

REGULATION DER BIOSYNTHESE VON SEKUNDÄRMETABOLITEN
UND PRAKTISCHE NUTZUNG VON PFLANZENEXTRAKTEN AM BEISPIEL
VON *STREPTOMYCES BOTTROPENSIS* UND *PLASMOPARA VITICOLA*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Philip Bastian Kössler
geboren in Freiburg im Breisgau

Göttingen, Dezember 2009

D 7

1. Referent: PROF. DR. PETR KARLOVSKY
2. Korreferentin: PROF. DR. ELKE PAWELZIK

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Februar 2010

Die vorliegende Arbeit wurde an der Fakultät für Agrarwissenschaften, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Fachgebiet für Pflanzenschutz und Pflanzenpathologie, Abteilung Molekulare Phytopathologie und Mykotoxinforschung der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN in der Zeit von Mai 2006 bis Dezember 2009 angefertigt. Begleitet wurde die vorliegende Arbeit durch den Referenten PROF. DR. PETR KARLOVSKY sowie der Korreferentin PROF. DR. ELKE PAWELZIK. Teile der Arbeit wurden ferner am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT in der Abteilung von PROF. DR. STEPHANIE GROND durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Boden als Lebensraum für Mikroorganismen.....	1
1.2	Actinobakterien im Ökosystem Boden.....	2
1.3	Actinomyceten oder Actinobakterien?	3
1.3.1	Taxonomie	3
1.3.2	Morphologie.....	4
1.3.3	Molekulare Phylogenie.....	5
1.4	Sekundärmetaboliten aus <i>Streptomyces</i> sp. in biologischer Interaktion.....	6
1.5	Regulierung pflanzenfördernder Symbiosen durch <i>Streptomyces</i>	9
1.6	Pflanzenpathogene Streptomyceten.....	10
1.7	Einsatz von <i>Streptomyces</i> sp. als Antagonist im Pflanzenschutz	11
1.8	Taxonomische Einordnung von <i>Plasmopara viticola</i>	12
1.9	Primärer und sekundärer Entwicklungszyklus von <i>Plasmopara viticola</i>	13
1.10	Historie und Bekämpfung von <i>Plasmopara viticola</i> in Europa	16
1.11	Pflanzeninhaltsstoffe als Quelle neuartiger Pflanzenschutz-mittel.....	18
1.12	Aufgabenstellung	22
2	Material und Methoden	25
2.1	Instrumentelle Analytik	25
2.1.1	Elektronenspektren (UV).....	25
2.1.2	Infrarotspektren (IR)	26
2.1.3	Kernresonanzspektren.....	26
2.1.4	Massenspektren	27

2.2	Chromatographie	28
2.2.1	Lösungsmittel.....	28
2.2.2	Dünnschichtchromatographie (DC) und Anfärbereagenzien.....	28
2.2.3	Säulenchromatographie (SC)	29
2.2.4	Mitteldruckchromatographie (MPLC)	29
2.2.5	Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC)	29
2.2.6	HPLC mit ESI-MS-Kopplung (HPLC-MS).....	30
2.2.7	HPLC Säulen, Programme und Laufmittelsysteme	30
2.3	Mikrobiologische und Molekulargenetische Geräte & Analytik	33
2.3.1	Fermentationseinheiten	33
2.3.2	Inkubatoren	33
2.3.3	Zentrifugen.....	34
2.3.4	Weitere Gerätschaften.....	34
2.4	Reagenzien, Nährmedien und organische Lösungsmittel	35
2.4.1	Reagenzien, Lösungen und organische Lösungsmittel.....	35
2.4.2	Nährmedienbestandteile und Nährmedien.....	36
2.5	Versuchspflanzen (Anzucht, Pflanzenschutz, Sterilisation)	40
2.5.1	Weinrebe (<i>Vitis vinifera</i> L. cv ‚Müller-Thurgau‘).....	40
2.5.2	Kartoffeln (<i>Solanum tuberosum</i> L. cv ‚Krone‘ und ‚Cilena‘).....	42
2.5.3	Radieschen (<i>Raphanus sativus</i> ssp. <i>sativus</i> ‚Sora‘)	43
2.5.4	Acker-Schmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i> ‚Columbia Zero‘)	43
2.6	Mikroorganismen (Inokulation und Stammhaltung)	44
2.6.1	Oomyceten.....	44
2.6.2	Streptomyceten	46
2.7	Versuchssubstanzen	50

2.7.1	Pflanzenextrakte	50
2.7.2	Sekundärmetaboliten phytopathogener <i>Streptomyces</i>	52
2.8	Methoden zur Testung der Wirkung von Pflanzenextrakten auf die Entwicklung von <i>Plasmopara viticola</i>	56
2.8.1	Vorbereitung des Pflanzenmaterials.....	56
2.8.2	Verdünnung und Applikation der Pflanzenextrakte	56
2.8.3	Inokulation von Blattscheiben	57
2.8.4	Sporulationsintensität	57
2.8.5	Real-Time PCR Untersuchungen zur Biomassenbestimmung von <i>Plasmopara viticola</i> im Wirtsgewebe	58
2.9	Fütterungsversuche an phytopathogenen Streptomyces	63
2.9.1	Fütterung von NOS-Inhibitoren bei <i>S. bottropensis</i> Dra 17	63
2.9.2	Untersuchungen zum Einfluss cellobiosehaltiger Medien auf die Biosynthese von Iromycinen und Thaxtominen	72
2.10	Untersuchungen zur Regulierungsaktivität von Iromycinen	74
2.10.1	Real-Time PCR Untersuchungen zur Biomassebestimmung an <i>Streptomyces</i> spp.	75
2.10.2	Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Kartoffeln.....	79
2.10.3	Inokulation und Inkubation von Kartoffelscheiben	79
2.10.4	Erstellung einer Fermentationskurve auf Kartoffelscheiben	80
2.10.5	Untersuchungen zur Virulenz verschiedener <i>Streptomyces</i> spp.	81
2.10.6	Untersuchungen zum Einfluss von Iromycin A und Thaxtomin A auf die Keimung von Radieschen (<i>Raphanus sativus</i> ssp. <i>sativus</i> ‚Sora‘).....	83
2.10.7	Untersuchungen zum Einfluss von Iromycin A und Thaxtomin A auf die Keimung des Acker-Schmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>).....	85
2.11	Statistische Datenauswertung.....	86

3	Ergebnisse	87
3.1	Ergebnisse zur Anzucht und Handhabung der Versuchspflanzen	87
3.1.1	Weinrebe (<i>Vitis vinifera</i> L. cv ‚Müller-Thurgau‘).....	87
3.1.2	Kartoffeln (<i>Solanum tuberosum</i> L. cv ‚Krone‘ und ‚Cilena‘).....	88
3.1.3	Radieschen (<i>Raphanus sativus</i> ssp. <i>sativus</i> ‚Sora‘) und Acker-Schmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i> ‚Columbia Zero‘).....	89
3.2	Optimierung der Inokulation sowie der Stammerhaltung von Versuchsorganismen	89
3.2.1	Oomyceten.....	89
3.2.2	Streptomyceten.....	90
3.3	Optimierung der Extraktion von Pflanzenextrakten sowie Charakterisierung von Einzelmetaboliten	91
3.3.1	Optimierung der Extraktion von Pflanzenextrakten.....	91
3.3.2	Charakterisierung von Sekundärmetaboliten aus phytopathogenen Streptomyceten.....	93
3.4	Darstellung der Wirkung von Pflanzenextrakten auf die Entwicklung von <i>Plasmopara viticola</i>	99
3.4.1	Auswirkung der Extraktionsmethode auf die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten.....	99
3.4.2	Biologische Wirkung unterschiedlicher „Extraktformen“.....	102
3.4.3	Einfluss von Lösungs- und Netzmitteln auf die Wirksamkeit.....	103
3.4.4	Besiedlungsintensität des Wirtsgewebes.....	104
3.5	Fütterungsversuche mit phytopathogenen Streptomyceten	106
3.5.1	Fütterung von NOS-Inhibitoren bei <i>S. bottropensis</i> Dra 17.....	106
3.5.2	Fütterungen von NOS-Inhibitoren bei <i>Streptomyces scabies</i> 1/3.....	113

