBS 110250 bei 63 % zu verzeichnen war.

Hinsichtlich *P. verrucosum* wurden zu Beginn der Lagerung Infektionsraten zwischen 30 und 65 % ermittelt. Tendenziell erhöhte sich die Befallsrate in allen vier Modellen zunächst, um schließlich gegen Ende der Lagerung wieder abzusinken, wobei in der Regel die Anfangswerte nicht unterschritten wurden. Als Ausnahme muss das Modell mit CBS 110250 erwähnt werden. Hier wurde nach Abschluss der Lagerung ein Befall von 92 % ermittelt, was einer Steigerung von insgesamt 30 % entsprach.

3.5.2.2 Analyse mittels DNA-Quantifizierung

Von Körnerproben aus den Wochen 2 und 12 sowie teilweise auch aus der Woche 6 wurde DNA isoliert und mittels realtime PCR quantifiziert, wobei der Einsatz von spezifischen Primern es ermöglichte, die Pilze getrennt voneinander zu erfassen. In Abbildung 23 sind die DNA-Gehalte von *F. graminearum* bezogen auf die Trockenmasse der Körnerprobe für alle Interaktionsmodelle dargestellt. Für den Stamm CBS 110250 wurden sowohl in den Interaktionsmodellen als auch in dem Einzelmodell nur sehr geringe DNA-Konzentrationen unter 0,2 mg/kg TM bestimmt. Im Einzelmodell konnte der höchste Gehalt mit 0,188 mg/kg TM in Woche 2 gemessen werden, der Wert für Woche 12 lag deutlich niedriger. Ähnlich verhielt es sich im Modell mit *A. alternata*. Hier war *F. graminearum* nach zwölf Wochen Lagerung im Gegensatz zu Woche 2 kaum nachweisbar (0,003 mg/kg TM). Im Modell mit *A. ochraceus* wurden sowohl in Woche 2 als auch in Woche 12 nur sehr geringe DNA-Mengen für *F. graminearum* nachgewiesen. Für das Modell mit *P. verrucosum* wurde in Woche 12 eine geringere DNA-Konzentration als in Woche 2 gemessen, wobei in Woche 6 ein deutliche Reduktion des DNA-Gehaltes zu verzeichnen war.

Für den Stamm *F. graminearum* Z3639 lagen die ermittelten DNA-Gehalte grundsätzlich höher als die für Stamm CBS 110250. Im Modell mit *P. verrucosum* konnte von Woche 2 zu 12 mit einem Gehalt von 2,11 mg/kg TM in Woche 12 eine Steigerung um Faktor 8,4 beobachtet werden. Im Modell mit *A. alternata* wurde in Woche 12 mit einem DNA-Gehalt von 5,8 mg/kg TM der Maximalwert für *F. graminearum* Z3639 ermittelt. Hier wurde die DNA-Konzentration von Woche 2 auf Woche 12 aber lediglich um Faktor 2 erhöht, der Gehalt in Woche 2 lag also deutlich höher als der im Modell mit *P. verrucosum*.

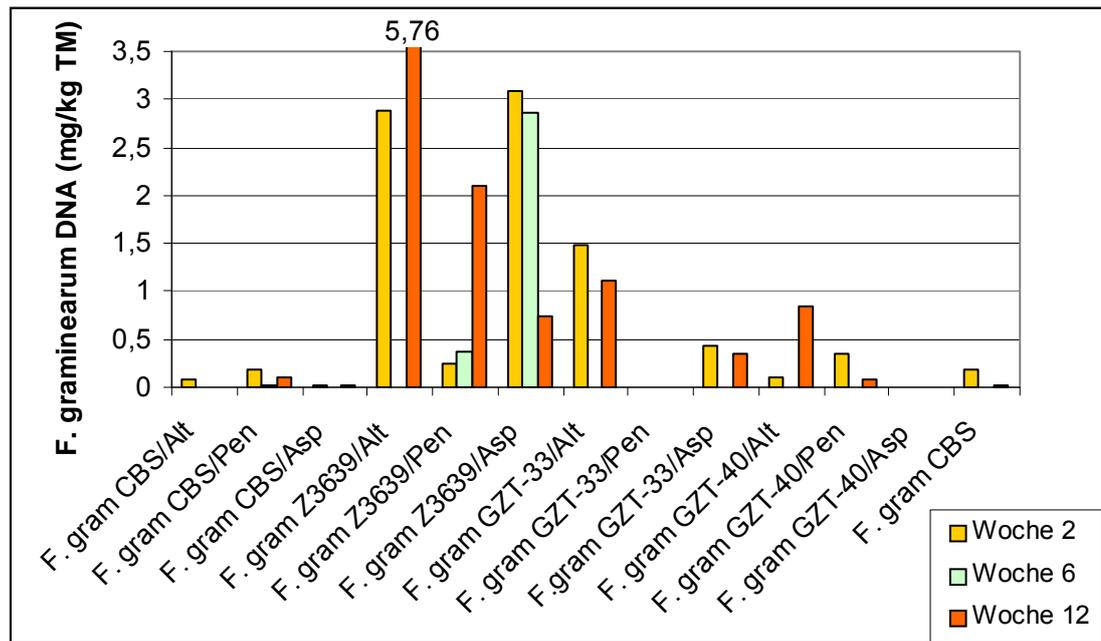


Abbildung 23: Konzentrationen der *F. graminearum* –DNA in der von Körnerproben der Interaktionsmodelle auf Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora nach 2, (teilweise) 6 und 12 Wochen suboptimaler Lagerung isolierten Gesamt-DNA bezogen auf die Trockenmasse der Körnerproben

Für *F. graminearum* GZT-33 konnte in dem Modell mit *P. verrucosum* an allen drei Untersuchungszeitpunkten kaum DNA nachgewiesen werden. Hingegen im Modell mit *A. ochraceus* konnten wenn auch geringe (unter 0,5 mg/kg TM) DNA-Konzentrationen gemessen werden. Von Woche 2 zu Woche 12 war eine Abnahme zu verzeichnen. Die höchsten DNA-Gehalte für *F. graminearum* GZT-33 (1,5 bzw. 1,1 mg/kg TM) wurden im Modell mit *A. alternata* ermittelt. Auch hier nahm die DNA-Konzentration zu Woche 12 hin ab.

Bezüglich *F. graminearum* GZT-40 stiegen die DNA-Gehalte im Modell mit *A. alternata* von 0,1 mg/kg TM in Woche 2 auf 0,8 mg/kg TM in Woche 12. Dies war der höchste Gehalt, der für den Stamm GZT-40 bestimmt wurde. Im Modell mit *P. verrucosum* sank die DNA-Konzentration von 0,34 auf 0,09 mg /kg TM, im Modell mit *A. ochraceus* war zu den ausgewählten Zeitpunkten kaum DNA von *F. graminearum* messbar.

Im folgenden werden die ermittelten DNA-Konzentrationen für die interagierenden Schimmelpilze dargelegt. Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, lagen die DNA-Gehalte für *A. alternata* so niedrig, dass sie in der Abbildung nicht dargestellt wurden. Der höchste Gehalt betrug 0,18 mg/kg TM im Modell mit *F. graminearum* Z3639 nach zwei Wochen Lagerung. Nach zwölf Wochen Lagerung konnten lediglich 0,02 mg/kg TM DNA quantifiziert werden. Ähnlich verhielt es sich im Modell mit *F. graminearum* GZT-40 mit

0,15 mg/kg TM zu Beginn und 0,01 mg/kg TM nach Abschluss der Lagerung. Bei Interaktion mit den beiden anderen Stämme von *F. graminearum* konnte keine *Alternaria*-DNA gemessen werden.

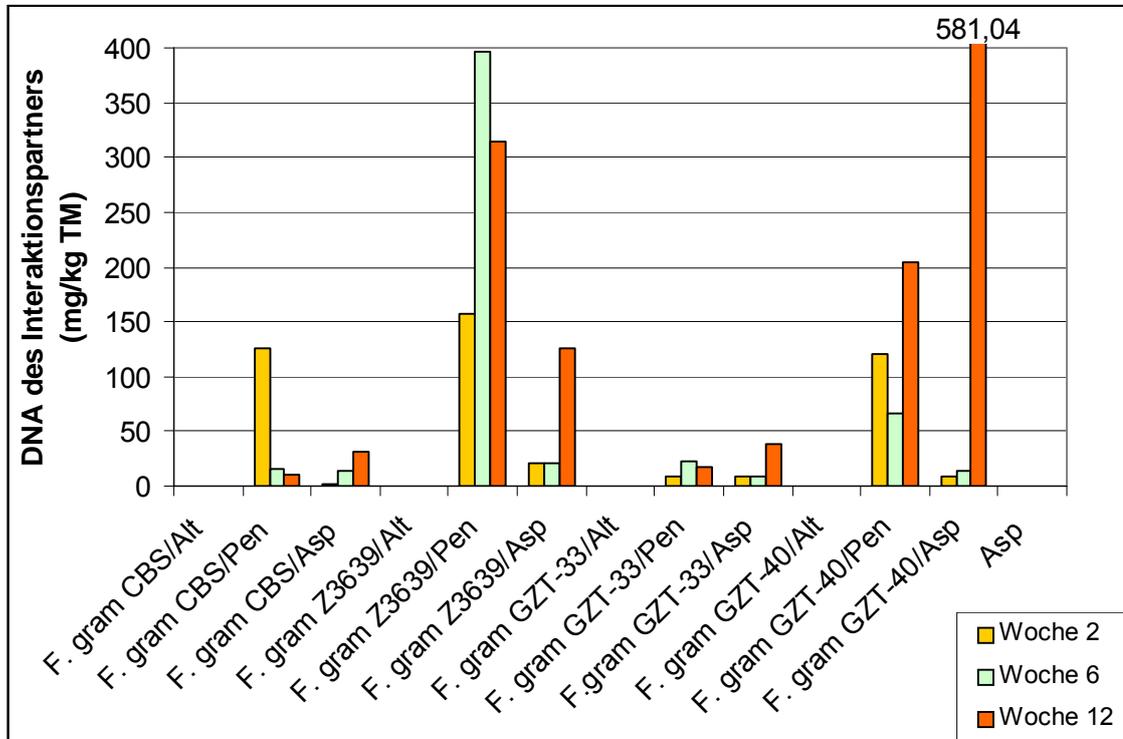


Abbildung 24: Konzentrationen der DNA der interagierenden Pilze in der von Körnerproben der Interaktionsmodelle auf Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora nach 2, (teilweise) 6 und 12 Wochen suboptimaler Lagerung isolierten Gesamt-DNA bezogen auf die Trockenmasse der Körnerproben

Die Ergebnisse bezüglich *P. verrucosum* sind uneinheitlich. So wird im Modell mit *F. graminearum* CBS 110250 nach zwei Wochen ein DNA-Gehalt von 126 mg/kg TM bestimmt, in den Wochen 6 und 12 konnte eine signifikante Abnahme auf 16 bzw. 10 mg/kg TM verzeichnet werden. Dagegen wurde in den Modellen mit Z3639 und GZT-40 eine Steigerung von Woche 2 zu Woche 12 festgestellt. Für die Interaktion mit Z3639 wurden in Woche 2 bereits über 150 mg DNA/kg TM ermittelt, was sich auf 400 mg/kg TM in Woche 6 erhöhte. In Woche 12 lag der DNA-Gehalt schließlich bei 300 mg/kg TM. Diese Werte entsprechen den für die jeweilige Woche höchsten, die für *P. verrucosum* ermittelt wurden. Für das Modell mit GZT-33 lagen die gemessenen DNA-Gehalte alle unter 25 mg/kg TM. Die drei untersuchten Zeitpunkte unterschieden sich nicht deutlich in den Werten.

Für *A. ochraceus* konnte in allen vier Modellen eine Zunahme der DNA-Konzentration von Woche 2 bis Woche 12 beobachtet werden. Dabei lagen die Werte zu Beginn relativ gesehen recht niedrig und steigerten sich um Faktor 4 bis 60. Die geringste Zunahme ist

im Modell mit GZT-33 zu verzeichnen, wobei die Endkonzentration der *Penicillium*-DNA mit 38 mg/kg TM ähnlich hoch lag wie in dem Modell mit CBS 110250. Für das Modell mit Z3639 wurden nach zwölf Wochen 125 mg DNA/kg TM quantifiziert. Dieser Wert wurde noch übertroffen mit 580 mg/kg TM nach zwölf Wochen in dem Modell mit *F. graminearum* GZT-40. Abschließend bleibt das Einzelmodell, welches nur mit *A. ochraceus* inokuliert wurde. Hier konnten mit 0,18 mg/kg TM nur sehr geringe Mengen an *Aspergillus*-DNA quantifiziert werden.

3.5.3 Entwicklung der Mykotoxingehalte während der suboptimalen Lagerung von Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora

Aus Körnerproben der Lagerungswochen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 wurden in getrennten Verfahren die Mykotoxine DON, ZEA und OTA extrahiert und die Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf die Trockenmasse bezogen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erlangen. In einem zweiten Schritt wurde außerdem die Anzahl der jeweiligen Produzenten berücksichtigt. Dazu wurden die Werte aus den kulturellen Untersuchungen der Körnerproben (3.5.2.1) herangezogen.

3.5.3.1 DON

Für die Interaktionsmodelle mit *F. graminearum* GZT-33 und GZT-40 entfiel die Quantifizierung von DON, da diese Mutanten nicht in der Lage sind, Trichothecene zu bilden. Die Analyse der DON-Gehalte der übrigen Körnerproben zeigte, dass es sich bei dem Stamm *F. graminearum* Z3639 im Vergleich zu dem Stamm CBS 110250 offenbar um einen stärkeren DON-Bildner handelt. Wie sich aus Abbildung 25 ergibt, lagen die DON-Gehalte für CBS 110250 außer in dem Interaktionsmodell *F. graminearum* / *A. ochraceus* deutlich unter 100 µg DON/kg TM, während für den Stamm Z3639 DON-Werte 100 –750 µg/kg TM bestimmt wurden.

Bezüglich dem Stamm CBS 110250 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den DON-Werten der Interaktions- und des Einzelmodells beobachtet werden. Weiterhin konnte im Verlauf der Lagerung keine nennenswerte Zu- oder Abnahme der DON-Gehalte ermittelt werden. Eine Ausnahme bildete das Interaktionsmodell mit *A. ochraceus*. Hier wurden ab der achten Lagerungswoche erhöhte DON-Werte gemessen.

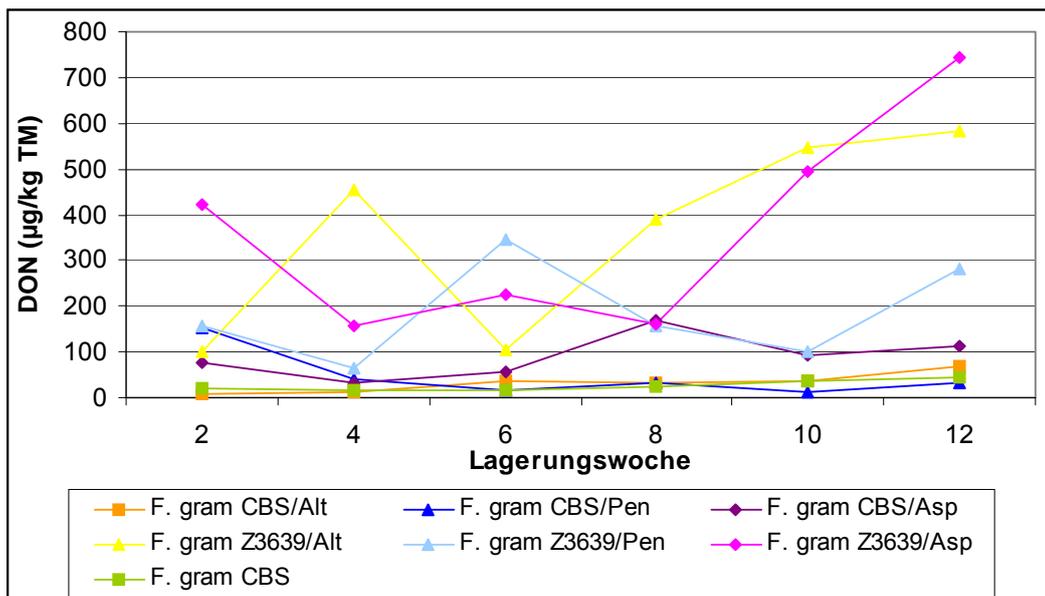


Abbildung 25: DON-Gehalte von Körnerproben verschiedener Interaktionsmodelle aus der suboptimalen Lagerung von Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora bezogen auf die Trockenmasse der Körnerproben

Für *F. graminearum* Z3639 konnten in den Modellen mit *A. alternata* und *A. ochraceus* ebenfalls ab Woche 8 steigende DON-Gehalte verzeichnet werden. Allerdings gab es in den Wochen 2 bzw. 4 im Gegensatz zu den Interaktionen von *F. graminearum* CBS 110250 bereits hohe DON-Werte. In dem Modell Z3639 / *P. verrucosum* wurde der höchste DON-Gehalt in Woche 6 mit 345 µg/kg TM gemessen, danach sank der Gehalt, um in Woche 12 wieder anzusteigen. Abbildung 26 stellt für die Wochen 2 und 12 die DON-Werte auf die Anzahl der Kolonien von *F. graminearum* bezogen sowie die Infektionsrate von *F. graminearum* und dem jeweiligen interagierende Pilz nach zwölf Wochen Lagerung dar. In allen Interaktionsmodellen lag nach zwei Wochen Lagerung die DON-Produktivität sehr niedrig. Nach zwölf Wochen zeigten sich in den Modellen mit *A. alternata* und *P. verrucosum* keinerlei Auswirkung der Interaktion auf die DON-Bildung. Damit einher gingen in diesen Modellen hohe Infektionsraten von *F. graminearum*. In den Interaktionen mit *A. ochraceus* jedoch erhöhte sich die DON-Produktivität. Für den Stamm Z3639 war dies ausgeprägter als für den Stamm CBS 110250. Gleichzeitig war der Befall der Körner durch *F. graminearum* sehr stark reduziert.

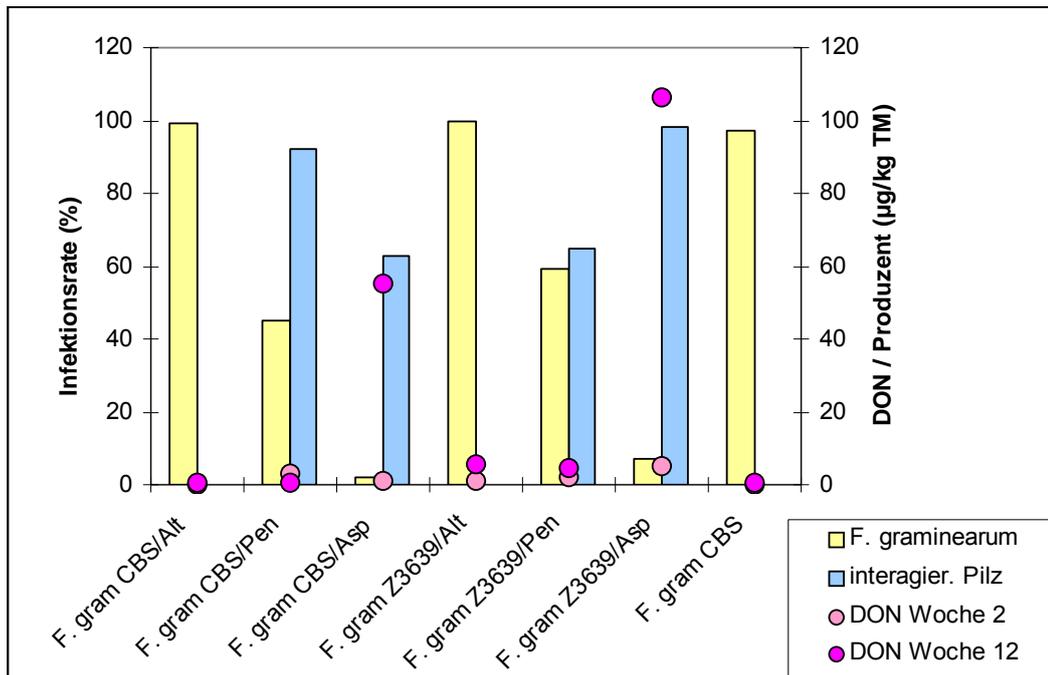


Abbildung 26: DON-Gehalte pro DON-Produzent nach 2 und 12 Wochen sowie die Infektionsraten der *F. graminearum* Stämme CBS 110250 und Z3639 sowie der interagierenden Pilze nach 12 Wochen von den Interaktionsmodellen aus der suboptimalen Lagerung von Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora

3.5.3.2 ZEA

Alle Interaktionsmodelle wurden bezüglich ZEA untersucht. Die Werte bezogen auf die Trockenmasse sind als Verläufe während der Lagerung in Abbildung 27 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die ZEA-Gehalte in allen Modellen mit andauernder Lagerung steigen. Auch in dem Einzelmodell mit *F. graminearum* CBS 110250 konnte ein deutlicher Anstieg gemessen werden, so dass nach zwölf Wochen Lagerung ein ZEA-Gehalt von 116 mg/kg TM ermittelt wurde. Hingegen in den Interaktionsmodellen mit diesem Stamm wurden zu diesem Zeitpunkt nur Werte unter 66 mg/kg TM erreicht.

Für den Stamm Z3639 fielen die Entwicklungen der ZEA-Gehalte ähnlich aus, abgesehen von dem Modell mit *A. ochraceus*. Hier wurde ein signifikanter Anstieg ab Woche 6 verzeichnet, der in einem Wert von 260 mg/kg TM mündete.

Eine vergleichbare ZEA-Konzentration in Woche 12 wurde auch für das Modell GZT-33 / *A. ochraceus* ermittelt, wobei der Anstieg erst nach Woche 10 erfolgte. Für die beiden anderen Modelle mit GZT-33 wurden im Unterschied zu dem Stamm Z3639 noch höhere Gehalte berechnet. In Interaktion mit *A. alternata* wurden 340 mg/kg TM, mit *P. verrucosum* 370 mg/kg TM erreicht.

In den Modellen mit dem Stamm GZT-40 wurden die höchsten ZEA-Gehalte gemessen. Die Entwicklung im Modell mit *A. ochraceus* verläuft annähernd so wie die des Stammes Z3639, wobei nach zwölf Wochen mit 740 mg/kg TM der höchste ZEA-Gehalt von allen Modellen ermittelt wurde. Für die Modelle GZT-40 / *A. alternata* bzw. *P. verrucosum* konnte bereits ab Woche 2 ein starker Anstieg der ZEA-Konzentration gemessen werden, der in Woche 10 Maximalwerte von über 1900 mg/kg TM erreicht. In Woche 12 waren diese Konzentrationen jedoch wieder auf 360 bzw. 560 mg/kg TM reduziert.

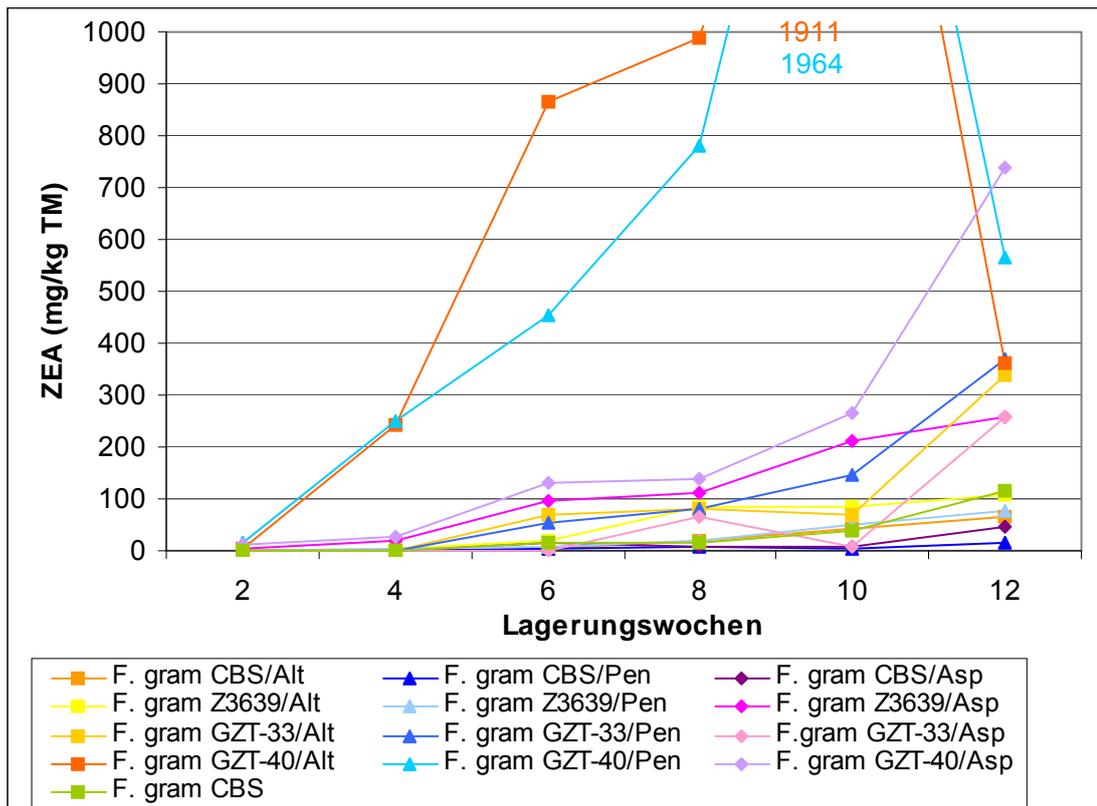


Abbildung 27: ZEA-Gehalte von Körnerproben der Interaktionsmodelle aus der suboptimalen Lagerung von Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora bezogen auf die Trockenmasse der Körnerproben

Betrachtet man nun die ZEA-Gehalte von Woche 2 und 12 bezogen auf die Anzahl der Produzenten, in diesem Fall *F. graminearum*, und vergleicht dies mit den Infektionsraten des interagierenden Pilzes und *F. graminearum* nach zwölf Wochen (Abbildung 28), so ergibt sich, dass zu Beginn in allen Modellen die ZEA-Produktivität sehr niedrig lag. Nach zwölf Wochen war für das Einzelmodell mit *F. graminearum* CBS 110250 ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Die vier höchsten ZEA-Gehalte / Produzent fanden sich in den vier Modellen mit *A. ochraceus* einhergehend mit hohem Befall durch *A. ochraceus* und niedrigen *Fusarium*-Infektionsraten.

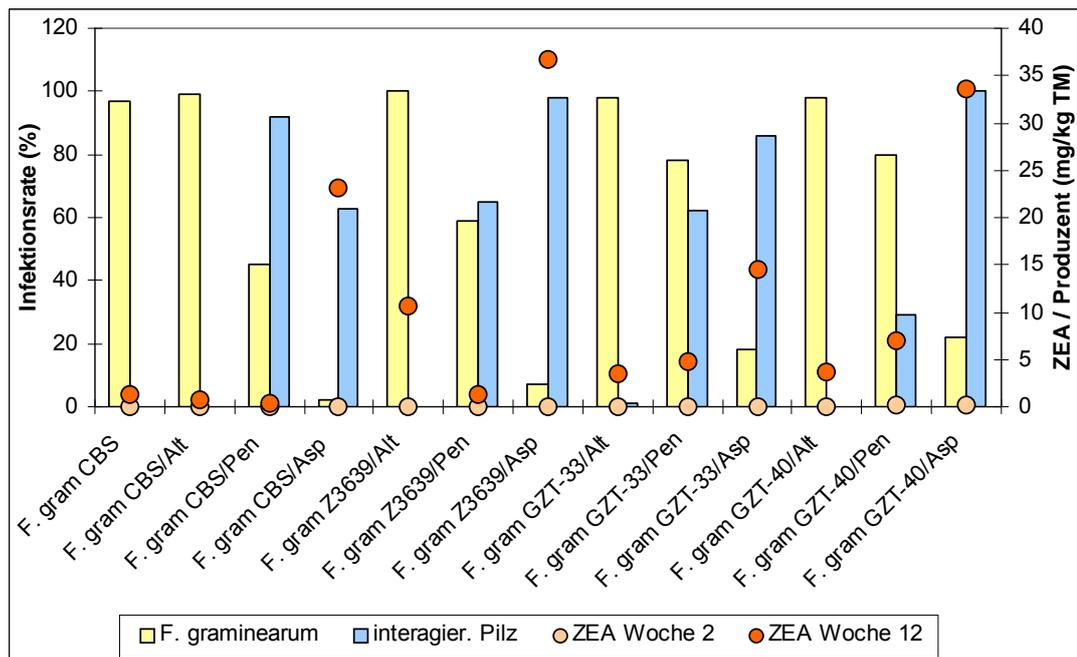


Abbildung 28: ZEA-Gehalte pro ZEA-Produzent und Infektionsraten der *F. graminearum* Stämme sowie der interagierenden Pilze nach zwölf Wochen von den Interaktionsmodellen aus der suboptimalen Lagerung von Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora

Vergleicht man die Modelle mit *P. verrucosum*, so ergibt sich ein interessanter Aspekt. *F. graminearum* CBS 110250 produzierte während der Lagerung nur wenig ZEA, die Infektionsrate für den Stamm lag unter 50 %, während der Befall durch *P. verrucosum* über 90 % betrug. Stamm Z3639 bildete geringfügig ZEA (1,3 mg/kg TM) pro Produzent und befiel über 50 % der Körner. Die Infektionsrate von *P. verrucosum* (65 %) war verglichen mit der des Modells mit Stamm CBS 110250 reduziert, jedoch noch höher als die von *F. graminearum* Z3639. Bei dem Modell GZT-33 / *P. verrucosum* wurde nach zwölf Wochen Lagerung eine ZEA-Produktivität von 4,7 mg/kg TM pro Produzent erreicht, gepaart mit einer Infektionsrate von 78 % für *F. graminearum* und nur 62 % für *P. verrucosum*. Diese Umkehrung der Verhältnisse im Befall war für das Modell GZT-40 / *P. verrucosum* noch ausgeprägter. Hier waren 80 % der Körner durch *F. graminearum* befallen und lediglich 30 % durch *P. verrucosum*. Parallel dazu lag die ZEA-Produktivität bei 7 mg/kg TM. Insgesamt konnte demnach beobachtet werden, dass mit zunehmender ZEA-Produktivität die Infektionsrate von *F. graminearum* anstieg und der Befall durch *P. verrucosum* reduziert wurde.

Betrachtet man die Modelle mit *A. alternata*, so konnten auch hier mehr oder weniger starke Zunahmen der ZEA-Produktivität pro Produzent verzeichnet werden. GZT-33 und GZT-40 bildeten vergleichbare Menge ZEA pro Produzent (3,5 bzw. 3,7 mg/kg TM), CBS 110250 produzierte nur 0,7 mg ZEA/kg TM und Z3639 10,7 mg/kg TM. Die Befallsraten sind in allen Modellen zumindest nach zwölf Wochen Lagerung ähnlich. *F. graminearum*

infizierte einen hohen Prozentsatz an Körnern, während *A. alternata* (fast) völlig aus dem Modell verdrängt worden war.

3.5.3.3 OTA

Bezüglich OTA wurden nur die Interaktionsmodelle analysiert, die mit OTA-Produzenten inokuliert wurden. Alle Modelle mit *A. alternata* entfielen demnach. Als Einzelmodell wurde das von *A. ochraceus* untersucht.

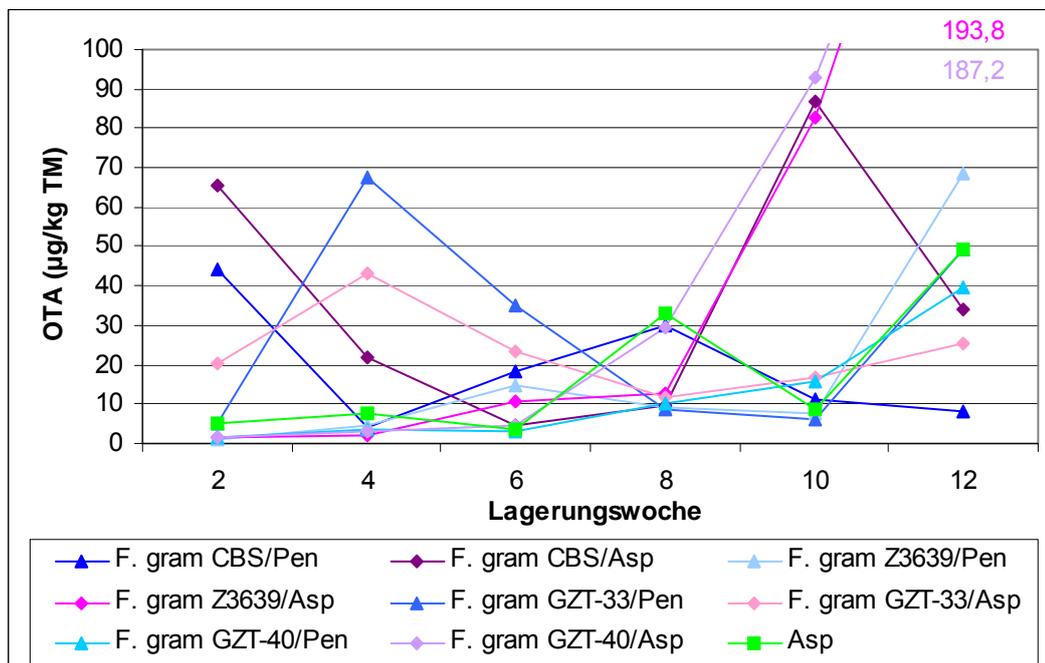


Abbildung 29: OTA-Gehalte von Körnerproben verschiedener Interaktionsmodelle aus der suboptimalen Lagerung von Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora bezogen auf die Trockenmasse der Körnerproben

Wie Abbildung 29 darstellt, konnte in allen Modellen mit Ausnahme des Modells *F. graminearum* CBS 110250/ *P. verrucosum* eine Zunahme der OTA-Gehalte von Woche 2 zu Woche 12 beobachtet werden. Zwar enthielten nicht alle Modelle zu Beginn wenig OTA, so konnte in Modell *F. graminearum* CBS 110250 / *A. ochraceus* bereits nach zwei Wochen ein Gehalt von 65 µg/kg TM ermittelt werden, aber verglichen mit den Gehalten nach zwölf Wochen war immer eine Zunahme zu verzeichnen. Auch im Einzelmodell mit *A. ochraceus* steigerte sich der OTA-Gehalt von anfänglich 5 µg/kg TM um Faktor 10 auf 50 µg/kg TM. In den Modellen mit *F. graminearum* Z3639 sowie mit GZT-40 lagen die OTA-Gehalte in Woche 2 etwas niedriger als im Einzelmodell, stiegen jedoch ab Woche 8 stark an. In Woche 12 wurden dann die höchsten OTA-Konzentrationen gemessen mit Werten von fast 200 µg/kg TM. Ansonsten wurden für Woche 12 OTA-Konzentrationen

von unter 70 µg/kg TM gemessen. Die Konzentrationsänderungen während der Lagerung lassen in den betreffenden Modellen keine einheitliche Beschreibung zu. Es gab z.T. große Schwankungen, z.B. im Modell *F. graminearum* GZT-33 / *P. verrucosum*. Hier wurde ein starker Anstieg von Woche 2 auf Woche 4 gemessen, dem ein Abfall bis Woche 10 folgte und in einem Wiederanstieg endete. Anders verhielt es sich in Modell CBS 110250 / *P. verrucosum*. Von einem hohen Anfangsgehalt reduzierte sich die OTA-Konzentration zunächst, um dann wieder anzusteigen und gegen Ende wieder zu sinken. Die Konzentrationsänderungen lassen nur sehr begrenzt mit den jeweiligen Befallsentwicklungen vereinbaren. So fiel bei den beschriebenen Modellen mit *P. verrucosum* ein reduzierter Befall mit ansteigenden OTA-Gehalten zusammen, während eine zunehmende Infektionsrate mit abnehmenden OTA-Gehalten einherging. Bei anderen Modellen (z.B. GZT-40 / *P. verrucosum*) lassen sich solche Korrelation jedoch nicht finden.

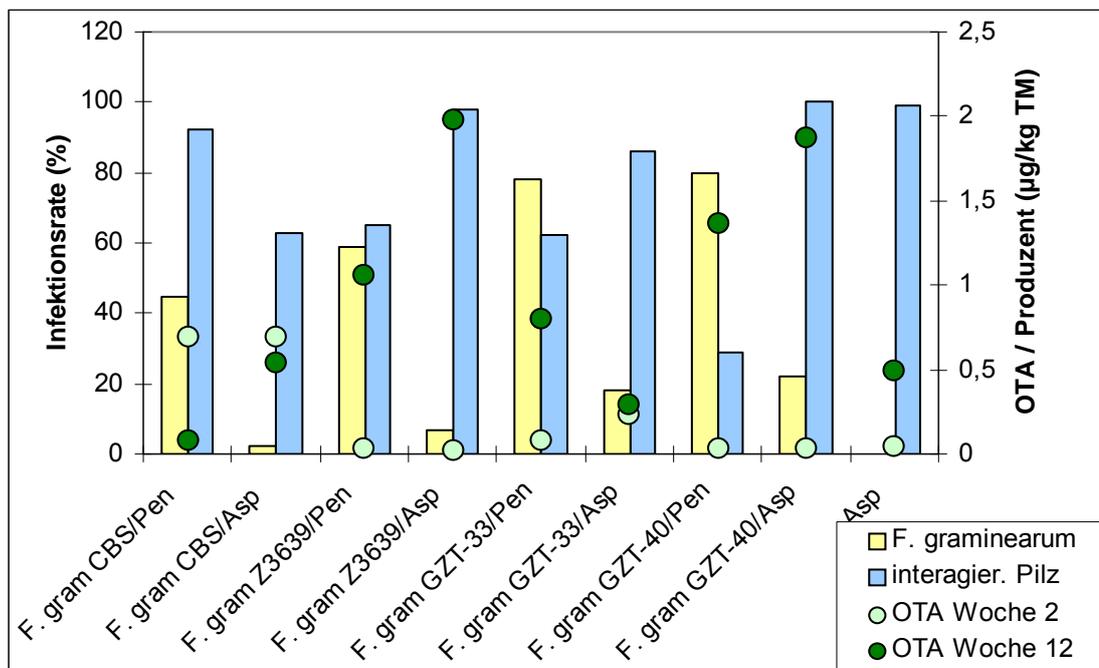


Abbildung 30: OTA-Gehalte pro OTA-Produzent und Infektionsraten der *F. graminearum* Stämme sowie der OTA-Produzenten nach zwölf Wochen von verschiedenen Interaktionsmodellen aus der suboptimalen Lagerung von Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora

In Abbildung 30 wurden die OTA-Gehalte auf die Anzahl der Produzenten umgerechnet, was aber nicht ermöglichte, eine einheitliche Tendenz festzulegen. In den Modellen mit den *F. graminearum* Stämmen Z3639 und GZT-40 konnten die für Woche 12 höchsten OTA-Produktivitäten (1,9 µg/kg TM pro *A. ochraceus*) ermittelt werden, in den beiden anderen Modellen mit *A. ochraceus* veränderte sich die Produktivität von Woche 2 auf Woche 12 kaum, wohingegen zwischen den vier Modellen kein signifikanter Unterschied im Befall bestand. Ein deutlicher Anstieg der Produktivität konnte auch im Einzelmodell

verzeichnet werden. Im Vergleich zum Beginn der Lagerung produzierte *P. verrucosum* am Ende der Lagerung in Interaktion mit *F. graminearum* stets vermehrt OTA. Als Ausnahme hierzu wurde in dem Modell mit Stamm CBS 110250 eine starke Abnahme beobachtet.