3.5.3	Einfluss cellobiosehaltiger Medien auf die Biosynthese von Iromycinen und Thaxtominen	118
3.6	Untersuchungen zur Regulierungsaktivität von Iromycinen <i>in planta</i>	120
3.6.1	Optimierung Inokulation und Inkubation von Kartoffelscheiben	120
3.6.2	Fermentationskurve auf Kartoffelscheiben	122
3.6.3	Phytopathogenität verschiedener Streptomycceten Stämme	127
3.6.4	Screening phytopathogener Streptomycceten auf die Produktion von Iromycinen und Thaxtominen in Flüssigkulturen.....	130
3.6.5	Einfluss von Iromycin A und Thaxtomin A auf die Keimung von Radieschen (<i>Raphanus sativus</i> ssp. <i>sativus</i> , Sora')	131
3.6.6	Einfluss von Iromycin A und Thaxtomin A auf die Keimung des Acker-Schmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i> , Columbia Zero')	139
4	Diskussion	143
4.1	Praktische Nutzung von Pflanzenextrakten am Beispiel von <i>Plasmopara viticola</i> .	143
4.1.1	Pflanzenstärkungsmittel eine Alternative im ökologischen Weinbau?	143
4.1.2	Auswahl der Pflanzen zur Extraktbereitung.....	145
4.1.3	Extraktion von Inhaltsstoffen aus pflanzlichem Gewebe	146
4.1.4	Untersuchungen zur Wirkung pflanzlicher Extrakte auf die Entwicklung von <i>Plasmopara viticola</i>	149
4.1.5	Ausblick	150
4.2	Regulation der Biosynthese von Sekundärmetaboliten am Beispiel von <i>Streptomyces bottropensis</i>	151
4.2.1	Taxonomie von <i>Streptomyces</i> sp. Dra 17	151
4.2.2	Sekundärmetaboliten aus <i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	152
4.3	Iromycin – ein neuer bioaktiver α-Pyridon Metabolit	154

4.3.1	Iromycin als Inhibitor des Komplex I der Atmungskette.....	154
4.3.2	Iromycin als Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS).....	155
4.3.3	Bekannte selektive NOS-Inhibition von Iromycinen.....	159
4.4	Thaxtomin A – ein Phytotoxin als Virulenzfaktor	160
4.4.1	Biosynthese von Thaxtomin A.....	162
4.4.2	Konservierung des Thaxtomin-Genclusters auf einer Pathogenen Insel (PAI)....	163
4.5	Fütterungsversuche zu phytopathogenen Streptomyceten	166
4.5.1	Fütterung von NOS-Inhibitoren an <i>S. bottropensis</i> Dra 17	166
4.5.2	Fütterung von NOS-Inhibitoren bei <i>Streptomyces scabies</i> 1/3.....	169
4.5.3	Einfluss cellobiosehaltiger Medien auf die Produktion von Iromycinen und Thaxtominen	172
4.6	Untersuchungen zur Regulationsaktivität von Iromycinen <i>in planta</i>.....	174
4.6.1	Inokulation von Kartoffeln, Extraktion von Sekundärmetaboliten und quantitative Bestimmung der bakteriellen Biomasse mittels Real-Time PCR.	175
4.6.2	Fermentationskurve auf Kartoffelscheiben	177
4.6.3	Phytopathogenität verschiedener Streptomyceten.....	179
4.6.4	Einfluss von Iromycin A und Thaxtomin A auf die Keimung von Radieschen und Ackerschmalwand.....	180
5	Zusammenfassung	183
5.1	Praktische Nutzung von Pflanzenextrakten am Beispiel von <i>Plasmopara viticola</i>	183
5.2	Regulation der Biosynthese von Sekundärmetaboliten am Beispiel von <i>Streptomyces bottropensis</i>	185
6	Literatur.....	189
7	Lebenslauf	A

8	Danksagung.....	C
9	Erklärungen.....	D

1 EINLEITUNG

1.1 Boden als Lebensraum für Mikroorganismen

Böden stellen nach Definition den oberen, lockeren, porösen Teil der festen Erdrinde dar. Als offene Systeme von spezifischer Struktur und Funktion stehen Böden im intensiven Stoff- und Energieaustausch mit angrenzenden Systemen (Hydro-, Litho-, Bio- und Atmosphäre) (SCHINNER & SONNLEITNER, 1996).

Sie bestehen aus festen, flüssigen und gasförmigen, anorganischen, organischen, lebenden und toten Bestandteilen von unterschiedlicher Größe und Qualität.

Böden sind Lebensraum für Bakterien, Pilze, Schleimpilze, Viren, Algen, Protozoen und Nematoden. Flechten, welche als Bodenbesiedler ebenfalls gefunden werden, stellen Lebensgemeinschaften zwischen Pilzen und Algen beziehungsweise Pilzen und Cyanobakterien dar. Die genannten Organismen werden als „Bodenleben“ oder Edaphon definiert.

Hiervon ausgeschlossen werden im Boden wurzelnde Pflanzen, welche dennoch einen wesentlichen Einfluss auf das Edaphon nehmen. Die Bodenfruchtbarkeit und der damit einhergehenden Eignung als Pflanzenstandort wird weitgehend durch die Aktivität der Bodenorganismen bestimmt (SCHINNER & SONNLEITNER, 1996).

Nach heutigem Stand der Wissenschaft sind Bodenbakterien die zahlenmäßig am stärksten vertretene Gruppe der Bodenorganismen. Schätzungen zufolge ist von den natürlich

vorkommenden Bakterien lediglich 1 % bis 10 % mit Hilfe konventioneller Medien im Labor kultivierbar. Ferner wird davon ausgegangen, dass weniger als 0,1 % der im Boden vorkommenden Bakterienarten bekannt sind. Literaturangaben zur Zahl der pro Gramm Boden nachgewiesenen Bakterien liegen zwischen 10^7 und 10^9 (ohne Actinobakterien). Für die Bakteriengruppe der Actinobakterien werden Populationen von 10^6 bis 10^8 angenommen (TORSVIK et al., 1990).

Standortfaktoren wie Feuchte, Belüftung, Temperatur, Textur, Verfügbarkeit von organischer Substanz, Basensättigung, Bodenreaktion sowie das Angebot an anorganischen Nährstoffen steuern die Qualität und Quantität der auftretenden Bodenbakterien.

Neben den beschriebenen Standortfaktoren sind das Auftreten sowie die Verteilung von Bodenbakterien auf landwirtschaftlichen Nutzflächen zudem stark von der Bodenbearbeitung beeinflusst:

Auf unbearbeiteten mineralischen Böden der gemäßigten Klimazone werden Bakterien fast ausschließlich im oberen Meter, meist sogar nur in den oberen Zentimetern nachgewiesen. Landwirtschaftlich bearbeitete Böden hingegen weisen eine weniger stark ausgeprägte Schichtung der Organismen im Profil auf. Häufig kommt es hier zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Bakterien auch bis in untere Bodenschichten (SCHINNER & SONNLEITNER, 1996). Aufgrund der durch die Bodenbearbeitung veränderten Standortfaktoren, speziell Temperatur, Feuchtigkeit sowie Belüftung, bilden Bodenbakterien unter diesen Bedingungen Ruhestadien wie beispielsweise Sporen oder Zysten aus, was sie zur langfristigen Überdauerung befähigt.

1.2 Actinobakterien im Ökosystem Boden

Die Actinobakterien repräsentieren eine wichtige im Boden auftretende Gattung von Bodenbakterien (SCHINNER & SONNLEITNER, 1996). Mehr als 500 verschiedene Arten wurden bislang beschrieben. Actinobakterien sind saprophytisch lebende Organismen, welche den Großteil ihres Lebenszykluses als halbruhende Spore verbringen (MAYFIELD et al. 1972).

Zu den Actinobakterien zählen im engeren Sinne Bakterien, welche ein mycelartiges Wachstum aufweisen. Im weiteren Sinne schließen Actinobakterien auch Bakterien ein, welche kein mycelartiges Wachstum aufweisen. Diese gehören meist zur Gruppe

grampositiver Aerobier. Actinobakterien sind zudem durch eine Reihe von Übergangsformen mit den coryneformen Bakterien sowie den Mykobakterien verbunden. Im Boden verbreitet auftretende Actinobakterien gehören den Gattungen *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Thermoactinomyces* und *Nocardia* an. Allgemein sind Actinobakterien für den komplexen Abbau organischer Substrate, einschließlich Cellulose, Chitin sowie anderer schwer zersetzbarer Stoffe im Boden, von großer Bedeutung. Hierbei spielen in erster Linie die Gattungen *Arthrobacter* und *Cellulomonas* eine entscheidende Rolle.

Neben dem Abbau komplexer organischer Substanzen zeichnen sich Actinobakterien durch diverse symbiontische bzw. parasitäre Lebensweisen aus: So bildet die Gattung *Frankia* mit extremophilen Bäumen und Sträuchern durch Stickstofffixierung eine Symbiose (SCHINNER & SONNLEITNER, 1996). Dem entgegengesetzt liegen bei der Gattung *Streptomyces* mehrere Berichte zu parasitärer sowie phytopathologischer Lebensweise vor (GOYER et al. 1998; Secondary metabolites in soil, capt. 6). Hintergrund sowohl bei symbiontischer als auch parasitärer Lebensweise ist die Bildung diverser, häufig antibiotisch aktiver Sekundärmetaboliten.

1.3 Actinomyceten oder Actinobakterien?

1.3.1 Taxonomie

Die Klassifizierung dieser Bakterien war über eine lange Zeit hinweg uneinheitlich und ist bis heute umstritten (WARNECKE, 2005). Hierzu zählt auch eine von STACKEBRAND et al. (1997) verfasste Definition der taxonomischen Einheit der Klasse der Actinobacteria. Zuvor wurde – und wird teilweise noch heute – diese Gruppe synonym als Actinomyceten bezeichnet. Der Name Actinomyceten beruht auf den griechischen Bezeichnungen *aktis* (Strahl) und *mykes* (Pilz) und bedeutet somit ‚Strahlenpilz‘ (SCHEELE & BOSS, 1999). Hintergrund hierbei sind die morphologischen Eigenschaften der Kolonien einiger Gattungen der Actinobakterien.

Die Actinobakterien stellen im Bezug auf ihre Morphologie und Physiologie eine äußerst vielseitige Gruppe von Prokaryonten dar. In der Vergangenheit war die Klassifizierung dieser Mikroorganismen höchst uneinheitlich. Sogar bis heute konnte man sich final nicht auf eine einheitliche Bezeichnung (Actinobakterien oder Actinomyceten) einigen, wodurch beide Begriffe, auch in aktueller Literatur vertreten sind.

Im Jahr 1997 wurde von STACKEBRANDT die taxonomische Klasse der Actinobakterien eingeführt und anhand molekulargenetischer Untersuchungen belegt. Hintergrund der Bezeichnung Actinobakterien sind die morphologischen Eigenschaften einiger Gattungen innerhalb dieser Klasse: so wachsen beispielsweise einige Streptomyceten in pilzähnlichen Strahlen nach außen und wurden somit irrtümlich als ‚Strahlenpilze‘ bezeichnet. Actinobakterien weisen jedoch die für Prokaryoten typischen Ribosomen und somit auch eine 16S ribosomale RNA auf (STACKEBRANDT et al., 1997). Ferner sind Actinobakterien häufig sensitiv gegenüber Antibiotika, welche den prokaryotischen Stoffwechsel angreifen und weisen außerdem eine Resistenz gegenüber antifungalen Substanzen auf. Weiterhin verfügen einige Actinobakterien über einen chemoautotrophen Metabolismus, welcher bei Pilzen nicht vorkommt (LECHEVALIE & LECHEVALIER, 1967).

1.3.2 Morphologie

Wie bereits beschrieben, beruhte die Bezeichnung Strahlenpilz auf morphologischen Untersuchungen bei den Gattungen Streptomyces- und Micromonospora. Beide bilden verzweigte Hyphen, aus denen ein pilzähnliches Mycelium auf der Substratoberfläche entsteht. Zusätzlich bilden einige Spezies Sporen, welche aus der Differenzierung der terminalen Hyphenzellen entstehen. Ferner wird bei einigen Arten neben dem beschriebenen Substratmycelium ein Luftmycelium (Pseudomycel) gebildet, welches die Sporen trägt und hierdurch für eine verbesserte Verbreitung sorgt.

Neben der Darstellung des Mycels unterscheiden sich einige Arten zusätzlich in der Struktur der Sporenträger, was außerdem als morphologisches Merkmal bei der Identifikation dienen kann (PARENTI & CORNELLI, 1979). Sporen von Actinobakterien sind extrem trockenresistent, verfügen aber über eine sehr niedrige Wärmetoleranz (MCBRIDE et al., 1987). Die Bildung von Sporen erfolgt in erster Linie zur Überdauerung ungünstiger Umwelteinflüsse. Ferner

wird aber auch über eine verbesserte Verbreitung des Bakteriums spekuliert (KRSEK et al., 2000). Ebenfalls zur verbesserten Verbreitung dienen die hierzu ausgebildeten Geißeln bzw. die Ausbildung einer hydrophoben Hülle, welche das Anheften und den Transport durch Gliederfüßler im Boden erleichtert. Der Aufbau der Zellwand entspricht dem eines grampositiven Prokaryoten (SINGLETON UND SAINSBURY, 2001) und lässt sich teilweise auch zur chemotaxischen Klassifizierung heranziehen. So unterscheiden sich grampositive Bakterien beispielsweise in der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der Zellwand (CUMMINS & HARRIS, 1956). Ferner findet man bei verschiedenen Actinobakterien Unterschiede bei ihren Peptidoglycanen, nicht nur im Bezug auf die Detektierbarkeit bestimmter Aminosäuren, sondern auch bei der Art der verknüpften Zuckermoleküle.

1.3.3 Molekulare Phylogenie

Ein wichtiges Merkmal zur Differenzierung grampositiver Bakterien ist der molare Anteil der Basen Guanin (G) und Cytosin (C) in ihrer genomischen DNA. Man unterscheidet hierbei in Gruppen mit niedrigem- und hohem GC-Gehalt, wobei Actinobakterien ausnahmslos zur Gruppe mit hohem GC-Gehalt gezählt werden. Die Bestimmung des Guanin- und Cytosingehaltes in der DNA erfolgt experimentell durch thermale Denaturierung im Cäsiumchlorid-Gradienten (SCHLEIFER & STACKEBRAND, 1983). Der GC-Gehalt bei Actinobakterien liegt danach zwischen 50 % und 78 % (STRACKEBRAND et al., 1997).

Die molekulargenetische Unterscheidung der Actinobakterien wurde zunächst durch Katalogisierung von ribosomalen RNA-Fragmenten durchgeführt (STACKEBRAND & WOESE, 1981). Hierzu wurde die 16S rRNA mittels Guanin-spezifischer Ribonuclease T1 verdaut, die entstandenen Fragmente getrennt und sequenziert. Anhand dieser Methode war es nun möglich, Actinobakterien in ein phylogenetisches System einzuordnen. Diese bestätigte die nahe Verwandtschaft grampositiver Bakterien sowie eine Aufspaltung in GC-reiche bzw. GC arme Linien. Durch die heutige Technologie auf dem Gebiet der Sequenzierung ist es nunmehr möglich anhand der gesamten 16S rRNA die Bestimmung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Bakterien heranzuziehen. Hieraus ergab sich

1997 eine neue Einheit der Klasse der Actinobakterien ein sowie daraus resultierend ein neues Klassifikationssystem (STACKEBRAND et al., 1997).

1.4 Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces* sp. in biologischer Interaktion

Im Ökosystem Boden ist die Gattung *Streptomyces* spp. allgegenwärtig – insgesamt wurden bis heute als 500 verschiedene Spezies beschrieben. Streptomyceten gelten als saprophytisch lebende Organismen, welche den Großteil ihres Lebenszyklus als Dauerspore verbringen (MAYFIELD et al. 1972). Im Laufe ihres Lebenszyklus beginnen die Sporen zu keimen und bilden ein sogenanntes Substratmycel. Ferner verwendet *Streptomyces* extrazelluläre hydrolytische Enzyme, um organische Komponenten aufzuschließen und anschließend zu verstoffwechseln.