3.6 *In vivo* Interaktion von Schimmelpilzen auf Weizenkörnern mit natürlicher mikrobieller Flora

3.6.1 Mikrobiologische Qualität des zu lagernden Getreides

Bei dem in diesem Lagerungsversuch verwendeten Getreide handelte es sich um Winterweizen der Sorte Drifter aus dem Erntejahr 2004. Der Feuchtegehalt wurde mit 10 % bestimmt. Durch Auslegen von 200 Körnern in CZID-Agar wurde das vom Versuchsgut Frankenforst der Universität Bonn bereitgestellte Getreide hinsichtlich des Befalls durch Schimmelpilze untersucht.

Im Vergleich zu dem Getreide für den Lagerungsversuch ohne natürliche mikrobielle Flora zeigte sich wie Abbildung 31 aus ersichtlich bei diesem Weizen ein starker Befall vor allem durch *Fusarium* spp. und *Alternaria* spp..

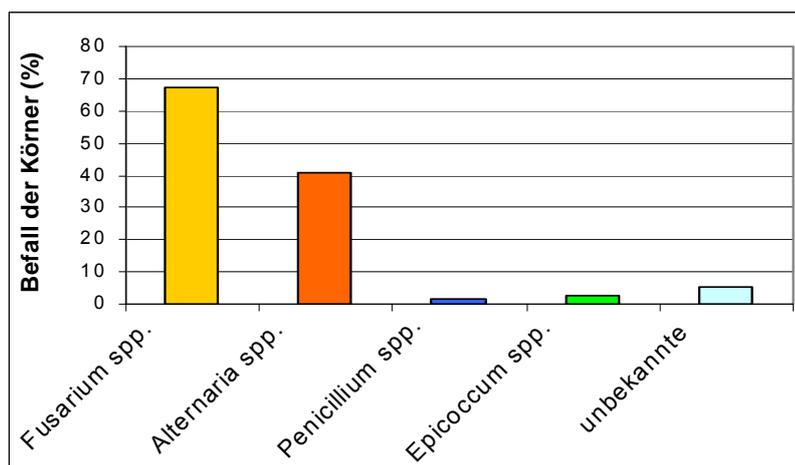


Abbildung 31: Spektrum der auf dem für den Lagerversuch mit natürlicher mikrobieller Flora verwendeten Weizen vorkommenden Schimmelpilze

Wie die Artbestimmung der *Fusarium* spp. zeigte (Abbildung 32), war *F. graminearum* die weitaus häufigste Art gefolgt von *F. cerealis*. Wie in Abbildung 32 anhand der Markierungen dargestellt, sind einige der identifizierten *Fusarium* spp. in der Lage, sowohl

DON als auch ZEA zu bilden. Dementsprechend lag der DON-Gehalt des Getreides vor Inokulation und Lagerung bei 650 µg/kg TM, die ZEA-Kontamination betrug 62 µg/kg TM. Der OTA-Gehalt wurde mit 70 µg/kg TM bestimmt.

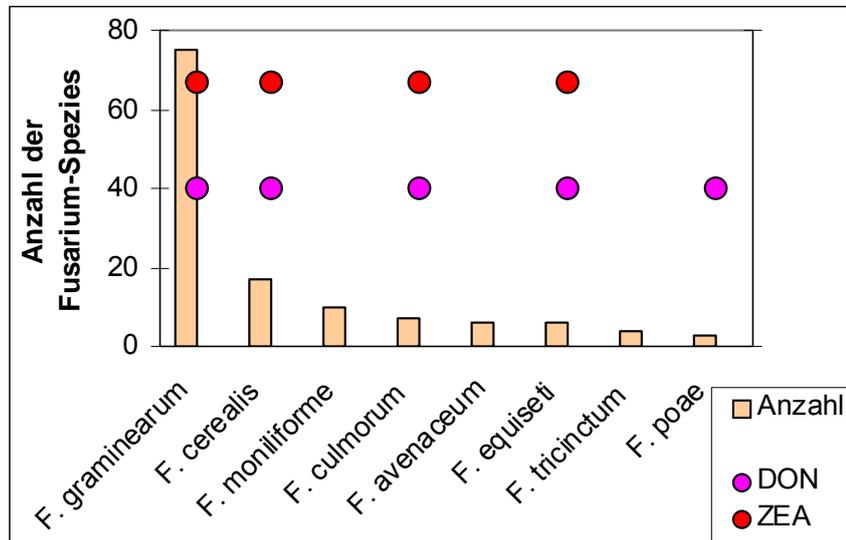
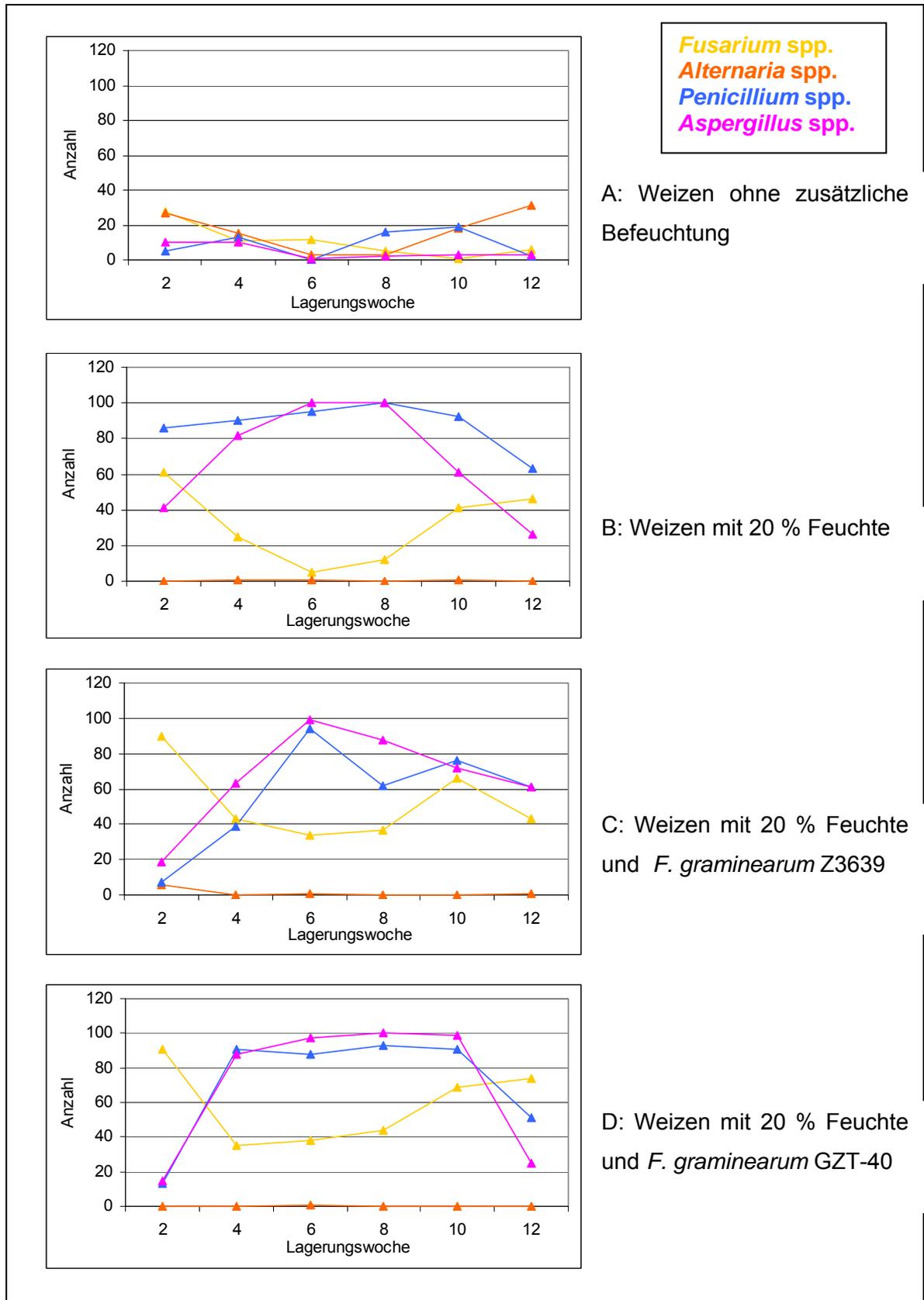


Abbildung 32: Artenspektrum der auf dem für den Lagerversuch mit natürlicher mikrobieller Flora verwendeten Weizen vorkommenden Fusarien sowie deren Fähigkeit zur Bildung von DON bzw. ZEA (Markierung dient keiner quantitativen Aussage, sondern gibt rein qualitativ an, ob es sich um einen DON- bzw. ZEA-Bildner handelt)

3.6.2 Befallsentwicklung des suboptimalgelagerten Getreides mit natürlicher mikrobieller Flora

Während der Lagerung zweiwöchentlich entnommene Proben wurden durch kulturelle Methoden und durch DNA-Quantifizierung hinsichtlich des Befalls durch Fusarien und Alternarien sowie den Lagerpilzen *Aspergillus* spp. und *Penicillium* spp. untersucht. Weiterhin wurden die nach Auslegen der Körner gewachsenen Fusarien anhand mikroskopischer Beurteilung der Makrokonidien speziesbestimmt.

3.6.2.1 Analyse mittels mikrobiologisch-kultureller Methode



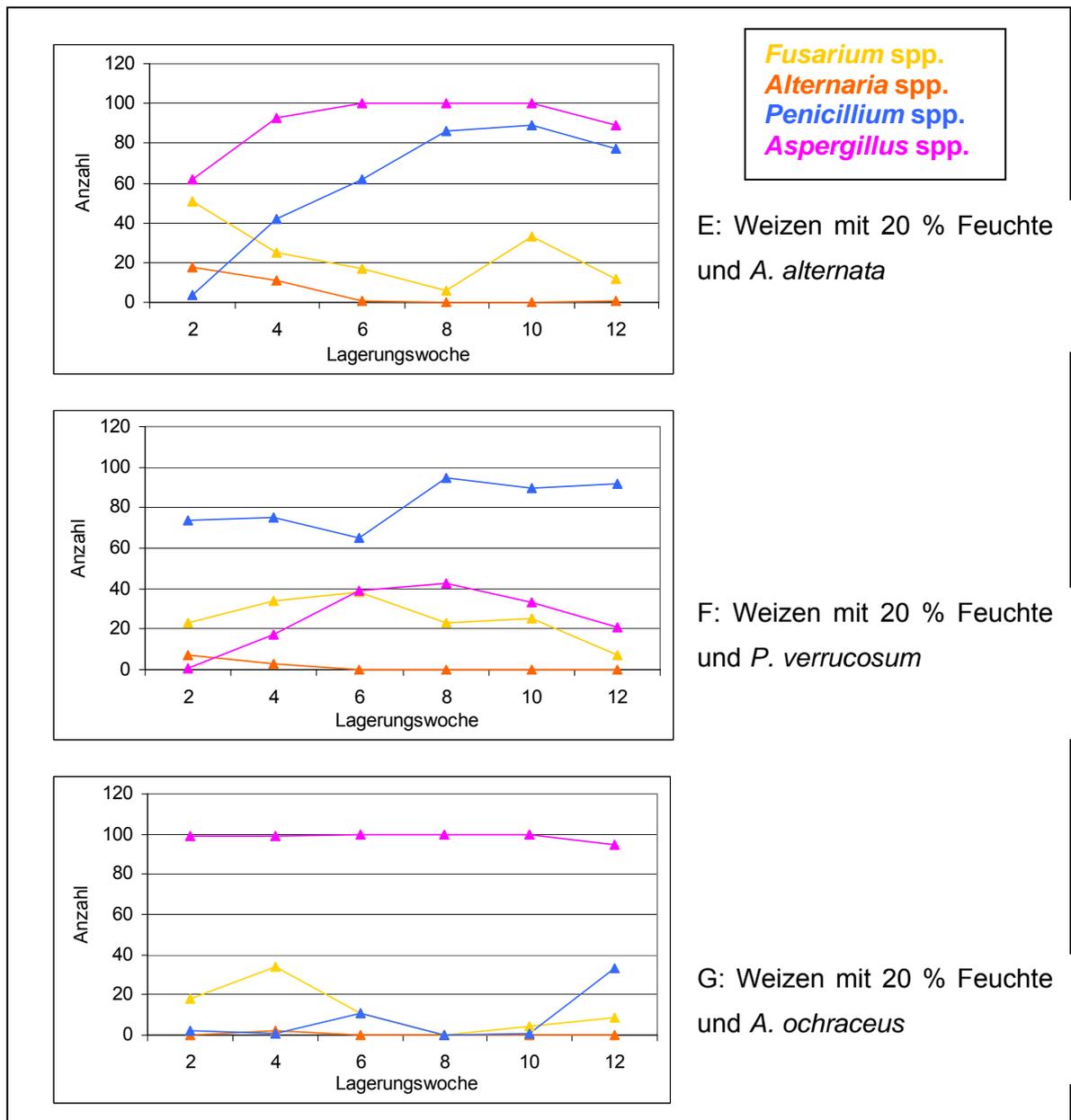


Abbildung 33: Befallsentwicklung der verschiedenen Modelle während der suboptimalen Lagerung von Weizenkörnern mit natürlicher mikrobieller Flora (Anzahl an Pilzen der jeweiligen Pilzgattung auf 100 Körnern)

Die Darstellung der Befallsentwicklung erfolgt der Übersichtlichkeit wegen getrennt nach Modellen.

Wie Abbildung 33 A zeigt, wurde Weizen mit einer natürlichen Feuchte von 10 % während suboptimaler Lagerung über die gesamte Lagerdauer deutlich geringfügiger von Schimmelpilzen befallen als Weizen mit einer Feuchte von 20 % (Abbildung 33 B). Besonders die als Lagerpilze bezeichneten Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* entwickelten sich kaum. Hingegen erhöhte sich der Befall durch *Alternaria* spp. im Vergleich zu den Modellen mit feuchtem Weizen signifikant. Es wurden Infektionsraten

von 30 % erreicht. Am Ende der Lagerung dominierte diese Gattung das Schimmelpilzspektrum.

Für alle weiteren Modelle wurde Weizen mit einer Feuchte von 20 % gelagert. Generell konnte beobachtet werden, dass die Gattung *Alternaria* in diesen Modellen keine Rolle spielte und völlig unterdrückt wurde. Im Folgenden werden deshalb lediglich anderen Schimmelpilze berücksichtigt.

Im Kontrollmodell (Abbildung 33 B) infizieren die Lagerpilze den Weizen innerhalb von vier Wochen so stark, dass jedes Korn befallen ist. Parallel dazu ging der Befall durch *Fusarium* spp. um ca. 60 % zurück. Nach 8 Wochen Lagerung jedoch steigt die Infektionsrate der Fusarien wieder und gleichzeitig sinkt der Befall durch *Penicillium* und *Aspergillus* spp. Für alle drei Gattungen wurden nach Abschluss der Lagerung ungefähr die anfänglichen Infektionsraten ermittelt.

Wurde dem Weizen mit *F. graminearum* Z3639 inokulierter Weizen zugemischt (Abbildung 33 C), so lag die Infektionsrate von *Fusarium* in Woche 2 um ca. 30 % höher als im Kontrollmodell. Jedoch mit einer Abnahme um etwa 60 % und einem leichten Wiederanstieg verlief die Entwicklung des Befalls während der Lagerung ähnlich, nur auf ein höheres Niveau versetzt. Der Befall durch die Lagerpilze erhöhte sich im Vergleich zum Kontrollmodell etwas verzögert, aber in Woche 6 waren ebenfalls jeweils 100 % der Körner infiziert. Diesem Maximum schloss sich sowohl für *Penicillium* als auch für *Aspergillus* direkt wieder eine Abnahme an.

Mit *F. graminearum* GZT-40 im Modell (Abbildung 33 D) wurden tendenziell die gleichen Verläufe ermittelt. Für die Fusarien, die ähnlich zu dem Modell mit Stamm Z3639 in Woche 2 eine Infektionsrate von 90 % aufwiesen, kam es zunächst zu einer Reduktion auf ca. 40 % und anschließend wieder zu einem Anstieg, der hier für GZT-40 ausgeprägter ausfällt als für Z3639. Am Ende der Lagerung waren über 70 % der Körner mit Fusarien infiziert. Die Lagerpilze befielen innerhalb der ersten 4 Wochen alle Körner und hielten diese Infektionsrate bis zu Woche 10. Diese konstante Phase trat ebenfalls bei dem Kontrollmodell -allerdings weniger deutlich- auf, während sie im Modell mit *F. graminearum* Z3639 wegfiel. Dagegen gestaltete sich die Abnahme des Befalls ab Woche 10 drastischer als in den zuvor beschriebenen Modellen.

Wie zuvor schon erwähnt, spielte die Gattung *Alternaria* bei der Lagerung von feuchtem Weizen keine Rolle. Dies wurde nochmals im Modell mit *A. alternata*-inokuliertem Weizen deutlich (Abbildung 33 E). Zwar lag die Infektionsrate für *Alternaria* spp. nach 2 Wochen Lagerung bei immerhin 20 %, aber ab Woche 6 war diese Gattung praktisch aus dem Pilzspektrum verschwunden. Für die Fusarien zeigte sich die bereits bekannte Entwicklung. Die mit dem Kontrollmodell vergleichbare Befallsrate von knapp 60 % in Woche 2 nahm bis Woche 8 auf 6 % ab. Die anschließende Zunahme auf ca. 40 %

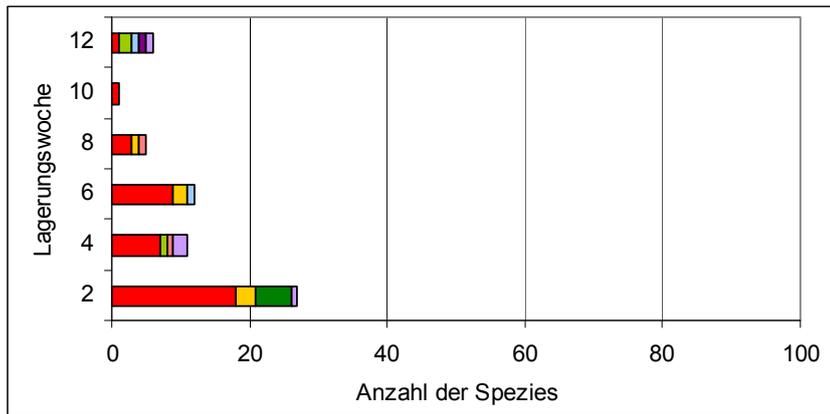
mündete allerdings mit unter 20 % in einem etwas niedrigeren Befall bei Ende der Lagerung. Im Gegensatz zu den Fusarien, die hier leicht unterrepräsentiert waren, zeigten sich die Lagerpilze stark. Der Befall von knapp 100 % konnte mit leichtem Rückgang auf 80-90 % bis zum Ende der Lagerung nachgewiesen werden.

Das Modell mit *P. verrucosum* (Abbildung 33 F) unterscheidet sich von den bisher beschriebenen in der Weise, dass für *P. verrucosum* Infektionsraten von 70-90 % ermittelt wurden, ohne dass es gegen Ende der Lagerung zu einem Rückgang kam und *Aspergillus* spp. signifikant weniger Körner befielen. Es wurde lediglich eine Maximalinfektionsrate von 40 % in den Wochen 6 und 8 erreicht, danach reduzierte sich der Befall auf 20 %. Für die Fusarien konnte zunächst eine leichte Zunahme von 20 auf 40 % beobachtet werden. Die Infektionsrate nahm jedoch ab Woche 6 ab und lag am Ende der Lagerung unter 10 %.

Bei Inokulation mit *A. ochraceus* (Abbildung 33 G) dominierte dieser das Pilzspektrum sehr stark. Zu allen untersuchten Zeitpunkten waren 100 % der Körner befallen. Die beiden anderen Gattungen, die bisher in der Lagerung bedeutsam waren, wurden deutlich zurückgedrängt. In Woche 4 waren zwar noch fast 40 % der Körner von Fusarien befallen, nachfolgend kam es jedoch zu einem merklichen Rückgang auf Infektionsraten unter 10 %. Auch die Penicillien erreichten lediglich in Woche 6 einen 10 %igen Befall. Allerdings kam es am Ende der Lagerung zu einer Zunahme auf über 30 %.

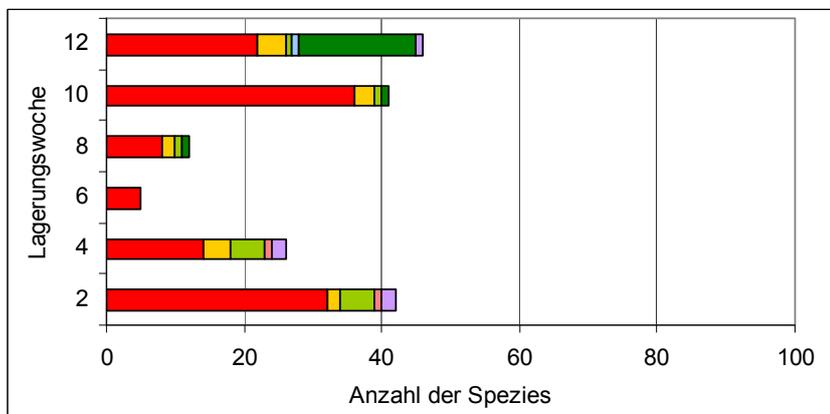
3.6.2.2 Verteilung der *Fusarium*-Arten im ermittelten Pilzspektrum

Die mit der kulturellen Methode aus den Körnern isolierten Fusarien wurden anhand ihrer Makrokonidien speziesbestimmt. Dies ist hinsichtlich der Mykotoxinanalysen relevant, da nicht alle *Fusarium* spp. DON bzw. ZEA zu bilden.

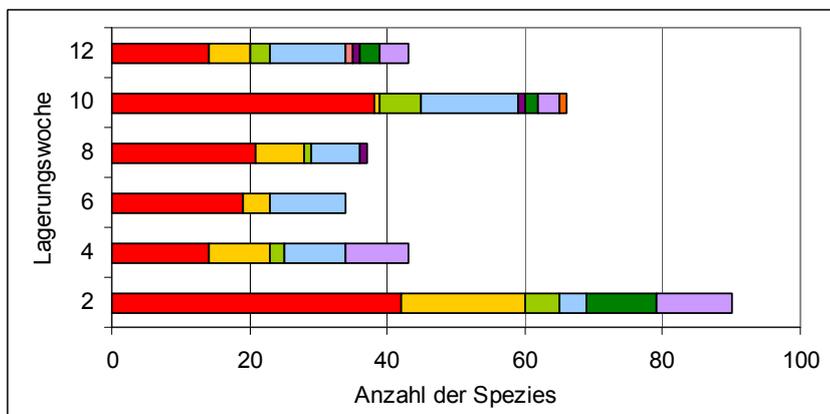


- F. graminearum*
- F. cerealis*
- F. culmorum*
- F. avenaceum*
- F. poae*
- F. tricinctum*
- F. moniliforme*
- F. equiseti*
- M. nivale*

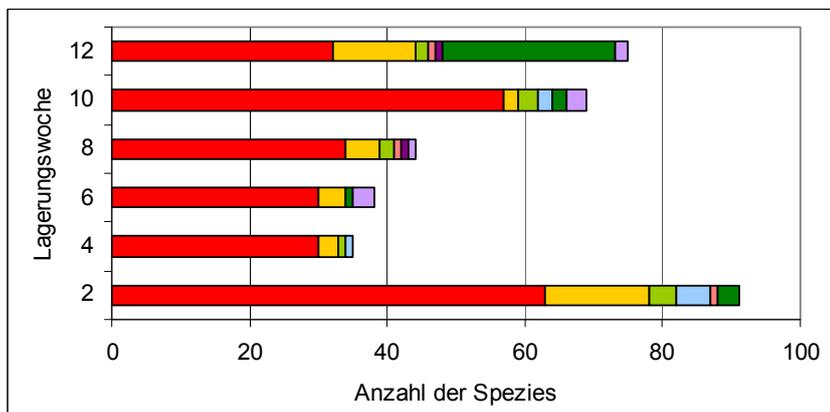
A: Weizen ohne zusätzliche Befuchtung



B: Weizen mit 20 % Feuchte



C: Weizen mit 20 % Feuchte und *F. graminearum* Z3639



D: Weizen mit 20 % Feuchte und *F. graminearum* GZT-40

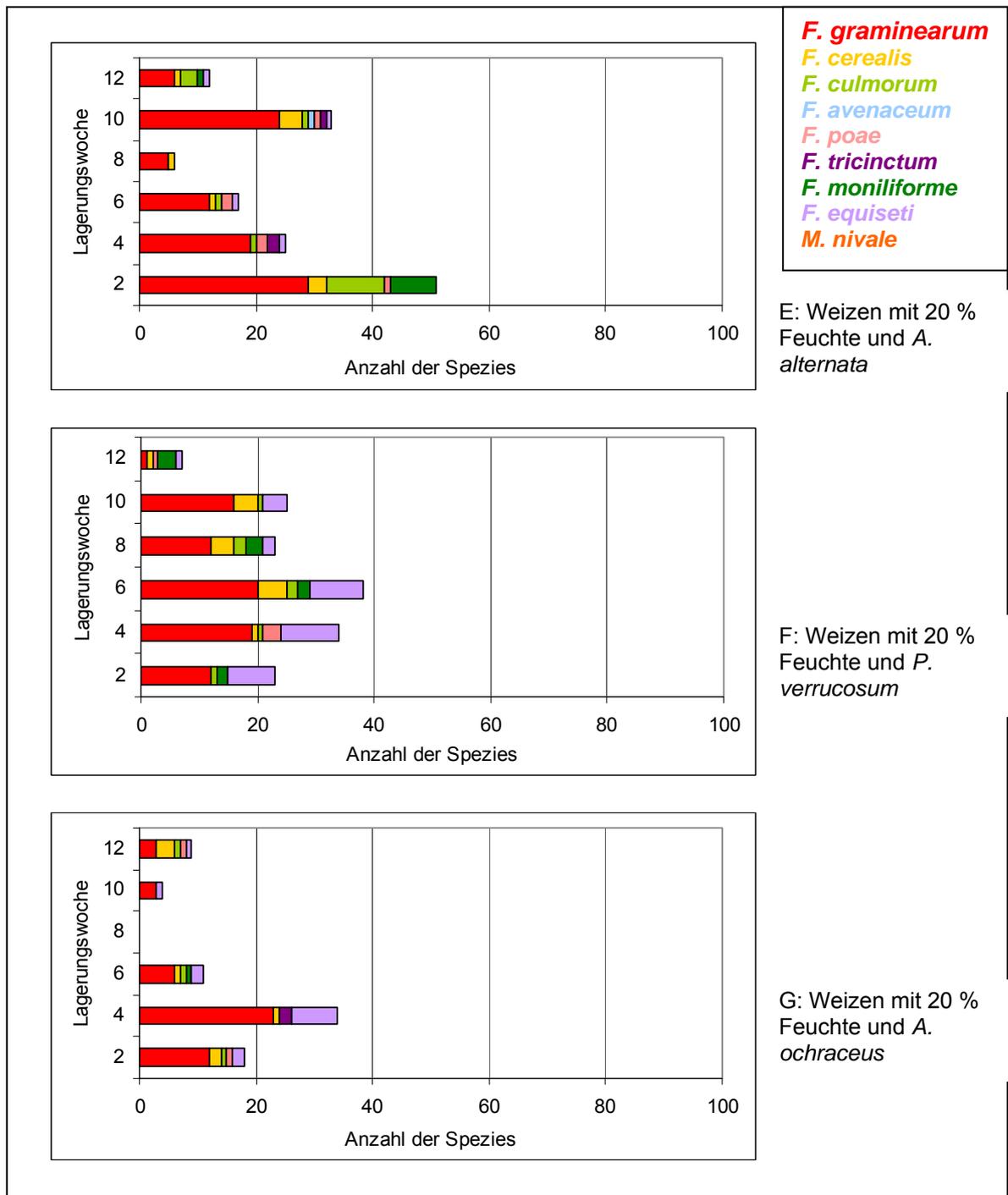


Abbildung 34: Spektrum und Anzahl der Fusarien-Arten der verschiedenen Modelle während der suboptimalen Lagerung von Weizenkörnern mit natürlicher mikrobieller Flora

Bei dem Modell mit Weizen ohne zusätzliche Befeuchtung (Abbildung 34 A) zeigte sich, dass der zu Beginn der Lagerung hohe Anteil an *F. graminearum* während der Lagerung zunehmend sank. Andere *Fusarium*-Arten wie *F. cerealis* oder *F. moniliforme* wurden ebenfalls dezimiert. Bei dem Modell mit Weizen, der einen Feuchtigkeitsgehalt von 20 % aufwies (Abbildung 34 B), entstand der Rückgang der Fusarien in den ersten vier Wochen einzig durch eine Reduktion von *F. graminearum*. Danach nahmen auch die Zahlen für *F.*

cerealis, *F. culmorum* und *F. equiseti* ab. Ab der Lagerungswoche 8 konnte ein deutlicher Anstieg für *F. graminearum* verzeichnet werden. Dies galt auch – allerdings in schwächerer Ausprägung – für *F. cerealis*. Auffällig war ein enormer Zuwachs in den letzten beiden Wochen bei *F. moniliforme*. Wurde dem Weizen *F. graminearum* Z3639 zugemischt (Abbildung 34 C), so dominierte die Art *F. graminearum* das Spektrum, nahm aber zunächst ab. Dies konnte auch für die Arten *F. cerealis* und *F. culmorum* festgestellt werden. Die Anzahl an *F. avenaceum* nahm zunächst zu und blieb dann während der Lagerung konstant bei etwa 10 Kolonien / 100 Körnern. Ab Woche 4 bis zur Woche 10 konnte für *F. graminearum* eine Zunahme verzeichnet werden, allerdings wurde die Anzahl von 42 in Woche 2 nicht überschritten. Gegen Ende der Lagerung traten vereinzelt auch die Arten *F. tricinatum*, *F. poae* und *M. nivale* auf. *F. equiseti* und *F. moniliforme* wurden etwas häufiger identifiziert. Die Entwicklung bezüglich *F. graminearum* fand sich auch in dem Modell mit *F. graminearum* GZT-40 (Abbildung 34 D) wieder. Der Anteil, den diese Art ausmachte, lag mit 63 Kolonien in Woche 2 noch höher als im Modell mit Z3639, jedoch ging die Anzahl zunächst zurück, um dann wieder zuzunehmen. Auch hier wurde der anfängliche Wert nicht überschritten. Gegen Ende der Lagerung traten die Arten *F. cerealis* und *F. equiseti* etwas stärker auf, sehr stark entwickelte sich *F. moniliforme*. Mit 25 Kolonien in Woche 12 war dies die zweithäufigste Art nach *F. graminearum*. Das Modell mit *A. alternata* (Abbildung 34 E) war im Vergleich zu den beiden vorigen Modellen insgesamt weniger mit Fusarien befallen, jedoch machte auch hier die Art *F. graminearum* die häufigste Art aus gefolgt von *F. culmorum* und *F. moniliforme*. Diese beiden Arten verschwanden in den folgenden Lagerungswochen fast völlig, während für *F. graminearum* ein langsamer Rückgang -abgesehen von Woche 10- zu beobachten war. Am Ende der Lagerung konnten lediglich 6 der Fusarien als *F. graminearum* identifiziert werden. Im Modell mit *P. verrucosum* (Abbildung 34 F) schwankte die Zahl der als *F. graminearum* bestimmten Fusarien zwischen 12 und 20, sank aber in Woche 12 auf nur noch 1. Als zweithäufigste Art trat *F. equiseti* auf. In den ersten 6 Wochen lagen die Zahlen recht konstant bei 10. Danach war eine Abnahme zu verzeichnen, die schließlich in Woche 12 bei ebenfalls 1 Kolonie mündete. Weitere identifizierte Arten mit geringen Anteilen waren *F. poae*, *F. culmorum* und *F. cerealis*. Trotz des dominanten *A. ochraceus* in Modell G (Abbildung 34 G) stieg die Zahl der Fusarien von Woche 2 auf Woche 4, wobei sich die Anzahl von *F. graminearum* auf 23 verdoppelte. Eine Zunahme war auch für *F. equiseti* zu beobachten. Nach Woche 4 allerdings nahm die Zahl der Fusarien ab, so dass in Woche 8 keine Fusarien gefunden wurden. Am Ende der Lagerung wurden von 9 Fusarien jeweils 3 Kolonien als *F. graminearum* und *F. cerealis* identifiziert. Weiterhin traten *F. poae*, *F. equiseti* und *F. culmorum* auf. Abschließend kann gesagt werden, dass die typischerweise auf Getreide vorkommenden *Fusarium* spp. identifiziert wurden. Wie

nach der Analyse des Ausgangsbefalls zu erwarten war, stellte in den meisten Modellen *F. graminearum* den Hauptanteil dar.

3.6.2.3 Auswertung der *Fusarium*-Artenspektren hinsichtlich der Mykotoxinbildungsfähigkeit

Nicht alle *Fusarium* spp. sind in der Lage, Trichothecene und ZEA zu bilden (s. auch Abbildung 32). Unter diesem Aspekt ist die Auswertung der unter 3.6.2.2 dargestellten Artenspektren bezüglich der Toxinbildungsfähigkeit für die Analysen der DON- und ZEA-Gehalte relevant. Die meisten *Fusarium*-Arten, die Trichothecene bilden können, sind auch in der Lage, ZEA zu produzieren. Eine Ausnahme stellt *F. poae* dar, der kein ZEA bilden kann. Da diese Art in den Artenspektren nur vereinzelt vorkommt, wird auf eine differenzierte Darstellung der Trichothecen- bzw. ZEA-Produzenten verzichtet. In Abbildung 35 sind stellvertretend die Trichothecen-Bildner aufgenommen.

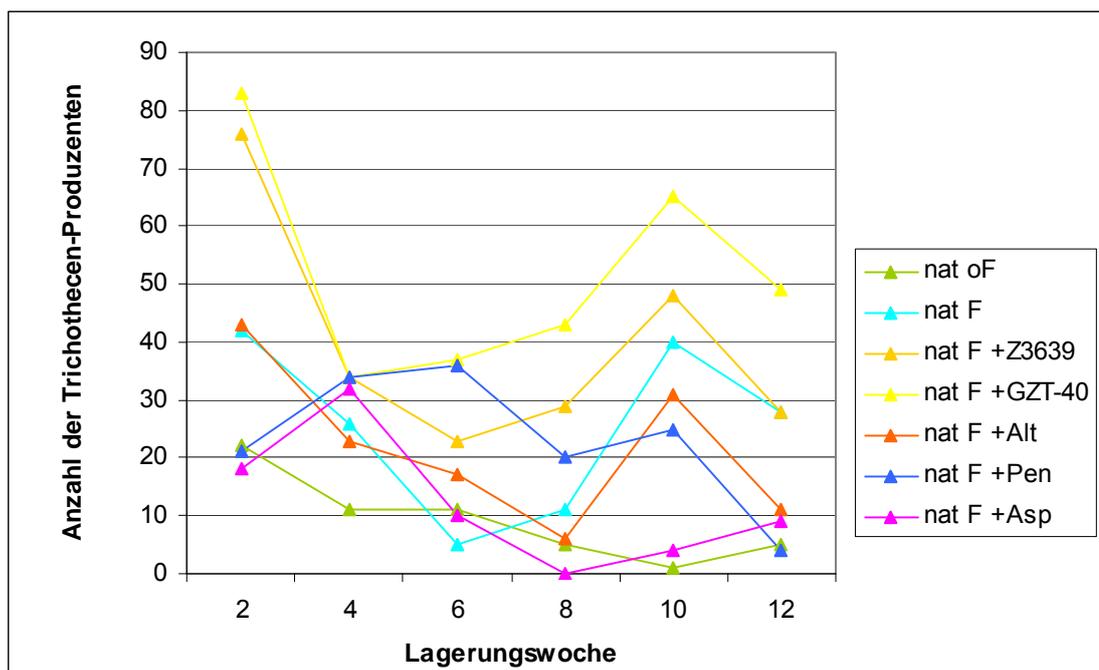


Abbildung 35: Anzahl der Trichothecen produzierenden Fusarien-Arten in den jeweiligen Modellen während der suboptimalen Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora

Die Entwicklungen entsprechen größtenteils denen für *F. graminearum*, was mit der Tatsache zusammenhängt, dass dies in den meisten Modellen die häufigste *Fusarium*-Art war. Die Modelle mit *F. graminearum* Z3639 bzw. GZT-40 und mit *A. alternata* sowie das Modell ohne Zusatz von inokuliertem Weizen (nat F) können zusammengefasst werden. Hier waren in Woche 2 stets die höchsten Zahlen für Trichothecenbildner zu finden. In den darauffolgenden zwei bis sechs Wochen kam es zu einer ausgeprägten Abnahme der

Toxinproduzenten, gefolgt von steigenden Zahlen, die immer in Woche 10 ihre Maxima erreichten. Am Ende der Lagerung gingen die Trichothecen-Produzenten wieder etwas zurück. Generell lagen die Zahlen für die Modelle mit *F. graminearum* Z3639 und GZT-40 deutlich über den Zahlen der beiden anderen Modelle, was durch den höheren Anteil an *F. graminearum* bedingt ist. Für das Modell mit *A. ochraceus* konnte eine ähnliche Entwicklung beobachtet werden, nur das Maximum in Woche 10 fehlte. Eine abnehmende Tendenz zeigte sich auch im Modell mit nicht zusätzlich befeuchteten Weizen (nat oF), wobei hier die Zahlen aufgrund der generell geringen Infektionsraten meistens sehr niedrig waren. Nur in dem Modell mit *P. verrucosum* konnte in den ersten sechs Wochen eine Zunahme der Trichothecenbildner verzeichnet werden. In der zweiten Hälfte der Lagerung sank auch hier die Zahl, so dass in Woche 12 im Vergleich zu den anderen Modellen in diesem Modell die wenigsten Toxinbildner zu finden waren.

3.6.2.4 Analyse mittels DNA-Quantifizierung

Von Körnerproben nach 2, 6 und 12 Wochen Lagerung wurde die Gesamt-DNA isoliert und die Pilze mit Hilfe von gattungsspezifischen Primern getrennt voneinander mittels quantitativer PCR erfasst.

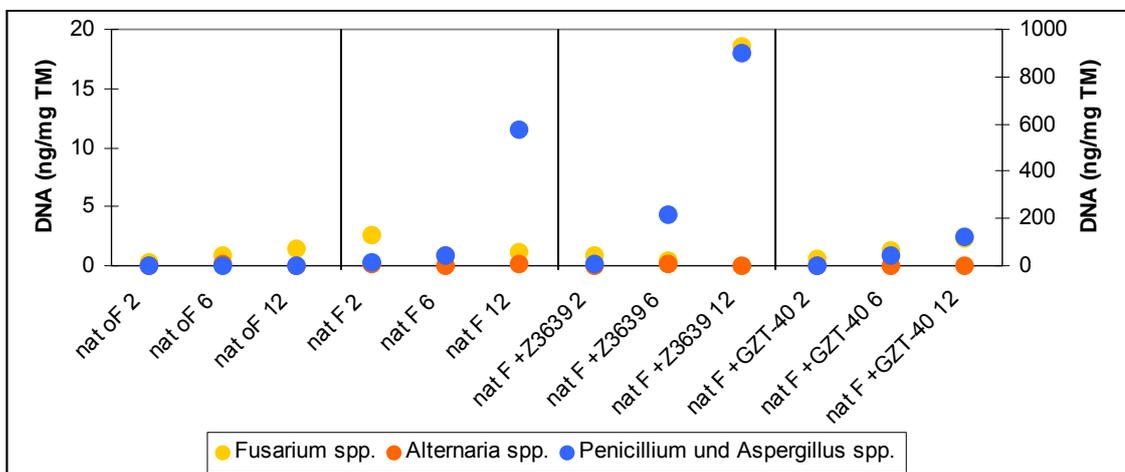


Abbildung 36: DNA-Konzentrationen bezogen auf die Trockenmasse für die Gattungen *Fusarium*, *Alternaria* sowie *Penicillium* und *Aspergillus* in vier verschiedenen Modellen nach 2, 6 und 12 Wochen suboptimaler Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora. Die Konzentrationen für *Fusarium* spp. und *Alternaria* spp. sind an der linken Y-Achse abzulesen, die Konzentration für *Penicillium* und *Aspergillus* spp. an der rechten Y-Achse. Die Lagerungswoche wird angegeben durch die letzte Zahl in der jeweiligen Modellbezeichnung in der X-Achse.