Streptomyceten sind neben ihrer ‚einfachen‘ Lebensweise speziell für ihre Fähigkeit bekannt, ein großes Spektrum an Sekundärmetaboliten zu synthetisieren. (GOODFELLOW & WILLIAMS, 1983; BERDY, 2005). Die Biosynthese dieser Substanzen wird häufig durch Umwelteinflüsse sowie durch physiologische Signale beeinflusst. Diese wiederum lösen, speziell gegen Ende der Wachstumsphase sowie zu Beginn der Sporulation, bei Streptomyceten vielfach die Entwicklung eines Luftmycels aus. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Produktion von Sekundärmetaboliten und der Verfügbarkeit von Nährstoffen, im Speziellen von Phosphat, konnte von BIBB (2005) nachgewiesen werden.

BERDY (1974) führte in diesem Zusammenhang die erste Nomenklatur zur Struktur-Wirkungsbeziehung antibiotischer Substanzen ein. SANGLIER et al. (1996) erkannten, dass sowohl hoch- als auch niedermolekulare Metaboliten aus 63 unterschiedlichen chemischen Klassen durch *Streptomyces* synthetisiert werden. Hierunter finden sich unter anderem Grundstrukturen, welche bisher bei keiner anderen Art gefunden wurden bzw. welche nicht einfach chemisch zu synthetisieren sind. Bis Mitte der 90er Jahre stieg die Zahl neuartiger Sekundärmetaboliten kontinuierlich, doch wurden seither nur noch wenige neue Stoffgruppen dargestellt (BERDY, 2005).

Neben einer antibiotischen Wirkung zeigen Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces* zudem diverse andere biologische Aktivitäten. Hierbei lassen sich diese in vier Kategorien unterteilen:

- antagonistisch wirksame Substanzen inklusive Antibiotika sowie Stoffe mit antifungischer, antiprotozoischer und antiviraler Wirkung
- pharmazeutische Substanzen inklusive Antitumorpräparate, Immunmodulatoren, neurologisch aktiver Substanzen sowie Enzyminhibitoren
- Pflanzenschutzmittel, inklusive Insektizide, Fungizide und Herbizide
- Substanzen mit regulatorischer Aktivität wie beispielsweise siderophore Stoffe und Wachstumsregulatoren

Um das weitere Feld von Bioaktivitäten, teilweise gepaart mit Kreuzaktivitäten zu ergründen, wurden in den letzten Jahren verstärkt pharmazeutische und agrarbiologische Assays mit antibakteriellen Tests kombiniert. Diese führten neben neuen therapeutischen und agrarwissenschaftlichen Ansätzen auch zu im Vorfeld unbekanntem biologischen Aktivitäten der Sekundärmetaboliten (SANGLIER et al., 1996; BERDY, 1995, 2005).

In den nächsten Jahren wird daher speziell dem Feld der Bioregulation von Sekundärmetaboliten im natürlichen Habitat eine immer größere Rolle zufallen.

Neben der unumstrittenen Bedeutung biologisch aktiver Substanzen im natürlichen Habitat leisten Naturstoffe auch auf der Grundlage der traditionellen als auch der modernen Medizin einen entscheidenden Beitrag bei der Gesundheitsvorsorge (GURIP-FAKIM, 2006; DEMAIN & SANCHEZ, 2009). Hierbei ist die Bedeutung von Naturstoffen für therapeutische Anwendungen gut dokumentiert. Alleine bei neuartigen Arzneimitteln welche zwischen den Jahren 1981 und 2007 zugelassen wurden zeigt sich, dass über 50 % der absatzstärksten Produkte auf dem westlichem Markt auf Naturstoffe zurückzuführen sind oder Naturstoffe als Leitstruktur für das Wirkstoffdesign dienten (NEWMAN, & CRAGG, 2007; CHIN et al., 2006).

Der Bedarf an neuartigen Substanzen, speziell neuartiger Wirkstoffgruppen ist besonders vor dem Hintergrund auftretender Resistenzen unbestritten. Die Sekundärmetaboliten verschiedener Organismen zeigen bei der Suche nach neuen Wirkstoffen eine oft

überraschende Strukturdiversität. Eine Begründung hierfür sind die ungewöhnlich komplexen Biosynthesewege, welche bei der Biosynthese dieser Stoffe beschriftet werden (HENKEL, et al., 1999; SHU, 1998; FISCHBACH & WALSH, 2009).

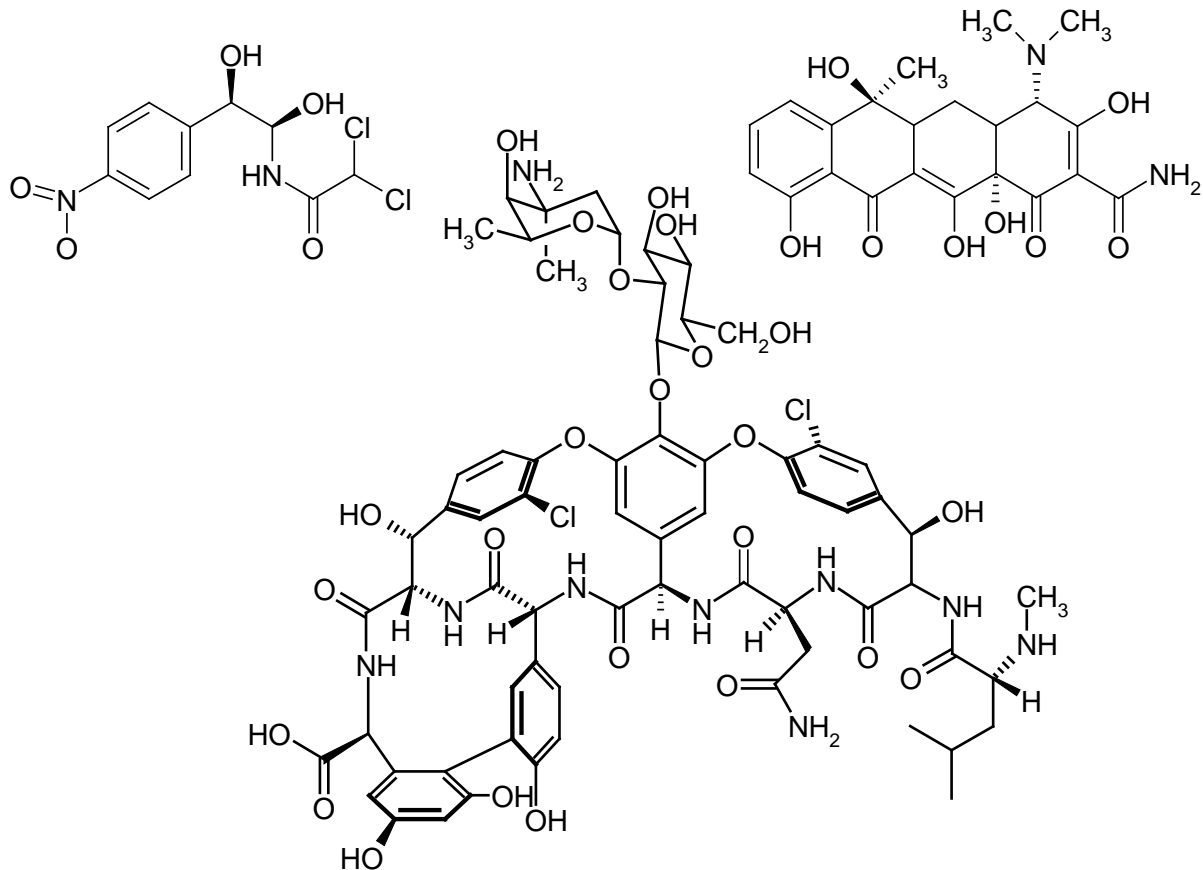


Abbildung 1: Strukturformeln bedeutender antibiotisch wirksamer Naturstoffe: (oben links) Chloramphenicol aus *Streptomyces venezuelae*, Wirkstoffklasse: Translationshemmer; (oben rechts) Tetracyclin, aus *Streptomyces aureofaciens*, Wirkstoffklasse: Translations- und Biosynthesehemmer; (unten Mitte) Vancomycin isoliert aus *Amycolatopsis orientalis*, Wirkstoffklasse: Hemmung des Aufbaus der Bakterienzellwand.