Für die Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* wurde ein Primerpaar verwendet, so dass die ermittelten DNA-Konzentrationen Arten beider Gattungen widerspiegeln.

In Abbildung 36 werden die DNA-Konzentrationen der beiden Kontrollmodelle sowie der Modelle mit den beiden *Fusarium*-Stämmen dargestellt. Für das Kontrollmodell ohne zusätzliche Befeuchtung des Weizens wurden für alle drei Gruppen an allen untersuchten Zeitpunkten sehr niedrige DNA-Konzentrationen ermittelt, was mit niedrigen Infektionsraten (s. Abbildung 33) korreliert. Die DNA-Gehalte bezüglich *Fusarium* im Kontrollmodell mit befeuchtetem Weizen entsprachen den mit der kulturellen Methode ermittelten Infektionsraten insoweit, dass eine abnehmende Infektionsrate mit reduziertem DNA-Gehalt einherging. Die niedrigen *Alternaria*-DNA-Gehalte deckten sich mit den geringen Infektionsraten für *Alternaria*. Diese Übereinstimmung fand sich für die Gruppe *Penicillium* und *Aspergillus* nicht. Während die Infektionsraten für beide in Woche 6 höher lagen als in Woche 12, stieg die DNA-Konzentration in Woche 12 im Vergleich zu Woche 6 um Faktor 13 auf 578 ng DNA/mg TM an. Für das Modell mit *F. graminearum* Z3639 nahm der DNA-Gehalt von *Aspergillus* und *Penicillium* stetig zu, dies war bei den Infektionsraten nicht zu beobachten. Die Konzentration an *Fusarium*-DNA nahm von Woche 6 auf Woche 12 von 0,5 ng/mg TM auf über 18 ng/mg TM zu, wohingegen der Befall konstant blieb. Im Modell mit *F. graminearum* GZT-40 konnten sowohl für *Fusarium* als auch für die Gruppe *Penicillium* und *Aspergillus* leicht steigende DNA-Konzentrationen gemessen werden, was nicht mit dem Befall korreliert.

Die ermittelten DNA-Konzentrationen für die Modelle mit *A. alternata*, *P. verrucosum* und *A. ochraceus* sind in Abbildung 37 dargestellt. In dem Modell, dem mit *A. alternata* infizierte Körner zugesetzt wurden, konnte in Woche 2 eine DNA-Konzentration von 1 ng/mg TM für die Gattung *Alternaria* gemessen werden. Im folgenden kam es wie auch bei den Infektionsraten für *Alternaria* spp. zu einer Reduktion, so dass in Woche 12 nur noch 0,2 ng DNA/mg TM quantifiziert wurden. Sowohl für *Penicillium/Aspergillus* als auch für *Fusarium* wurden leicht ansteigende DNA-Gehalte verzeichnet, obwohl der Befall für die Fusarien zurückging und für die Lagerpilze stark anstieg. Im Modell mit *P. verrucosum* wurde nach zwei Wochen für die Lagerpilze der höchste Wert gemessen (297 ng/mg TM), danach reduzierten sich die DNA-Konzentrationen auf 50-60 ng/mg TM. Eine gegenläufige Entwicklung wurde für die Fusarien ermittelt. Hier stieg die DNA-Konzentration von 0,43 ng/mg TM in Woche 2 auf 1,3 ng/mg TM in Woche 12 an. Für *Alternaria* wurden relativ niedrige DNA-Konzentrationen (max. 0,13 ng/mg TM) gemessen. Für das Modell mit *A. ochraceus* waren die *Fusarium*-DNA-Konzentrationen relativ konstant (0,4-0,48 ng/mg TM), während bei den DNA-Gehalten von *Aspergillus/ Penicillium* von Woche 6 zu Woche 12 ein Anstieg um Faktor 5 zu beobachten war. Es wurden am Ende der Lagerung in diesem Modell 962 ng/mg TM quantifiziert.

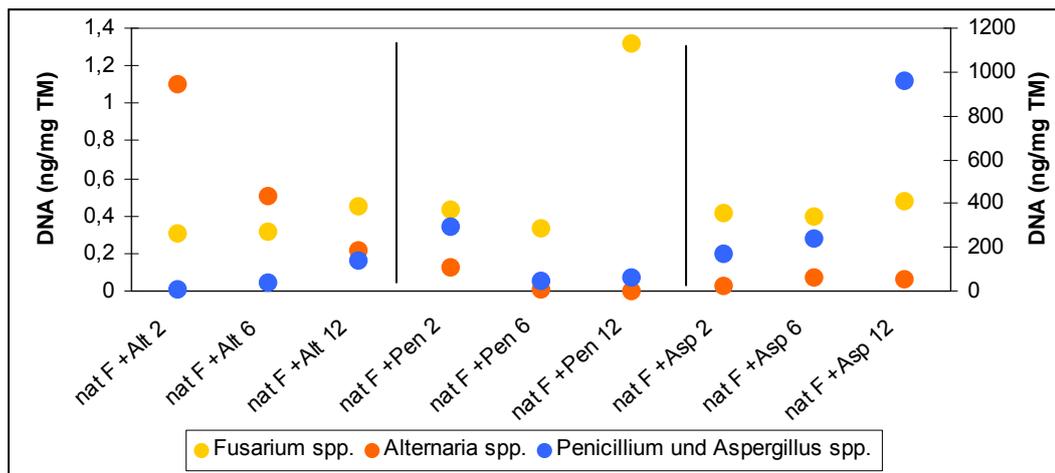


Abbildung 37: DNA-Konzentrationen bezogen auf die Trockenmasse für die Gattungen *Fusarium*, *Alternaria* sowie *Penicillium* und *Aspergillus* in drei verschiedenen Modellen nach 2, 6 und 12 Wochen suboptimaler Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora. Die Konzentrationen für *Fusarium* spp. und *Alternaria* spp. sind an der linken Y-Achse abzulesen, die Konzentration für *Penicillium* und *Aspergillus* spp. an der rechten Y-Achse. Die Lagerungswoche wird angegeben durch die letzte Zahl in der jeweiligen Modellbezeichnung in der X-Achse.

3.6.3 Entwicklung der Mykotoxingehalte während der suboptimalen Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora

Nach 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Wochen Lagerung wurden Körnerproben hinsichtlich der Mykotoxine DON, ZEA und OTA analysiert. Die erhaltenen Werte wurden zum einen auf die Trockenmasse des Getreides und zum anderen auf die Anzahl der jeweiligen Produzenten bezogen. Hier kommt die unter 3.6.2.1 - 3.6.2.3 dargestellten Ergebnisse zum Tragen unter besonderer Berücksichtigung, welche der identifizierten *Fusarium* spp. fähig sind, DON bzw. ZEA zu bilden. Die Arten, die keine dieser Toxine bilden können, wurden nicht in dieser Berechnung erfasst.

3.6.3.1 DON

Die DON-Gehalte der verschiedenen Modelle sind in Abbildung 38 dargestellt. Von den mittels ELISA gemessenen Werten wurde der Ausgangs-DON-Gehalt des im Versuch verwendeten Getreides (650 µg/kg TM) subtrahiert, wodurch in manchen Fällen negative DON-Gehalte berechnet wurden, die im folgenden mit null angegeben wurden. Allgemein bestand die Tendenz zu steigenden Konzentrationen mit zunehmender Lagerungsdauer, wobei die Unterschiede zwischen den Modellen nicht signifikant waren.

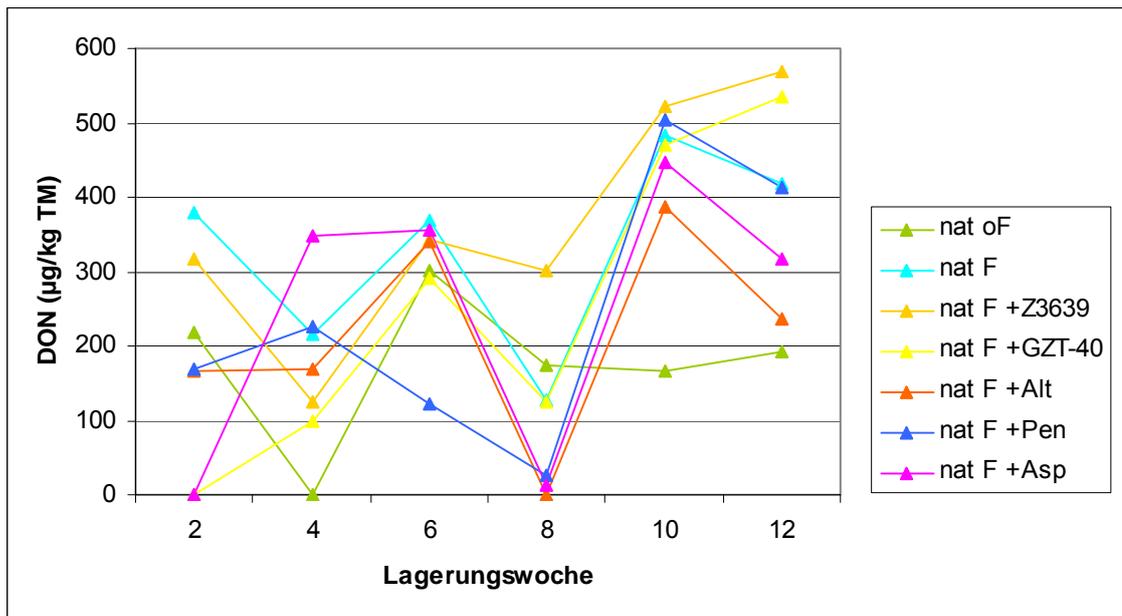


Abbildung 38: DON-Gehalte der verschiedenen Modelle während der suboptimalen Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora bezogen auf die Trockenmasse der Körnerproben und um den DON-Gehalt des Ausgangsgetreides reduziert

Wie zu erwarten war, blieb der DON-Gehalt in dem Kontrollmodell mit Weizen, der nicht zusätzlich befeuchtet war, über die Lagerdauer hinweg relativ unverändert und im Vergleich zu den anderen Modellen recht niedrig (max. 300 µg/kg TM). In dem zweiten Kontrollmodell mit befeuchteten Körnern schwankte der DON-Gehalt zwischen Werten von 130 und 480 µg/kg TM und lag insgesamt betrachtet höher als in der nicht befeuchteten Kontrolle. Die Modelle mit zugemischten infizierten Körnern zeigten untereinander keine Unterschiede. Am Ende der Lagerung enthielt das Modell mit *F. graminearum* Z3639 mit 570 µg/kg TM den höchsten DON-Gehalt, das Modell mit der Mutante GZT-40 enthielt nur geringfügig weniger DON (535 µg/kg TM). Für die anderen Modelle wurden Werte zwischen 200 und 400 µg/kg TM gemessen. Die reine Betrachtung der DON-Konzentrationen reicht unter dem Aspekt, dass die Anzahl der DON-Bildner in den Modellen verschieden war, nicht aus. Aus diesem Grund wurden in Abbildung 39 die DON-Gehalte auf die Anzahl der Produzenten bezogen. Dies führte dazu, dass im nicht befeuchteten Kontrollmodell aufgrund der sehr geringen Infektion durch Pilze und des niedrigen Anteils an DON produzierenden Fusarien sowohl nach zwei Wochen als auch nach zwölf Wochen eine erhöhte DON-Produktivität (38 µg/kg TM+Produzent nach zwölf Wochen) entstand. Lediglich das Modell mit *P. verrucosum* hat mit über 100 µg/kg TM+Produzent eine höhere Produktivität nach Abschluss der Lagerung, gleichzeitig wurde in diesem Modell die geringste Anzahl an DON-Bildnern ermittelt. Zwischen dem Verhältnis der DON-Produzenten und den übrigen interagierenden Pilzen, die auch

Fusarium-Arten umfassen, die nicht in der Lage sind, DON zu bilden, konnte kein Zusammenhang zur DON-Konzentration hergestellt werden.

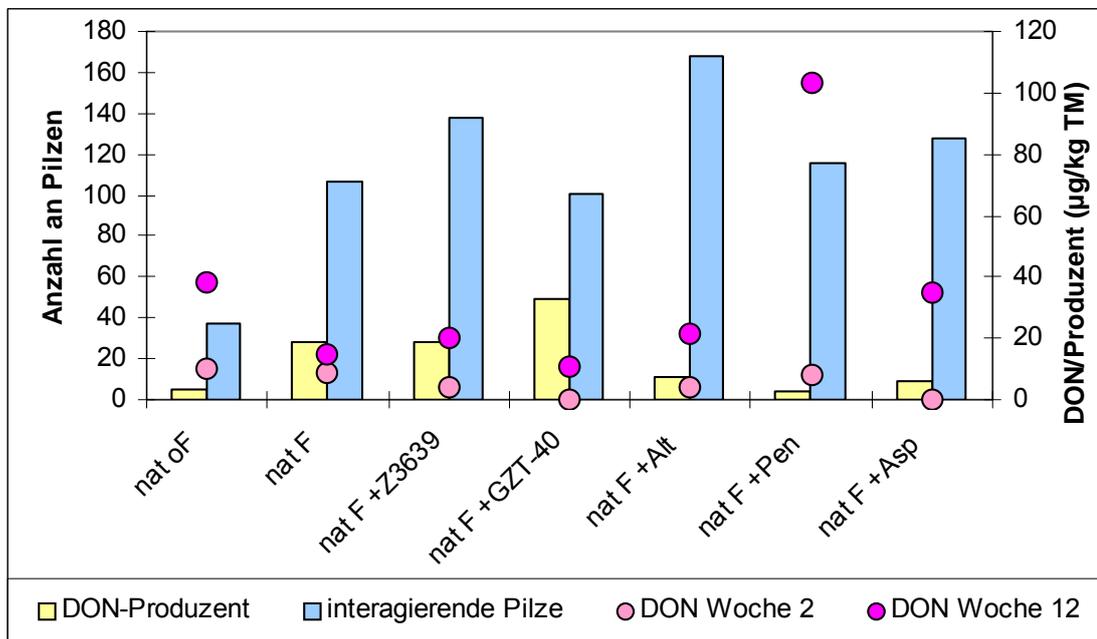


Abbildung 39: DON-Gehalte pro DON-Produzent nach 2 und 12 Wochen sowie die Anzahl der DON bildenden *Fusarium* spp. sowie der interagierenden Pilze (inkl. der *Fusarium* spp., die kein DON bilden können) nach 12 Wochen von den verschiedenen Modellen aus der suboptimalen Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora

3.6.3.2 ZEA

Die ZEA-Gehalte aller gelagerten Modelle nach 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Wochen wurde um den ZEA-Gehalt des Getreides vor der Lagerung bereinigt. Die Untersuchung ergab, dass im Verlauf der Lagerung bei allen Modellen außer bei dem nicht befeuchteten Kontrollmodell die ZEA-Gehalte bezogen auf die Trockenmasse stiegen (Abbildung 40). In dem befeuchteten Kontrollmodell (nat F) konnte eine kontinuierliche Zunahme der ZEA-Konzentration nachgewiesen werden, die bei einem Höchstwert von 50 mg/kg TM in Woche 12 endete. Mit Ausnahme der Modelle, denen *F. graminearum* zugesetzt worden war, wurden in den übrigen Modellen geringere End-Gehalte ermittelt. So lag der ZEA-Gehalt für das Modell mit *A. alternata* bei 14 mg/kg TM, für das Modell mit *P. verrucosum* bei 22 mg/kg TM und für das Modell mit *A. ochraceus* lediglich bei 5 mg/kg TM. Diese Endkonzentrationen wurden ebenfalls durch sehr geringfügige, aber stetige Zunahmen erreicht.

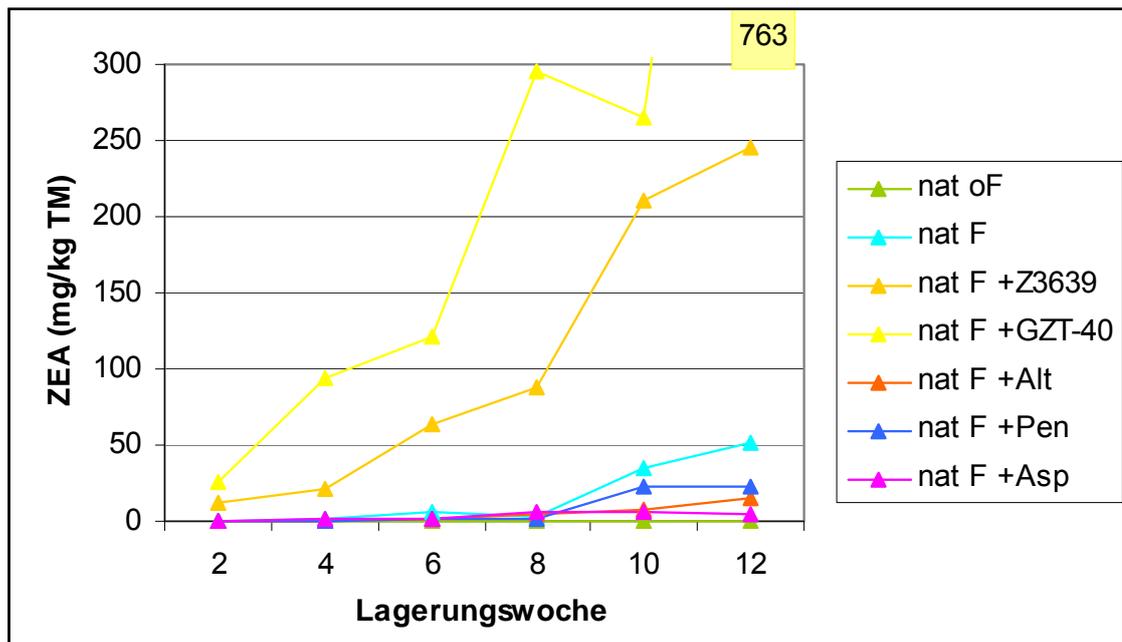


Abbildung 40: ZEA-Gehalte der verschiedenen Modelle während der suboptimalen Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora bezogen auf die Trockenmasse der Körnerproben und um den ZEA-Gehalt des Ausgangsgetreides reduziert

Die beiden Modelle mit *F. graminearum* Z3639 bzw. GZT-40 hoben sich von den übrigen Modellen ab, da hier die ZEA-Gehalte sehr stark anstiegen. Für das Modell mit dem Stamm Z3639 wurde bereits nach 6 Wochen eine Konzentration von 64 mg/kg TM gemessen, also deutlich über dem Maximum der Endkonzentrationen der bisher beschriebenen Modelle. Nach Abschluss der Lagerung wurde ein Wert von 245 mg/kg TM erreicht. Für das Modell mit der Mutante GZT-40 wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt die jeweils höchste ZEA-Konzentration ermittelt. In Woche 6 enthielt die Körnerprobe mit 120 mg/kg TM eine um Faktor 2 höhere, nach 12 Wochen (763 mg/kg TM) sogar eine um Faktor 3 höhere ZEA-Konzentration als das Modell mit Z3639.

Durch die Umrechnung der ZEA-Konzentrationen auf die im jeweiligen Modell zu diesem Zeitpunkt vorhandenen ZEA-Bildner erlangen die beschriebenen Werte noch weitere Aussagekraft. Abbildung 41 zeigt die Infektionsraten der ZEA-Bildner sowie der interagierenden Pilze nach zwölf Wochen Lagerung und dazu die ZEA-Gehalte pro Produzent nach 2 und 12 Wochen.

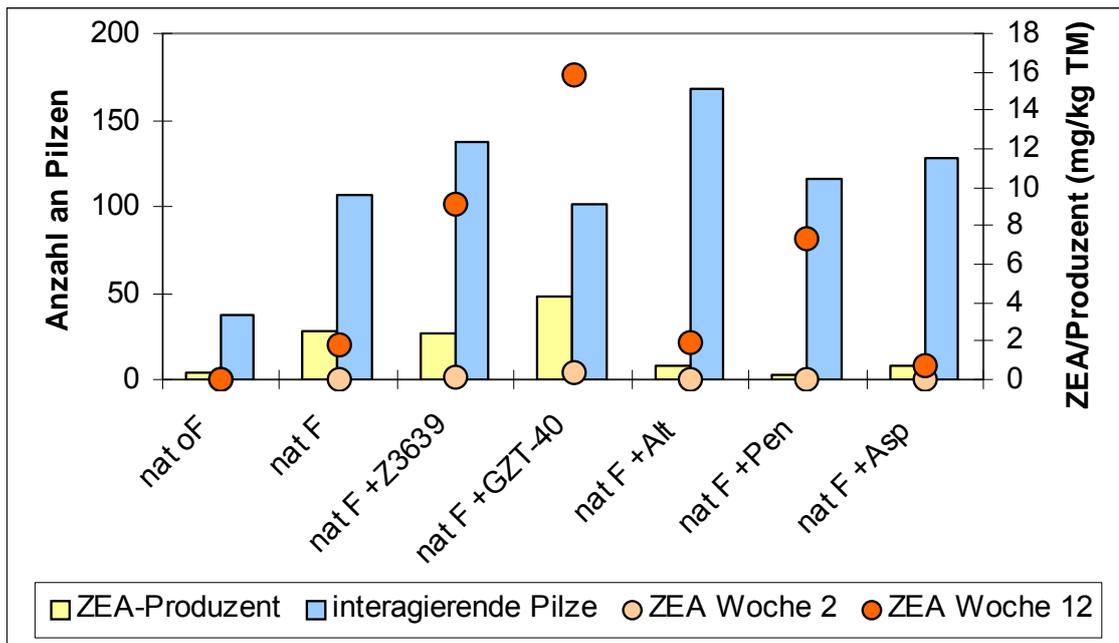


Abbildung 41: ZEA-Gehalte pro ZEA-Produzent nach 2 und 12 Wochen und die Anzahl der ZEA bildenden *Fusarium* spp. sowie der interagierenden Pilze (inkl. der *Fusarium* spp., die kein ZEA bilden können) von den verschiedenen Modellen nach 12 Wochen suboptimaler Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora

Vergleicht man die beiden Kontrollmodelle, so war die ZEA-Produktivität in dem befeuchteten Getreide gegenüber dem unbefeuchteten Getreide erhöht und gleichzeitig das Verhältnis zwischen ZEA-Produzenten und interagierenden Pilzen zugunsten der ZEA-Produzenten verlagert (1:4 gegenüber 1:9). Beide Modelle mit *F. graminearum* wiesen mit 9 bzw. 16 mg ZEA /kg TM hohe Gehalte pro Produzent auf, wobei auch hier das Modell mit der höheren Produktivität, nämlich das mit GZT-40, ein besseres Verhältnis von ZEA-Produzenten zu interagierenden Pilzen (1:2 gegenüber 1:5) erzielte. Im Modell mit *A. alternata* war die ZEA-Produktivität leicht erhöht, das Verhältnis der beiden Pilzgruppen mit 1:21 für die ZEA-Bildner als unterlegen zu werten. Ein noch stärker verlagertes Verhältnis stellte sich im Modell mit *P. verrucosum* ein. Hier kamen auf einen ZEA-Produzenten 38 interagierende Pilze. Die ZEA-Produktivität war jedoch mit 7,4 mg ZEA/kg TM vergleichsweise hoch. Das Modell mit *A. ochraceus* wies abgesehen von dem nicht befeuchteten Kontrollmodell die geringste Produktivität auf.

3.6.3.3 OTA

Abbildung 42 stellt die Entwicklung der OTA-Gehalte in den verschiedenen Modellen während der Lagerung dar. Ähnlich wie bei den ZEA-Gehalten stiegen die OTA-

Konzentrationen in allen Modellen außer in dem unbefeuchteten Kontrollmodell an, wobei die Endkonzentrationen teilweise beträchtlich differierten.

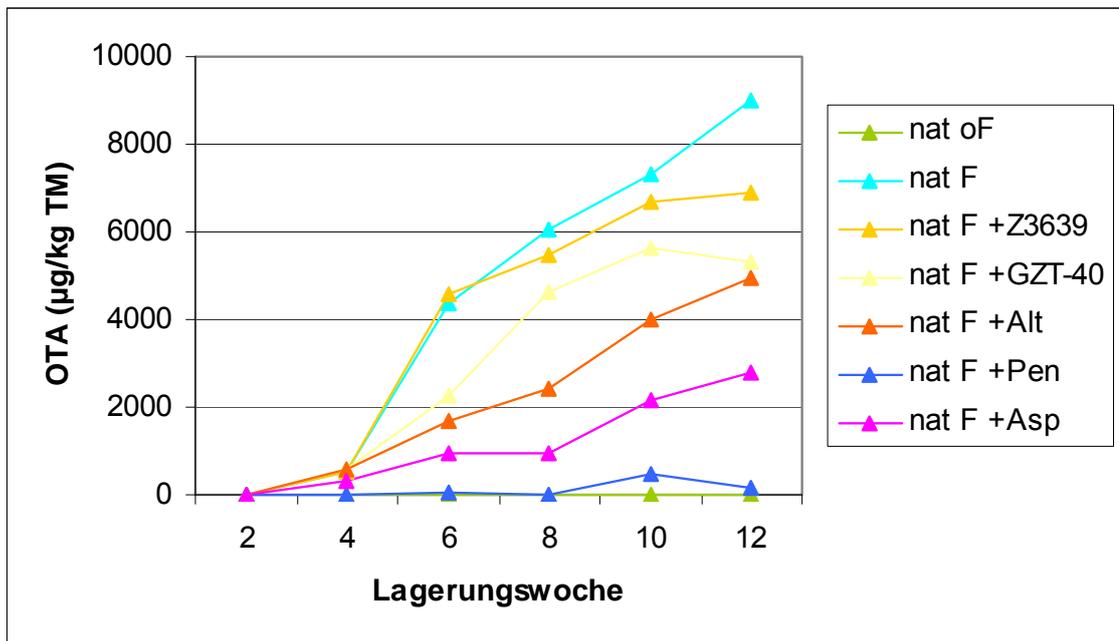


Abbildung 42: OTA-Gehalte der verschiedenen Modelle während der suboptimalen Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora bezogen auf die Trockenmasse der Körnerproben und um den OTA-Gehalt des Ausgangstreibes reduziert

Interessanterweise wurden die niedrigsten OTA-Gehalte in den beiden Modellen mit zugemischten OTA-Produzenten ermittelt. In dem Modell mit *P.verrucosum* wurde der höchste Wert in Woche 10 mit 490 µg OTA/kg TM gemessen, in dem Modell mit *A. ochraceus* stieg die Konzentration kontinuierlich an, um nach zwölf Wochen 2800 µg OTA/kg TM zu erreichen. Nach einer beinahe linearen Zunahme des OTA-Gehalts in dem Modell mit *A. alternata* wurden schließlich 5000 µg/kg TM erreicht. Mit einem ähnlichen Wert (5300 µg/kg TM) schloss auch das Modell mit *F. graminearum* GZT-40 ab, wobei hier der Maximalwert in Woche 10 mit 5600 µg/kg TM ermittelt wurde, also gegen Ende der Lagerung ein leichter Rückgang zu verzeichnen war. Im Modell mit *F. graminearum* Z3639 stieg der OTA-Gehalt von Woche 4 auf 6 sprunghaft um Faktor 8,5 auf einen Wert von 4500 µg/kg TM an. Nach 12 Wochen wurde eine Konzentration von fast 7000 µg OTA/kg TM erreicht. Das befeuchtete Kontrollmodell enthielt ab Woche 8 im Vergleich zu allen anderen Modellen die höchsten OTA-Konzentrationen. Nach Abschluss der Lagerung wurde der Spitzenwert von 9000 µg OTA/kg TM ermittelt.

Ein Bezug der dargestellten Werte zu der Anzahl der Produzenten muss hier entfallen, da die aus den kulturellen Untersuchungen der Körnerproben hervorgegangenen *Penicillium* und *Aspergillus* spp. nicht weiter spezifiziert worden sind, so dass es nicht möglich ist, die

Zahl der OTA-Produzenten zu benennen. Allerdings stellt Abbildung 43 den Bezug zwischen Infektionsraten und OTA-Gehalten her.

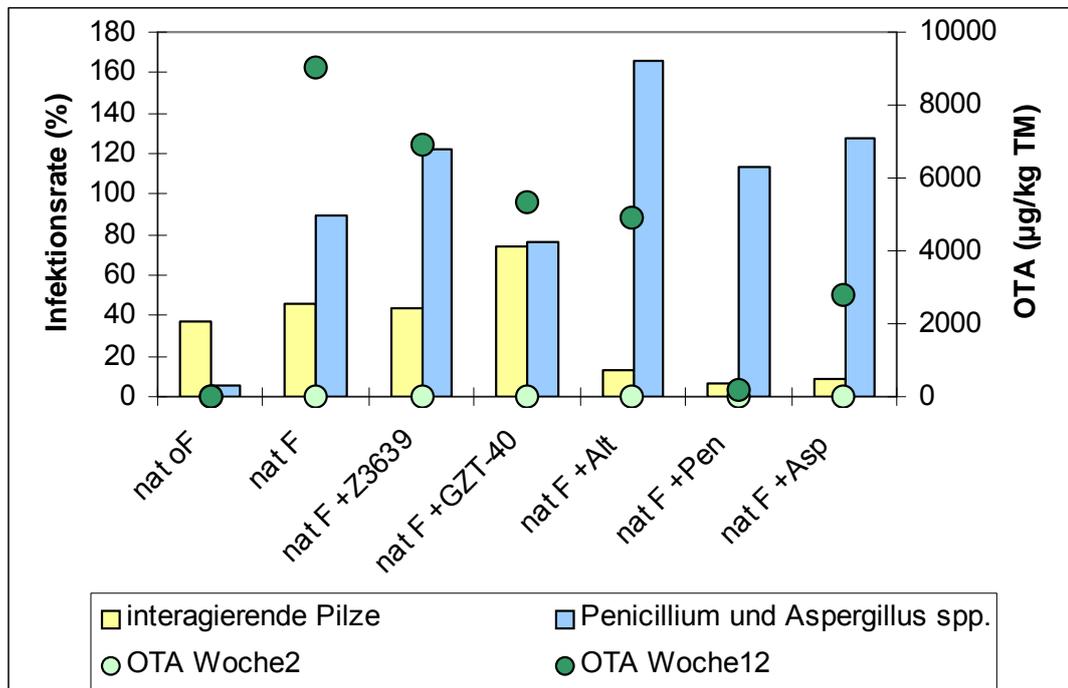


Abbildung 43: OTA-Gehalte nach 2 und 12 Wochen und die Anzahl der *Penicillium* und *Aspergillus* spp. sowie der interagierenden Pilze von verschiedenen Modellen nach 12 Wochen suboptimaler Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora

Die Modelle mit *F. graminearum* Z3639 bzw. GZT-40 sowie das befeuchtete Kontrollmodell zeichneten sich durch eine hohe Infektionsrate der interagierenden Pilze aus und gleichzeitig stiegen die OTA-Konzentrationen während der Lagerung signifikant an (5000-9000 µg/kg TM). In den Modellen mit *P. verrucosum* bzw. *A. ochraceus* lagen die Infektionsraten der interagierenden Pilze im Gegensatz zu denen der *Penicillium/Aspergillus*-Gruppe niedrig. Die OTA-Gehalte erreichten nach zwölf Wochen lediglich Werte unter 3000 µg/kg TM. Im Modell mit *A. alternata* trafen niedrige Infektionsrate der interagierenden Pilze mit hoher OTA-Konzentration zusammen, so dass keine generelle Aussage bezüglich eines Einflusses mikrobieller Interaktion auf die OTA-Produktion möglich ist.

3.7 Molekularbiologische Arbeiten an *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *F. graminearum*

Ziel der molekularbiologischen Arbeiten an *E. coli*, *B. subtilis* und *F. graminearum* war die Fluoreszenzmarkierung der Zellen, um diese bei mikroskopischen Untersuchungen *in situ* in Interaktion differenzieren zu können.

3.7.1 Strategien zur Fluoreszenzmarkierung von *B. subtilis* und *E. coli*

Die Strategie zur Fluoreszenzmarkierung wurde mit Modifikationen nach Gandhi *et al.* (2001) entwickelt und wird im folgenden erläutert.

Um bei der mikrobiellen Interaktion der Bakterien mit *F. graminearum* den Einsatz von Antibiotikum zu vermeiden, wurde als Endvektor für *E. coli* ein temperatursensitives Plasmid pTSK29 und für *B. subtilis* pKSV7 ausgewählt. pKSV7 ist ein Shuttle-Vektor, der sowohl in *E. coli* als auch in *B. subtilis* abgelesen werden kann und wie pTSK29 temperatursensitiv ist. Die Thermosensitivität bedeutet, dass bei Anzucht oberhalb einer bestimmten Temperatur, hier 42 °C, eine Replikation vom plasmidcodierten Replikationsursprung nicht mehr möglich ist. Die Bakterien schleusen das Plasmid entweder aus oder integrieren das Plasmid, wenn eine zu ihrem Genom homologe Sequenz vorhanden ist. Bei Verlust des Plasmids geht gleichzeitig auch ein Gen verloren, welches die Resistenz für ein Antibiotikum vermittelt. Enthält das Anzuchtmedium dieses Antibiotikum, so werden die Zellen sterben, die ihr Plasmid eliminieren. Jene Zellen, die über Integration das Plasmid und somit auch das Gen für die Antibiotikumresistenz behalten, können sich vermehren.

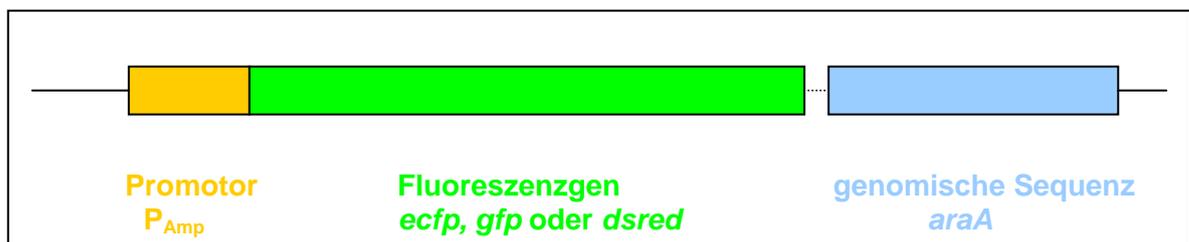


Abbildung 44: Aufbau des Inserts für die temperatursensitiven Plasmide zur Fluoreszenzmarkierung von *E. coli* und *B. subtilis*

Ziel der molekularbiologischen Arbeiten (s. auch Abbildung 44) war also die Verknüpfung eines Gens, welches für ein fluoreszierendes Protein codiert (im folgenden Fluoreszenz-Gen) mit einer vorgeschalteten Promotorstruktur sowie eines Teilstücks einer genomischen Sequenz von *E. coli* bzw. *B. subtilis* und die Inserierung des gesamten

Konstruktes in die jeweiligen temperatursensitiven Vektoren, um diese schließlich in den beiden Bakterien zu exprimieren.

Da der Bereich im Genom, der für die Rekombination genutzt wird, durch die Insertion des Plasmids in seiner Funktion beeinträchtigt wird, wurde dafür ein nicht-essentielles Gen ausgewählt. Es handelt sich sowohl bei *E. coli* als auch bei *B. subtilis* um ein Teilstück des Gens *araA* aus dem Arabinoseoperon. Weiterhin standen drei verschiedene Fluoreszenzgene zur Verfügung: *gfp* aus pGFPuv, *ecfp*, ein Derivat des *gfp*, aus pECFP und *dsred* aus pDsRed2. Die erwähnten Vektoren sind bis auf das Fluoreszenzgen identisch. Abbildung 45 zeigt beispielhaft pECFP. Die Vektoren vermitteln außer der Fluoreszenz eine Ampicillinresistenz. Weiterhin besitzen sie vor und hinter dem Fluoreszenzgen Klonierungsbereiche (MCS) mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Analog zu den Arbeiten von Gandhi *et al.* (2001) wurde der konstitutive Promotor des Ampicillinresistenz-Gens als Promotor für das Fluoreszenzgen gewählt.

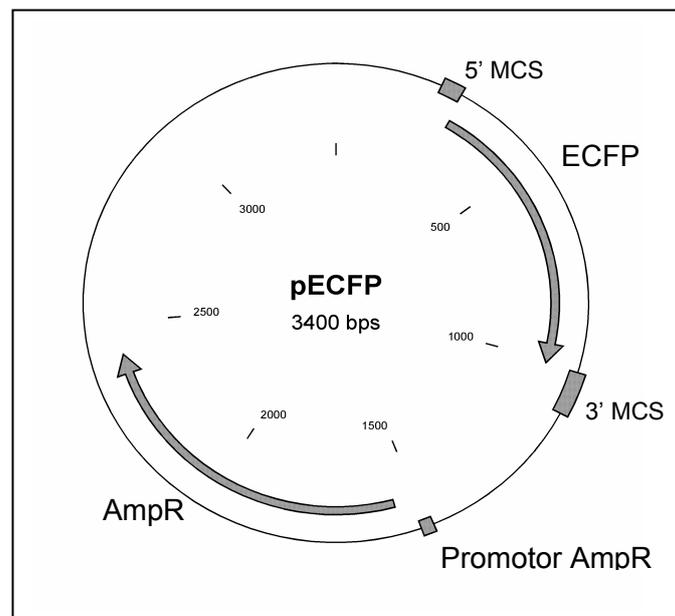


Abbildung 45: Vektorkarte des Plasmids pECFP. Das Fluoreszenz vermittelnde Gen *ecfp* wird von Klonierungsbereichen (MCS) flankiert. Das Ampicillinresistenz vermittelnde Gen *AmpR* (eine β -Lactamase) wird über einen konstitutiven Promotor reguliert.

3.7.2 Klonierung der Vektoren zur Fluoreszenzmarkierung von *E. coli* und *B. subtilis* mit ECFP und DsRed

Mit den Vektoren pECFP und pDsRed2 als Ziel-DNA konnten die jeweiligen Fluoreszenzgene durch PCR amplifiziert werden. Der Promotorbereich des Ampicillinresistenzgens wurde mit pECFP als Ziel-DNA in einer PCR amplifiziert. Für die

Fusions-PCR zur Verknüpfung der Fluoreszenzgene mit dem Promotor musste in einer vorbereitenden PCR über einen verlängerten forward-Primer eine zum Ende des Promotorfragmentes komplementäre Sequenz am Anfang des Fluoreszenzgens eingeführt werden. Nach dieser Modifikation der Fluoreszenzgene konnte eine Fusions-PCR mit Promotorfragment und Fluoreszenzgen wie unter 2.6.9.5 beschrieben durchgeführt werden. Das amplifizierte Produkt Promotor-Fluoreszenzgen (ca. 1 kb) wurde in den Vektor pGEM-T ligiert. Es entstanden die Vektoren pGEM-T-Promecfp und pGEM-T-Promdsred.