Neben dem Interesse an neuen Wirkstoffgruppen und Naturstoffstrukturen sind in den vergangenen Jahren jedoch die ursprünglichen Zusammenhänge der Sekundärstoffproduktion in den Hintergrund getreten. Dabei stellen nicht nur die für die Landwirtschaft ökologischen Gefüge des mikrobiellen Stoffwechsels sowie deren Auswirkungen auf die Umwelt ein wichtiges Themenfeld der Zukunft dar. Die Diskussion zur Vielfalt des mikrobiellen Stoffwechsels - speziell bei ‚begabten Mikroorganismen‘ - hat

vor dem Hintergrund der Aufklärung des Gesamtgenoms verschiedener Produzentenstämme neue Aktualität gewonnen: So enthalten die Genome ungeahnt viele Informationen über bisher nicht erschlossenes Potential einer neuen Strukturdiversität sowie einer bis heute unüberschaubaren Vielzahl an Regulationsmechanismen (CHALLIS & HOPWOOD, 2003; FISCHBACH & WALSH, 2006).

1.5 Regulierung pflanzenfördernder Symbiosen durch *Streptomyces*

Mehrere Untersuchungen zur Interaktion zwischen symbiotischen Partnern und wurzelnahen Streptomyceten konnten einen direkten Einfluss des Bodenbakteriums belegen. Sowohl positive wie negative Einflüsse durch Streptomyceten konnten hierbei dokumentiert werden (WYSS et al., 1992; TOKALA et al., 2002, SCHREY et al., 2007).

Terrestrische Pflanzen entwickeln mit bodenbürtigen Pilzen häufig symbiotische Strukturen. Hierbei dient die Pflanze als Donator für Kohlenhydrate, während der Pilz die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen verbessert (HAMPP & SCHAEFFER, 1998; SMITH & READ, 1997).

Arbuskuläre Mykorrhiza (AM) sind eine besondere Form der Endomykorrhiza: typisch für diese häufigste Art von Mykorrhiza ist die Bildung von Arbuskeln – weit verzweigte, zarte Hyphen in Bäumchenform innerhalb der Wurzelzellen (SMITH & READ, 1997). Die meisten, durch Coinokulation an AM-Symbiosen getesteten Actinobakterien, einschließlich *S. griseoviridis*, unterdrückten die Keimung der AM Sporen. Hierdurch konnte die Entwicklung der Symbiose zwischen Pilz und Pflanze nachhaltig unterbrochen werden (MEYER & LINDERMANN, 1986; AMES, 1989). Im Gegensatz dazu konnte die Produktion von Mykorrhiza-fördernden Sekundärmetaboliten bei verschiedenen Streptomyceten nachgewiesen werden (MUGNIER & MOSSE, 1987). Hierbei wird die aktive Substanz über die Gasphase entlassen und stimuliert spezifisch die Entwicklung der AM (TYLKA et al., 1991). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei *S. coelicolor* und *Glomus interradices* an Hirse gemacht werden. Die endgültige Aufklärung der dafür verantwortlichen Sekundärmetaboliten steht bisher noch aus (ABDEL-FATTAH & MODAMEDIN, 2000).

1.6 Pflanzenpathogene Streptomyceten

Unter den über 500 beschriebenen Streptomyceten konnten bis heute lediglich vier verschiedene Spezies als direkte Pflanzenpathogene beschrieben werden. Diese Spezies *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* und *S. ipomoeae* stehen in einem genetisch engen verwandtschaftlichen Verhältnis. Ferner sind alle vier Spezies Verursacher des Kartoffelschorfes (LORIA et al., 1997). Diese Krankheit führt zu einer Reduktion des Wurzelwerkes sowie der Sprosslänge, radialer Schwellung der Wurzel, Chlorose-Erscheinungen des Gewebes sowie Nekrosenbildung. Problematisch hierbei sind weder Ernteeinbußen durch den direkten Befall der Knolle noch der Einfluss auf das vegetative Wachstum der Pflanze. Vielmehr spielen die Qualitätsminderung, die Verringerung der Lagerfähigkeit sowie die Schaffung von Eintrittspforten sekundärer Phytopathogene eine entscheidende Rolle. Untersuchungen zum Penetrationsmechanismus durch phytopathogene Streptomyceten wurden in den letzten Jahren vermehrt durchgeführt (JOSHI et al., 2006). Einen direkten Zusammenhang zwischen Symptomatik und der Produktion des zyklischen Dipeptides Thaxtomin A konnte unter anderem durch LORIA et al. (2004) beschrieben werden. Zwei wichtige Erkenntnisse unterstrichen hierbei die Rolle von Thaxtomin A bei der Entwicklung des Pathogens *in planta*: Einerseits konnten durch direkte Applikation von reinem Thaxtomin A identische Symptome wie beim Pathogen selbst hervorgerufen werden (LAWEWNCE et al., 1990; KING et al., 1992). Ferner konnte durch Mutanten von *S. scabies* gezeigt werden, dass die Virulenz des Pathogens stark mit der Biosynthese des Sekundärmetaboliten Thaxtomin A korreliert (GOYER et al., 1998).

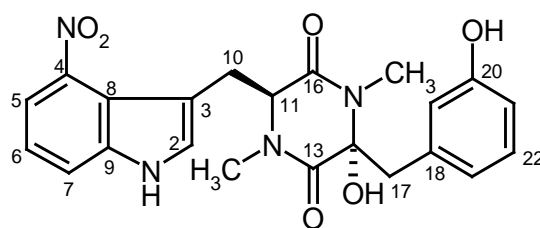


Abbildung 2: Strukturformel von Thaxtomin A

Pflanzenpathogene Streptomyceten verbindet im Weiteren eine ‚hochkonservierte Pathogene Insel‘ (PAI), welche bei allen vier Spezies zu finden ist. Dieses konnte durch Transformationsversuche mit nichtpathogenen Streptomyceten nachgewiesen werden (KERS et al., 2005). Die Aufklärung der Steuerung der Thaxtominproduktion ist speziell in den letzten Jahren stark vorangetrieben worden. Hauptaugenmerk lag hierbei auf der genetischen Kontrolle der Biosynthese, speziell auf Genabschnitten welche sensitiv auf Umwelteinflüsse (AraC/XylS-Regulatoren) reagieren (JOSHI et al., 2007). Ferner ist auch eine Regulation durch andere Sekundärmetaboliten nicht auszuschließen.

1.7 Einsatz von *Streptomyces* sp. als Antagonist im Pflanzenschutz

Zur biologischen Bekämpfung von Oomyceten, wie beispielsweise den Falschen Mehltau der Weinrebe (*Plasmopara viticola*), wurden bei Screening-Untersuchungen von TILCHER (1995) pilzwachstumshemmende Bakterien, unter anderem Streptomyceten, eingesetzt.

Hierbei zeigten *in vitro* Untersuchungen an *Phytophthora infestans*, *Plasmopara parasitica*, *Phythium ultimum* und *Botrytis cinerea* eine starke Abhängigkeit des antagonistischen Potentials eingesetzter Bakterienkulturen bezüglich des verwendeten Mediums. Dieser Effekt findet ebenfalls bei der sogenannten OSMAC (One Strain MAny Compounds) Methode Anwendung, wonach die chemische Variabilität der Sekundärmetaboliten von Bakterien, speziell von Actinobakterien, mit den Kulturbedingungen korreliert (BODE et al., 2002)

Untersuchungen mit dem obligat biotrophen Schadpilz *Plasmopara viticola*, dem Erreger des Falschen Mehltaus der Rebe, wurden auf Blattscheiben bzw. Blättern der Rebsorte Müller-Thurgau durchgeführt (TILCHER, 1995). Zum Einsatz kamen hierbei protektiv applizierte Organismen als Flüssigkultur, verdünntes Kulturfiltrat sowie verdünnter Bakteriensuspensionen. Alle getesteten Actinobakterien konnten sowohl in Labor als auch Gewächshausuntersuchungen den Befall mit dem Falschen Mehltau reduzieren. Ausgewählte Streptomyceten zeigten dabei Wirkungsgrade von 100 %, wobei die Applikationen des verdünnten Kulturfiltrates verhältnismäßig abfiel. Neben der beschriebenen Aktivität bei protektiver Applikation lagen die Wirkungsgrade bei kurativer Applikation bei etwa 80 % (TILCHER, 1995).