Mittels PCR aus Kolonien wurde ein 560 bp langes Teilstück des *araA*-Gens von *E. coli* bzw. *B. subtilis* isoliert. Dieses wurde hinter das Promotor-Fluoreszenzgen-Fragment in die durch Restriktionsverdau linearisierten Vektoren pGEM-T-Promecfp und pGEM-T-Promdsred kloniert. Über die das Gesamtkonstrukt flankierenden Klonierungsstellen (MCS) wurde das 1,5 kb lange Konstrukt Promotor-Fluoreszenzgen-*araA* ausgeschnitten und die passend verdauten Vektoren pTSK29 und pKSV7 ligiert. Es entstanden die Vektoren pTSKPEA und pTSKPRA sowie pKSVPEA und pKSVPRA.

Nach Transformation dieser Vektoren in *E. coli* wurden die Kolonien mit Hilfe einer Handfluoreszenzlampe gescreent. Keine Kolonie emittierte Fluoreszenzlicht. Dieses Ergebnis bestätigte auch die Fluoreszenz-Mikroskopie der Mutanten im Vergleich zu den fluoreszierenden *E. coli* pECPF und *E. coli* pDsRed2.

3.7.2 Klonierung der Vektoren zur Fluoreszenzmarkierung von *E. coli* und *B. subtilis* mit GFP

Da Gandhi *et al.* (2001) GFP als fluoreszierendes Protein genutzt haben, sollte der Vektor pGFP_{uv} mit dem Fluoreszenzgen *gfp* für die Markierung der Bakterien als Grundlage dienen. Im Unterschied zu *ecfp* und *dsred* ergab sich bereits aus der 5'-Sequenz von *gfp* ein Bereich von 13 Basen, der komplementär zum Sequenzende des Promotorfragmentes war, so dass hier nach der Amplifikation von *gfp* für die Fusion mit dem Promotor keinerlei weitere Vorbereitung erforderlich war. Nach der Ligation des Promotor-*gfp*-Konstruktes in p-GEM-T entstand der Vektor p-GEM-T-Promgfp. *E. coli*-Transformanden mit diesem Plasmid konnten anhand ihrer Fluoreszenz bei Anregung durch UV-Licht identifiziert werden, wobei die Kolonien der Transformationsplatten interessanterweise bei Bestrahlung mit der UV-Handlampe unterschiedliche Fluoreszenz aufwiesen. Im folgenden wurde mit einer leuchtintensiven Mutante weitergearbeitet. Die jeweiligen *araA*-Teilstücke aus *E. coli* und *B. subtilis* konnten trotz mehrmaliger Ansätze nicht hinter das Promotor-*gfp*-Fragment kloniert werden, deshalb wurden sie schließlich vorgeschaltet. Es

gingen die Vektoren pGEM-T-APG (mit *araA* aus *B. subtilis*) und pGEM-T-AePG (mit *araA* aus *E. coli*) hervor, die nach Transformation in *E. coli* fluoreszierende Kolonien erzeugten. Die Gesamtkonstrukte wurden in einem letzten Schritt aus diesen Plasmiden ausgeschnitten und in die temperatursensitiven Vektoren pTSK29 und pKSV7 kloniert, wobei die Vektoren pTSKAePG und pKSVAPG entstanden. Nach Transformation in *E. coli* konnte für beide eine Fluoreszenz detektiert werden. Der Vektor pKSVAPG wurde mittels der unter 2.5.13.2 beschriebenen Transformationsmethode in *B. subtilis* DSMZ 402 eingebracht. Die Beurteilung der daraus hervorgegangenen Kolonien bezüglich ihrer Fluoreszenz war - wie noch dargestellt wird - schwierig. Durch PCR aus Kolonien wurde sowohl für *E. coli* pKSVAPG als auch für *B. subtilis* pKSVAPG bestätigt, dass das Plasmid vorlag und das erwartete inserierte Konstrukt mit einer Größe von 1,5 kb (*araA* 560 bp; Promotor 180 bp; *gfp* 810 bp) mit den Primern *nara* und *cecfp* amplifiziert werden konnte. Dieses Ergebnis gibt die Aufnahme der in einem Agarosegel aufgetrennten PCR-Ansätze in Abbildung 46 wieder.

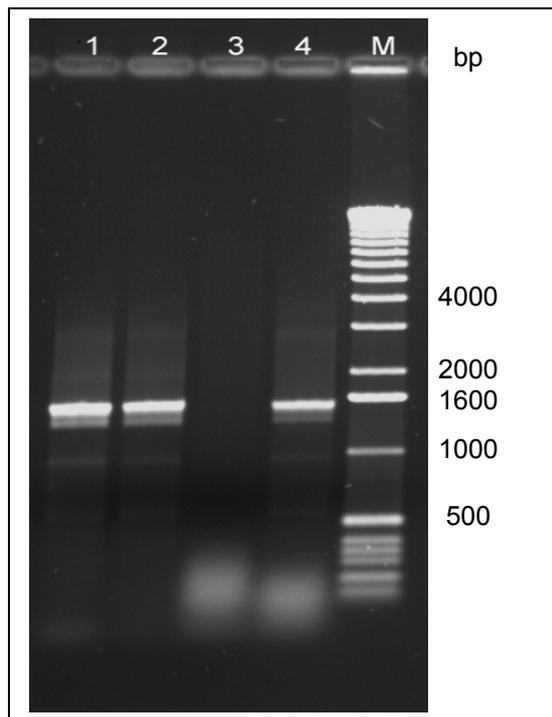


Abbildung 46: Agarosegel nach Elektrophorese von PCR-Ansätzen (Spuren 1-4) und eines 1kb-Markers (Spur 5); Spur 1= DNA aus *B. subtilis* pKSVAPG als Ziel-DNA in einer PCR mit 1,5 mM MgCl₂; Spur 2= DNA aus *B. subtilis* pKSVAPG als Ziel-DNA in einer PCR mit 2 mM MgCl₂; Spur 3= DNA aus *E. coli* pKSVAPG als Ziel-DNA in einer PCR mit 1,5 mM MgCl₂; Spur 4= DNA aus *E. coli* pKSVAPG als Ziel-DNA in einer PCR mit 2 mM MgCl₂; Spur 5= 1 kb-Marker

3.7.3 Expression der Fluoreszenz in *E. coli* und *B. subtilis*

Die Gene für die hier verwendeten Fluoreszenzproteine lagen auf kommerziell erhältlichen Plasmiden (Fa. Clontech). Nach Transformation von *E. coli* mit diesen Plasmiden veränderten die daraus entstandenen Kolonien bereits makroskopisch ohne Anregung durch UV-Licht ihre Farbe. Die Kolonien von *E. coli* pECFP und *E. coli* pGFPuv besaßen einen grünlich-gelblichen Farbton, während *E. coli* pDsRed2 rote Kolonien bildete (s. Abbildung 47). Bei Bestrahlung der Agarplatten mit einer UV-Handlampe fluoreszierten die Kolonien gelbgrün bzw. rot.

Sobald die Fluoreszenzgene aus den ursprünglichen Plasmiden in einen anderen Vektor gebracht wurden, nahm die Fluoreszenz im Falle von pECFP und pDsRed2 stark ab, so dass die Kolonien farblich nicht von Wildtyp-Kolonien unterscheidbar waren. Stabiler erwies sich die Expression von *gfp*. Hier fluoreszierten die Kolonien von *E. coli* pTСКАePG und *E. coli* pKSVAPG unter UV-Licht immerhin schwach. Bei *B. subtilis* pKSVAPG konnten keine fluoreszierenden Kolonien beobachtet werden.

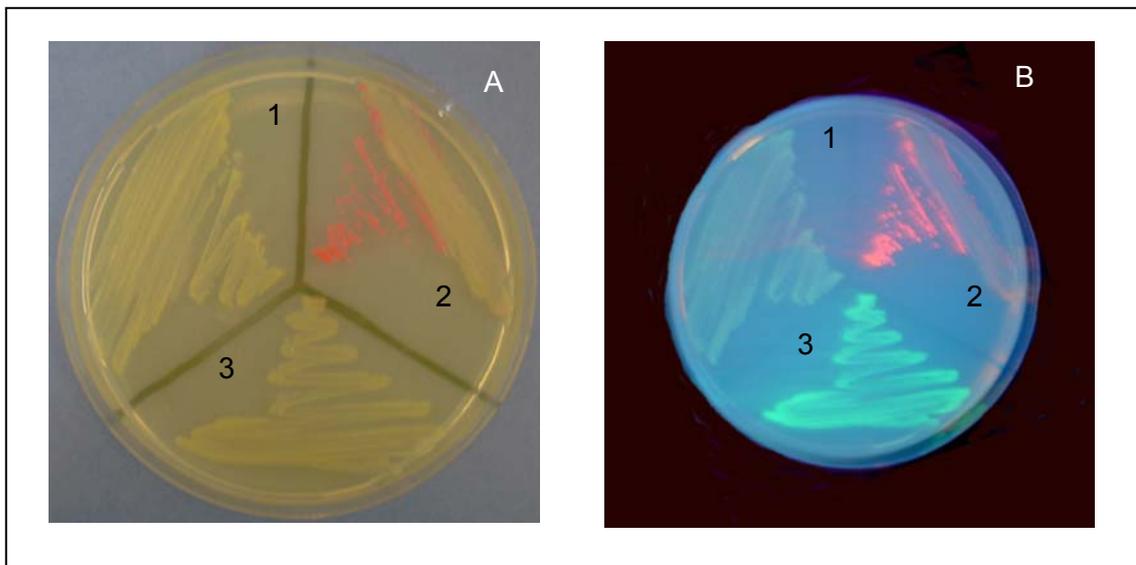


Abbildung 47: Fotografie einer Agarplatte bei Tageslicht (A) und bei UV-Bestrahlung (B); 1= *E. coli* pKSVAPG, 2= *E. coli* pDsRed2, 3= *E. coli* pECFP

Bei mikroskopischer Betrachtung von Nativpräparaten mit dem Fluoreszenzmikroskop leuchteten *E. coli* pECFP und *E. coli* pGFPuv (s. auch Abbildung 48) sehr intensiv und emittierten grünes Licht. *E. coli* pDsRed2 fluoreszierte rot. Die Intensität der Fluoreszenz von *E. coli* pTСКАePG erschien zwar schwächer als die von *E. coli* pGFPuv, jedoch waren auch Einzelzellen immer noch gut zu differenzieren. *B. subtilis* pKSVAPG fluoreszierte, wenn überhaupt, nur sehr schwach. Die Bewertung bei mikroskopischer

Betrachtung wird dadurch erschwert, dass der Wildtyp *B. subtilis* DSMZ 402 eine geringe Autofluoreszenz aufweist. Wurde das Plasmid pKSVAPG in *E. coli* gebracht, konnten fluoreszierende Zellen nachgewiesen werden.

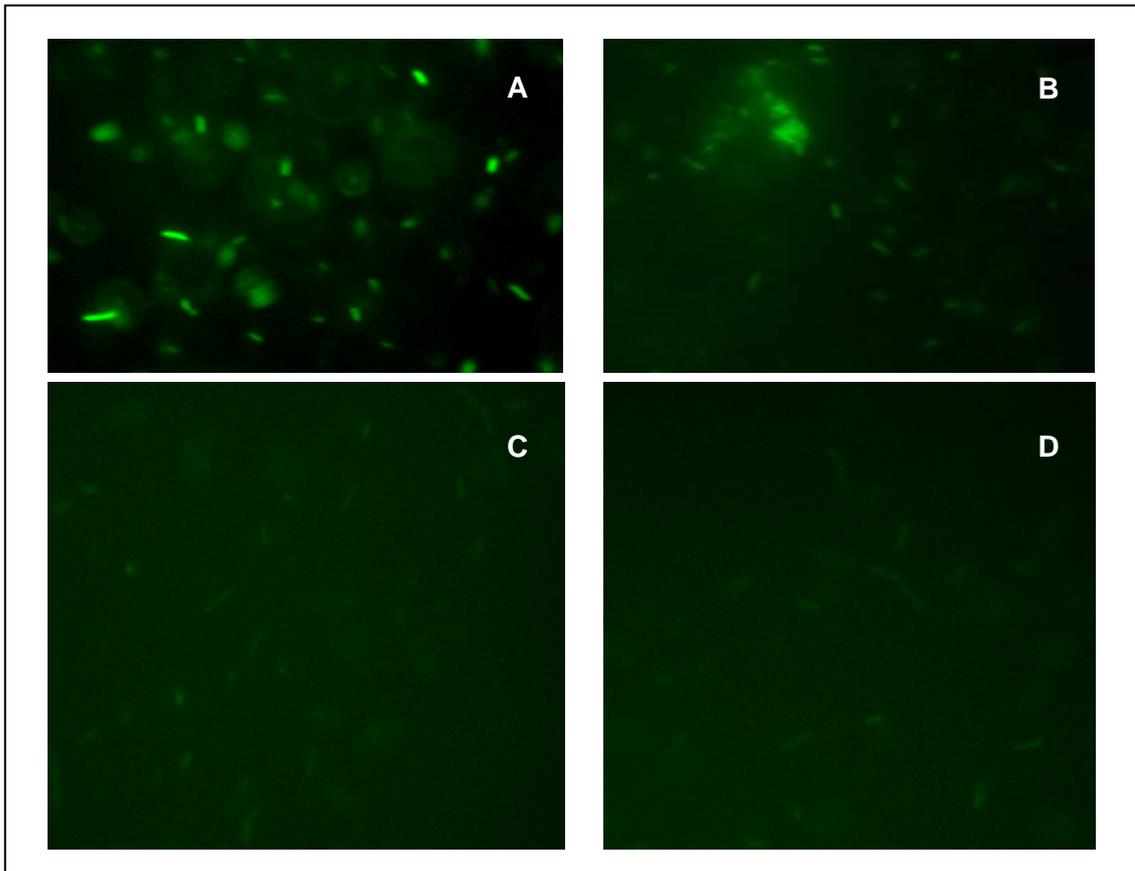


Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Nativpräparaten mit *E. coli* pGFPuv (A), *E. coli* pTSKAePG (B), *B. subtilis* pKSVAPG (C) und *B. subtilis* Wildtyp (D); die Präparate von *B. subtilis* wurden mit Glycerin angefertigt; Vergrößerung 1000X;

In einer weiteren Untersuchung wurden die in Abbildung 49 dargestellten Emissionsspektren über einen Bereich von 420 bis 800 nm von in Puffer aufgenommenem Zellmaterial aufgenommen. Das Maximum bei 509 nm bildet die Fluoreszenz von GFP ab. Anhand der in Abbildung 49 angegebenen Intensitäten bei 509 nm ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzintensität von *E. coli* pGFPuv deutlich die der anderen Mutanten überstieg. Die mikroskopische Betrachtung von *E. coli* pGFPuv und *E. coli* pTSKAePG ließ den signifikanten Unterschied (Faktor 6,7) zwischen den gemessenen Fluoreszenzintensitäten nicht vermuten. Dagegen zeigte die mikroskopische Untersuchung eine deutliche Reduktion zwischen *E. coli* pTSKAePG und *B. subtilis* pKSVAPG, was sich jedoch nicht in den Emissionsmaxima (Faktor 1,5) widerspiegelte. Hier spielt vielleicht eine Rolle, dass es sich um verschiedene Organismen, zudem es sich um einen grampositiven und einen gramnegativen handelt.

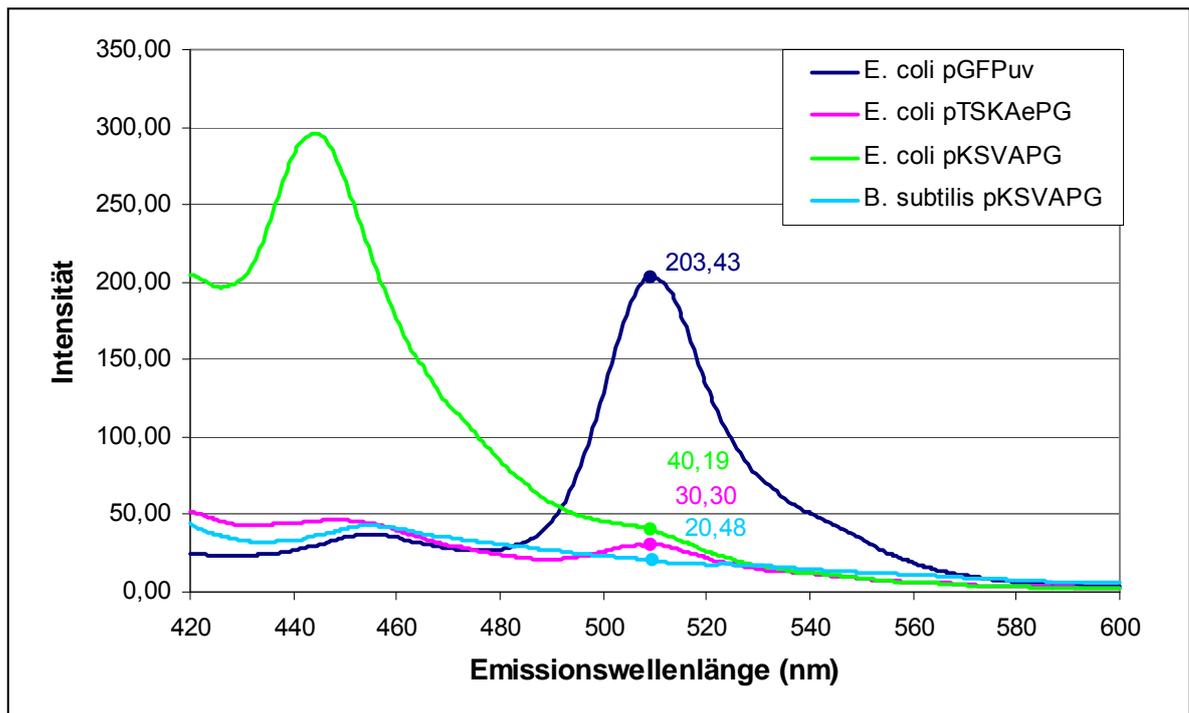


Abbildung 49: Emissionsspektren von *E. coli* pGFPuv, *E. coli* pTSKAePG, *B. subtilis* pKSVAPG und *B. subtilis* pKSVAPG bei Anregung mit 395 nm

3.7.4 Strategie zur Fluoreszenzmarkierung von *F. graminearum*

Grundlage für die Markierung von *F. graminearum* war das Plasmid pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987), welches es über eine resistenzvermittelnde Phosphotransferase ermöglicht, Transformanten mit Hygromycin B zu selektionieren. Dem *hph*-Gen der Phosphotransferase vorgeschaltet ist eine Promotorstruktur des Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens aus *Aspergillus nidulans*. Stromabwärts des *hph*-Gens liegt eine Terminationsregion des *trpC*-Gens (Tryptophan-Biosynthese) aus *A. nidulans*. Für verschiedene filamentöse Pilze wie z.B. *Schizophyllum commune* und andere *Aspergillus*-Arten wurde das Plasmid bereits verwendet (Punt *et al.*, 1987).

Für die Fluoreszenzmarkierung von *F. graminearum* wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollte das Resistenzgen gegen das Fluoreszenzgen ausgetauscht werden und der entstandene Vektor zusammen mit pAN7-1 in einer bei Pilzen üblichen Cotransformation in protoplastierte Zellen von *F. graminearum* eingeschleust werden. Als Nachteil dieser Strategie erschien, dass lediglich pAN7-1 selektioniert werden kann, nicht aber das zweite Plasmid. Deshalb sollte zum anderen das Fluoreszenzgen hinter das Phosphotransferase-Gen kloniert und nur ein Vektor in die Transformation eingesetzt werden.

3.7.5 Klonierung der Vektoren zur Fluoreszenzmarkierung von *F. graminearum* mit ECFP und DsRed

Zur Umsetzung der ersten Strategie musste das *hph*-Gen aus pAN7-1 entfernt werden. Dazu wurde das Plasmid mit *Scal* verdaut, wobei drei Fragmente (1766 pb, 3906bp und 1084 bp) entstanden. Die beiden größeren Fragmente wurden in eine Ligation eingesetzt, bei der pAN7-1 Δ *hph* gebildet wurde. Dieser Vektor wurde linearisiert und mit *ecfp* bzw. *dsred* ligiert. Die Fluoreszenzgene wurden mittels PCR von den Plasmiden pECFP und pDsRed2 gewonnen. Als Endprodukt lagen die Vektoren pANE3 mit *ecfp* und pAND6 mit *dsred* vor.

Zur Umsetzung der zweiten Strategie wurde pAN7-1 lediglich mit *Bam*HI direkt hinter dem *hph*-Gen aufgeschnitten und die Fluoreszenzgene wie oben beschrieben eingeführt. Es resultierten die Vektoren pANHE4 und pANHD1.

3.7.6 Präparation von pilzlichen Protoplasten zur PEG-vermittelten Transfomation

Myzel von *F. graminearum* CBS 110250 konnte durch Inkubation in einer Enzymlösung teilweise protoplastiert werden. Dazu wurden die Enzyme Driselase, Lyticase und Lysing Enzyme eingesetzt. Die Konzentration an Protoplasten wurde nach Filtrieren der Myzelsuspension durch Auszählen in der Fuchs-Rosenthal-Kammer ermittelt. Meistens wurde eine Zellzahl von 10^8 Protoplasten/ml erreicht.

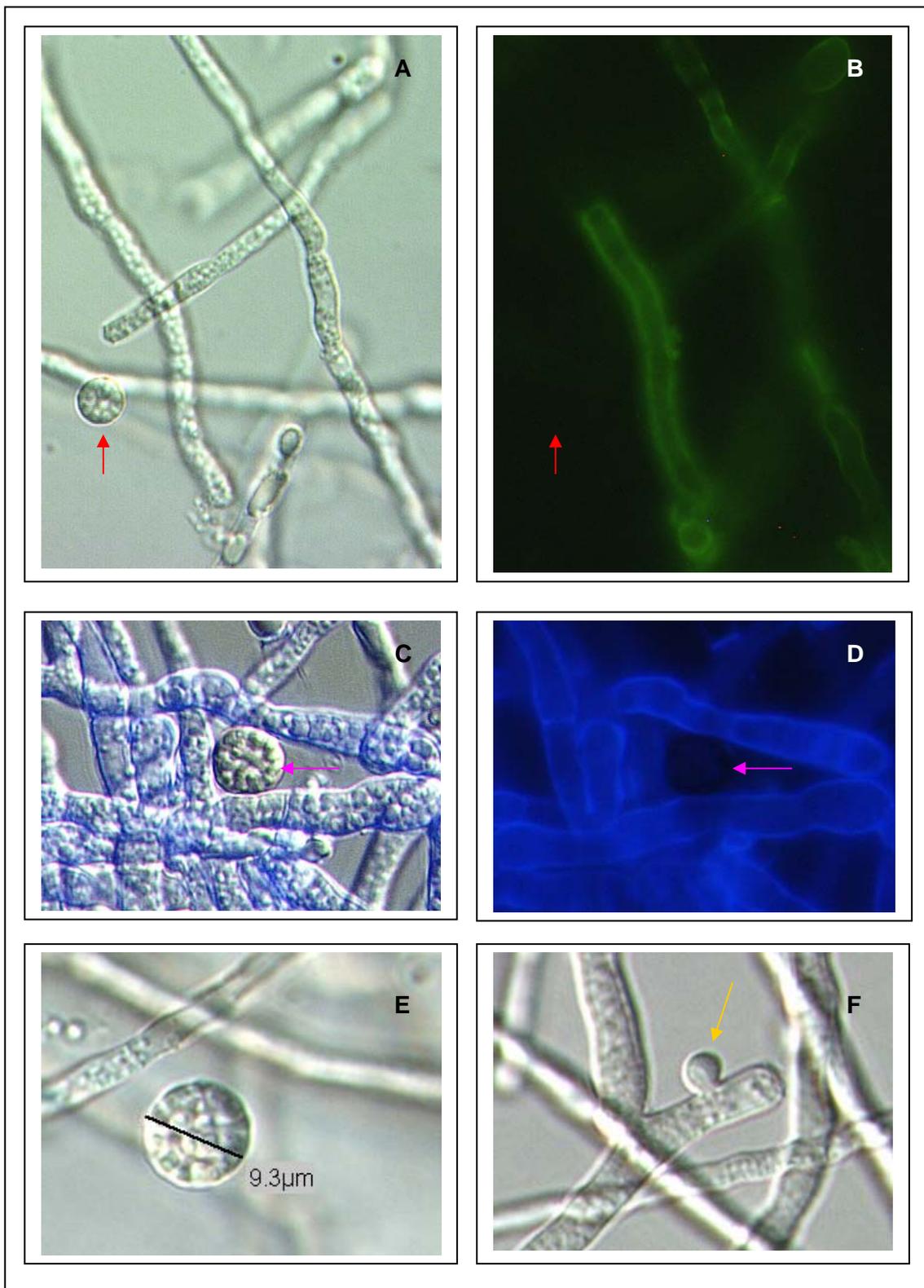


Abbildung 50: Mikroskopische Aufnahmen von *F. graminearum* CBS 110250 mit Protoplasten (markiert durch Pfeile); Vergrößerung 1000x. A und B: Präparat behandelt mit WGA; A: Lichtmikroskopische Aufnahme; B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des gleichen Präparates; C und D: Präparat behandelt mit Calcofluor; C: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme unter Zuschaltung von Licht; D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; E: Protoplast mit Durchmesserangabe; F: Hyphe mit teilweise abgebauter Zellwand und austretendem Protoplasten

Der durch die Enzyme hervorgerufenen Zellwandabbau konnte mit WGA (Wheat germ agglutinin) dokumentiert werden. WGA ist ein Lektin, welches selektiv an N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure bindet. Ein an WGA gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff (Oregon Green) wird dann sichtbar und kann durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Ein weiterer Nachweis des Zellwandabbaus wurde mit Calcofluor erbracht, welches an Kohlenhydrate wie Chitin und Cellulose bindet und dann fluoresziert. Abbildung 50 zeigt eine Zusammenstellung von mikroskopischen Bildern, aus denen ersichtlich wird, dass es sich bei den in den Präparaten enthaltenen globulären Strukturen um Protoplasten handelt, da diese weder mit WGA noch mit Calcofluor angefärbt werden konnten (Abbildung 50 A-D). Die Größe der Protoplasten lag zwischen 8 und 10 µm. Auch die Entstehung der Protoplasten (Abbildung 50 F) konnte beobachtet werden.

3.7.7 Expression der Fluoreszenz in *F. graminearum*

In einer PEG-vermittelten Cotransformation wurden pAN7-1 und pANE3 bzw. pAND6 in Protoplasten von *F. graminearum* eingeschleust. Bei anschließender Selektion mit Hygromycin B konnten stets viele Transformanten gewonnen werden. Da aber die Aufnahme von pAN7-1 alleine ausreichend war, um gegenüber Hygromycin B resistent zu sein, konnte über die Aufnahme des zweiten Vektors pANE3 oder pAND6 keine Aussage getroffen werden. Die Transformanten wurden durch Fluoreszenzmikroskopie gescreent. Außer einer verglichen mit *B. subtilis* recht starken Autofluoreszenz konnte jedoch keine darüber hinaus gehende intensivere Fluoreszenz beobachtet werden.

Im Falle der Transformation von pANHE4 bzw. pANHD1 konnten keine Transformanten gewonnen werden, was vermuten lässt, dass das *hph*-Gen nicht mehr zu einer funktionalen Phosphotransferase exprimiert werden konnte.

3.7.8 Kurioses um GFP und Co

Die Tatsache, dass bakterielle Kulturen gelegentlich, keinesfalls immer, drei-vier Tage benötigten, bis sie fluoreszierten, erscheint mit dem Wissen, dass die Fluoreszenzproteine bezüglich korrekter Faltung empfindlich sind, hinnehmbar. Verwunderlich ist allerdings die Beobachtung, dass beim Passagieren von Mutanten der Ausstrich nur stellenweise fluoreszierte. So konnten z.B. auf einer Agarplatte (LB mit Ampicillin) rote, rosafarbene und weiße Kolonien von *E. coli* pDsRed2 entdeckt werden, die entsprechend ihrer Pigmentierung auch in ihrer Fluoreszenz unterscheidbar waren (s. auch Abbildung

47). Eine weitere Untersuchung dieser Kolonien zeigte, dass die weißen Kolonien in der nachfolgenden Weiterkultivierung nicht mehr in ampicillinhaltigem Medium wuchsen und ihr Plasmid verloren hatten.

Empfindlich schienen die Fluoreszenzproteine auch gegenüber Licht zu sein. Platten aus einer Transformation mit pGEMTAePG in *E. coli* wurden mit Hilfe einer UV-Handlampe gescreent, wobei fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Kolonien beobachtet wurden. Nach dieser Auswertung blieben die Platten als Stapel ca. 5 Tage auf der Laborbank stehen und waren in dieser Zeit diffusem Tageslicht sowie Neonlicht ausgesetzt. Danach zeigten die oberen Platten im Stapel drei verschiedene Kolonietypen: cremefarbene, grünlich-gelbe und grünlich-graue.

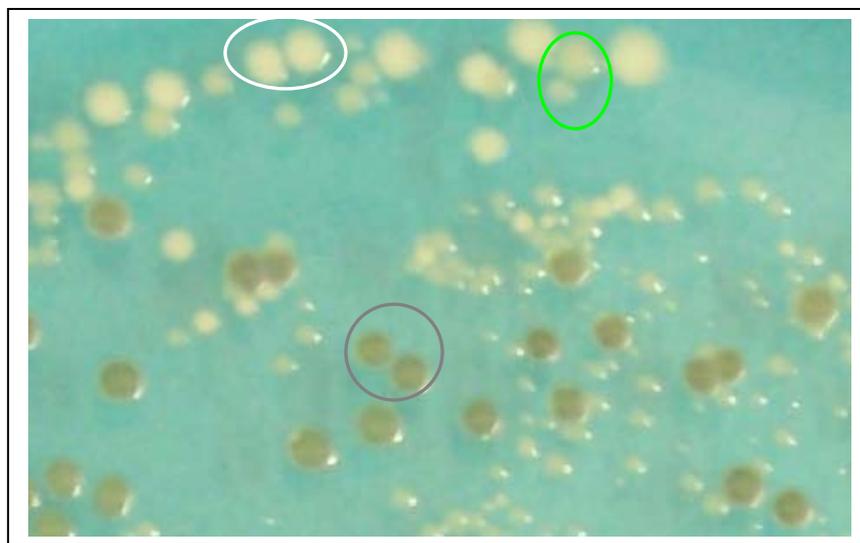


Abbildung 51: *E. coli* DH5 α und *E. coli* pGEMTAePG auf einer Agarplatte mit LB-Ampicillin zur Selektion von Transformanten (hier fotografiert auf einem türkisfarbenen Untergrund); *E. coli* DH5 α weiß markiert, fluoreszierende *E. coli* pGEMTAePG grün markiert und nicht mehr fluoreszierende *E. coli* pGEMTAePG grau markiert;

Die in Abbildung 51 cremefarbenen Kolonien von *E. coli* fluoreszierten zu keinem Zeitpunkt, alle grünlich-gelben Kolonien fluoreszierten, während die jetzt grünlich-grauen Kolonien nach ÜN Inkubation noch grünlich-gelb aussahen und fluoreszierten, jedoch nach der Verfärbung die Fluoreszenz verloren hatten.

Im Gegensatz zu den empfindlichen GFP-Proteinen zeigten sich die entsprechenden Vektoren der Fa. Clontech als unkompliziert. So wurde durch Anzucht von *E. coli* pECFP selbst isoliertes, also in nicht übermäßig hoher Konzentration vorliegendes pECFP als Ziel-DNA in PCR-Ansätze eingesetzt. Nach der PCR enthielten die Ansätze ohne Nebenprodukte das gewünschte Insert als Amplifikat, mussten aber trotz der sauberen PCR vor der Ligation durch Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion des Amplifikates gereinigt werden. Die direkte Ligation des PCR-Ansatzes lieferte nach

Transformation des Ligationsansatzes hauptsächlich fluoreszierende Klone, die pECFP aufgenommen hatten, obwohl pECFP als Ziel-DNA nur sehr verdünnt im Ligationsansatz enthalten sein konnte. Offensichtlich konnten sich die *E. coli* Zellen, die pECFP aufgenommen hatten, während der Regenerationszeit sehr gut vermehren und waren beim Ausplattieren der Transformationsansätze in der Überzahl.

3.8 Proteinanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese

3.8.1 Präparation von Proteinextrakten aus *F. graminearum*

Grundsätzlich kann die Vorbereitung für eine Proteinanalyse in drei Schritte eingeteilt werden. Zunächst müssen die Zellen aufgebrochen werden, damit intrazelluläre Proteine zugänglich werden. Weiter müssen die Proteine solubilisiert bzw. aus den Zell- und Organellmembranen gelöst werden. Außerdem müssen störende Substanzen abgetrennt werden. Um für die 2D-Gelelektrophorese geeignete Proteinextrakte herzustellen, müssen verschiedene Punkte beachtet werden. Es besteht der Anspruch, das Proteom zu untersuchen. Demnach muss der Proteinverlust minimal gehalten werden. Zudem sollen möglichst alle Proteine, also sowohl hydrophile als auch hydrophobe, gelöst werden. Zur Solubilisierung dürfen jedoch nur ungeladenen oder zwitterionische Detergenzien eingesetzt werden. SDS als sehr gutes Detergenz darf nicht bzw. nur zu einem geringen Prozentsatz verwendet werden, da es die Eigenladung der Proteine mit seiner Negativladung überlagert und somit eine isoelektrische Fokussierung unmöglich macht. Störend für die Methode wirken sich auch alle weiteren zellulären Moleküle wie Lipide, Polysaccharide, DNA und auch Salze aus. Diese müssen aus dem Proteinextrakt entfernt werden.

3.8.1.1 Zellaufschluss

Da *F. graminearum* als filamentöser Pilz eine feste Zellwand aufweist, fallen verschiedene eher sanfte Aufschlussmethoden wie z.B. Einfrieren und Wiederauftauen (Humangewebe) oder Aufziehen in einer Spritze (Bakterien, z.B. *Allochromatium vinosum* bei Reinartz, 2002) weg.

Als zielführend erwiesen sich Ultraschall, French Press und Mörsern. Für den Ultraschall wurde Myzel in Puffer aufgenommen und in einem gekühlten Probenbecher 1 min pro ml mit 50% Leistung in einem Cell disrupter (Branson Sonifier) beschallt. Die vor der

Behandlung makroskopisch sichtbaren Myzelverbände wurden dadurch aufgelöst und die Hyphen aufgebrochen, was mikroskopisch anhand von Myzelbruchstücken beobachtet werden konnte. Als Puffer wurde PBS und Lysispuffer ausprobiert. Problematisch war, dass dem Puffer kein Detergenz zugesetzt werden konnte, da die Probe sonst bei der Ultraschallbehandlung schäumte. Die Solubilisierung musste folglich dem Zellaufschluss angeschlossen werden, was durch Zusatz von Detergenz und Inkubation der Probe erfolgte. Diese Zeitverzögerung jedoch ermöglichte es den besonders in Pilzen reichlich vorkommenden Proteasen, Proteine abzubauen, so dass in den Proben bei Verwendung von PBS als Puffer keine oder in Lysispuffer nur sehr wenige Proteine detektiert werden konnten. Meistens wurde ein „Schmier“ angefärbt, der den Proteinabbau dokumentierte. Wurde das Myzel mit der French Press aufgeschlossen, so konnte Lysispuffer mit Detergenz verwendet werden. Der Zellaufschluss wurde mit einem Druck von 1200 psi in drei Durchgängen erzielt. Auch hier veränderte sich die Probe makroskopisch. Mikroskopisch war kein Myzel mehr erkennbar. Allerdings nahm der Zellaufschluss viel Zeit in Anspruch, da zwischen den einzelnen Durchgängen das Kolbensystem immer wieder in Ausgangsposition gebracht werden musste. Abbildung 52 zeigt beispielhaft angefärbte Gele mit auf diese Weise gewonnenen Proteinproben. Es konnten zwar Proteine über die Probenbearbeitung hinweg erhalten werden, jedoch lag die Anzahl der Spots in dem 2D-Gel sehr niedrig, was sich zum einen in der Anzahl der in der Probe enthaltenen Proteine, zum anderen auch im Verfahren der 2D-Gelelektrophorese begründete. Beide Punkte wurden wie im folgenden noch dargestellt wird, optimiert.

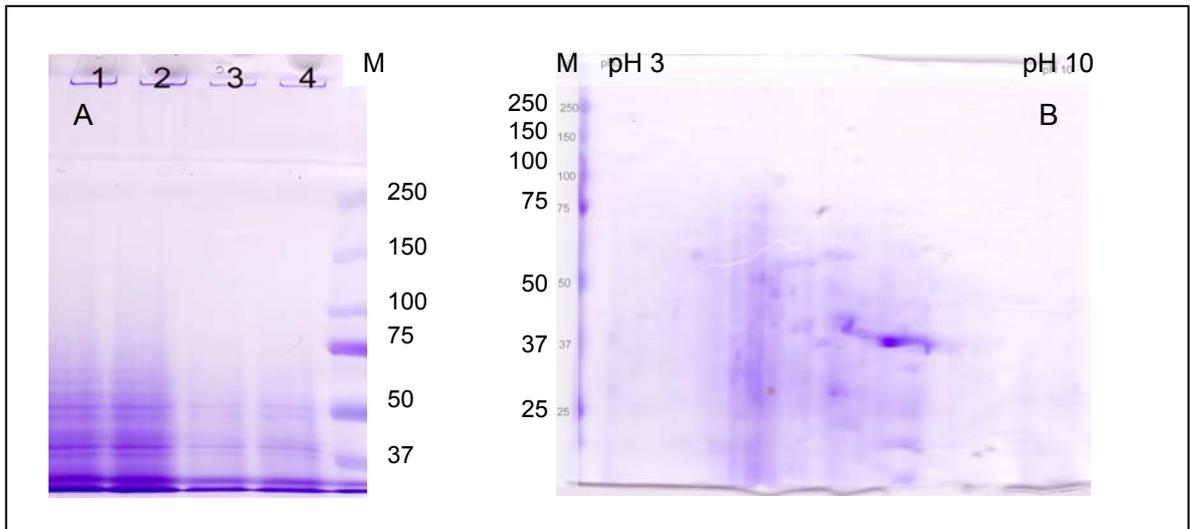


Abbildung 52: A: Auftrennung verschiedener Proteinproben von *F. graminearum* CBS 110250 durch SDS-PAGE angefärbt mit Coomassie; Spur 1= mit Aceton gefällte und in IEF-Puffer aufgenommene Proteine aus mittels French Press gewonnenem Zellysatz von *F. graminearum* CBS 110250 unter Zusatz von 0,5 M Deoxycholat als Detergenz; Spur 2= wie Spur 1 ohne Zusatz von Deoxycholat; Spur 3= mittels French Press gewonnenes Zellysatz von *F. graminearum* CBS 110250 unter Zusatz von 0,5 M Deoxycholat als Detergenz; Spur 4= wie Spur 3 ohne Zusatz von Deoxycholat; Spur 5= Proteinmarker; B: 2D-Gel gefärbt mit Coomassie: in die isoelektrische Fokussierung eines 7 cm langen Streifens mit einem pH-Gradienten von pH3 bis pH 10 wurde die in Abbildung 52 A Spur 2 aufgetragene Proteinprobe eingesetzt.