1.8 Taxonomische Einordnung von *Plasmopara viticola*

Wie bei anderen Pathogenen sind immer noch viele Einzelheiten zur Biologie des Erregers ungeklärt. So werden die Untersuchungen erschwert, da *P. viticola* als obligat biotropher Organismus nur auf lebenden Reorganen wächst und nicht auf künstlichen Nährmedien kultiviert werden kann (ALEXOPOULOS, 1966). Darüber hinaus findet ein Großteil der Entwicklung des Endoparasiten im Blattinneren statt. Nur ein relativ kurzer Abschnitt der Pathogenese ereignet sich an der Blattunterseite. Oomyceten zählten bis vor wenigen Jahren zu den Vertretern der echten Pilze. Neuere Untersuchungen, wie Sequenzvergleich der kleineren r-RNA-Untereinheit ergaben dagegen, dass *P. viticola* aufgrund seiner Ähnlichkeit zu goldbraunen Algen (GUNDERSON et al., 1987), die dem Reich der Chromista zugehörig ist (GAMS et al., 1998). Hierzu zählen hauptsächlich Algen mit heterokont begeißelten und beweglichen Planosporen. Die so genannte Flimmergeißel ist nach vorn gerichtet und von Mastigonemen bedeckt, während die nach hinten gerichtete Geißel als Peitschen- bzw. Schleppgeißel bezeichnet wird. Trotz der auffälligen Ähnlichkeit zu den echten Pilzen lassen sich die Oomyceten in vielerlei Hinsicht von diesen abgrenzen. So bestehen zum Beispiel die Zellwände echter Pilze aus Chitin, während sich die der Oomyceten hauptsächlich aus Cellulose zusammensetzen (FEVRE, 1979). Außerdem unterscheiden sie sich in den für die Integrität der Membran verantwortlichen Sterolen. Im Gegensatz zu den echten Pilzen liegt bei den Oomyceten kein Ergosterol vor. Die Membranen enthalten entweder kein Sterol bzw. Cholesterol und werden daher nicht, wie echte Pilze als Folge einer Wirt-Parasit-Wechselbeziehung von pflanzlichen Saponinen angegriffen (KAMOUN et al., 1999).

Neuere Untersuchungen hingegen zeigen, dass *P. viticola* in der Lage ist, Zwischenzellwände auszubilden, was für einen Oomyceten mit bekanntermaßen coenocytischem Myzel untypisch ist. So konnten am Übergang von der encystierten Zoospore zum Keimschlauch sowie an der Basis und an den Enden der Sporangienträger Septierungen nachgewiesen werden (KIEFER et al., 2002; KORTEKAMP, 2005). Die Septen bestehen aus Glukanen des Kallose-Typs, was mittels enzymatischer Techniken untersucht wurde (KORTEKAMP, 2005). Im Vergleich zu den „Echten“ Pilzen unterscheiden sich die Oomyceten hinsichtlich der Zellwandbestandteile: Sie besitzen β -1,3- und β -1,6-Glukane, Cellulose (β -1,4-Glukan) und nach neuesten Studien einen geringen Anteil an Chitin (AGRIOS, 2005; KORTEKAMP, 2008).

Die zur Sterolbiosynthese fehlenden Enzyme (Squalen Epoxidase und 14- α -Demethylase) sind ein weiteres wichtiges Charakteristikum der Oomyceten (AGRIOS, 2005; KORTEKAMP, 2008, ATTARD, 2008).

Plasmopara viticola gehört wie auch die als Pflanzenpathogene bedeutenden Gattungen *Pythium* und *Phytophthora* zur Ordnung *Peronosporales*. Kennzeichnend für diese Ordnung sind ein stark entwickeltes Myzel und enzystierende Planosporen, welche Keimschläuche ausbilden. Besonderes Merkmal der Familie der *Peronosporaceae* (Falsche Mehltäupilze) sind die verzweigten baumförmigen Sporangioophoren, die aus den Stomata der Wirtspflanze austreten.

1.9 Primärer und sekundärer Entwicklungszyklus von *Plasmopara viticola*

Der Primärzyklus, der in den vergangenen Jahren näher untersucht wurde (LOSKILL, 2003; GOBBIN et al., 2005; LOSKILL et al., 2005), beginnt mit dem Keimen der Oosporen. Diese werden ab August im befallenen Blattgewebe gebildet (LOSKILL, 2003). Durch ihre doppelte glucanhaltige Zellwand sind die Oosporen gegenüber abiotischen Umwelteinflüssen unempfindlich. Durch das Zusammentreffen zweier unterschiedlicher Paarungstypen im Wirtsgewebe, entstehen Oogonien und Antheridien (WONG et al., 2001; SCHERER & GISI, 2006). Durch die Verschmelzung von Oogonien und Antheridien sowie der sexuellen Rekombination kommt es zur Bildung der Oosporen (AGRIOS, 2005). Die Oosporen gelangen durch den Blattfall auf den Erdboden, werden durch die Zersetzung des Blattgewebes freigesetzt und überwintern in der obersten Bodenschicht. Nach einem Reifeprozess können sie im Frühjahr bei geeigneten Bedingungen (ausreichender Bodenfeuchte und Temperaturen von ≥ 8 °C) keimen. Zunächst wird das Primärsporangium gebildet, welches die gleiche Form und Funktion wie die Sporangioophore des Sekundärzyklus (Sekundärsporangium) hat. Die Bedingungen für eine erfolgreiche Infektion, die stets an tropfbar flüssiges Wasser gebunden. Dieses macht das enge Verwandtschaftsverhältnis zur Familie der Algen deutlich (GUNDERSON et al., 1987). Typisches Krankheitssymptom des Falschen Mehltaus der Rebe (*P.viticola*) ist zunächst die Bildung eines Ölflecks auf der Blattoberseite. Dieser entsteht nach bei der Besiedelung des Schwammparenchyms und dem

damit verbundenem Nährstoffentzug aus den Wirtszellen. (AGRIOS, 2005; KEIL, 2007). Im Anschluss an die Inkubationszeit (temperaturabhängig) bildet sich auf der Blattunterseite ein weißer Pilzrasen (ausgetretene Sporangioaphore aus Stomataöffnungen). Dieser wird analog zum Sekundärzyklus durch Wasser und Wind auf andere Reborgane übertragen.

Beim Sekundärzyklus entlassen die Sporangien unter hoher Luftfeuchte (> 95 % r. F.) und Temperaturen über 12 °C nach einer Keimungsphase mehrere biflagellat begeißelte Planosporen. Da Licht den Differenzierungsprozess der Sporangien unterbindet, bedarf es einer ausgeprägten Dunkelphase (BROOK, 1979; RUMBOLZ, et al. 2002). Die begeißelten Planosporen können sich nach ihrem Schlupf im Wasserfilm auf der Blattunterseite zielgerichtet zu den Stomata bewegen (MÜLLER & SLEUMER, 1934). In der Nähe der Spaltöffnungen werfen die Planosporen die Geißeln ab und beginnen sich zu enzystieren. Anschließend wird ein Keimschlauch (Penetrationshyph) gebildet, der in die Atemhöhle der Stomata hineinreicht und sich dort zu einem substomatären Vesikel differenziert. Das daraus entstehende Myzel besiedelt das Blattgewebe und wächst hauptsächlich interzellulär im Schwammparenchym. Mit Hilfe der im Schwammparenchym gebildeten Haustorien ist der obligat biotrophe Organismus in der Lage, die Nährstoffaufnahme aus dem Wirtsgewebe sicherzustellen (KIEFER et al., 2002). Bis zum Austreten der Sporangioaphore aus den Stomata, welche sich aus dem substomatären Vesikel entwickeln, vergehen bei optimalen Bedingungen (24 °C) nur vier Tage. Die Sporulation von *P. viticola* endet nach Ablauf der Inkubationszeit nicht spontan, sondern dauert, je nach Witterung und Energiereserve im Wirtsgewebe über mehrere Tage. Untersuchungen von KAST und STARK-URNAU (1999) zeigten, dass sich durch Ausreifung der Sporangien in den ersten Stunden nach deren Austritt das Infektionspotential stark erhöht, jedoch binnen der nächsten Tage wieder stark abnimmt.