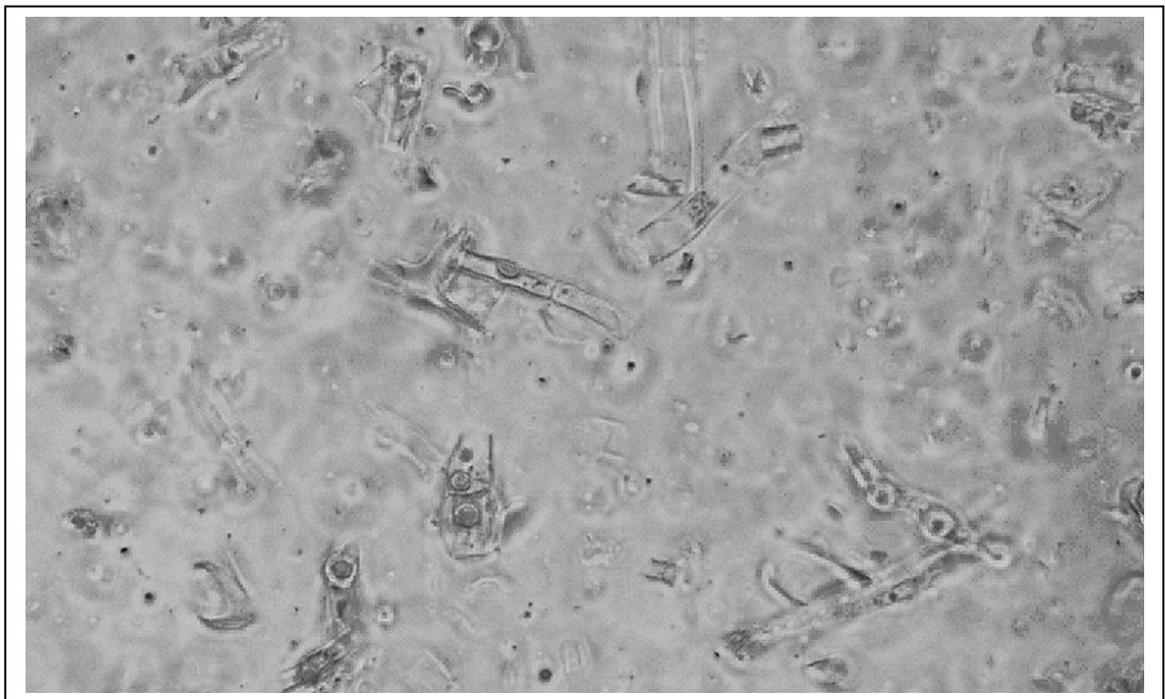


Abbildung 53: Lichtmikroskopische Aufnahme von Myzel von *F. graminearum* Z3639 aufgeschlossen durch Mörsern; Vergrößerung 400x

Als drittes Zellaufschlussverfahren wurde das Pulverisieren von Myzel unter Zusatz von Flüssigstickstoff in einem handelsüblichen Porzellan-Mörser ausprobiert. Variiert wurde hier der Zustand des eingesetzten Myzels in Form von gefriergetrocknetem Material oder Naßmyzel. Weiterhin wurde getestet, ob der Zusatz von Glaskügelchen die Effektivität des Aufschlusses steigern konnte. Es zeigte sich, dass die Lyophilisierung des Myzels und zugesetzte Glaskügelchen keine Vorteile boten. Als geeignet erwies sich das Pulverisieren von Naßmyzel, welches durch Zugabe von flüssigem Stickstoff in ein sehr hartes Material verwandelt wurde, welches gut mit dem Pistill zerstoßen und dann zu Pulver zerrieben werden konnte. Durch mehrmalige Zugabe von kleinen Mengen Flüssigstickstoff wurde verhindert, dass das Myzel während des Prozesses auftaute.

Verglichen mit Ultraschall und French Press bot diese Aufschlussmethode verschiedene Vorteile. Die eingesetzte Menge an Myzel konnte wesentlich reduziert werden. Weiterhin ging der Proteinabbau durch Proteasen durch die niedrige Temperatur während des Zellaufschlusses und durch die sich direkt an den Zellaufschluss anschließende Fällung der Proteine sehr stark zurück. Außerdem gestaltete sich der zeitliche Aufwand für jede Probe gering, so dass es möglich war, mehrere Proben hintereinander zu bearbeiten.

Der beste Aufschluss wurde mit der French Press erzielt. Ultraschall und Mörsern waren miteinander vergleichbar. Abbildung 53 zeigt durch Mörsern aufgeschlossenes Myzel. Es sind zwar noch Bruchstücke von Myzel zu erkennen, jedoch lagen keine intakten Zellen oder gar Hyphen vor.

3.8.1.2 Reinigung der Proteinprobe

Für die isoelektrische Fokussierung sollen möglichst alle störenden Substanzen entfernt werden. Dazu wurden verschiedene Verfahren getestet. In einer TCA-Fällung wurden 2,5-3 Vol der Proteinprobe mit 1 Vol einer 10 %igen TCA-Lösung versetzt, nach Inkubation und Zentrifugation konnte das Pellet in IEF-Puffer aufgenommen werden. Mit dieser Fällung konnte die Proteinprobe zwar konzentriert werden, eine nennenswerte Reinigung wurde jedoch nicht erzielt. Durch den Einsatz von Lösungsmitteln sollte dies verbessert werden. Eine zweite Methode nach Wessel & Flügge (1984) beinhaltete Methanol und Chloroform, allerdings konnte es hier zu Proteinverlusten kommen, da im Laufe der Aufarbeitung wässrige und Lösungsmittelphase getrennt werden mussten, wobei sich die Proteine in der Interphase sammelten. In einer Acetonfällung wurde 1 Vol Proteinprobe mit 9 Vol kaltem Aceton versetzt und nach Inkubation zentrifugiert. Das Pellet konnte nach Lufttrocknen jedoch oft nur schlecht in IEF-Puffer gelöst werden. In einer kombiniert Aceton/TCA-Fällung wurde mit einer eiskalten Mischung aus 10 % TCA und 0,3 % DTT in

Aceton für 2h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt und der Ansatz zentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen und dann in IEF-Puffer gelöst, wobei eine evt. mehrmalige Behandlung in einem Ultraschallbad die Solubilisierung erleichterte. Diese Fällung eignete sich in Bezug auf Handhabung und Löslichkeit der gefällten Proteine am besten.

Eine zusätzliche Aufarbeitung der Proben vor Einsatz in die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem 2-D Clean-up Kit (Fa. Amersham Biosciences) durchgeführt, wobei nach Protokoll B des Herstellers vorgegangen wurde.

Zusammenfassend lässt sich folgende Aufarbeitung von Proteinextrakten aus *F. graminearum* festhalten:

Myzel wurde unter Zusatz von Flüssigstickstoff in einem Mörser aufgeschlossen. Das entstandene Pulver wurde einer Aceton/TCA-Fällung unterzogen und die nach Solubilisierung des Pellets gewonnene Proteinlösung mit dem 2-D Clean-up Kit aufgearbeitet. Eine Quantifizierung erfolgte mit dem Protein Assay der Firma Biorad, wobei die Proteinproben mindestens 1:100 verdünnt wurden, um den hohen Harnstoffgehalt zu reduzieren, der bei den meisten Proteinbestimmungen störend wirkt.

3.8.2 Auftrennung von Proteinproben mittels 2D-Gelelektrophorese

3.8.2.1 Optimierung des Verfahrens

Um das Verfahren kennenzulernen und Verbesserungen auszuarbeiten, wurde mit 7 cm langen IPG-Streifen gearbeitet. Im folgenden werden unabhängig voneinander verschiedene Punkte abgehandelt, die von den üblichen Angaben in Herstellerprotokollen oder anderen allgemeinen Empfehlungen abweichen.

Für die nach der isoelektrischen Fokussierung folgende SDS-PAGE wurden zunächst laut dem Instruktionshandbuch der Fa. Biorad 0,75 mm dicke Gele hergestellt. Die nach der Rehydrierung aufgequollenen Gelstreifen passten jedoch nicht in den 0,75 mm großen Abstand der beiden Gelplatten und wurden gequetscht. Deshalb wurden 1 mm dicke Gele verwendet.

Als weiteres Problem bei der SDS-PAGE gestaltete sich der Markerauftrag. Der 2D-Probenkamm, der nach dem Gelgießen eingesetzt wird, hält eine große Tasche für den IPG-Streifen frei und eine kleine für den Proteinmarker. Jedoch passte der IPG-Streifen nicht in die große Tasche, so dass der IPG-Streifen gekürzt werden musste. Um den IPG-Streifen intakt zu lassen, wurde alternativ das Gel ohne Probenkamm gegossen und mit

Butanol überschichtet, um eine glatte Kante zu erzeugen. Dann wurde zunächst der IPG-Streifen aufgelegt werden. Der Marker wurde auf ein schmales Filterpapier aufgebracht, welches neben den IPG-Streifen platziert wurde.

In vielen Anleitungen zur 2D-Gelelektrophorese wird der auf das Gel aufgelegte IPG-Streifen mit Agarose überschichtet. Sowohl beim Auflegen des Streifens als auch beim Überschichten dürfen keine Luftblasen eingeschlossen werden, da diese das Einwandern der Proteine aus dem IPG-Streifen in das Gel stören würden, was nachträglich im Proteinmuster durch leere Streifen erkennbar wird. Statt den IPG-Streifen zu überschichten, wurde zunächst etwas Agaroselösung auf der Gelkante verteilt, der IPG-Streifen eingebettet und dann mit Agarose überschichtet. So konnte ein guter Kontakt des Streifens mit dem Gel gewährleistet werden und Luftblasen wurden sehr gut verdrängt.

Im allgemeinen wurde die Rehydrierung der IPG-Streifen mit der Proteinlösung aktiv vorgenommen, d.h. es wurde eine Stromstärke von 50 μA pro IPG-Streifen angelegt. Bei Verwendung eines sogenannten „narrow range“ IPG-Streifens mit einem Gradienten von pH 4,7 bis pH 5,9 jedoch quoll der Streifen nur an den Enden. Mittig blieb der Streifen dehydriert. Hier eignete sich die passive Rehydrierung besser, außerdem wurde dem IEF-Puffer 10 % Glycerin zugemischt.

3.8.2.2 Die 2D-Gelelektrophorese in der Anwendung

Der weiteste pH-Gradient bei IPG-Streifen, der kommerziell erhältlich ist, umfasst den Bereich von pH 3 bis pH 10. Abbildung 54 zeigt ein 2D-Gel, auf welches ein 17 cm IPG-Streifen mit einem solchen pH-Spektrum aufgelegt wurde. Es wurde ein Proteinextrakt von *F. graminearum* GZT-40 aufgetrennt. In dem Gel lagen die meisten Proteine im Extrakt aus *F. graminearum* GZT-40 in dem Bereich um $\text{pH}7 \pm 1,5$. Nur wenige Proteine liegen in den extremeren pH-Bereichen. Der gleiche Proteinextrakt wurde in einem IPG-Streifen pH 5 – 8 fokussiert und anschließend auf ein SDS-Gel aufgelegt. Abbildung 55 gibt das Gel wieder.

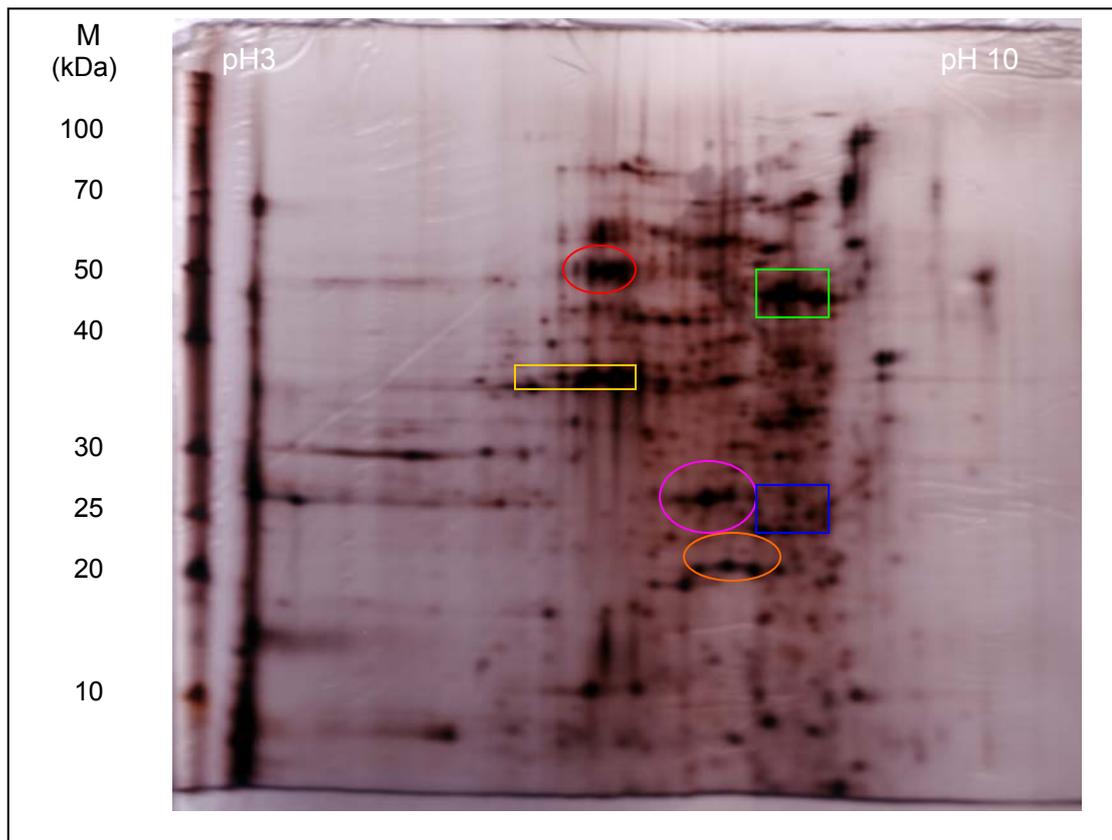


Abbildung 54: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes aus *F. graminearum* GZT-40 über einen Bereich von pH 3 bis pH 10; Auftrag: 400 µg Protein; Silberfärbung; farbige Markierungen dienen zum Vergleich mit Abbildung 55

Da für Abbildung 55 ein kleinerer pH-Bereich auf der gleichen Länge (17 cm) als für Abbildung 54 untersucht wurde, konnte eine bessere Auflösung der Proteinspots erzielt werden. Viele Punkte, die in Abbildung 55 differenziert werden konnten, wurden in Abbildung 54 eher als Fläche mit weniger scharfe Begrenzungen detektiert. Andererseits gingen Proteinspots, die in den Randbereichen des Gels von Abbildung 54 lagen, in dem Gel von Abbildung 55 verloren.

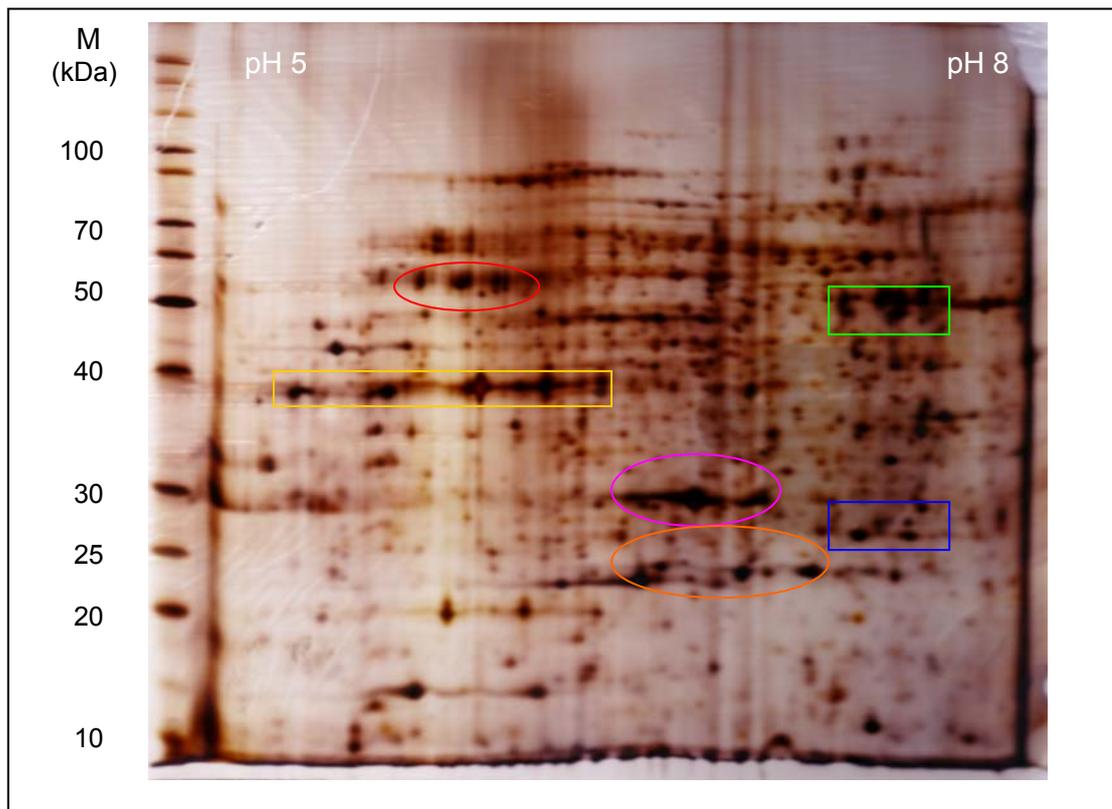


Abbildung 55: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes aus *F. graminearum* GZT-40 über einen Bereich von pH 5 bis pH 8; Auftrag: 400 µg Protein; Silberfärbung; farbige Markierungen dienen zum Vergleich mit Abbildung 54

Die Analyse von Proteinextrakten mittels 2D-Gelelektrophorese wird außer von dem gewählten pH-Bereich auch von der Menge des eingesetzten Gesamtproteins beeinflusst. Abbildung 56 zeigt einen Proteinextrakt von *F. graminearum* GZT-40 aufgetrennt in einem Gradienten von pH 5 bis pH 8, unterscheidet sich jedoch von Abbildung 55 dadurch, dass hier nur 200 µg Protein aufgetragen wurde.

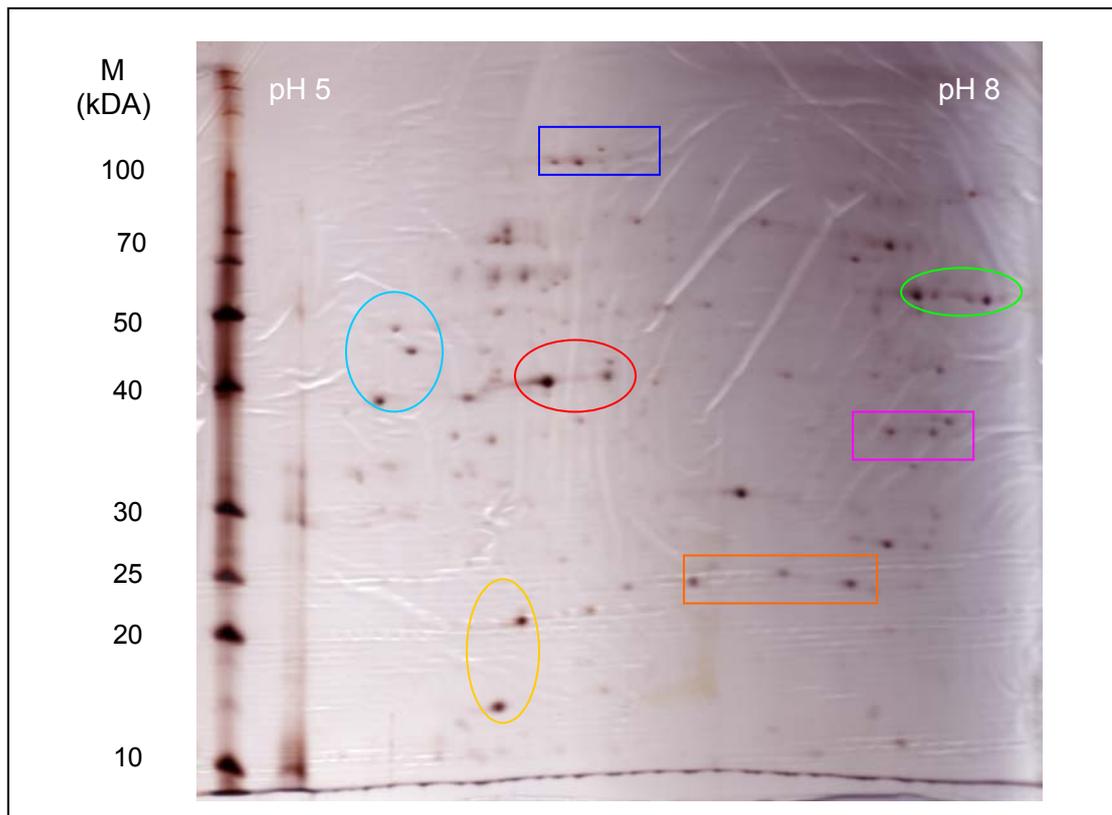


Abbildung 56: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes aus *F. graminearum* GZT-40 über einen Bereich von pH 5 bis pH 8; Auftrag: 200 µg Protein; Silberfärbung; farbige Markierungen dienen zum Vergleich mit Abbildung 57

Die unspezifische Hintergrundfärbung reduziert sich bei geringerem Proteinauftrag, das Gel aus Abbildung 56 blieb sehr klar, die Proteinspots waren dadurch klar abgegrenzt. Allerdings lagen viele Spots mit ihrer Proteinkonzentration unter der Nachweisgrenze der Silberfärbung, so dass die Anzahl der detektierten Proteine geringer erschien als bei Abbildung 55, wobei bemerkt werden muss, dass durch die Dokumentation des Gels in einem Scanner schwach angefärbte Proteine in der Darstellung verloren gingen.

Ein Vergleich der Gele in Abbildung 56 (*F. graminearum* GZT-40) und Abbildung 57 (*F. graminearum* CBS 110250) zeigte, dass die Proteinextrakte der beiden Stämme sehr ähnliche Proteinmuster ergeben. Die farbigen Markierungen umrahmen beispielhaft in den Abbildungen übereinstimmende Bereiche.

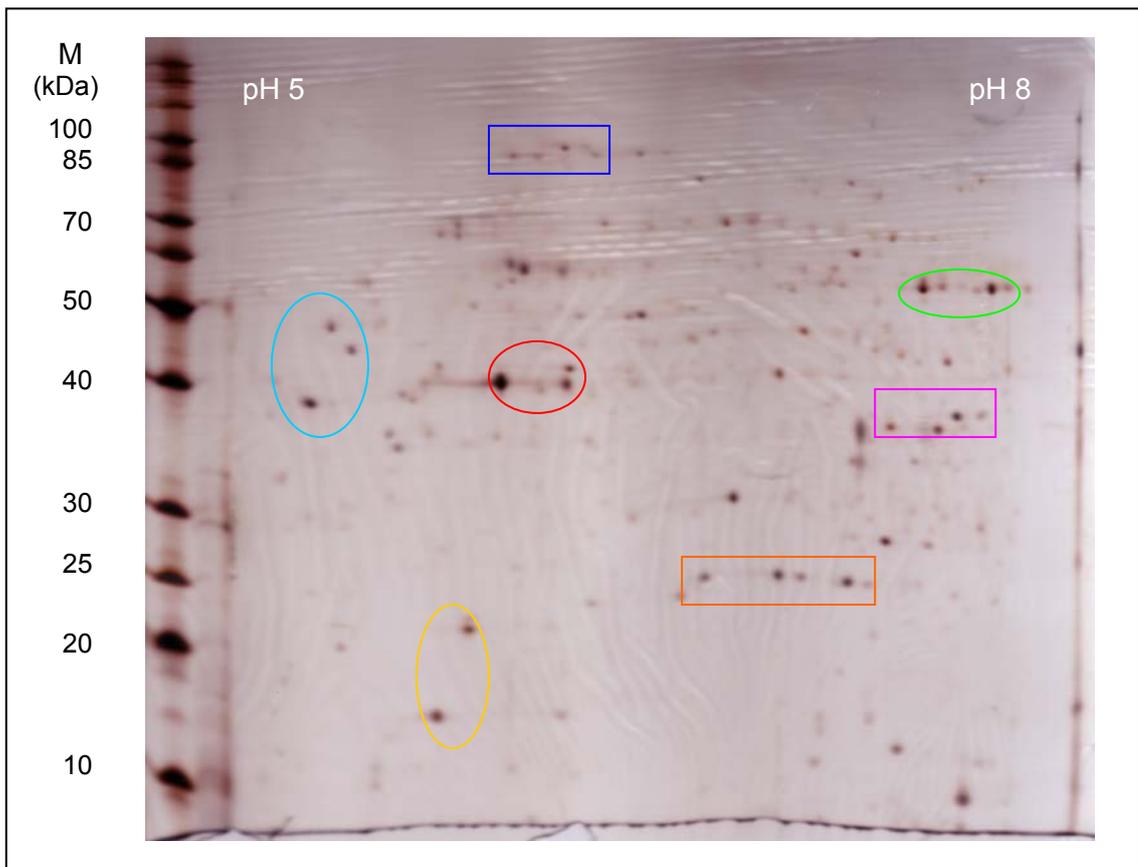


Abbildung 57: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes aus *F. graminearum* CBS 110250 über einen Bereich von pH 5 bis pH 8; Auftrag: 200 µg Protein; Silberfärbung; farbige Markierungen dienen dem Vergleich mit Abbildung 56

Aufgrund der Arbeiten von Shimizu und Wariishi (2005) an dem filamentösen Pilz *Tyromyces palustris* wurden Protoplasten von *F. graminearum* CBS 110250 im Vergleich zu intaktem Myzel für die 2D-Gelelektrophorese vorbereitet. Die Protoplasten wurden wie unter 2.4.9 hergestellt und, da die Zellen ohne Zellwand schnell lysieren, direkt ohne Zellaufschluss mit eiskaltem Aceton mit 10 % TCA und 0,3 % DTT versetzt. Bei Shimizu und Wariishi (2005) konnte die Anzahl der Spots gesteigert werden, wenn *T. palustris* protoplastiert wurde. Bei dem vorliegenden Experiment konnte eine deutliche Zunahme (s. Abbildung 58) nicht bemerkt werden. Zwar konnten in dem Gel mit aufgetrenntem Extrakt aus Protoplasten durchaus Spots detektiert werden, die in dem Gel mit Extrakt aus intaktem Myzel fehlten. Diese waren jedoch nur sehr schwach angefärbt, so dass der Unterschied durch den Qualitätsverlust beim Scannen der Gele verloren ging.

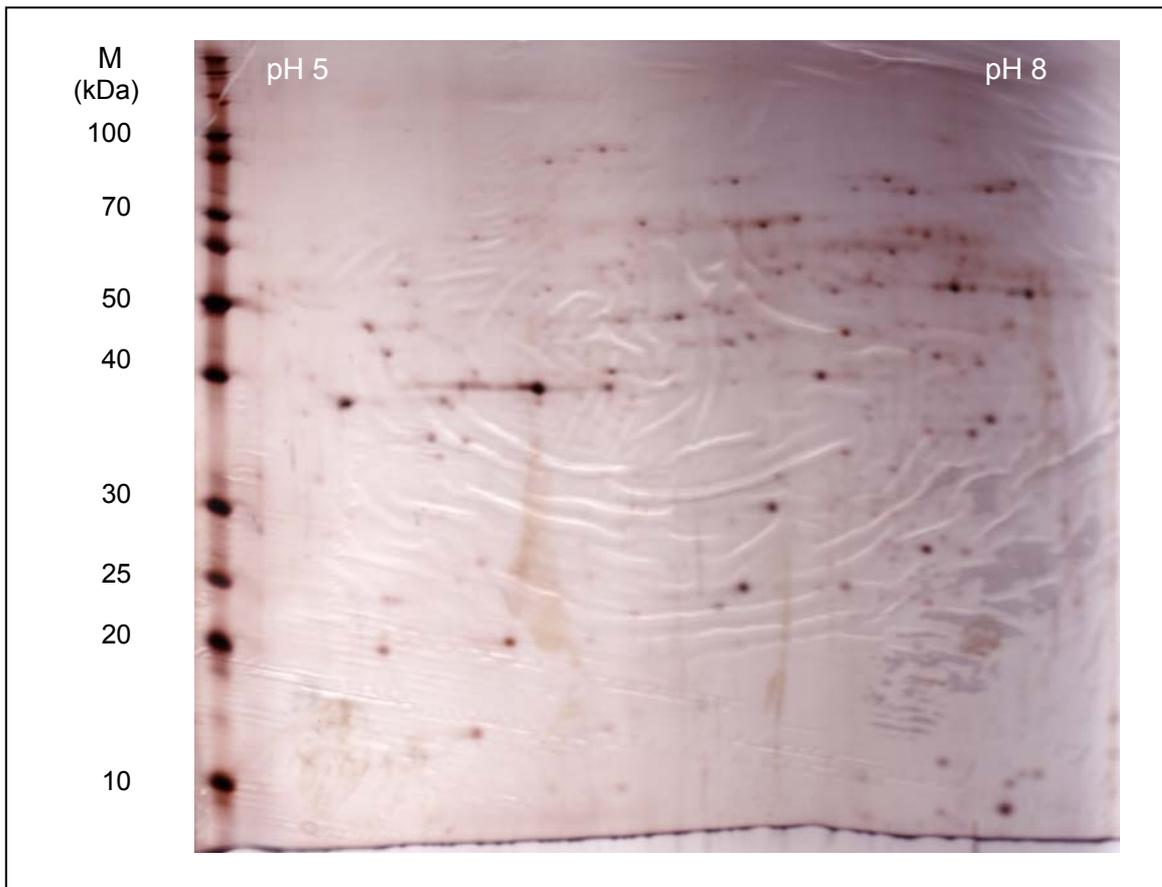


Abbildung 58: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes aus Protoplasten von *F. graminearum* CBS 110250 über einen Bereich von pH 5 bis pH 8; Auftrag: 200 µg Protein; Silberfärbung;

Die möglichen Auswirkungen mikrobieller Interaktionen auf das Proteom von *F. graminearum* wurden mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurde *F. graminearum* CBS 110250 zusammen mit *A. ochraceus* in einer Flüssigkultur angezogen. Eine Trennung der beiden Proteome wurde dadurch erreicht, dass die Kultur von *A. ochraceus* in einen Dialyseschlauch (Porendurchmesser 25 Å) verpackt und in das Medium gelegt wurde, welches dann mit *F. graminearum* beimpft wurde. So konnten kleine Moleküle ungehindert zwischen beiden Kulturen ausgetauscht werden, ohne dass ein direkter Kontakt der beiden Pilze nötig war.

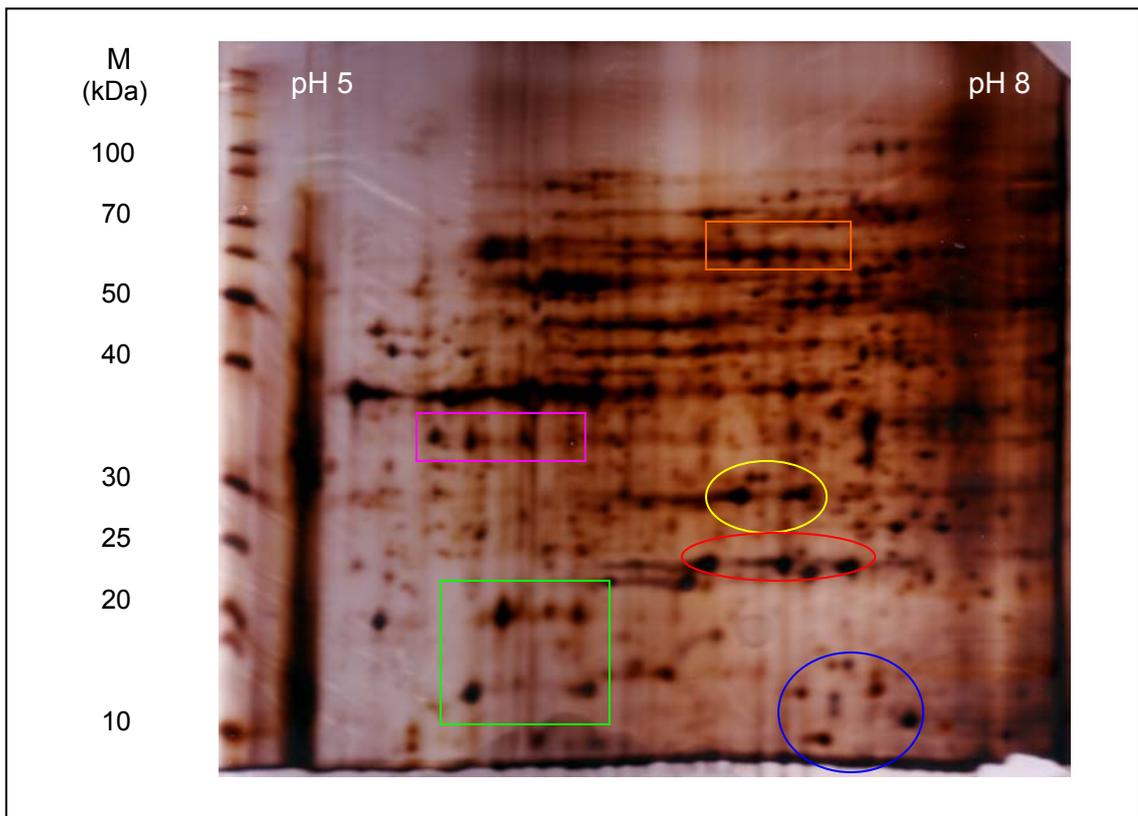


Abbildung 59: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes von *F. graminearum* CBS 110250 über einen Bereich von pH 5 bis pH 8; Auftrag: 400 µg Protein; Silberfärbung; farbige Markierungen dienen dem Vergleich mit Abbildung 60

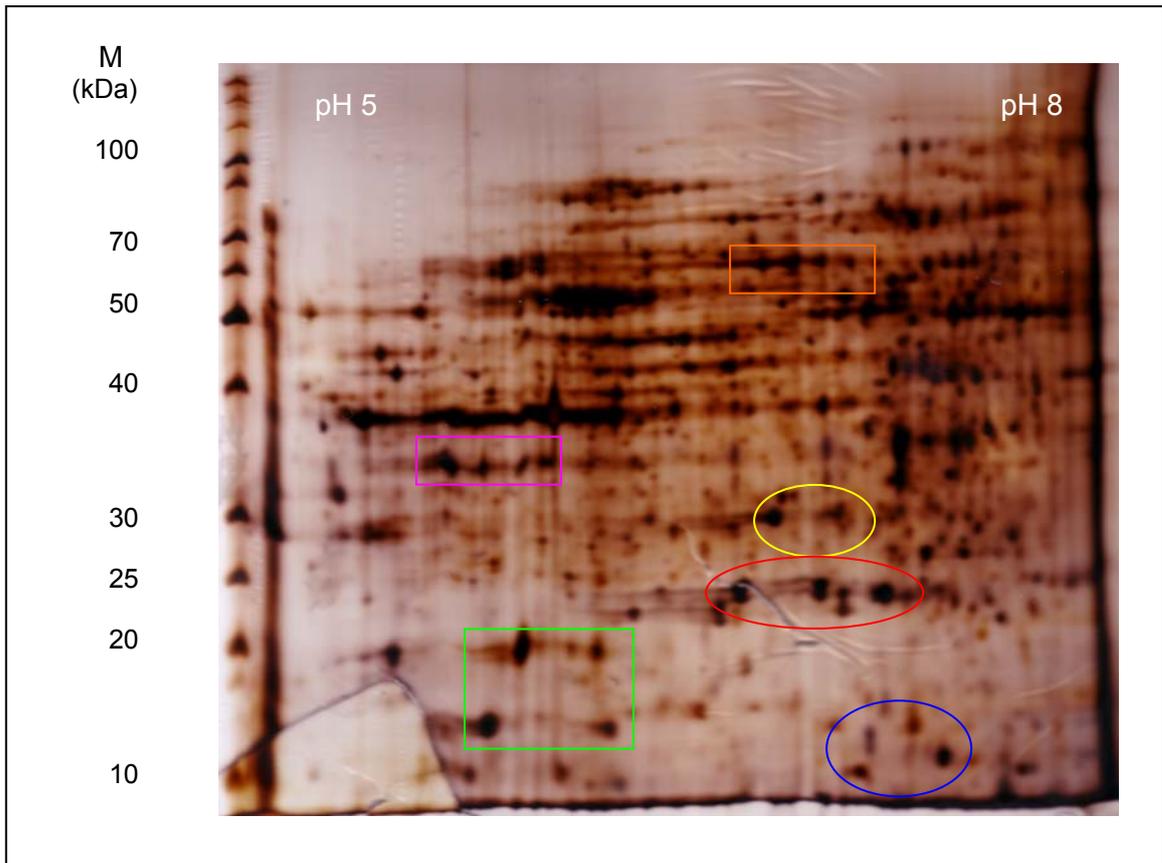


Abbildung 60: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes von *F. graminearum* CBS 110250 gewachsen in Cokultur mit *A. ochraceus* über einen Bereich von pH 5 bis pH 8; Auftrag: 400 µg Protein; Silberfärbung; farbige Markierungen dienen dem Vergleich mit Abbildung 59

Zwischen den beiden Gelen in Abbildung 59 und Abbildung 60 konnten viele übereinstimmende Proteine gefunden werden (s. farbige Markierungen). Allein durch Auswertung mit bloßem Auge waren keine zusätzlichen bzw. fehlenden Proteine in den Mustern zu erkennen, lediglich die Intensität einzelner Proteine variierte, was vielleicht bedingt ist durch die Interaktion mit *A. ochraceus* oder -mit größerer Wahrscheinlichkeit- durch die Schwankungen, die sich hinsichtlich der Probenaufarbeitung ergeben. In manchen Bereichen lagen die Proteinspots sehr eng beieinander. Um hier eventuelle Unterschiede festzustellen, müsste eine höhere Auflösung erreicht werden. Dazu könnten IPG-Streifen mit engeren, sich überschneidenden pH-Bereichen gewählt werden.

Die 2D-Analyse wurde ebenfalls eingesetzt, um den genetischen Unterschied zwischen *F. graminearum* Z3639 und *F. graminearum* GZT-40 zu untersuchen. Der Stamm Z3639 verfügt im Gegensatz zu dem Stamm GZT-40 noch über das Gen *tri 5*, ist also demnach in der Lage, das Enzym Trichodiensynthase zu synthetisieren. Die Trichodiensynthase aus *F. sporotrichoides* ist ein Homodimer, wobei für die Untereinheit eine Größe von 45 kDa ermittelt wurde (Hohn und Vanmiddlesworth, 1986). Eine Suche in der Swiss-Prot-

Datenbank ergab für die Trichodiensynthese von *Gibberella zeae*, der Hauptfruchtform von *F. graminearum*, eine Größe von 43,9 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 5,16. Aufgrund des pI wurden für die Analyse 17 cm lange IPG-Streifen mit einem Bereich von pH 4,7 bis pH 5,9 verwendet.

In den vorangegangenen *in vitro* Versuchen wurden die höchsten DON-Gehalte meist nach einem Tag Inkubation gemessen. Deshalb wurden Flüssigkulturen nur einen Tag inkubiert und dann bereits abgeerntet. Da im allgemeinen gilt, dass Proteome den gleichen Bedingungen entspringen müssen, um einen Vergleich zuzulassen, wurden sowohl für den Stamm Z3639 als auch für den Stamm GZT-40 solche Kulturen angelegt. Nach Abernten des Zellmaterials aus den einen Tag inkubierten Kulturen wurde der Überstand von der Kultur mit *F. graminearum* Z3639 mittels DON-ELISA hinsichtlich seines DON-Gehaltes analysiert. Aus der Doppelbestimmung ergab sich ein Mittelwert von 4 µg DON/kg, knapp über der Nachweisgrenze von 3,7 µg DON/kg des ELISA-Tests.

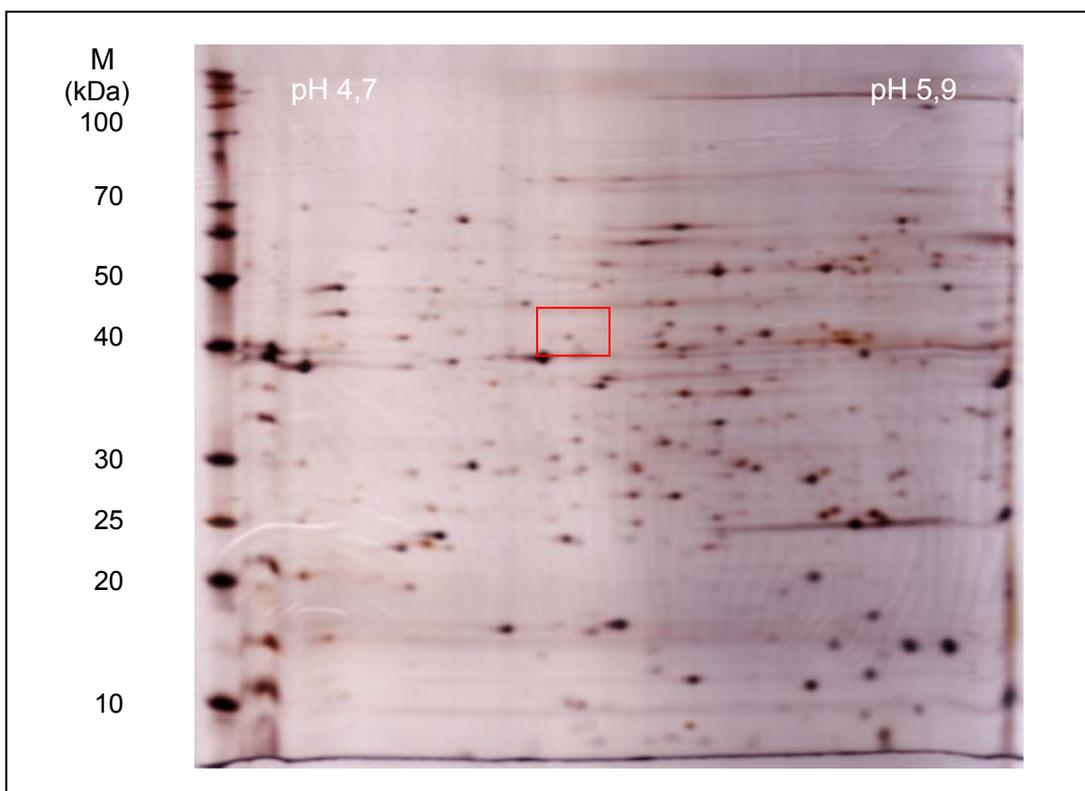


Abbildung 61: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes von *F. graminearum* Z3639 nach eintägiger Anzucht über einen Bereich von pH 4,7 bis pH 5,9; Auftrag: 250 µg Protein; Silberfärbung;

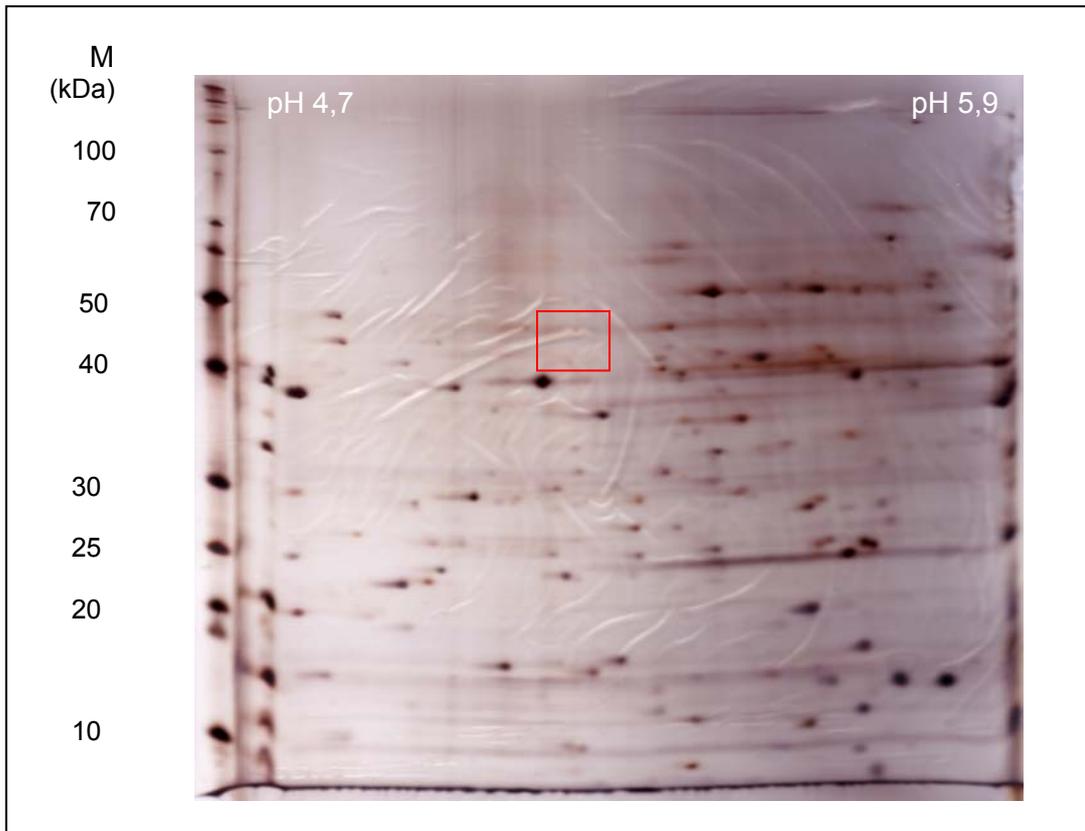


Abbildung 62: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes von *F. graminearum* GZT-40 nach eintägiger Anzucht über einen Bereich von pH 4,7 bis pH 5,9; Auftrag: 250 µg Protein; Silberfärbung;

In dem hinsichtlich Größe und pI der Trichodiensynthese in Frage kommenden Bereich (roter Kasten) ist zwar bei Abbildung 61 (*F. graminearum* Z3639) ein Proteinspot erkennbar, der in dem Proteinextrakt aus dem Stamm GZT-40 (Abbildung 62) fehlt. Jedoch traf dies auf weitere Proteinspots ebenfalls zu, so dass eine definitive Aussage, ob es sich bei dem betreffenden Proteinspot um die Trichodiensynthese handelt, nicht möglich war. In Anbetracht des niedrigen DON-Gehaltes ist fraglich, ob die Trichodiensynthese überhaupt exprimiert wurde.

3.8.3 Ausweitung der Methode auf weitere filamentöse Schimmelpilze

Abschließend zu dem Teil der Proteinanalyse wurde untersucht, inwieweit die für *F. graminearum* ausgearbeitete Präparation der Proteinextrakte auf andere Pilze übertragbar ist. Ausgewählt wurden *A. ochraceus* und *P. verrucosum*, da diese Pilze in Flüssigkultur sehr kompakte, stabile und recht große Myzelkugeln ausbilden, während *F. graminearum*

in kleineren und schwammigeren kugeligen Strukturen wächst, die sich leichter aufbrechen lassen. Außerdem waren die Pilze aus den bisherigen Experimenten bereits bekannt. Es wurden IPG-Streifen mit einem Bereich von pH 5 bis pH 8 verwendet und jeweils 200 µg Protein aufgetragen. Abbildung 63 und Abbildung 64 zeigen die entstandenen Gele.

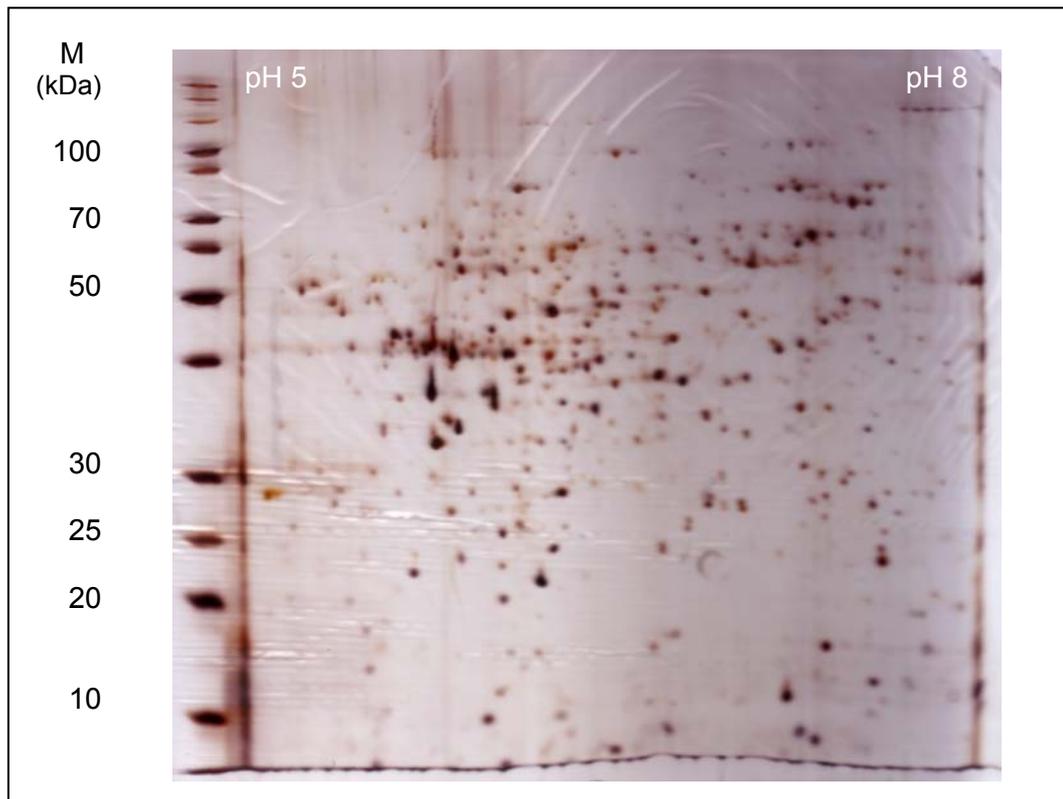


Abbildung 63: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes von *A. ochraceus* über einen Bereich von pH 5 bis pH 8; Auftrag: 200 µg Protein; Silberfärbung;

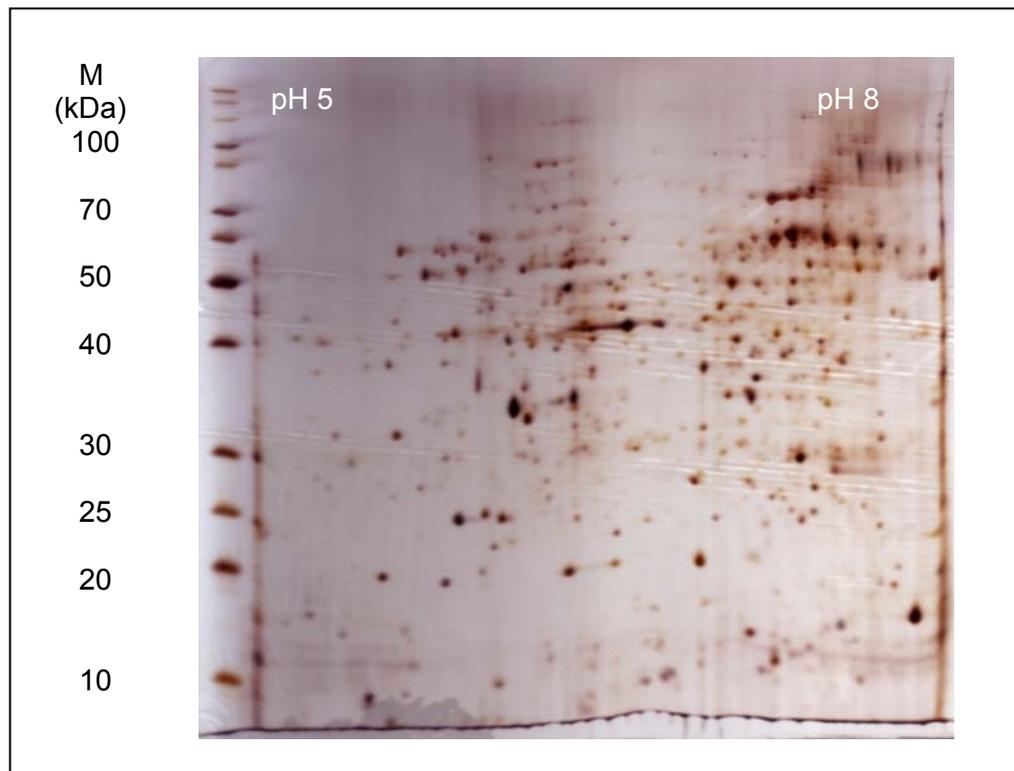


Abbildung 64: Zweidimensionale Auftrennung eines Proteinextraktes von *P. verrucosum* über einen Bereich von pH 5 bis pH 8; Auftrag: 200 µg Protein; Silberfärbung;

Wie Abbildung 63 und Abbildung 64 zeigen, eignete sich das Probenaufbereitungsverfahren auch für die filamentöse Pilze *A. ochraceus* und *P. verrucosum*, die eine sehr feste Zellwand aufweisen. Die Proteinmuster waren sehr klar und die Größenverteilung der Spots zwischen 10 und 100 kDa zeigte, dass viele verschiedene Proteine extrahiert wurden und auch Proteinabbau nicht auftrat, was die geringfügige Hintergrundfärbung erkennen ließ. Ein Vergleich der Gele von Abbildung 63 und Abbildung 64 sowie die von *F. graminearum* (z.B. Abbildung 57) veranschaulicht die Individualität der Proteome bei verschiedenen Pilzen, denn im Muster übereinstimmende Bereiche lassen sich nicht finden.

4 Diskussion

4.1 Speziesbestimmung eines mit *P. verrucosum* bezeichneten Schimmelpilzes

Für den in der Stammsammlung des Bereichs „Lebensmittelmikrobiologie und Hygiene“ des Instituts für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften der Universität Bonn als *P. verrucosum* bezeichneten Schimmelpilz erschien es notwendig, die korrekte Einordnung als solchen zu überprüfen, denn innerhalb der OTA bildenden *Penicillium* spp. wurden in den letzten Jahren Umgruppierungen vorgenommen.

Zunächst wurden *P. verrucosum* und *P. viridicatum* in nahe Verwandtschaft gestellt (Raper *et al.*, 1949), dann jedoch wurden alle OTA bildenden *P. viridicatum*-Stämme als *P. verrucosum* reklassifiziert und *P. verrucosum* galt als die einzige OTA produzierende Spezies innerhalb der *Penicillia* (Pitt, 1987). Eine Analyse von Sekundärmetaboliten aller OTA bildender *Penicillium* Stämme ergab jedoch zwei distinkte Muster (Larsen *et al.*, 2001). Das eine Muster entsprach dem von *P. nordicum*, so dass alle Stämme mit diesem Muster als *P. nordicum* eingestuft wurden. Die andere Gruppe wurde als *P. verrucosum* bezeichnet. *P. nordicum* gilt als ein starker OTA-Bildner und wird meist von proteinreichen Lebensmitteln wie Fleisch und Käse isoliert, während *P. verrucosum* von Pflanzen isoliert und lediglich als moderater OTA Produzent angesehen wird. Die meisten Stämme sind darüber hinaus in der Lage, Citrin und Verrucine zu bilden.

Diese chemotaxonomische Klassifizierung wurde mittels RAPD- und AFPL-Sequenzierung genotypisch bestätigt (Castella *et al.*, 2002). Eine ebenfalls durchgeführte ITS-Analyse zeigte eine starke Homologie der ribosomalen DNA, was die molekulargenetischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Eine weitere, häufig verwendete Methode zur taxonomischen Einordnung von Schimmelpilzen zieht morphologische und physiologische Charakteristika heran. So ist für *P. verrucosum* eine braune Kolonieunterseite bei Wachstum auf YES-Medium typisch, was für den untersuchten Pilz beobachtet werden konnte, so dass eine Klassifizierung von *P. verrucosum* als in hohem Maße richtig eingestuft werden kann.

4.2 Einfluss physiologischer Parameter auf die Bildung von DON und ZEA bei *F. graminearum*

In einem *in vitro* Versuch wurde die Abhängigkeit der Mykotoxinproduktion von den Parametern Temperatur (17 und 20 °C), pH-Wert (pH 3,5 bis pH 8,5) und Wasserverfügbarkeit (a_w 0,914 bis 0,786) bei *F. graminearum* untersucht (s. 3.2). Bezüglich der Inkubationstemperatur konnte festgestellt werden, dass bei der niedrigeren Temperatur weniger Trockenmasse ermittelt wurde als bei der höheren unter ansonsten gleichen Bedingungen. Nun differieren die hier gewählten Temperaturen nicht sehr, jedoch beschrieben auch Ramirez *et al.* (2006) im Bereich von 10 bis 25 °C für *F. graminearum* steigende Wachstumsraten. Hinsichtlich des pH-Wertes konnte bei allen vier untersuchten Stämmen beobachtet werden, dass in Medium mit einem pH-Wert von 3,5 das Wachstum reduziert war im Vergleich zu Kulturen mit einem pH-Wert von 4,5. Im Bereich von pH 4,5 bis 8,5 konnten nur noch geringfügige Zu- oder Abnahmen festgestellt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer Studie von Wheeler *et al.* (1991), die ebenfalls diese Effekte, allerdings auf festem Medium, beschrieben haben. Die Einflüsse von Temperatur und pH-Wert wurden in einem Experiment untersucht, dem sich eine DON-Analyse des Kulturüberstandes anschloss. Jedoch konnte bei keinem Stamm DON oberhalb der Detektionsgrenze des ELISA-Tests gemessen werden. In der Literatur finden sich unterschiedliche Hinweise zur Temperaturabhängigkeit der DON-Produktion. So konnten Ryu & Bullerman (1999) mit Experimenten auf Reis niedrige Inkubationstemperaturen von 15 °C als Auslöser für eine erhöhte DON- und ZEA-Produktion ausmachen, wohingegen Hope & Magan (2003) mit vergleichbaren Messmethoden bei *F. culmorum* niedrigere DON-Werte bei 15 °C als bei 25 °C fanden. Auch Ramirez *et al.* (2006) beschrieben als Optimum für die DON-Bildung bei *F. graminearum* einen Temperaturbereich von 25-30 °C. Dieses Ergebnis wird unterstützt von Lorens *et al.* (2004 a), die für *F. graminearum* die höchste DON-Produktion bei 28 °C ermittelten und nur stark reduzierte DON-Werte bei 15 und 20 °C messen konnten. In dieser Studie wurden spanische Isolate untersucht, die möglicherweise an ein wärmeres Klima angepasst sind. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten CBS-Stämme von *F. graminearum* stammen aus Südafrika, Iran und USA (Michigan) (O'Donnell *et al.*, 2000), also ebenfalls aus tropischen bzw. kontinentalem Warmklima, so dass vermutlich die im Versuch gewählten Temperaturen von 17 und 20 °C nicht den optimalen Temperaturen für die DON-Produktion entsprechen. Es darf aber nicht außer acht gelassen werden, dass Fusarien ihre physiologischen Eigenschaften bei Wachstum auf künstlichen Nährmedien verändern (Booth, 1971), so dass die ursprüngliche Herkunft von

untersuchten Stämmen, sowohl die von Lorens *et al.* als auch die in dieser Arbeit verwendeten, irrelevant sein könnte.

Hinsichtlich des a_w -Wertes als dritten Parameter konnte ein zunehmend eingeschränktes Wachstum mit absinkendem a_w -Wert beobachtet werden. Dies überrascht nicht, schließlich ist die Trocknung das älteste Verfahren, um Lebensmittel haltbar zu machen, was nichts anderes bedeutet, als mikrobielles Wachstum zu unterbinden. Auch aktuelle Studien wie von Torres *et al.* (2003) bestätigen die Abhängigkeit des Wachstums von der Wasseraktivität. Sie untersuchten die Keimfähigkeit von Sporen und die initiale Wachstumsrate verschiedener Schimmelpilze elektronenmikroskopisch bei verschiedenen a_w -Werten (0,98 bis 0,92) und verzeichneten für alle Pilze eine verzögerte Keimung und reduzierte Wachstumsgeschwindigkeiten der Hyphen mit sinkendem a_w -Wert. In diesem Kontext ist es überraschend, dass in der vorliegenden Arbeit bei a_w 0,902 höhere Trockenmassen als bei a_w 0,914 ermittelt wurden. Zwar wird dieses Phänomen auch von anderen Autoren beschrieben, so z.B. ermittelten Hope *et al.* (2005) für *F. culmorum* und *F. graminearum* größere Koloniedurchmesser bei a_w 0,98 als bei a_w 0,995, aber die a_w -Werte liegen deutlich höher als der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Bereich. Sautour *et al.* (2002) konnten für *Aspergillus flavus* und *Penicillium chrysogenum* gesteigerte Wachstumsraten bei a_w 0,95 im Vergleich zu a_w 0,99 nachweisen. Nach Hope *et al.* (2005) fand bei a_w -Werten unterhalb von 0,90 kein Wachstum mehr statt. In der vorliegenden Arbeit konnte Wachstum auch bei a_w 0,821 und in sehr geringem Maße auch noch bei a_w 0,786 beobachtet werden. Im Unterschied zu den hier in Fertigbouillon durchgeführten Experimente wurden die Fusarien bei Hope *et al.* (2005) auf Weizenkörnern kultiviert. Da auf natürlichen Substraten Nährstoffe nicht so leicht zugänglich sind wie in *in vitro* Medien, könnte dies die limitierende a_w -Wert-Grenze nach oben verschoben haben.

Die DON-Analyse der Kulturen mit verschiedenen a_w -Werten ergab für zwei Stämme zu allen untersuchten Zeitpunkten nur Werte unterhalb der Nachweisgrenze und für die anderen beiden Stämme uneinheitliche und schwankende Tendenzen (s. Abbildung 4), so dass eine generelle Aussage bezüglich der Abhängigkeit vom a_w -Wert nicht möglich ist. Eine sehr starke Absenkung des a_w -Wertes auf 0,786 schien die DON-Synthese zu unterbinden, während Wachstum noch nachweisbar war. Hope & Magan (2003) limitierten die DON-Produktion bei Wachstum von *F. culmorum* auf Weizenmehlmedium auf einen a_w -Bereich oberhalb von 0,981 bei 25 °C oder 0,955 bei 15 °C. Auf Weizenkörnern kultiviert wurde von Hope *et al.* (2005) bei *F. graminearum* noch bei a_w 0,95 DON nachgewiesen. Die maximale DON-Produktion wurde bei 15 °C bei einem leicht abgesenkten a_w -Wert von 0,975 ermittelt. Ramirez *et al.* (2006) kommen zu der Aussage, dass die DON-Produktion bei *F. graminearum* auf Weizen erst zwischen a_w -Werten von

0,93 und 0,90 eingestellt wird. Zudem stieg die DON-Produktion mit zunehmendem a_w -Wert, wonach Wasserstress abträglich für die Toxinbildung ist. Zu einem anderen Ergebnis kommen Lorens *et al* (2004 a). Bei ihren Untersuchungen hatte die Feuchte im Bereich von a_w 0,96 bis 0,98 weder hemmenden noch fördernden Einfluss auf die DON-Bildung bei *F. graminearum* und *F. culmorum*. Aus diesen uneinheitlichen Aussagen kann zusammenfassend gesagt werden, dass in der vorliegenden Arbeit bei noch niedrigeren a_w -Werte DON gebildet wurde. Im Unterschied zu den genannten Studien wurden die vorliegenden Experimente wie oben bereits erwähnt in einem reichhaltigen Nährmedium durchgeführt und nicht auf natürlichem Substrat, was Wachstum und DON-Bildung erleichtert haben könnte.

Die ZEA-Analyse der Kulturen mit verschiedenen a_w -Werten ergab über den untersuchten Zeitraum hinweg meistens eine Zunahme des ZEA-Gehaltes (Abbildung 5). Gleichzeitig konnte häufig beobachtet werden, dass bei a_w -Werten von 0,902 oder 0,864 mehr ZEA gebildet wurde als bei a_w 0,914. Bei weiter reduzierten a_w -Werten nahm die ZEA-Produktion ab. Für den Stamm CBS 110264 konnte unabhängig vom a_w -Wert kein ZEA nachgewiesen werden, was im Einklang steht mit den Angaben von O'Donnell *et al.* (2000), wonach dieser Stamm im Gegensatz zu den beiden anderen CBS-Stämmen kein ZEA bildet. Nach Lorens *et al.* (2004 b) liegt das Temperaturoptimum für die ZEA-Bildung bei *F. graminearum* bei 20 °C, was den vorliegenden Versuchsbedingungen entspricht. In einem Bereich von a_w 0,96 bis 0,98 konnte von dieser Arbeitsgruppe jedoch kein Effekt auf die ZEA-Produktion beobachtet werden. Im Rahmen von Untersuchungen anderer Mykotoxine bezüglich ihrer Abhängigkeit zur Wasseraktivität fanden Marin *et al.* (1999) bei Wachstum von *F. moniliforme* auf Maiskörnern mit steigendem a_w -Wert auch steigende Fumonisin-Konzentrationen. Auch Schwabe und Krämer (1995) stellten bei ihren Untersuchungen an *F. sporotrichioides* fest, dass ein abgesenkter a_w -Wert sich in reduzierten Mengen an T2-Toxin im Überstand von Flüssigkulturen niederschlägt. Magan *et al.* (1984) untersuchten die Mykotoxinbildung bei *A. alternata* und fanden bei einem a_w -Wert von 0,95 weniger als die Hälfte an Alternariol und Derivaten als bei einem a_w -Wert von 0,98. Mit weiterer Absenkung des a_w -Wertes reduzierten sich die Toxingehalte nochmals.

Viele der angesprochenen Studien können zu der Aussage zusammengefasst werden, dass bei Absenkung des a_w -Wertes die Toxinbildung verringert wird und schließlich eingestellt wird, allerdings nicht gleichzeitig, sondern eher als das Wachstum. Außerdem wurde häufig die Beobachtung gemacht, dass optimale Wachstumsbedingungen nicht übereinstimmen mit den Bedingungen maximaler Toxinbildung.

4.3 *In vitro* Interaktionen von Schimmelpilzen

Mit Bezug auf die Ergebnisse aus den *in vitro* Versuchen (3.4) werden Wachstum und Toxinbildung im folgenden zunächst getrennt betrachtet.

Ein Vergleich des Wachstums der Einzelkulturen mit dem der Cokulturen zeigt, dass sich die mikrobielle Konkurrenz -mit einer Ausnahme- negativ auf das Wachstum auswirkte. Dies gilt nicht nur für die untersuchten *Fusarium*-Stämme, sondern auch für *P. verrucosum* und *A. ochraceus*. Diese Beobachtung bestätigen auch andere Studien. So konnten Simpson *et al.* (2004) in der Interaktion von *Microdochium nivale* und *F. culmorum* für beide Pilze vom erste Tag an ein reduziertes Wachstum beobachten, wobei die Experimente in vergleichbarer Weise durchgeführt wurden wie in der vorliegenden Arbeit. Für *F. moniliforme* und *F. proliferatum* kommen Marin *et al.* (1998) zu der Aussage, dass diese Pilze *in vitro* über einen großen Temperatur- und a_w -Wert-Bereich sehr kompetitiv gegenüber verschiedenen *Penicillium* spp. und *Aspergillus flavus* sind. Hingegen hängt die Interaktion mit *A. ochraceus* von dem a_w -Wert ab. Bei frei verfügbarem Wasser besteht ein wechselseitiger Antagonismus, der bei Absenkung des a_w -Wertes in eine Dominanz von *A. ochraceus* übergeht. Wachsen die beiden *Fusarium* spp. zusammen mit *F. graminearum*, so reduzieren sich ihre Wachstumsraten, während die von *F. graminearum* nicht beeinträchtigt wird.

Der Gedanke liegt nahe, dass generell mikrobielle Interaktion mit Konkurrenz um Nährstoffe einhergeht. Marin *et al.* (1998) testeten aus diesem Grund auch die Verwertung verschiedener C-Quellen durch die in ihre Interaktionsexperimente einbezogene Pilze und ermittelten daraus sogenannte Nischenüberlappungsindices. Dabei zeigte sich, dass diese Indices für die der *Fusarium*-Arten nicht sehr voneinander abwichen. Weiterhin konnten aus den ermittelten Indices der anderen Pilze nicht immer die Dominanzverhältnisse abgeleitet werden. Daraus zog die Gruppe den Schluss, dass es keine direkte Korrelation zwischen dem Nischenüberlappungsindex und der Dominanz eines Pilzes gibt. Auf der anderen Seite stellten Lee & Magan (1999 b) fest, dass sich die Anzahl von verwendbaren C-Quellen mit absinkendem a_w -Wert verringert. Die Fähigkeit, ungewöhnliche C-Quellen oder C-Quellen unter nicht-optimalen Bedingungen zu nutzen, stellt ohne Frage einen Konkurrenzvorteil dar und könnte einer Art unter solchen Bedingungen höhere Dominanz gegenüber einer anderen Art verleihen. Die oben dargestellte Abhängigkeit der Dominanzverhältnisse zwischen *A. ochraceus* und *F. moniliforme* bzw. *F. proliferatum* von dem jeweiligen a_w -Wert könnte von der Nährstoffverwertung abhängen. Wie Marin *et al.* herausfanden, ist *A. ochraceus* auch noch bei niedrigen a_w -Wert (0,92) in der Lage einige C-Quellen zu nutzen, während dies

für die *Fusarium*-Arten nicht der Fall ist. Es scheint demnach doch einen Zusammenhang zwischen Stoffwechsellistung und Dominanz zu geben. Ob dies jedoch in den vorliegenden Interaktionsversuchen zum Tragen kommt, ist fraglich, da eine komplexe Mischung aus leicht zugänglichen C-Quellen vorliegt. Ueno *et al.* (1975) untersuchten die Trichothecenproduktion von *Fusarium* spp. in Schüttelkulturen mit verschiedenen Medien und stellten fest, dass drei Tage nach der Inokulation eines glucosehaltigen Mediums (10 g/l) die Glucose verbraucht war. Es ist anzunehmen, dass auch die Konzentration der – wenn auch komplexeren- C-Quellen wie in dem für die vorliegenden Experimente verwendeten Medium enthalten nach zweiwöchiger Inkubation stark reduziert wurde und Konkurrenz um Nährstoffe durch Stoffwechsellistungen beeinflusst wird.

In allen der vorliegenden Interaktionsmodellen konnte für jeweils beide Pilze ein reduziertes Wachstum festgestellt werden. Eine Ausnahme bilden die Cokulturen von *F. graminearum* Z3639 mit den Stämmen von *A. alternata*. Hier konnte für *F. graminearum* ein besseres Wachstum im Vergleich zur Einzelkultur nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt Experimente mit anderen Stämmen von *F. graminearum* (CBS 110250 und CBS 110263) im Rahmen der Diplomarbeit von Saß (2005). Auch diese Stämme wuchsen in Cokultur mit *A. alternata* PK und CBS besser als alleine, während das Wachstum von *A. alternata* in der Interaktion reduziert war im Vergleich zu der Einzelkultur. Diese Beobachtung steht im Kontrast zu einigen anderen Aspekten. So untersuchten Lee & Magan (1999 a) *in vitro* die Interaktion von *A. alternata* und *A. ochraceus* in Abhängigkeit vom a_w -Wert. Bei frei verfügbarem Wasser war *A. alternata* dem sonst sehr dominanten Lagerpilz überlegen. Dieses Verhältnis kehrte sich um bei Verringerung des a_w -Wertes auf 0,95. Aus einer weiteren Arbeit dieser Autoren (Lee & Magan, 1999 b) geht hervor, dass die optimale Wachstumsrate von *A. alternata* bei einem a_w -Wert von 0,995 liegt, während sich für *A. ochraceus* ein a_w -Wert von 0,95 positiv auf die Wachstumsrate auswirkt. Diese Beobachtung kann wiederum anhand der Stoffwechsellistungen der beiden Pilze erklärt werden. Bei hohem a_w -Wert kann der Feldpilz mehr oder mindestens gleich viele C-Quellen verwerten wie der Lagerpilz. Sinkt der a_w -Wert, ist die Nutzung von C-Quellen für *A. alternata* wesentlich eingeschränkter als die von *A. ochraceus* (Lee & Magan, 1999 b). In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen *A. alternata* und *F. graminearum* untersucht. Bezüglich der Effekte unterschiedlicher Medien und Inkubationstemperaturen ist die Publikation von Osman *et al.* (1992) interessant, die sich mit *A. alternata* und *F. oxysporum* beschäftigt. Auf allen getesteten Medien produzierte *A. alternata* mehr Biomasse -auf PDA sogar etwa das zweifache- als die Fusarien-Art. Auch hinsichtlich der Inkubationstemperatur -außer bei 35 °C- lagen die Wachstumsraten über denen von *F. oxysporum*. Diese Informationen vermitteln den Eindruck, dass eigentlich *A. alternata* der im Wachstum überlegenere

Feldpilz ist. Nun muss bedacht werden, dass die Interaktionskulturen mit Sporen inokuliert wurden und Keimung und Hyphenwachstum zwei verschiedene Prozesse sind, die unterschiedlich durch Substanzen beeinflusst werden können (McAllister *et al.*, 1996). Es stellt sich die Frage, welcher Pilz der *in vitro*-Interaktionsmodelle bei der Auskeimung im Vorteil ist. In einer Studie von Torres *et al.* (2003) wurde die Auskeimung und das initiale Wachstum verschiedener Pilze elektronenmikroskopisch ausgewertet. Es zeigte sich, dass diese Prozesse a_w -Wert- und temperaturabhängig sind. Als Bezug zu den vorliegenden *in vitro*-Experimente ist ein hoher a_w -Wert und die Temperatur von 20 °C maßgebend. Ausgehend von Sporen wurde eine Hyphenlänge von 100 µm bei *A. alternata* bereits nach 10 h, bei *Fusarium verticillioides* erst nach über 25 h und für *A. ochraceus* sogar erst nach 40 h erreicht. Ein Blick auf die DNA-Messungen einen Tag nach Inokulation der *F. graminearum* / *A. ochraceus*-Cokulturen (vgl. z.B. Abbildung 7 mit Abbildung 18) zeigt den verzögerten Start von *A. ochraceus*. Die quantifizierte DNA-Menge lag bei allen Modellen unter der des jeweiligen Stammes von *F. graminearum*. Für die *F. graminearum* / *A. alternata*-Modelle muss nach den bisherigen Darlegungen davon ausgegangen werden, dass *A. alternata* nicht von *F. graminearum* überwachsen werden sollte. Allerdings konnten Kosiak *et al.* (2004) anhand verschiedener Getreide unterschiedlicher Qualität zeigen, dass *F. graminearum* andere *Fusarium* und *Alternaria* spp. verdrängt. Eine negative Interaktion wiesen auch Andersen *et al.* (1996) auf Haferkörnern nach. Diese Arbeiten bestätigen die Ergebnisse aus den hier vorgelegten *in vitro*-Experimenten. Die Verhältnisse in den Interaktionsmodelle *F. graminearum* / *A. alternata* können jedoch weder mit den Wachstumsraten noch anhand der Substratverwertung oder Keimungsgeschwindigkeit der Sporen begründet werden. Eine Hemmung aufgrund gebildeter Mykotoxine –zumindest der hier untersuchten- kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da die Toxine DON und ZEA in den Cokulturen mit *A. alternata* nicht anstiegen.

Im folgenden werden die Mykotoxinanalysen der *in vitro*-Interaktionsmodelle diskutiert. Hinsichtlich DON und ZEA konnten in den Cokulturen mit *A. ochraceus* und *P. verrucosum* gegenüber der Einzelkultur (außer ZEA bei GZT-40) erhöhte Werte gemessen werden. Für DON wurde dies einen Tag nach Inokulation gemessen, steigende ZEA-Gehalte wurden gegen Ende des untersuchten Zeitraumes ermittelt. In den Cokulturen mit *A. alternata* stieg die Toxinproduktion nicht.

Auffällig waren die stets an Tag 1 im Vergleich zu den anderen Erntetagen höheren DON-Werte, die mit weiterer Inkubation meist auf sehr niedrige Werte absanken. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich um ein sehr stabiles Molekül handelt, welches nicht einfach zerfällt oder weiterreagiert, kommen zwei Aspekte in Frage, die für diese Reduktion verantwortlich sein könnten. Zum einen wäre eine Bindung des Trichothecens an den

Kunststoff der verwendeten Kulturschalen denkbar. Damit wäre das Toxin der Messanalyse entzogen. Um dies auszuschließen, wurden Versuche in Glaskolben angesetzt. Auch hier wurden nach Tag 1 absinkende DON-Gehalte ermittelt. Zum anderen könnte von einem Abbau des Mykotoxins ausgegangen werden. Da sinkende DON-Gehalte auch in den Einzelkulturen festgestellt wurden, wäre *F. graminearum* der abbauende Pilz, was nicht ausschließt, dass auch die anderen Pilze in den Cokulturen sich daran beteiligen könnten. Versuche auf DONhaltigem Medium würden weiter Aufschluss geben, zum jetzigen Zeitpunkt muss diese Frage jedoch offen bleiben. Zumindest kann davon ausgegangen werden, dass DON während des ersten Tages gebildet wurde und nicht mit den Sporen, die zur Inokulation der Versuche eingesetzt wurden, eingetragen wurde, denn nach Beyer *et al.* (2005) enthalten Konidien kaum DON. Wie aus den *in vitro*-Experimenten hervorgeht, scheinen die Interaktionen mit den Lagerpilzen die DON- und ZEA-Produktion zu beeinflussen. Ein Vergleich mit anderen Arbeiten gestaltet sich schwierig, da -wie bereits dargelegt- die Mykotoxinbildung vom Substrat und Parametern wie Temperatur, a_w -Wert und auch Inkubationsdauer abhängt. Cooney *et al.* (2001) untersuchten *in vitro* die Interaktionen verschiedener nicht DON bildender *Fusarium* spp. mit *F. graminearum* und stellten fest, dass die DON-Produktion generell reduziert wurde, aber das Ausmaß stark differierte. Die Interaktion von *F. graminearum* mit *Aspergillus flavus* wirkte sich nicht auf die DON-Bildung aus (Etcheverry *et al.*, 1998). Auch die ZEA-Produktion wurde in diesem Modell untersucht. Jedoch ergaben sich hier ähnlich wie bei DON keine signifikanten Unterschiede zur Einzelkultur. Dagegen berichteten Simpson *et al.* (2004) von *in vitro*-Experimenten mit *M. nivale* und *F. culmorum*, dass in Cokulturen der DON-Gehalt an Tag 1 etwa gleich hoch war wie in der Einzelkultur, bezogen auf die reduzierte Pilzmenge jedoch eine höhere Produktivität zu verzeichnen war. Diese glich sich aber nach vier Tagen Inkubation in Co- und Einzelkultur an. Im Rahmen der vorliegenden *in vitro*-Experimente wurde die Produktivität bisher nicht betrachtet. Da generell in den Cokulturen (außer denen mit *A. alternata*) die Pilzmenge reduziert und gleichzeitig die Toxinwerte erhöht wurde, steigern sich die Produktivitäten und der Eindruck, der aus den meist erhöhten Toxinwerten bereits gewonnen wurde, wird verstärkt.