Die Ausprägung der Sporangienträger, sowie die Bildung von Sporangien kann hierbei durch äußere Einflüsse – also beispielsweise durch Applikation von Pflanzenschutzmitteln – nicht beeinflusst werden. Lediglich durch Variation der Belichtungsverhältnisse bzw. durch Verminderung der Luftfeuchtigkeit lassen sich Deformationen der Sporangien auslösen. Dies ist allerdings in der Praxis nicht realisierbar (KASSEMAYER, 2003). Durch die bei optimalen

Bedingungen sehr kurze Inkubationszeit, kann es im Freiland zu einer raschen - teilweise ‚explosionsartigen‘ - Ausbreitung des Oomyceten über den Sekundärzyklus führen. Binnen einer Vegetationsperiode (Mai bis September) können hierbei mehrere Zyklen durchlaufen werden. Man kann daher bei *P. viticola* von einer polyzyklischen Krankheit sprechen (MÜLLER & SLEUMER, 1934).

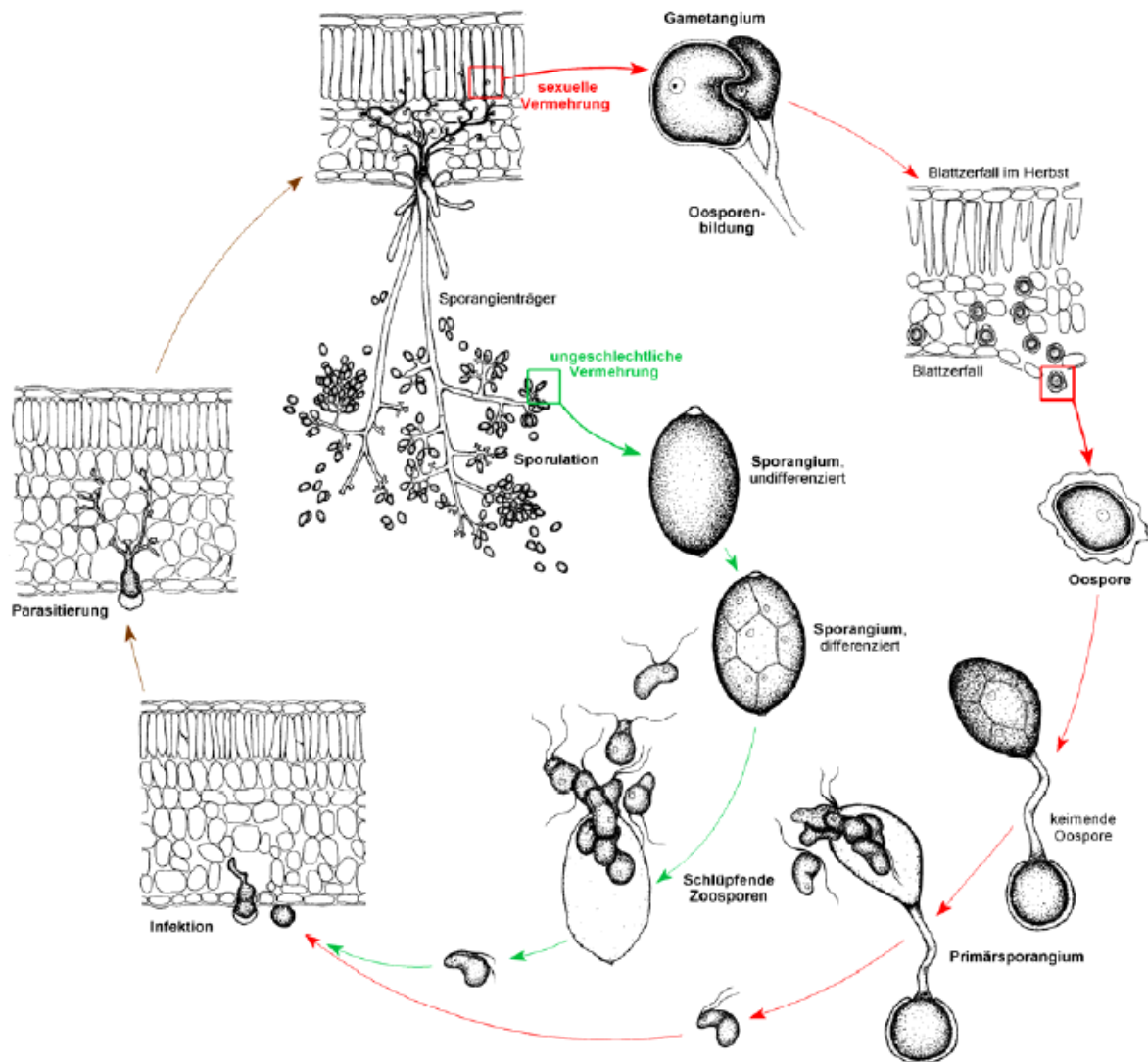


Abbildung 3: Primäre (rot) und sekundäre (grün) Entwicklung des Falschen Mehltaus der Rebe (*Plasmopara viticola*) (Quelle: Staatliches Weinbauinstitut Freiburg).

1.10 Historie und Bekämpfung von *Plasmopara viticola* in Europa

„Der Falsche Mehltau der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), welcher durch den Oomyceten *Plasmopara viticola* (BERK. & CURT. EX DE BARY) BERL. & DE TONI verursacht wird, gehört weltweit zu den wirtschaftlich bedeutendsten pilzlichen Krankheiten in der Landwirtschaft (LAFON & BULIT, 1981)“ (KÖSSLER, 2006). Infektionen an Blättern, Trauben sowie dem Rebholz führen neben starken Qualitäts- auch zu empfindlichen Ertragseinbußen (JUTSUM, 1988). Zudem ist bei mehrjährigem starkem Befall durch *P. viticola* mit einer Verminderung der Holzausreife, einer damit einhergehenden geringeren Frostfestigkeit sowie einer Verringerung des Folgeertrags zu rechnen (ZILLIG, 1941; HILLEBRAND et al., 1998, KÖSSLER, 2006).

Der Erreger welcher erstmals 1878 von Nordamerika nach Frankreich eingeschleppt (FARLOW, 1882) wurde, breitete sich über sämtliche europäischen Weinbaugebiete aus und verursachte große Ertragsausfälle sowie einen starken Rückgang der Ertragsreblfläche (ALEXOPOULOS, 1966). Erste chemische Bekämpfungsansätze gehen zurück auf Millardet (MILLARDET & GAYON, 1887), welcher 1885 ein Kupfervitriol-Kalk-Gemisch ausbrachte (MARTIN, 1967, KÖSSLER, 2006).

Viele Jahre blieben Kupferformulierungen die einzige Bekämpfungsmöglichkeit der Rebenperonospora. Im modernen Weinbau stehen zur Bekämpfung des Pilzes diverse organische Fungizide zur Verfügung. Diese sind durch ihre systemische und lang anhaltende Wirkung dem Kupfer weit überlegen. (HAAS & AMPLATZ, 1989; TICHLER & BRENDEL, 1991).

Organische Fungizide stehen jedoch ausnahmslos den konservativ und ökologisch integriert wirtschaftenden Weinbaubetrieben zur Verfügung. Ökologisch wirtschaftende Betriebe haben bisher keine weiteren Alternativen als Kupfer und Pflanzenextrakten (HOFMANN et al., 1995). Ein Problem der kontinuierlichen Anwendung von Kupfer speziell in Ertragsweinbergen ist die Anreicherung des im Boden stark immobilen Schwermetalls mit bisher ungeklärten Auswirkungen auf das Agrarökosystem (KÖSSLER, 2006). In einigen Weinbergsböden wurden aufgrund der Applikation kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel in über 70 Jahren der Anwendung 370 bis 800 mg Cu/kg Erde angereichert (CLAUS, 1979; SCHOLL & ENKELMANN, 1984; MOHR, 2005). Durch die Anwendung neuer Formulierungen

und die Beschränkungen ist die Anreicherung in den letzten Jahren deutlich zurückgegangen, ist aber dennoch nachzuweisen (MOHR et al., 2007).