Ähnlich wie bei DON war auch der OTA-Gehalt in den meisten Kulturen am ersten Tag erhöht und sank mit weiterer Inkubation ab. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Einzelkulturen die maximalen OTA-Werte aufwiesen, die Interaktionen somit einen hemmenden Einfluss auf die OTA-Bildung hatten. Dies gilt sowohl für *P. verrucosum* als auch für *A. ochraceus*. Ähnliche Ergebnisse aus andere Arbeiten bestätigen dies. *P. verrucosum* wurde von Ramakrishna *et al.* (1996 b) in Interaktion mit *F. sporotrichioides* untersucht und produzierte ebenfalls reduzierte Mengen an OTA. Etcheverry *et al.* (1998)

analysierten die Interaktion von *F. graminearum* und *A. parasiticus* auch hinsichtlich des Gehaltes von Aflatoxin B1 und stellten fest, dass die Abnahme in der Cokultur von den Inokulumverhältnissen abhängt. Lee & Magan (2000) untersuchten *A. ochraceus* in Interaktion mit verschiedenen Pilzen und beobachteten gleichzeitig mit einer Hemmung von *A. ochraceus* auch eine reduzierte OTA-Bildung. Allerdings führten sie ihre Experimente auf Maiskörnern durch und ein Vergleich mit zuvor *in vitro* auf Maismehlagar durchgeführte Interaktionsversuche mit den gleichen Pilzen (Lee & Magan, 1999 a) zeigte, dass die Einflüsse mikrobieller Interaktionen auf die OTA-Bildung *in vitro* und *in vivo* teilweise voneinander abwichen. Dies unterstreicht die Schwierigkeit, von solchen Modellsystemen Rückschlüsse auf die natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften auf dem Feld oder in Getreidelagern und deren Einflüsse auf die wechselseitige Toxinbildung zu ziehen.

4.4 *In vivo* Interaktionen von Schimmelpilzen auf Weizenkörnern mit und ohne natürliche mikrobielle Flora

Zunächst soll auf die Veränderungen der Schimmelpilzflora während suboptimaler Lagerung der Weizenkörner eingegangen werden. Interagierten lediglich zwei Pilze auf den Körnern (ohne natürliche mikrobielle Flora; s. 3.5), lassen sich die Tendenzen für die vier untersuchten *F. graminearum* –Stämme zusammenfassen. Mit Befallsraten von 90-100 % dominierten sie bereits nach zwei Wochen die Interaktionsmodelle mit *A. alternata*. Dagegen wurden sie im Verlauf der Lagerung durch *A. ochraceus* unterdrückt, jedoch erstreckte sich dieser Prozess über den gesamten Lagerungszeitraum. In den Interaktionen mit *P. verrucosum* kam es zu geringfügigen Schwankungen der Infektionsraten mit meist abnehmender Tendenz. Jedoch kann keineswegs von einer Verdrängung von *F. graminearum* gesprochen werden. Für die jeweiligen Interaktionspartner konnten gegenläufige Entwicklungen beobachtet werden. *A. alternata* wurde sehr schnell verdrängt und konnte kaum mehr nachgewiesen werden. Hingegen dominierte *A. ochraceus* die entsprechenden Modelle im Verlauf der Lagerung sehr stark. Bei *P. verrucosum* zeigten sich –mit Ausnahme eines Modelles- wenige Veränderungen, gegen Ende der Lagerung kam es teilweise zu einem leichten Rückgang der Infektionsrate. Diese sehr klaren Verläufe konnten in der Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora und Inokulation mit jeweils einem Pilz größtenteils wiedergefunden werden (s.3.6). Übereinstimmend wurde auch in diesen Modellen die Gattung *Alternaria* sehr schnell aus dem Pilzspektrum verdrängt. Eine Ausnahme bildet die nicht zusätzlich angefeuchtete Kontrolle. Hier entwickelten sich die Alternarien zu der dominierenden

Pilzgattung. Diese Beobachtungen werden durch Arbeiten von Birzele (2001) bestätigt. Die auf erntefrischen Weizen noch häufig identifizierte Gattung *Alternaria* verschwand auch hier bei Lagerung unter suboptimalen Bedingungen. Versuche von Bünker (2003) und Prange (2004) zeigten ebenfalls, dass *Alternaria* Arten bei suboptimaler Lagerung von Weizen aus dem Pilzspektrum verdrängt wurden, aber als dominierende Gattung auftraten, wenn der Weizen nicht zusätzlich befeuchtet wurde. Es liegt demnach die Vermutung nahe, dass die Bedingungen auf dem Feld für die Gattung *Alternaria* förderlich sind -nicht ohne Grund zählt diese Gattung zu den Feldpilzen- während bei Lagerung von Getreide die Feuchte für Dominanz oder Unterlegenheit dieser Gattung ausschlaggebend ist.

Bezüglich der Entwicklung der Lagerpilze können die Versuche mit natürlichem Weizen wie folgt zusammengefasst werden: Der Befall durch *Penicillium* und *Aspergillus* spp. stieg in den ersten vier bis acht Wochen an und ging danach wieder mehr oder weniger stark zurück. Der Rückgang von *P. verrucosum* gegen Ende der Lagerung fand sich zum Teil ebenfalls bei den Versuchen mit Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora. In den Modellen, die mit *P. verrucosum* oder *A. ochraceus* inokuliert wurden, erwies sich wie zu erwarten war, die jeweilige Art als sehr stark vertreten. Die Dominanz war im Fall von *A. ochraceus* ausgesprochen ausgeprägt. Dies bestätigt Untersuchungen von Lee & Magan (1999), die *A. ochraceus* einen hohen Dominanzindex zuschreiben und als sehr kompetitiv einstufen. Arbeiten von Marin *et al.* (1998b) zeigten eine gute Konkurrenzfähigkeit des Pilzes bei reduzierten a_w -Werten ähnlich denen der vorliegenden Lagerungsversuchen.

Ein Aspekt, der möglicherweise die Korrelation der Ergebnisse aus den beiden Lagerungsversuchen erschwert, betrifft das Inokulum. Für den Lagerungsversuch mit Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora wurden die interagierenden Pilze mit gleichen Sporenmengen eingetragen. Dies entspricht nicht natürlichen Gegebenheiten. Es ist anzunehmen, dass die Feldpilze, die sich bereits vor der Ernte auf den Pflanzen vermehren können (Krämer, 2002), eine größere Menge an Inokulum in zu lagernden Weizen einbringen als die Lagerpilze, die erst nach der Ernte vermehrt auftreten. Dies wird auch sichtbar an den mykologischen Profilen der Ausgangsgetreide der beiden Lagerversuche, welche dominiert werden von Feldpilzen. Die Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora wird den natürlicher Inokulumverhältnissen gerechter, dies bezieht sich insbesondere auf die Modelle ohne zusätzliche Inokulation durch einen anderen Pilz. Die Zugabe eines 25%igen Anteils von mit jeweils einem Pilz infizierten Körnern hat je nach Pilz keine (z.B. bei *A. alternata*) bis sehr massive (z.B. *A. ochraceus*) Auswirkungen.

Im folgenden soll auf die Lagerungsbedingungen eingegangen werden. Es wurde eine Feuchte von 20 % und eine Lagertemperatur von 20 °C gewählt. Dies entspricht in keiner Weise der guten landwirtschaftlichen Praxis. Getreide sollte bei 10-15 °C mit einem Wassergehalt von max. 14 % gelagert werden (Krämer, 2002). Allerdings kann es in niederschlagsreichen Sommern oder in feuchteren Klimaten wie in Skandinavien (Langseth *et al.*, 1993) dazu kommen, dass Getreide mit einer relativ hohen Feuchte geerntet und anschließend getrocknet werden muss. Je nach Kapazität kann es zu Engpässen in den Trocknungsanlagen kommen oder die Trocknung kann sich über einige Wochen erstrecken. Ein weiteres Beispiel suboptimaler Lagerungsbedingungen ist die Maisproduktion in Spanien (Lorens *et al.*, 2004 b), die größtenteils noch in traditionellen Familienbetrieben erfolgt. Die frisch geernteten Kolben werden monatelang in sogenannten Horreos eingelagert. Dies sind aus Granit erbaute belüftete Lagerhäuser. Die Maisernte wird bis zur Verwendung als Tierfutter nicht weiter behandelt, was bei der hohen Luftfeuchtigkeit und einer Durchschnittstemperatur von 20 °C hinsichtlich der Kontamination durch Pilze und Mykotoxine ein Risiko darstellt. Selbst bei sorgfältiger Einlagerung von trockenem Getreide kann die Ausbildung von sogenannten Feuchtenestern aufgrund der Atmungsaktivität der Körner nicht verhindert werden (Skriegan, 1995). Die geschilderten Situationen kommen Lagerungsbedingungen wie sie in den vorliegenden Versuchen gewählt wurden, nahe.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Mykotoxinanalyse erörtert. Bezüglich DON wurden in beiden Lagerungsversuchen Maximalwerte von 600 bis 700 µg/kg TM erreicht. Dies ist verglichen mit anderen auf ähnliche Weise gelagerten Weizenproben verhältnismäßig wenig. So konnte Birzele (2001) DON-Gehalte von über 3000 µg/kg TM bereits nach vierwöchiger suboptimaler Lagerung nachweisen. Dies mag im mykologischen Spektrum und dem Ausmaß des Befalls begründet sein. Die relativ niedrigen DON-Gehalte der vorliegenden Weizenproben stimmen überein mit den bereits in den *in vitro* Versuchen ermittelten geringen DON-Werten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die eingesetzten Stämme von *F. graminearum* nicht zu den ausgeprägten DON-Bildner zu zählen sind. Wird die DON-Produktivität der vorliegenden Lagerversuche betrachtet, so ergibt sich aus dem Lagerversuch mit Weizen ohne natürliche mikrobielle Flora ein klares Bild. Die Interaktionen von *F. graminearum* mit *A. ochraceus* führten nach zwölf Wochen Lagerung zu einer stark erhöhten Produktivität, während Interaktionen mit *A. alternata* oder *P. verrucosum* keinerlei Auswirkungen auf die Produktivität zeigten. Diese Beobachtungen finden sich bei den Modellen mit Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora teilweise wieder. So zeigte das Modell mit zugemischtem *A. ochraceus* eine erhöhte Produktivität. Dieser Pilz entwickelte sich in diesem Modell als

sehr dominant und unterdrückte nahezu alle anderen Pilze. Der DON-Gehalt in Relation zur Anzahl an Trichothecenbildnern schlägt sich deshalb in einer gesteigerten Produktivität nieder. In dem Modell mit *P. verrucosum* konnte eine signifikant erhöhte DON-Produktivität verzeichnet werden. Die Körner waren dabei nur zu einem recht geringen Anteil mit *Aspergillus* spp. infiziert. In anderen Modellen lag der Anteil an *Aspergillus* spp. im mykologischen Spektrum deutlich höher. Dies blieb aber ohne Auswirkung auf die DON-Produktivität, so dass vermutet werden kann, dass der Einfluss von Interaktionen auf die DON-Bildung von den aufeinandertreffenden Pilzspezies abhängt. Dies wird durch andere Interaktionsmodelle bestätigt. So konnten Etcheverry *et al.* (1998) keinen Effekt der Interaktion von *F. graminearum* mit *Aspergillus parasiticus* auf die DON-Bildung feststellen. Die Versuche wurden unter vergleichbaren Bedingungen auf Mais durchgeführt. Andererseits berichteten Ramakrishna *et al.* (1996 a) von einer deutlich erhöhten T2-Toxinproduktion durch *F. sporotrichioides* in Coexistenz mit *A. flavus* oder *P. verrucosum*. Insgesamt betrachtet bedarf die Frage nach dem Einfluss von pilzlichen Interaktionen auf die DON-Produktion jedoch weiteren Untersuchungen.

Wird die Entwicklung der DON-Gehalte über den Lagerzeitraum betrachtet, wird aus dem Lagerversuch mit natürlicher mikrobieller Flora deutlich, dass in den ersten Wochen die Anzahl der Trichothecenbildner zurückgeht, aber ab Woche 8 in nahezu allen Modellen wieder deutlich ansteigt. Damit einher geht auch ein Zunahme des DON-Gehaltes in den jeweiligen Proben. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass sich die Zunahmen der Trichothecenbildner in einem Rahmen von 20-30 % bewegen, die Erhöhungen der DON-Gehalte jedoch nicht ähnlich einheitlich verlaufen. Hier kommt es zu Veränderungen um Faktor <1 bis 15. Dies bestätigt bisherige Beobachtungen, dass pilzliche Biomasse und Mykotoxingehalt nicht korrelieren müssen (Birzele, 2001; Prange, 2004).

Betrachtet man die ZEA-Gehalte und Produktivitäten, so ergibt sich aus dem Lager-versuch mit Weizen ohne natürliche Flora bei der Interaktion von *F. graminearum* mit *A. ochraceus* wiederum eine eindeutig erhöhte Produktivität für alle vier getesteten Stämme. In den Modellen mit *P. verrucosum* trat mit zunehmender ZEA-Produktivität eine verminderte Infektionsrate von *P. verrucosum* auf. Dies lässt vermuten, dass ZEA einen hemmenden Einfluss auf diese Pilzspezies hat. Die Lagerung von Weizen mit natürlicher mikrobieller Flora zeigte in den Modellen mit zugemischtem *P. verrucosum* sowie mit *F. graminearum* Z3639 und GZT-40 erhöhte ZEA-Produktivitäten. Verglichen mit den anderen ZEA-unauffälligen Modellen kann jedoch keine Hemmung der Lagerpilze erkannt werden. Dies begründet sich vermutlich in dem komplexer gestalteten *in vivo* -System mit mehreren beteiligten Spezies, die wahrscheinlich in unterschiedlicher Weise auf ZEA reagieren, so dass Effekte auf einige wenige Pilze überlagert werden.

Bezüglich der Bildung von OTA während der suboptimalen Lagerung können aus beiden Lagerversuchen keine einheitlichen Aussagen gewonnen werden. In den meisten Modellen kommt es im Verlauf der Lagerung zu einer Zunahme des OTA-Gehaltes. Die Modelle mit *F. graminearum* CBS 110250 und *P. verrucosum* bzw. *A. ochraceus* zeigen keine erhöhte OTA-Produktivität. Alle anderen Modelle auf sterilem Weizen lassen eine Zunahme der Produktivität erkennen. Dies betrifft auch die Einzelkultur von *A. ochraceus*. Allerdings steigt die Produktivität in diesem Modell nicht so stark wie in den Interaktionsmodellen. Ein Rückschluss von der Infektionsrate auf die Entwicklung des OTA-Gehaltes ist in diesen Modellen nicht möglich. Dies gilt auch für den Lagerversuch mit natürlicher mikrobieller Flora. So sind in dem Modell mit zugemischtem *P. verrucosum* alle Körner mit Lagerpilzen befallen, der OTA-Gehalt bleibt aber über die zwölf Wochen hinweg unauffällig. Auch das Verhältnis von Lagerpilzen zu interagierenden Pilzen lässt keine allgemeingültige Aussage bezüglich des zu erwartenden OTA-Gehaltes zu. So sind in dem Modell mit zugemischtem *F. graminearum* GZT-40 Lagerpilze und interagierende Pilze zu gleichen Anteilen vertreten. Der OTA-Gehalt ist jedoch vergleichbar mit dem des Modells mit *A. alternata*, in dem die Verhältnisse der Infektionsraten massiv zugunsten der Lagerpilze verschoben sind. Andere Untersuchungen zum Einfluss von pilzlichen Interaktionen auf die OTA-Bildung zeigten teilweise eine Hemmung. So wurde *A. ochraceus* auf Maiskörnern durch andere Schimmelpilze im Wachstum gehemmt, was einherging mit einer reduzierten OTA-Produktion (Lee & Magan, 2000). Diese Ergebnisse werden aber durch *in vitro* Versuche auf Maismehlagar nicht bestätigt (Lee & Magan, 1999 a). Neuere Arbeiten mit *Aspergillus carbonarius* bezogen außer der mikrobiellen Interaktion auch die Parameter Temperatur und a_w -Wert in die Analyse ein (Valero *et al.*, 2006). So wurde in *in vitro* Versuchen bei einem a_w -Wert von 0,92 kaum OTA gebildet unabhängig vom Interaktionspartner. Bei einem a_w -Wert von 0,97 waren Stimulation oder Inhibition der OTA-Bildung abhängig von Temperatur und Interaktionspartner.

Die Lagerversuche haben gezeigt, dass unter suboptimalen Bedingungen Pilze der Gattungen *Fusarium*, *Penicillium* und *Aspergillus* in der Lage sind, sich stark zu vermehren. Dabei kommt es auch – in unterschiedlichem Ausmaß – zur Synthese von Mykotoxinen. Es ist anzunehmen, dass die Interaktion von *Fusarium* spp. mit *A. ochraceus* sowohl die DON- als auch die ZEA- Produktion stimuliert, während *A. alternata* keinen Einfluss auf die Toxinsynthese nimmt. Dieser Feldpilz verschwindet während der Lagerung völlig. Interessanterweise entwickelt er sich bei einer geringeren Kornfeuchte (12 %) unter suboptimalen Bedingungen zur dominierenden Pilzgattung. Hinsichtlich der Mykotoxinproblematik muss bedacht werden, dass auch *Alternaria*-Arten in der Lage sind, Toxine wie Alternariol, Alternariolmethylether oder Tenuazonsäure zu bilden. Dies zeigt,

dass nicht nur die Kornfeuchte, sondern auch die Luftfeuchte für eine mikrobiologisch sichere und unbegrenzte Lagerung von Getreide bedeutsam ist.

Abschließend zu den Lagerversuchen sollen die beiden Methoden, die zur Bestimmung des Wachstums der verschiedenen Pilze herangezogen werden, diskutiert werden. Zum einen wurden die Weizenkörner über das klassische Auslegen kulturell analysiert, zum anderen wurde die pilzliche DNA von Weizenkörnern isoliert und mittels real time PCR quantifiziert. Vergleicht man die Ergebnisse aus der kulturellen Untersuchung (3.5.2.1) mit den Ergebnissen aus der quantitativen PCR (3.5.2.2), so findet man nicht in allen Fällen eine übereinstimmende Tendenz.

Der hohe Befall durch *F. graminearum* in den Interaktionen mit *A. alternata* spiegelt sich darin wieder, dass außer bei Stamm CBS 110250 die für den jeweiligen Stamm höchsten DNA-Konzentrationen in diesem Modell zu finden sind. Für die Interaktionen mit *A. ochraceus* konnte aus den kulturellen Untersuchungen für alle *F. graminearum* Stämme eine Abnahme des Befalls beschrieben werden. Diese Tendenz bestätigt die DNA-Analyse nur für die Stämme Z3639 und GZT-33. Bei den anderen beiden Stämmen war *Fusarium*-DNA kaum nachweisbar, was für Woche 12 noch zutreffen mag, für Woche 2 jedoch im scheinbaren Widerspruch steht. Der *Fusarium*-Befall in den Interaktionen mit *P. verrucosum* verläuft den kulturellen Untersuchungen gemäß mehr oder weniger gleichbleibend. Die DNA-Quantifizierung zeigte hingegen für den Stamm Z3639 eine signifikante Steigerung und für die Stämme CBS 110250 und GZT-40 abnehmende Tendenzen. Für den Stamm GZT-33 war kaum DNA nachweisbar, was mit den ermittelten Befallsraten von um 80 % zunächst nicht vereinbar ist.

Jedoch muss darauf eingegangen werden, inwieweit die beiden Methoden miteinander vergleichbar sind. Die kulturelle Untersuchung schließt als Vorbereitung der Körner eine oberflächliche Desinfektion ein, d.h. Sporen und Myzel, welche den Körnern außen anhaften, werden abgetötet. Zum Wachstum kommen nur Pilze, die das Innere der Körner besiedelt haben und sich so der Oberflächendesinfektion entzogen haben. Dagegen werden im Rahmen der DNA-Isolierung von Körnern pilzliche Bestandteile mittels Ultraschall gelöst und lysiert. Dazu werden intakte Körner eingesetzt, die auch nach Beendigung des Beschallens noch intakt sind. Demzufolge erreicht man mit dieser Methode nicht die Pilze im Innern der Körner. Allein aus diesem Aspekt ergeben sich aus den beiden Untersuchungsmethoden unterschiedliche Aussagen.

Weiterhin muss erwähnt werden, dass für die DNA-Isolierung stets das gleiche Gewicht an Körnern eingesetzt wurde, sich aber durchaus beträchtliche Schwankungen in der Füllhöhe des Probengefäßes ergaben, wodurch möglicherweise unterschiedliche Qualitäten in der Ultraschallbehandlung resultierten, zumal es sich nicht um eine

Flüssigkeit, die durch das Beschallen umgewälzt wird, sondern ein Gemisch aus Feststoff und Flüssigkeit handelt. Demzufolge wurde den Ergebnissen aus den kulturellen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit mehr Aussagekraft zugesprochen.

4.5 Molekularbiologische Arbeiten an *E. coli*, *B. subtilis* und *F. graminearum*

Zur Fluoreszenzmarkierung von *E. coli* wurden die Gene für die Proteine ECFP, DsRed2 und GFP zusammen mit einem konstitutiven Promotor (PampR) in den konditionell aktiven Vektor pTSK29 kloniert. Lediglich im Fall von GFP konnte bei *E. coli* pTSKAePG eine Fluoreszenz detektiert werden. Die Verknüpfung der Promotorsequenz mit dem jeweiligen Fluoreszenzgen erfolgte wie bei Gandhi et al. (2001) beschrieben über eine Fusions-PCR, wobei bei *gfp* eine bereits vorliegende komplementäre Sequenzüberlappung von Promotorsequenz-Ende und Fluoreszenzgen-Anfang ausgenutzt werden konnte. Diese Sequenzüberlappung musste bei *dsred* und *ecfp* über verlängerte Primer eingeführt werden, was zur Folge hatte, dass der Abstand zwischen Promotor und Fluoreszenzgen um 12 bp vergrößert wurde. Möglicherweise lag hier die Ursache, weshalb mit diesen Fluoreszenzgenen keine Fluoreszenz beobachtet werden konnte.

Die Klonierungsarbeiten zur Herstellung des Vektors für eine fluoreszierende Mutante von *B. subtilis* wurden in *E. coli* durchgeführt. Nach Transformation des Endvektor pKSVAPG in *E. coli* fluoreszierte die Mutante deutlich. Die Fluoreszenzintensität lag bei fotometrischen Messungen – auch so beobachtet bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen – sogar höher als die der Mutante *E. coli* pTSKAePG. Dies begründet sich vermutlich in der unterschiedlichen Kopienzahl der Plasmide in den Mutanten. Für pTSK29 werden von Phillips (1999) unter nicht-integrativen Bedingungen 6-7 Kopien pro Zelle angegeben, wohingegen Smith und Youngman (1992) pKSV7 (der Ausgangsvektor von pKSVAPG) als high-copy-Plasmid in *E. coli* beschreiben. Allerdings konnten Gandhi et al. (2001) mit der gleichen Klonierungsstrategie und pTSK29 als Ausgangsvektor leuchtintensive Mutanten von *Salmonella* Stanley generieren. Die Fluoreszenz blieb auch nach Integration des Konstruktes in das Chromosom von *Salmonella* Stanley erhalten, obwohl das Fluoreszenzgen dann lediglich als Einzelkopie vorlag.

Für *B. subtilis* konnte in der vorliegenden Arbeit keine Fluoreszenzmarkierung erzielt werden. Als mögliche Ursachen kommen verschiedene Aspekte in Betracht. Zunächst könnte es sein, dass der verwendete Ausgangsvektor pKSV7 ungeeignet war. Smith und Youngman (1992) konstruierten diesen Vektor mit temperatursensitivem Replikationsursprung als Shuttle-Vektor für *E. coli* und *B. subtilis*. In *E. coli* können Klonierungs-

arbeiten vorgenommen werden, was aufgrund immer wieder auftretender niedriger Transformationsraten bei *B. subtilis* (Brückner, 1992) von Vorteil ist. In *E. coli* liegt pKSV7 als high-copy-Plasmid vor. Wird der klonierte Vektor, wie auch in dieser Arbeit, schließlich in *B. subtilis* gebracht, so liegen pro Zelle lediglich 5 Kopien vor (Smith und Youngman, 1992). Es ist demnach davon auszugehen, dass nach der Transformation des Plasmids pKSVAPG in *B. subtilis* das *gfp*-Gen nur mit 5 Kopien für die Expression zur Verfügung stand. Die Kopienanzahl würde mit der Integration des Plasmids bei Anzucht oberhalb der kritischen Temperatur weiter auf eine Kopie sinken. Itaya *et al.* (2001) erreichten eine Fluoreszenzmarkierung von *B. subtilis* ebenfalls mit einem Shuttle-Vektor und *gfp*. Dieser Vektor lag mit einer Kopienzahl von 15 pro Zelle vor. Die Integration des Vektors führte zum Verlust der Fluoreszenz, da die nur noch einfach vorhandene Kopie für eine detektierbare Fluoreszenz nicht ausreichte. Nun stellt sich die Frage, ob eine Integration notwendig ist, wenn in nachfolgenden Experimenten auf eine Antibiotikaselektion verzichtet werden soll. Prachaiyo und McLandsborough (2000) berichten über einen Verlust des Plasmids innerhalb von acht Stunden ohne Antibiotikaselektion bei 90 % der Population von *E. coli*. Dagegen dokumentieren Itaya *et al.* (2001) bei *B. subtilis*, dass bei Anzucht ohne Antibiotikum unabhängig von der Inkubationstemperatur nach 10 Generationen ein Verlust des Plasmids lediglich bei maximal 1% der Zellen festzustellen war. Es ist anzunehmen, dass die Anzucht ohne Selektion auf das Plasmid bei verschiedenen Gattungen unterschiedliche Auswirkung hat.

Ein weiterer Grund für die fehlende Fluoreszenz in *B. subtilis* könnte der verwendete Promotor sein, der dem *gpf*-Gen vorgeschaltet ist. Tatsache ist, dass der konstruierte Vektor pKSVAPG in *E. coli* zu einer Fluoreszenzexpression führt. Der Promotor stammt ursprünglich von dem Plasmid pECFP (Fa. Clontech, Biosciences), steuert dort das Ampicillin-Resistenz-Gen und ist ein konstitutiver Promotor. Gandhi *et al.* (2001) verwendeten diesen Promotor zusammen mit *gfpuv* zur Fluoreszenzmarkierung von *Salmonella* Stanley. Es stellt sich die Frage, ob ein Promotor, der sich für *E. coli* (eigene Arbeit) und *Salmonella* (Gandhi *et al.*, 2001) -zwei gramnegative Organismen- eignet, auch in dem grampositiven *B. subtilis* funktionell ist. Die für *E. coli* typischen Konsensussequenzen -35 und -10 sind oft homolog zu entsprechenden Sequenzen in *Bacillus*-Promotoren, jedoch weisen *Bacillus*-Promotoren stromaufwärts von -35 Sequenzen mit einem AT-Gehalt von mehr als 70 % auf, ein Merkmal, welches sich eher selten bei *E. coli*-Promotoren findet (Peschke *et al.*, 1985). Da für den verwendeten Promotor in Hinblick auf *B. subtilis* keine Informationen vorliegen, wäre ein anderer Promotor evtl. besser geeignet. So ist der *vegII*-Promotor, der aus *B. subtilis* stammt und erstmalig 1982 von LeGrice und Sonenshein beschrieben wurde, im Ursprungsorganismus ein starker Promotor und wird auch in *E. coli* -weniger effizient- erkannt.

Brückner (1992) brachte diesen Promotor in den *E. coli* - *B. subtilis*-Shuttle-Vektor pRB374. Schäffer *et al.* (2002) benutzten den Vektor, um enterobakterielle Enzyme in *B. subtilis* zu exprimieren, berichteten allerdings auch über Anfälligkeiten des Vektors bezüglich Rearrangement und Deletion. Die von Itaya *et al.* (2001) erzeugte Fluoreszenzmarkierung von *B. subtilis* mit GFP wurde über den *bsr*-Promotor (BlasticidinS-Resistenz) angeschaltet. Wie jedoch bereits geschildert konnte nach Integration des Vektors keine Fluoreszenz detektiert werden, da eine Kopie des *gfp*-Gens zumindest unter diesem Promotor nicht ausreichte. Bei Verwendung des *bsr*-Promotors müsste folglich auf eine Integration verzichtet werden.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Expression von *gfp* nicht außer acht gelassen werden darf, ist die Tatsache, dass die Clonetech-Vektoren hinsichtlich des Codon-Gebrauchs für die Expression in höheren Eukaryonten optimiert worden sind. Allerdings wird dadurch die Expression in *B. subtilis* –zumindest nach Feucht und Lewis (2001)- nicht beeinträchtigt.

Zusammenfassend lässt sich nicht klären, weshalb *gfp* in *B. subtilis* pKSVAPG nicht exprimiert wurde. Es könnte an einem evt. nicht funktionellen oder sehr schwachen Promotor oder an der niedrigen Kopienzahl des Plasmids oder an einer Kopplung beider Aspekte gelegen haben. Für die in der vorliegenden Arbeit angestrebte Fluoreszenzmarkierung von *B. subtilis* ohne Antibiotikaselektion wäre höchstwahrscheinlich die Verwendung des starken *vegII*-Promotors zusammen mit *gfp* in pKSV7, dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten und als stabil erwiesenen Vektor, und anschließender Integration des Konstruktes in das Chromosom von *B. subtilis* erfolgversprechend.

Im übrigen wird die bei den vorliegenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des *B. subtilis* beschriebene Autofluoreszenz von Feucht und Lewis (2001) ebenfalls erwähnt, wenn *B. subtilis* mit UV-Licht beleuchtet wird.

Für die Fluoreszenzmarkierung von *F. graminearum* wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurde der Hygromycin B -Resistenz vermittelnde Vektor pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987) sowie ein selbst hergestellter Fluoreszenzvektor (ein Derivat von pAN7-1 mit dem Fluoreszenzgen anstelle des Resistenz vermittelnden Gens *hph*) in eine Cotransformation eingesetzt. Zum anderen wurde in pAN7-1 das Fluoreszenzgen direkt hinter das *hph*-Gen kloniert und der entstandene Vektor alleine in die Transformation eingesetzt.

Die Cotransformation von zwei Plasmiden ist eine bei Pilzen gängige Methode und wurde im Zusammenhang mit GFP auch bei *Fusarium* spp. bereits durchgeführt. Sowohl Lagopodi *et al.* (2002) als auch Nahalkova & Fatehi (2003) setzten den jeweiligen Fluoreszenzvektor zusammen mit pAN7-1 in die Transformation von *Fusarium oxysporum*

ein und selektionierten die Transformanden mit Hygromycin B. Allerdings wurde beobachtet, dass nur etwa 60 % der Transformanden die Fluoreszenz exprimierten (Lagopodi *et al.*, 2002), was möglicherweise darauf beruht, dass mit Hygromycin B nur der Vektor pAN7-1 selektioniert wird, so dass nicht jeder Transformand beide Plasmide aufgenommen haben muss. Weiterhin wurde beschrieben, dass die Fluoreszenzintensitäten bei den Transformanden variierten (Lagopodi *et al.*, 2002) und die Reifung des DsRed2-Proteins mindestens drei Tage andauerte (Nahalkova *et al.*, 2003), jedoch konnten im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit fluoreszierende Mutanten gewonnen werden. Eine naheliegender Ansatzpunkt betrifft die Expressionssteuerung. Nach Lorang *et al.* (2001) erzielen GFP-Expressionsvektoren mit *Aspergillus*-Promotoren lediglich niedrige Expressionslevels für GFP in Pilzen aus verschiedenen Gattungen. Als vorteilhafter wird der Promotor *PtoxA* aus *Pyrenophora tritici-repentis* angesehen. In der vorliegenden Arbeit diente der Promotor *PgpdA* aus *Aspergillus nidulans* als Promotor des Fluoreszenzgens. Das Terminationssignal des *trpC*-Gens stammte ebenfalls aus diesem Pilz. Beide Elemente steuern das *hph*-Gen in pAN7-1. Da diese beiden Expressionssignale bereits in *F. oxysporum* (Lagopodi *et al.*, 2002; Nahalkova & Fatehi, 2003) verwendet wurden, war davon auszugehen, dass dies für *F. graminearum* ebenfalls möglich sein würde. Aus den durchgeführten Cotransformationen konnten auch stets Hygromycin B resistente Transformanden gewonnen werden, d. h. das *hph*-Gen wurde mittels des Promotors und der Terminationssequenz erfolgreich gesteuert. Nun wurde zur Klonierung der Fluoreszenzvektoren pANE3 und pAND6 der Vektor pAN7-1 mit dem Restriktionsenzym *Scal* verdaut, um das *hph*-Gen zu entfernen. Nach der Vektorkarte von pAN7-1 wurde dadurch ein kleines Stück der Promotorsequenz entfernt. Ein Blick auf die Sequenz des *gpdA*-Gens aus *A. nidulans* (Punt *et al.*, 1988) zeigt jedoch, dass die TATA-Box, das Polyadenylierungssignal sowie der Transkriptionsstartpunkt stromaufwärts von der *Scal*-Schnittstelle liegen. Stromabwärts folgt der Schnittstelle lediglich ein Intron und dann bereits das ATG-Startcodon des *gpdA*-Gens. Es ist demnach nicht davon auszugehen, dass der Promotor durch den Restriktionsverdau in seiner Funktion beeinträchtigt wurde. Eine weitere Ursache für das Nicht-Fluoreszieren der erhaltenen Mutanten könnte die Verwendung eines ungeeigneten Fluoreszenzgens sein. Die Expression des Wildtyp-*gfps* gilt u. a. in Pilzen aufgrund von Problemen beim Codon-Gebrauch als nicht möglich (Cormack, 1998). Lorang *et al.* (2001) empfehlen für die Expression von GFP in Pilzen die Variante SGFP, welches sowohl von Lagopodi *et al.* (2002) als auch von Aboul-Soud *et al.* (2004) verwendet wurde. Bei SGFP handelt sich um ein Derivat des Wildtyp-GFPs mit einem Aminosäureaustausch an Position 65 (Serin zu Threonin), welches als Reporterprotein in Pflanzen entwickelt wurde (Chiu *et al.*, 1996). Das hier verwendete ECFP enthält diesen Aminosäureaustausch ebenfalls und

wurde wie aus der Beschreibung des Anbieters (Fa. Clontech, Biosciences) hervorgeht noch weitergehend für die Expression in Säugetier- und Pflanzenzellen verbessert. Es ist folglich unwahrscheinlich, dass das *ecfp*-Gen in Pilzen nicht abgelesen werden kann. Darüberhinaus setzten Nahalkova & Fatehi (2003) DsRed2 erfolgreich als Fluoreszenzmarker in *F. oxysporum* ein.

Die Cotransformation birgt als Problematik, dass von den zwei in die Transformation eingesetzten Plasmide nur eines selektioniert wird. Deshalb wurde in der zweiten Strategie das Fluoreszenzgen hinter den Selektionsmarker in den gleichen Vektor kloniert. Die Tatsache, dass keine Transformanten gewonnen werden konnten, lässt den Rückschluss zu, dass die Expression nicht mehr zu einer funktionierenden Phosphotransferase führte und somit keine Resistenz gegenüber Hygromycin B bestand

4.6 Proteinanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese

Mit der 2D-Gelelektrophorese wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode etabliert, die es ermöglichen sollte, bislang unbekannte Proteine, die im Kontext zu der Synthese und Wirkung von Mykotoxinen stehen, identifizieren kann.

Eine zweidimensionale Elektrophorese wurde erstmals von O'Farrell (1975) und zeitgleich von Klose (1975) vorgestellt. Dabei wurde die isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid-Gelen, die abhängig von freien Carrier Ampholyten einen pH-Gradienten generierten, durchgeführt. Eingeführt von Görg *et al.* (1985) verbesserten stabile pH-Gradienten, die durch kovalente Bindung zwischen sauren und basischen Puffern und dem Polyacrylamid-Gel immobilisiert sind, die Reproduzierbarkeit und Handhabung der Methode. Inzwischen stellt die 2D-Gelelektrophorese gepaart mit der Massenspektroskopie die Hauptmethode der Proteomanalyse dar (Phillips & Bogoy, 2005). Die zahlreichen Veröffentlichungen beziehen sich allerdings überwiegend auf Humangewebsproben oder tierische Proben. In allgemein einführenden Übersichtsartikeln wie z.B. von Fey *et al.* (1997) oder Görg *et al.* (2000 und 2004) werden für diese und darüberhinausgehend auch für Pflanzen und Hefen Extraktionsverfahren und Proteinreinigungsprotokolle vorgestellt. Literatur zur Proteomforschung an Pilzen ist bislang nur wenig verfügbar und zu Fusarien wurde nach meiner Kenntnis bisher nichts veröffentlicht außer einer Arbeit zum Exoproteom (Phalip *et al.*, 2005).

Im Zuge der Probenaufarbeitung galt es verschiedene Probleme zu bewältigen. Zunächst musste ein geeignetes Aufschlussverfahren gefunden werden. Da *Eumycota* über eine feste Zellwand verfügen, die -so für *Neurospora crassa* beschrieben und als mit anderen Pilzen vergleichbar dargestellt- 250 µm dick sein kann (Carlile & Watkinson, 1994),

mussten rigide Methoden ausgewählt werden. Sowohl Ultraschall als auch French Press und Mörsern erwiesen sich in Bezug auf den Zellaufschluss als geeignet, allerdings kam es bei der Behandlung mit Ultraschall und mit der French Press bzw. bei der weiteren Probenvorbereitung zu massivem Proteinabbau. Pilze -insbesondere phytopathogene wie *F. graminearum*- bilden sehr viele Proteasen (Carlile & Watkinson, 1994, Petäistö *et al.*, 1994). Deshalb wurde vor dem Zellaufschluss das abgeerntete Myzel in zwei Durchgängen gewaschen, um extrazelluläre Substanzen und darunter auch Proteasen zu entfernen, jedoch blieben zellwandgebundene und intrazelluläre Enzyme davon unberührt. Weiterhin wurde ein speziell für Hefen und Pilze zusammengestellter Protease Inhibitor Cocktail mit verschiedenen Proteasen eingesetzt, der aber kaum Wirkung zeigte. Da allgemein gilt, dass solche Protease Inhibitoren unspezifisch Proteinmodifikationen erzeugen können (Görg *et al.*, 2004), was im Zuge der weiteren Analyse des Proteinextraktes als nachteilig zu bewerten wäre, wurde auf diese Maßnahme verzichtet. Der Proteinabbau konnte beim Mörsern mit flüssigem Stickstoff und anschließender Fällung mit TCA/Aceton effektiv eingedämmt werden. Die Präzipitation mit TCA/Aceton minimiert nicht nur den Proteinabbau, sondern entfernt auch Lipide (aufgrund des Acetons), Polysaccharide und Salze (Görg *et al.*, 2004).

Ein generelles Problem der 2D-Gelelektrophorese ist, dass theoretisch alle Proteine, hydrophile und hydrophobe, gleichermaßen erfasst werden sollen. Der von O'Farrell (1975) eingeführte Puffer mit 9 M Harnstoff ist für hydrophobe Proteine nicht uneingeschränkt geeignet. Rabilloud (1998) konnte mit einem Harnstoff/Thioharnstoffpuffer die Solubilisierung hydrophober Proteine verbessern. Dieser Effekt konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden, wobei sich dies evt. in der Verwendung des neuartigen Detergenz CHAPS begründet. Dieses eignet sich für Membranproteine besser als z.B. das klassische nichtionische Detergenz Triton X-100 und gleicht die Schwäche des Harnstoffpuffers zumindest teilweise aus.

Die in den 2D-Gelen detektierten Proteine lagen in einem Größenbereich von 10 bis 100 kDA, was aufgrund der Daten von anderen Pilzen oder Hefen (Harder *et al.*, 1999; Nandakumar & Marten, 2002; Grinyer *et al.*, 2004) den Erwartungen entspricht. Als problematisch ist die Methode der Detektion anzusehen. Eine Coomassiefärbung eignet sich, um quantitative Unterschiede zu ermitteln, hat aber ein Detektionslimit von 200-500 ng/Spot. Die Silberfärbung detektiert noch 0,1 ng Protein/Spot, ist aber wenig reproduzierbar und eignet sich nicht für eine Quantifizierung, da der Endpunkt der Färbung subjektiv vom Bearbeiter bestimmt wird. Abgesehen davon tritt die Fläche eines Proteinspots nicht als einheitlich gefärbt auf, sondern erzeugt sogenannte Krater, d.h. der Spot ist mittig heller und hat außen einen dunkleren Rand. Somit eignet sich die Silberfärbung nicht für die eigentlichen Ziele der Proteomforschung (Rabilloud *et al.*,

2001). In der vorliegenden Arbeit war jedoch das primäre Ziel die Methodenetablierung und somit stand die Sensitivität der Silberfärbung im Vordergrund. Für quantitative Analysen wäre ein Fluoreszenzfarbstoff wie z.B. SYPRO Ruby zu empfehlen, der eine sensitive Proteinfärbung ermöglicht und eine nachgeschaltete Massenspektroskopie zulässt (Yan *et al.*, 2000). Die Bilddokumentation muss dann allerdings an einem Fluoreszenzscanner erfolgen.

Mit den unter 3.8.2 dargestellten 2D-Gelen konnte gezeigt werden, dass zum einen die Wahl des pH-Gradienten und zum anderen die aufgetragene Proteinmenge die Auflösung des Proteinmusters beeinflussen. Die Komplexität eines Proteoms kann zudem noch durch Fraktionierung reduziert werden. So könnten z.B. Zellorganellen isoliert werden. Es gestaltet sich jedoch schwierig, die Zellen zu lysieren, dabei aber die Organellen intakt zu halten. Es wurden die Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, wobei die Hefe zuvor protoplastiert wurde (Meisinger *et al.*, 2000). Die Arbeiten an *Tyromyces palustris* (Shimizu und Wariishi, 2005), einem filamentösen Pilz, zeigten, dass protoplastierte Zellen dieses Pilzes ein qualitativ besseres Ergebnis in der 2D-Gelelektrophorese ergaben als intaktes Myzel. Außerdem wurden mehr Proteine isoliert, die in einem größeren kDa-Bereich lagen. Eine subzelluläre Fraktionierung konnte mit den Protoplasten ebenfalls erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinproben isoliert aus Protoplasten von *F. graminearum* untersucht. Eine wesentliche Verbesserung sowohl hinsichtlich Qualität als auch Quantität gegenüber den Proben von intaktem Myzel konnte nicht beobachtet werden. Dies liegt möglicherweise an der zu Shimizu & Wariishi (2005) abweichenden Probenaufarbeitung. Hier wurde ein SDS-Puffer in Verbindung mit Hitze einwirkung zur Extraktion der Proteine gewählt, da mit Triton X-114 bzw. CHAPS - anders als in der vorliegenden Arbeit - kaum Spots auf den 2D-Gelen detektiert werden konnten. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich die Proteinexpression aufgrund der Behandlung mit Zellwand abbauenden Enzymen verändert und da keine wesentliche Verbesserung für die Extraktion zellulärer Proteine durch die Protoplastierung erzielt werden konnte, kann das erarbeitete Probenaufbereitungsprotokoll in Bezug auf diese Proteine als optimal angesehen werden kann. Hinsichtlich der Zellwand assoziierten Proteine könnten weitere Veränderungen in der Probenbearbeitung sinnvoll sein. Gerade im Hinblick auf die bereits angesprochenen unbekannt Proteine im Zusammenhang mit Mykotoxinen sind Rezeptoren oder Kanäle in der Zellhülle denkbar wie z.B. die bereits bekannte membranständige Efflux-Pumpe für Trichothecene Tri102 (Wuchiyama *et al.*, 2000). Für diese Zielsetzung wäre allerdings eine Trennung von Zellwand und Membran von Cytosol und Organellen sinnvoll, damit die höchstwahrscheinlich in geringer Konzentration in der Zelle vorkommenden Rezeptoren nicht von Haushaltsproteinen überlagert werden.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit auch demonstriert werden, dass das an *F. graminearum* entwickelte Probenaufarbeitungsprotokoll sich auch für die Pilze *A. ochraceus* und *P. verrucosum* eignet. Dies war in Anbetracht der unterschiedlichen Wachstumsweisen nicht selbstverständlich. Filamentöse Pilze wachsen in Flüssigkulturen entweder filamentös oder als Pellets (Carlile und Watkinson, 1994). Filamentös meint dabei eine homogene Suspension von Hyphen im Medium. Bei manchen Pilzen ist die Form des Wachstums von der Größe des Inokulums abhängig. Die beiden oben genannten Pilze wachsen im Gegensatz zu *F. graminearum* als kompakte, sehr widerstandsfähige Pellets. Jedoch konnten auch diese Pellets nach Tieffrieren mit Flüssigstickstoff problemlos aufgebrochen werden. Die 2D-Gele mit aus diesen Pilzen stammenden Proteinextrakte waren qualitativ sehr gut. Anhand dieser Ergebnisse kann der entwickelten Probenaufarbeitung eine für Pilze allgemeingültige Eignung zugeschrieben werden.

Einige der in 3.8.2 dargestellten 2D-Gele dienen dem Vergleich verschiedener Anzuchtbedingungen oder Stämmen von *F. graminearum*. Allerdings werden solche Vergleiche in der Regel computergestützt durchgeführt. Dazu müssen die Gele mit einer Software erfasst und dann zunächst manuell bearbeitet werden. Das bedeutet, dass möglichst viele Proteinspots einander als identisch zugeordnet werden. Anhand dieser Fixpunkte werden minimale Unterschiede in der Lage der Spots ausgeglichen und dann erfolgt eine automatische Zuordnung von Spots. Auf diese Weise ist auch eine Auswertung bezüglich quantitativer Unterschiede möglich. Es setzt aber voraus, dass eine geeignete Proteinfärbung gewählt wird. Aus der Arbeit von Reinartz (2002) ist zu entnehmen, dass die computergestützte Bildanalyse nicht zufriedenstellend ist und sich für silbergefärbte Gele nicht eignet. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich eine Auswertung mit dem Auge vorgenommen werden, weshalb kein Anspruch auf vollständige und exakte Analyse erhoben wird. Als eine sehr vielversprechende Methode zum Vergleich zweier Proteome wurde die Differential-Gelelektrophorese (DIGE) entwickelt (Tonge *et al.*, 2001), wo die Proteome zunächst getrennt mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen behandelt werden und dann beide Proteome gemeinsam in die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt werden. Über unterschiedliche Anregungs- und Emissionswellenlängen können beide Proteome separat, aber in einem Gel miteinander verglichen werden.

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eröffnen Fragestellungen für weitere Forschungen:

Da physiologische Parameter einen eher kleinen Einfluss auf verstärkte DON-Produktion nehmen, sollten mikrobielle Interaktionen weitergreifend untersucht werden. Das Modell des suboptimal gelagerten Weizens eignet sich sehr gut, um *in vivo*-Untersuchungen durchzuführen. In ähnlichen Versuchen könnten Inokulumverhältnisse der interagierenden Pilze natürlichen Gegebenheiten angepasst werden. Das Spektrum der interagierenden Mikroorganismen könnte auf andere ebenfalls mit Weizen assoziierten Pilzen wie *Cladosporium* spp. und auch Bakterien wie *B. subtilis* erweitert werden. Auch sollte *F. culmorum* als weit verbreitete Fusarienart und potenter Toxinbildner einbezogen werden.

Obwohl der ZEA-Syntheseweg genetisch noch nicht abschließend aufgeklärt ist, sind zwei Polyketidsynthasegene beschrieben (Gaffoor *et al.*, 2006), deren Genprodukte maßgeblich an der ZEA-Synthese beteiligt sind. Mit der Ausschaltung dieser Gene würde eine Mutante zur Verfügung stehen, mit der die Bedeutung von ZEA näher untersucht werden könnte.

Auslöser und Bildung von Trichothecenen könnten mit Hilfe der Fluoreszenz von GFP untersucht werden. Analog zu den Experimenten von Chen *et al.* (2000) könnte der Promotor des *tri5*-Gens das Fluoreszenzgen *gfp* steuern, so dass DON-Bildung durch Fluoreszenz angezeigt würde. Durch eine Reportergenfusion von *gfp* mit dem *tri6*-Gen könnte die Regulation der Trichothecene transparenter werden.

Expressionsmuster könnten mit der Methodik der 2D-Gelelektrophorese in Abhängigkeit von verschiedenen Wachstumsbedingungen verglichen werden. Dabei auffallende Proteine könnten durch Massenspektroskopie näher charakterisiert werden oder ansequenziert werden. Expressionsstudien könnten auch über die Quantifizierung von mRNA gestaltet werden.

5 Zusammenfassung

Als Grundlage zur Untersuchung pilzlicher Interaktionen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Bildung von Mykotoxinen wurde der Einfluss physiologischer Parameter auf die DON- und ZEA-Produktion verschiedener Stämme von *F. graminearum* geprüft. Für DON konnte dabei keine Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur und Wasseraktivität – zumindest in den gewählten Bereichen– beobachtet werden. Abhängig vom Stamm stieg die Produktion von ZEA teilweise bei Absenkung des a_w -Wertes, wurde jedoch bei a_w -Werten um 0,8 eingestellt.

In vitro wurden die Interaktionen zwischen *F. graminearum* und *A. alternata*, *P. verrucosum* und *A. ochraceus* in Dualkulturen bezüglich Wachstum, DON-, ZEA- und OTA-Synthese untersucht. Es zeigte sich, dass in fast allen Cokulturen verglichen mit den entsprechenden Einzelkulturen das Wachstum der einzelnen Spezies reduziert war. Sowohl für DON als auch für ZEA erhöhten sich die Gehalte in den Cokulturen von *F. graminearum* mit *P. verrucosum* bzw. *A. ochraceus*. Dies konnte für DON einen Tag nach Inokulation verzeichnet werden, während steigende ZEA-Gehalte mit zunehmendem Alter der Kultur gemessen wurden. In den Cokulturen mit *A. alternata* stieg die Produktion der *Fusarium*-Toxine nicht. Auf die OTA-Bildung von *P. verrucosum* und *A. ochraceus* hatten pilzliche Interaktionen einen hemmenden Einfluss.

Als *in vivo*-Modell für pilzliche Interaktionen wurden Weizenkörner unter hinsichtlich Feuchte und Temperatur suboptimalen Bedingungen über zwölf Wochen gelagert. Bei Körnern, die vor Lagerbeginn sterilisiert und lediglich mit zwei Pilzen (wie in den *in vitro*-Versuchen) beimpft wurden, konnten einheitliche Infektionsverläufe während der Lagerung für die untersuchten *F. graminearum*-Stämme zusammengefasst werden. In allen Interaktionen der *F. graminearum*-Stämme mit *A. alternata* dominierte *F. graminearum* eindeutig, während *A. alternata* verdrängt wurde. Dagegen wurde *F. graminearum* in den Interaktionen mit dem Lagerpilz *A. ochraceus* unterdrückt, während *A. ochraceus* sehr schnell alle Körner infizierte. Obwohl *P. verrucosum* auch zu den Lagerpilzen zählt, stellte sich im Verlauf der Lagerung ein fast paritätisches Verhältnis zwischen diesem Pilz und *F. graminearum* ein. Diese Entwicklungen traten tendenziell auch bei der Lagerung von Körnern mit natürlicher mikrobieller Flora und Inokulation mit einem der Pilze auf.

In Bezug auf die DON-Bildung hatten die *in vivo*-Interaktionen abhängig von den beteiligten Spezies unterschiedliche Auswirkungen. In der Interaktion zwischen *F.*

graminearum und *A. ochraceus* erhöhte sich die Produktivität, während Interaktionen mit *A. alternata* bzw. *P. verrucosum* keinen Einfluss hatten. ZEA wurde verstärkt in den Modellen *F. graminearum*/*A. ochraceus* und teilweise auch in den Modellen mit *P. verrucosum* gebildet, wobei hier ein hemmender Effekt auf *P. verrucosum* beobachtet werden konnte. Der OTA-Gehalt steigt in fast allen Modellen während der Lagerung, jedoch ist eine Korrelation zu der Infektionsrate oder den Verhältnissen der Pilze zueinander nicht gegeben.

Zusammenfassend lassen sich Entwicklungen hinsichtlich der Toxinbildung in einem mikrobiologisch komplexen System wie Getreide nur schwer prognostizieren. Die Lagerversuche haben gezeigt, dass sich die ausgewählten Pilze außer *A. alternata* unter suboptimalen Bedingungen stark vermehren und dabei Mykotoxine bilden. Die Bildung von DON konnte nicht als Vorteil des Produzenten gegenüber interagierenden Pilzen gewertet werden, nicht zuletzt entwickelten sich Mutanten von *F. graminearum*, die nicht in der Lage sind, DON zu synthetisieren, in vergleichbarer Weise wie der Wildtyp-Stamm. Ob die Interaktionen in Zusammenhang mit der ZEA-Synthese stehen oder die Bildung von ZEA einen Vorteil für den jeweiligen Pilz darstellt, ist spezies- und vermutlich auch stammspezifisch.

Zur mikroskopischen *in situ*-Lokalisation von interagierenden Pilzen und Bakterien wurden verschiedene Vektoren zur Fluoreszenzmarkierung von *E. coli*, *B. subtilis* und *F. graminearum* konstruiert. Eine für die Detektion von Einzelzellen ausreichende Fluoreszenz konnte nur für *E. coli* erzielt werden.

Zur Analyse von pilzlichen Proteomen konnte am Modell *F. graminearum* eine Probenaufbereitung mit anschließender 2D-Gelelektrophorese etabliert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Methode auch für andere filamentöse Pilze (*P. verrucosum* und *A. ochraceus*) geeignet ist.

6 Literatur

ABILDGREN MP, LUND F, THRANE U und EMHOLT S (1993) Czapek-Dox agar containing iprodione and dicloran as a selective medium for the isolation of *Fusarium* species. *Letters in Applied Microbiology* 5: 83-86

ABOUL-SOUD MAM, YUN B, HARRIER LA und LOAKE GJ (2004) Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a gfp transgene. *Mycopathologia* 158: 475-482

AMMAN HM (2005) Mycotoxins in indoor air. In: Degen GH, Föllmann W, Arnold-Schulz-Gahmen B und Lindemann S (eds.) 27. Mykotoxin-Workshop, Dortmund

ANDERSEN B, THRANE U, SVENDSEN A und RASMUSSEN IA (1996) Associated field mycobiota on malt barley. *Canadian Journal of Botany* 74: 854-858

BAI GH, DESJARDINS AE und PLATTNER RD (2001) Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153: 91-98

BAYMAN P, BAKER JL, DOSTER MA, MICHAILIDES TJ und MAHOONEY NE (2002) Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and environmental microbiology* 68: 2326-2329

BERLETH M (1997) Landwirtschaftliche und technologische Einflüsse auf Getreide mit Deoxynivalenol und anderen Mykotoxinen. Dissertation, Universität Bonn

BEVIS BJ und GLICK BS (2002) Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Natural Biotechnology* 20: 83-87

BEYER M, VERREET J und RAGAB WSM (2005) Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. *International Journal of Food microbiology* 98: 233-240

BIRZELE B (2001) Untersuchungen zur mikrobiologischen Qualität von erntefrischem und suboptimal gelagertem Weizen aus Organischem Landbau unter besonderer Berücksichtigung der Mykotoxine Deoxynivalenol und Ochratoxin A. Dissertation, Universität Bonn

BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254

BRÜCKNER R (1992) A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* 122: 187-192

BÜNKER J (2003) Kultureller und molekularbiologischer Nachweis verschiedener *Fusarium*-Arten und Quantifizierung von Deoxynivalenol in Weizen aus suboptimaler Lagerung. Diplomarbeit, Universität Bonn

CARLILE MJ und WATKINSON SC (1994) *The fungi*. Academic press limited, San Diego

- CASTELLA G, LARSEN TO, CABANES J, SCHMIDT H, ALBORESI A, NIESSEN L, FÄRBER P und GEISEN R (2002) Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 74-83
- CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW und PRASHER DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805
- CHEN L, MCCORMICK SP und HOHN T (2000) Altered regulation of 15-acetyldeoxynivalenol production in *Fusarium graminearum*. *Applied and environmental microbiology* 66: 2062-2065
- CHIU W, NIWA Y, ZENG W, HIRANO T, KOBAYASHI H und SHEEN J (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6: 325:330
- CHRISTENSEN CM (1987) Field and storage fungi. In: Food and beverage mycology. Ed. Beuchat LR; 2. Aufl. AVI-Book, New York, USA
- COONEY JM, LAUREN DR und DI MENNA ME (2001) Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural Chemistry* 49: 522-526
- CORMACK B (1998) Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Current Opinions in Microbiology* 1: 406-410
- CZACZYK K, TROJANOWSKA K und MUELLER A (2002) Antifungal activity of *Bacillus coagulans* against *Fusarium* sp.. *Acta Microbiologica Polonica* 51: 275-283
- D'MELLO JPF und MACDONALD AMC (1997) Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 69: 155-166
- D'MELLO JPF, PLACINTA CM und MACDONALD AMC (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80: 183-205
- DAGERT M und EHRLICH SD (1974) Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of *Escherichia coli*. *Gene* 6: 23-28
- DAVIS ND und DIENER UL (1987) Mycotoxins. In: Food and beverage mycology. Ed. Beuchat L R; 2. Aufl. AVI-Book, New York, USA
- DESJARDINS AE, HOHN TM und MCCORMICK SP (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* Species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological reviews* 57: 595-604
- ETCHEVERRY M, MAGNOLI C, DALCERO A, CHULZE S und LECUMBERRY S (1998) Aflatoxin B1, zearalenone und deoxynivalenol production by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* in interactive cultures on irradiated corn kernels. *Mycopathologia* 142: 37-42
- FAHMY F, FLOSSDORF J und CLAUS D (1985) The DNA base composition of the type strains of the genus *Bacillus*. *Systematic and Applied Microbiology* 6: 60-65
- FEUCHT A und LEWIS PJ (2001) Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* 264: 289-297

- FEY SJ, NAWROCKI A, LARSEN MR, GÖRG A, ROEPSTORFF P, SKEWS GN, WILLIAMS R und LARSEN PM (1997) Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae*: a methodological outline. *Electrophoresis* 18: 1361-1372
- FINGER FP, HUGHES TE und NOVICK P (1998) Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* 92: 559-571
- FINK-GREMMELS J (2005) Zearalenone: a review. In: Degen GH, Föllmann W, Arnold-Schulz-Gahmen B und Lindemann S (eds.) 27. Mykotoxin-Workshop, Dortmund
- FRISVAD JC (1989) The connection between the penicillia and aspergilli and mycotoxins with the emphasis on misidentified isolates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18: 452-467
- GAFFOOR I und TRAIL F (2006) Characterization of two polyketid synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and environmental Microbiology* 72: 1793-1799
- GANDHI M, GOLDING S, YARON S und MATTHEWS KR (2001) Use of green fluorescent protein expressing *Salmonella* Stanley to investigate survival, spatial location, and control on alfalfa sprouts. *Journal of Food Protection* 64: 1891-1898
- GANDHI M, GOLDING S, YARON S und MATTHEWS K R (2001) Use of green fluorescent protein expressing *Salmonella* Stanley to investigate survival, spatial location, and control on Alfalfa sprouts. *Journal of Food Protection* 64: 1891-1898
- GÖRG A (2003) Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: a laboratory manual. [http:// weihenstephan.de/blm/deg](http://weihenstephan.de/blm/deg)
- GÖRG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, HARDER A, SCHEIBE B, WILDGRUBER R und WEISS W (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053
- GÖRG A, POSTEL W, GÜNTHER S und WESER J (1985) Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and layin-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 6: 599-604
- GÖRG A, WEISS W UND DUNN MJ (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3685
- GRINYER J, MCKAY M, NEVALAINEN H UND HERBERT BR (2004) Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 45: 163-169
- HAMPTON RY, KONING A, WRIGHT R und RINE J (1996) *In vivo* examination of membrane protein localization and degradation with green fluorescent protein. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 93: 828-833
- HANAHAN D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580
- HARDER A, WILDGRUBER R, NAWROCKI A, FEY S J, LARSEN P M und GÖRG A (1999) Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20: 826-829

HARVEY RB, EDRINGTON TS, KUBENA LF, ELISSADE M, CASPER HH, ROTTINGHAUS GE und TURK JR (1996) Effects of dietary fumonisin B1-containing culture material, deoxynivalenol-contaminated wheat, or their combination on growing barrows. *American Journal of Veterinary Research* 57: 1790-1794

HAUGLAND RA, VARMA M, WYMER LJ und VESPER SJ (2004) Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 198-210

HOHN TM und VANMIDDLESWORTH F (1986) Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthetase from *Fusarium sporotrichioides*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 251: 756-761

HOPE R und MAGAN N (2003) Two-dimensional environmental profiles of growth, deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* on a wheat-based substrate. *Letters in Applied Microbiology* 37: 70-74

HOPE R, ALDRED D und MAGAN N (2005) Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Letters in Applied Microbiology* 40: 295-300

INNIS MA und GELFAND DH (1990) Optimization of PCR's. In: Innis MA (ed.) PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, pp. 3-12

ITAYA M, SHAHEDUZZAMAN SM, MATSUI K, OMORI A und TSUJI T (2001) Green marker for colonies of *Bacillus subtilis*. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry* 65: 579-583

JACKOWIAK H, PACKA D, WIWART M und PERKOWSKI J (2005) Scanning electron microscopy of *Fusarium* damaged kernels of spring wheat. *International Journal of Food Microbiology* 98: 113-123

JANSEN C, VON WETTSTEIN D, SCHÄFER W, KOGEL KH, FELK A und MAIER FJ (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of National Academy of Science USA* 102: 16882-16897

JARVIS WR (1988) *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* 69: 49-64

KANG Z und BUCHENAUER H (2002) Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *European Journal of Plant Pathology* 108: 653-660

KLOSE J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* 26: 231-243

KONING AJ, ROBERTS CJ und WRIGHT RL (1996) Different subcellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* HMG-CoA reductase isozymes at elevated levels corresponds to distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations. *Molecular Biology of cell* 7: 769-789

KOSIAK B, TORP M, SKJERVE E UND ANDERSEN B (2004) *Alternaria* and *Fusarium* in norwegian grains of reduced quality-a matched pair sample study. *International Journal of Food microbiology* 93: 51-62

KRÄMER J (2002) Lebensmittel-Mikrobiologie; 4. Aufl.; Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

LAGOPODI AL, RAM AF J, LAMERS GEM, PUNT PJ, VAN DEN HONDEL CAMJJ, LUGTENBERG BJJ und BLOEMBERG GV (2002) Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Molecular Plant Microbe Interaction* 15: 172-179

LANGSETH W, STENIG H, STOIGN L und MO E (1993) Growth of moulds and production of mycotoxins in wheat during drying and storage. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B* 43: 32-37

LARSEN TO, SVENDSEN A und SMEDGAARD J (2001) Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3630-3635

LE GRICE S und SONENSHEIN AL (1982) Interaction of *Bacillus subtilis* RNA polymerase with a chromosomal promoter. *Journal of Molecular Biology* 162: 551-564

LEE HB und MAGAN N (1999 a) Environment factors influence *in vitro* interspecific interactions between *A. ochraceus* and other maize spoilage fungi, growth and ochratoxin production. *Mycopathologia* 146: 43-47

LEE HB und MAGAN N (1999 b) Environmental factors and nutritional utilization patterns affect niche overlap indices between *Aspergillus ochraceus* and other spoilage fungi. *Letters in Applied Microbiology* 28: 300-364

LEE HB und MAGAN N (2000) Impact of environmental and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. *International Journal of Food microbiology* 61: 11-16

LLORENS A, MATEO R, HINOJO MJ, VALLE-ALGARRA FM und JIMENEZ M (2004 a) Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. From spanish crops. *International Journal of Food Microbiology* 94: 43-54

LLORENS A, MATEO R, HINOJO MJ, LOGRIECO A und JIMENEZ M (2004 b) Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp.. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 253-260

LORANG JM, TUORI RP, MARTINEZ JP, SAWYER TL, REDMAN RS, ROLLINS JA, WOLPERT TJ, JOHNSON KB, RODRIGUEZ RJ, DICKMAN MB und CIUFFETTI LM (2001) Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1987-1994

MAGAN N, CAYLEY GR und LACEY J (1984) Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 1113-1117

MARIN S, MAGAN N, BELLI N, RAMOS AJ, CANELA R und SANCHIS V (1999) Two-dimensional profiles of fumonisin B₁ production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium*

proliferatum in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 51: 159-167

MARIN S, SANCHIS V, ARNAU F, RAMOS AJ und MAGAN N (1998 a) Colonization and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* 45: 107-117

MARIN S, SANCHIS V, RAMOS AJ, VINAS I und MAGAN N (1998 b) Environmental factors, *in vitro* interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research* 102: 831-837

MARIN S, SANCHIS V, RULL F, RAMOS AJ und MAGAN N (1998 c) Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. *Journal of Food Protection* 61: 1489-1496

MARIN S, SANCHIS V, SAENZ R, RAMOS AJ, VINAS I und MAGAN N (1998 d) Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. From maize grain. *Journal of Applied Microbiology* 84: 25-36

MATZ MV, FRADKOV AF, LABAS YA, SAVITSKY AP, ZARAIISKY AG, MARLEKOV ML und LUKYANOV SA (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Natural Biotechnology* 17: 969-973

MAYER S, VALERIU C, GAREIS M und USLEBER E (2006) Concentrations of airborne mycotoxins and toxicity of grain dust in grain handling companies. In: Grajewski J, Twaruzek M und Szymanska A (eds.) 28. Mykotoxin Workshop, Bydgoszcz, Polen

MCALLISTER CB, GARCIA-GARRIDO JM, GARCIS-ROMERA I, GODEAS A und OCAMPO JA (1996) *In vitro* interactions between *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* and *Glomus mosseae*. *Symbiosis* 20: 163-174

MEISINGER C, SOMMER T und PFANNER N (2000) Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Analytical Biochemistry* 287: 339-342

MILLER JD, APSIMON JW, BLACKWELL BA, GREENHALGH R und TAYLOR A (2001) Deoxynivalenol: a 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance. In: *Fusarium* - Paul E. Nelson Memorial Symposium edited by Summerell B A, Leslie J F, Backhouse D, Bryden W Lund Burgess L W. 1. Auflage The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA

MULLANEY EJ, HAMER JE, ROBERTI KA, YELTON MM und TIMBERLAKE WE (1985) Primary structure of the *trpC* gene from *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics* 199: 37-45

NAHALKOVA J und FATEHI J (2003) Red fluorescent protein (DsRed2) as a novel reporter in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters* 225: 305-309

NAKAMURA LK (1989) Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 295-300

- NAKAMURA LK, ROBERTS MS und COHAN FM (1999) Relationship of *Bacillus subtilis* clades associates with strains 168 and W 23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1211-1215
- NANDAKUMAR MP und MARTEN MR (2002) Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two- dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. *Electrophoresis* 23: 2216-2222
- NIESSEN L (2006) Molecular detection of ochratoxin A producers: an updated review. *Mycotoxin Research* 22: 48-53
- NIESSEN ML und VOGEL RF (1998) Group specific PCR-detection of potential trichothecene-producing *Fusarium* species in pure cultures and cereal samples. *Systematic and Applied Microbiology* 21: 618-631
- NIRENBERG HI (1976) Untersuchungen über die morphologische und die biologische Differenzierung der *Fusarium* –Sektion *Liseola*. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 169: 1-117
- O'DONNELL K, CIGELNIK E und CASPER HH (1998) Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genetics and Biology* 23: 57-67
- O'DONNELL K, KISTLER HC, TACKE BK und CASPER HH (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 97: 7905-7910
- O'FARRELL PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biology and Chemistry* 250: 4007-4021
- OREN L, EZRATI S, COHEN D und SHARON A (2003) Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein expressing transgenic isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1695-1701
- OSMAN M, EL-SHAYED A, MOHAMED YAH und METWALLY M (1992) Effect of various culture conditions on *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. Culture media, temperature, age and carbon source. *Microbios* 71: 15-26
- PAPANDRIKOPOULOU A (1991) Richtlinien zur Berechnung der Schmelztemperatur bei der Hybridisierung mit Oligonukleotid-Proben. In: Bertram S und Gassen HG (Hrsg.) *Gentechnische Methoden* Gustav Fischer Verlag, pp 225-226
- PARDO E, MARIN S, RAMOS A J und SANCHIS V (2006) Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates Predictive models for fungal spoilage prevention- a review. *Food Additives and Contaminants* 23: 398-410
- PESCHKE U, BEUCK V, BUJARD H, GENTZ R und LE GRICE S (1985) Efficient utilization of *Escherichia coli* transcriptional signals in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* 186: 547-555

- PETÄISTÖ RL, RISSANEN TE, HARVIMA RJ und KAJANDER EO (1994) Analysis of the protein of *Gremmeniella abietina* with special reference to protease activity. *Mycologia* 86: 242-249
- PHALIP V, DELALANDE F, CARAPITO C, GOUBET F, HATSCH D, LEIZE-WAGNER E, DUPREE P, VAN DORSSELAER A und JELTSCH J (2005) Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Current Genetics* 48: 366-379
- PHILLIPS CI und BOGYO M (2005) Proteomics meets microbiology: technical advances in the global mapping of protein expression and function. *Cell Microbiology* 7: 1061-1076
- PHILLIPS GJ (1999) New cloning vectors with temperature-sensitive replication. *Plasmid* 41: 78-81
- PITT JI (1987) *Penicillium viridicatum*, *P. verrucosum* and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 266-269
- PLACINTA CM, D'MELLO JPF und MACDONALD AMC (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78: 21-37
- PRACHAIYO P und MCLANDBOROUGH A (2000) A microscopic method to visualize *Escherichia coli* interaction with beef muscle. *Journal of Food Protection* 63: 427-433
- PRANGE A (2004) Lebensmittelmykologische und röntgenabsorptionsspektroskopische Untersuchungen zum Einfluss phytopathogener Mykotoxin bildender Schimmelpilze auf die Kleberproteinstruktur und Backqualität von Weizen. Dissertation, Universität Bonn
- PROCTOR RH, DESJARDINS AE, MCCORMICK SP, PLATTNER RD, ALEXANDER NJ und BROWN DW (2002) Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 691-698
- PROCTOR RH, HOHN TM und MCCORMICK SP (1995 a) Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8: 593-601
- PROCTOR RH, HOHN TM, MCCORMICK SP und DESJARDINS AE (1995 b) *Tri6* encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and environmental Microbiology* 61: 1923-1930
- PUNT PJ, DINGEMANS MA, JACOBS-MEIJSSING BJM, POUWELS PH und VAN DEN HONDEL CAMJJ (1988) Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 69: 49-57
- PUNT PJ, OLIVER RP, DINGEMANS MA, POUWELS PH und VAN DEN HONDEL CAMJJ (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56: 117-124
- RABILLOUD T (1998) Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19 : 758-760
- RABILLOUD T, STRUB JM, LUCHE S, VAN DORSSELAER A und LUNARDI J (2001) A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1: 699-704

- RAMAKRISHNA N, LACEY J UND SMITH JE (1996) Colonizaion of barley grain by *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A formation in the presence of competing fungi. *Journal of food protection* 59: 1311-1317
- RAMIREZ ML, CHULZE S und MAGAN N (2006) Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two argentinian strains of *Fusarium graminearum* onirradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology* 106: 291-296
- RAPER KB, THOM C und FENNEL DI (1949) A manual of the *penicillia*. Williams & Wilkins, Baltimore
- REINARTZ M (2002) Physiologische, molekulargenetische und enzymatisch-proteinbiochemische Untersuchungen zum oxidativen Stoffwechsel in *Thiobacillus denitrificans* RT; Dissertation, Universität Bonn
- REIß, J (1998) Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. 2. Auflage Springer Verlag, Heidelberg
- ROTEM J (1994) The genus *Alternaria*. 1. Aufl. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA
- RYU D UND BULLERMAN LB (1999) Effect of cycling temperatures on the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* NRRL 5883. *Journal of Food Protection* 62: 1451-1455
- SAß V (2005) Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zur mikrobiellen Interaktion von *Fusarium graminearum* und *Alternaria alternata*. Diplomarbeit, Universität Bonn
- SAUTOUR M, SOARES MANSUR C, DIVIES C, BENSOUSSAN M und DANTIGNY P (2002) Comparison of the effects of temperture and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28: 311-315
- SCHÄFFER C, WUGEDITSCH T, MESSNER P und WHITFIELD C (2002) Functional expressin of enterobacterial O-polysaccharide biosynthesis enzymes in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4722-4730
- SCHILLING AG, MÖLLER EM und GEIGER HH (1996) Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Molecular Plant Pathology* 86: 515-522
- SCHWABE M und KRÄMER J (1995) Influence of water activity on the production of T2-toxin by *Fusarium sporotrichioides*. *Mycotoxin Research* 11: 35-39
- SCUDAMORE KA (2005) Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Additives and Contaminants, Suppl. I*: 17-25
- SHIMIZU M und WARIISHI H (2005) Development of a sample preparation method for fungal proteomics. *FEMS Microbiology Letters* 247: 17-22
- SHIMOMURA O, JOHNSON FH und SAIGA Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedus, *Aequorea*. *Journal of Cell Compartment Physiology* 59: 223-227

- SIMPSON DR, THOMSETT MA UND NICHOLSON P (2004) Competitive interactions between *Microdochium nivale* var. *majus*, *M. nivale* var. *nivale* and *Fusarium culmorum* in planta and in vitro. *Environmental Microbiology* 6: 79-87
- SKRIEGAN E (1995) Aufbereitung und Lagerung von Körnerfrüchten. Teil 4: Aufbereitung und Lagerung von Körnerfrüchten. *Die Mühle + Mischfüttertechnik* 23: 391-396
- SMITH K und YOUNGMAN P (1992) Use of a new integrational vector to investigate compartment-specific expression of the *Bacillus subtilis* *spoIIIM* gene. *Biochimie* 74: 705-711
- SNIJDERS CHA (1990) *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96: 187-198
- TORRES MR, RAMOS AJ, SOLER J, SANCHIS V und MARIN S (2003) SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 81: 185-193
- UENO Y, SAWANO M und ISHII K (1975) Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture. *Applied Microbiology* 30: 4-9
- VALERO A, FARRE JR, SANCHIS V, RAMOS AJ und MARIN S (2006) Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and a(w). *International Journal of Food Microbiology* 110: 160-164
- VAN DER MERWE KJ, STEYN PS, FOURIE L, SCOTT DB UND THERON JJ (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh.. *Nature* 205: 1112-1113
- WESSEL D und FLÜGGE UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* 138: 141-143
- WHEELER KA, HURDMAN BF und PITT JI (1991) Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 12: 141-149
- WUCHIYAMA J, KIMURA M und YAMAGUCHI I (2000) A trichothecene efflux pump encoded by *Tri102* in the biosynthetic gene cluster of *Fusarium graminearum*. *Journal of Antibiotics* 53: 196-200
- XUE G, JOHNSON JS und DALRYMPLE BP (1999) High osmolarity improves the electrotransformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbiological Methods* 34: 183-191
- YAN JX, HARRY RA, SPILBEY C und DUNN MJ (2000) Postelectrophoretic staining of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using SYPRO dyes. *Electrophoresis* 21: 3657-3665
- ZUR G, SHIMONI E, HALLERMAN E UND KASHI Y (2002) Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Food Protection* 65: 1433-1440

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Krämer möchte ich für das interessante Thema und die Bereitstellung von Arbeitsplatz sowie Arbeitsmaterialien und darüber hinaus für das entgegengebrachte Vertrauen danken.

Herrn Prof. Dr. Erwin A. Galinski danke ich besonders für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Für die praktische Betreuung der Arbeit und die zahlreichen Diskussionen und fachlichen Hinweise möchte ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. A. Prange bedanken.

Frau Dr. U. Steiner-Stenzel, INRES, Universität Bonn, möchte ich herzlich für die mikroskopischen Aufnahmen von *F. graminearum* danken.

Herrn R. H. Proctor, Mycotoxin Research Unit, National Center for Agriculture Utilization Research, Preoria, Illinois, USA, danke ich sehr für die Überlassung der drei *F. graminearum* Stämme Z3639, GZT-33 und GZT-40.

Herrn P. Punt, TNO Medical Biological Laboratory, Rijswijk, Niederlande danke ich für den Vektor pAN7-1, den er mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Bei Herrn P. Babitzke, Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Pennsylvania State University, USA bedanke ich mich für den Vektor pKSV7, den er mir nebst Informationen hat zukommen lassen.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Lebensmittel-mikrobiologie möchte ich mich herzlich für die stetige Unterstützung, die interessanten Gespräche sowie die nette Atmosphäre bedanken.

An alle Mitarbeiter des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie geht mein Dank für die gute Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft, besonders was das Ausleihen von Geräten angeht, und das angenehme Arbeitsklima.

Den beiden LTA-Auszubildenden Frau Marisa Güttler und Frau Allegra Sellmer danke ich für ihre sorgfältigen Arbeiten im Labor während ihrer Ausbildungsstation in der Abteilung Lebensmittelmikrobiologie.

Für die finanziellen Mittel für Teile dieser Arbeit geht mein Dank an die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Dem Cusanuswerk sage ich Dank für die Unterstützung meiner Arbeit mit einer Graduiertenförderung sowie für die zahlreichen außerdisziplinären Anregungen.

Abschließend möchte ich mich in besonderer Weise bei meiner Familie, vor allem bei meinem Mann Frank Milles bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Veröffentlichungen

Tagungsbeiträge

MILLES J (2004) Mikrobielle Interaktionen verschiedener Schimmelpilze und Bakterien in Bezug zur Mykotoxinbildung. Vortrag im Rahmen der XVIII. Wissenschaftlichen Jahrestagung des Instituts für Pflanzenkrankheiten

MILLES J, BIRZELE B, KRÄMER J und PRANGE A (2004) Variation of physiological parameters and influence on growth and mycotoxin production of *Fusarium graminearum*. Posterbeitrag im Rahmen des Symposiums "Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittel-Mikrobiologie", Lemgo

SAß V, MILLES J, KRÄMER J und PRANGE A (2005) Simple and efficient cell disruption of extremely small quantities of mycelium from phytopathogenic mycotoxin-producing moulds for quantitative extraction of genomic DNA. Posterbeitrag im Rahmen des 27. Mykotoxin-Workshops, Dortmund

MILLES J, KRÄMER J und PRANGE A (2006) *Fusarium graminearum* in competitive interaction with other fungi in suboptimal stored wheat. Vortrag im Rahmen des 28. Mykotoxin-Workshops, Bydgoszcz, Polen

MILLES J, KRÄMER J und PRANGE A (2006) Development of Deoxynivalenol and Zearalenone contents in microbial interactions of *Fusarium graminearum* with storage fungi on wheat. Posterbeitrag im Rahmen des 20. International ICFMH Symposium (FoodMicro), Bologna, Italien

MILLES J, KRÄMER J und PRANGE A (2007) Development of a proteomic approach to monitor protein expression in mycotoxin producing moulds. Posterbeitrag im Rahmen des 29. Mykotoxin-Workshops, Stuttgart (in Vorbereitung)

Artikel

SAß V, MILLES J, KRÄMER J und PRANGE A (2005) Simple and efficient cell disruption of extremely small quantities of mycelium of phytopathogenic mycotoxin-producing moulds for quantitative extraction of genomic DNA *Mycotoxin Research*, 21: 213-217

SAß V*, MILLES J*, KRÄMER J und PRANGE A (2007) Competitive interactions of *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* *in vitro* in relation to deoxynivalenol and zearalenone production. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5: 84-88
* both authors contributed equally to this work

MILLES J, KRÄMER J und PRANGE A (2007) *In vitro* interactions of *Fusarium graminearum*, *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* with regard on mycotoxin production (in Vorbereitung)

MILLES J, KRÄMER J und PRANGE A (2007) Impact of microbial interactions between field and storage fungi on growth and mycotoxin production in wheat grain (in Vorbereitung)

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und zur Anfertigung der Arbeit die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bonn, im Februar 2007