Zwar sind viele Organismen durch natürliche Vorkommen des Schwermetalls (Cu) in Wasser und Boden angepasst, benötigen das Schwermetall sogar als Spurennährstoff, doch sind andererseits auch Schadwirkungen speziell bei erhöhten Kupfergehalten dokumentiert (GÄRTEL, 1985; KAST, 2003, KÖSSLER, 2006). Das Umweltbundesamt (UBA) sieht die weitere Anwendung von Kupferpräparaten besonders kritisch, da die Auswirkungen auf den Naturhaushalt vor allem auf Vögel, Kleinsäuger, Regenwürmer sowie aquatische Organismen nicht vertreten werden kann (KÜHNE, 2008). Neben den üblichen Untersuchungsverfahren bei der Pflanzenschutzmittelzulassung werden in Zukunft auch negative Auswirkungen auf die Kupferverteilung und -verlagerung im System Pflanze-Boden näher zu erforschen sein. Ebenso muss das Verbraucherrisiko unter erhöhten Kupfergehalten im Boden erneut beleuchtet werden (BECKER, 2001, KÖSSLER, 2006). Schon heute ist bekannt, dass vor allem in alten Weinbergslagen der klassischen Weinbauregionen, die Konzentration von Kupfer im Boden über ein kritisches Maß hinaus angestiegen ist. Erste Untersuchungen verschiedener Forschungseinrichtungen ergaben eine Zunahme von Chlorosen, Phytotoxschäden, eine Hemmung der mikrobiellen Stoffkreisläufe (im Weinberg als auch in der Kellerei), Schädigungen von Regenwürmern und Veränderungen in der Biozönose (KAST, 2003). Die daraus resultierenden oenologischen Fragestellungen wie beispielsweise Gärhemmungen, Geschmacksbeeinflussungen sowie das Erreichen der erlaubten Kupferkonzentration im Wein bzw. Traubensaft unterstreichen die Gesamtproblematik. (HURTER et al., 1966; EHRENHARDT & JAKOB, 1968; DROBNICA et al. 1980; GEHMANN, 1987; SCHÜEPP & SIEGFRIED, 1988). Auch der Eintrag von Kupfer in Oberflächengewässer ist aufgrund der Anreicherung im Sediment als auch der Toxizität für Fische und Fischnährtiere als kritisch zu betrachten (KAST, 2003). Ziel muss es daher sein, den Einsatz kupferhaltiger Präparate zu minimieren. Weitere Untersuchungen zu Alternativen, speziell im ökologisch wirtschaftenden Weinbau sind daher unumgänglich (KÖSSLER, 2006).

1.11 Pflanzeninhaltsstoffe als Quelle neuartiger Pflanzenschutzmittel

Weltweit sind mehr als 300.000 verschiedene Pflanzenarten beschrieben, welche nur zu einem Bruchteil näher auf ihre Inhaltsstoffe sowie deren Auswirkungen auf das Ökosystem hin untersucht worden sind. Bereits im Altertum wurde erkannt, dass manche Pflanzen für gewisse Pflanzenkrankheiten unempfindlich sind und Extrakte diese Pflanzen ihre Eigenschaften auch auf Kulturpflanzen übertragen können. Nicht nur die Herstellung von Pflanzentees und deren Veredlung, beispielsweise durch Fermentation, fanden zu jener Zeit Anwendung, sondern auch die Kombination unterschiedlicher natürlicher Präparate, welche sich gegenseitig in Ihrer Wirkung verstärkten (KÖSSLER, 2006).

In der heutigen industrialisierten Landwirtschaft sind die Herstellung sowie der Einsatz von Pflanzenextrakten im Pflanzenschutz kaum denkbar. Hintergrund hierbei ist in erster Linie die Ausweitung der landwirtschaftlichen Nutzflächen einzelner Betriebe sowie der immense Kosten- und Zeitaufwand zur Herstellung derartiger ‚Naturarzneien‘.

Lediglich ökologisch wirtschaftende Betriebe bzw. landwirtschaftliche Betriebe in Entwicklungs- und Schwellenländern sind mangels Alternativen synthetisch hergestellten Präparate auf Teedrogen als Pflanzenschutz- bzw. Pflanzenstärkungsmittel angewiesen.

Dennoch stellen Pflanzeninhaltsstoffe, neben Untersuchungen der Sekundärmetaboliten aus Mikroorganismen, auch in Zukunft ein weites und teilweise unerforschtes Gebiet der Naturstoffforschung für den Pflanzenschutz dar (FUGMANN et al., 1991; PILLMOOR et al., 1993, PLIMMER, 1993).

Entscheidend für die Suche nach neuen Wirkstoffen sind neben der Bereicherung des Instrumentariums für den integrierten Pflanzenschutz auch die ständig steigenden Ansprüche an diese aktiven Substanzen. Neben einem hohen Wirkniveau bei sehr geringen Aufwandmengen erwartet man ein breites Wirkungsspektrum. Dieses sollte mit einem geringen bzw. keinen toxischen Nebenwirkungen auf die Kulturpflanze und ‚Nicht-Zielorganismen‘ einhergehen. Weiterhin muss ein hoher Sicherheitsgrad für Umwelt, Anwender und Endverbraucher gewährleistet sein (EVANS & LAWSON, 1992). Dies alles führt

zu einem drastischen Anstieg der Entwicklungskosten für neue Produkte (OERKE et al. 1994). Weiterhin machen die durch die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln, vor allem durch die verstärkte Verwendung von systemischen Wirkstoffen auftretenden Resistenzen eine Auffindung von Substanzen mit neuen Wirkmechanismen in Zukunft unverzichtbar (EVANS & LAWSON, 1992). Neben dem Problem der Fungizidresistenzen bewirken auch die zunehmenden 'Lückenindikationen' eine steigende Nachfrage nach alternativen Problemlösungen. Ursachen der 'Lückenindikationen' sind unter anderem höhere Umweltauflagen und dadurch nicht mehr erteilte Zulassungen für Pflanzenschutzmittel (ZORNACH, 1994).

Bei Naturstoffen aus Pflanzen ist die Auffindungsrate von geeigneten Einzelmetaboliten beziehungsweise Wirkstoffkomplexen (Rohextrakten) als relativ hoch anzusehen. Dies liegt zum einen am hohen Reichtum an Primär- und Sekundärmetaboliten in Pflanzen sowie an deren komplexer chemischer Struktur, welche unterschiedlichste Wirkungscharakteristika aufweisen (KÖSSLER, 2006). Hierbei sind primär die direkte schädigende Wirkung des Zielpathogens sowie eine Induktion der pflanzeigenen Resistenz zu nennen (BLAESER, 2002; METRAUX et al, 1991; STAUB et al. 1992, RUESS et al., 1996; GÖRLACH et al. 1996). Nachteilig, im Gegensatz zur chemischen Synthese, sind die schwierige und extrem teure Herstellung zu nennen. Ferner ist die schlechte Verfügbarkeit von Derivaten sowie die nur sehr schwer erreichbare Standardisierung des Ausgangsmaterials anzuführen (ANKE & STEGLICH, 1988). Die Diskrepanz zwischen möglicher Anzahl geeigneter Wirkstoffe und vergleichsweise geringer kommerzieller Verwendung erklärt sich zudem durch die unzureichende Versorgung mit Rohmaterial aus landwirtschaftlichen Betrieben. Durch unterschiedliche Anbau- und Umweltbedingungen ist auch die natürliche Varianz der Inhaltsstoffe für eine industrielle Herstellung problematisch. (JESPERS & DE WAARD, 1993, KÖSSLER, 2006). Darüber hinaus kann aufgrund der Umwelteinflüsse die chemische und biologische Stabilität der Präparate bei Freilandbedingungen nicht gewährleistet werden. Sekundärmetaboliten aus Pflanzen lassen sich, wie bereits erwähnt, direkt zur Bekämpfung von Schadorganismen applizieren. Ferner dienen sie der Industrie als sogenannte Leitstruktur bei der Synthese von neuen Wirkstoffen. Wichtigster Vertreter der aus

Naturstoffen synthetisierten Wirkstoffe ist das Strobilurin A des Kiefernzapfenröhlings, welches für zahlreiche organisch systemische Fungizide die Leitstruktur lieferte (SCHRAMM ET AL., 1978, KÖSSLER, 2006).

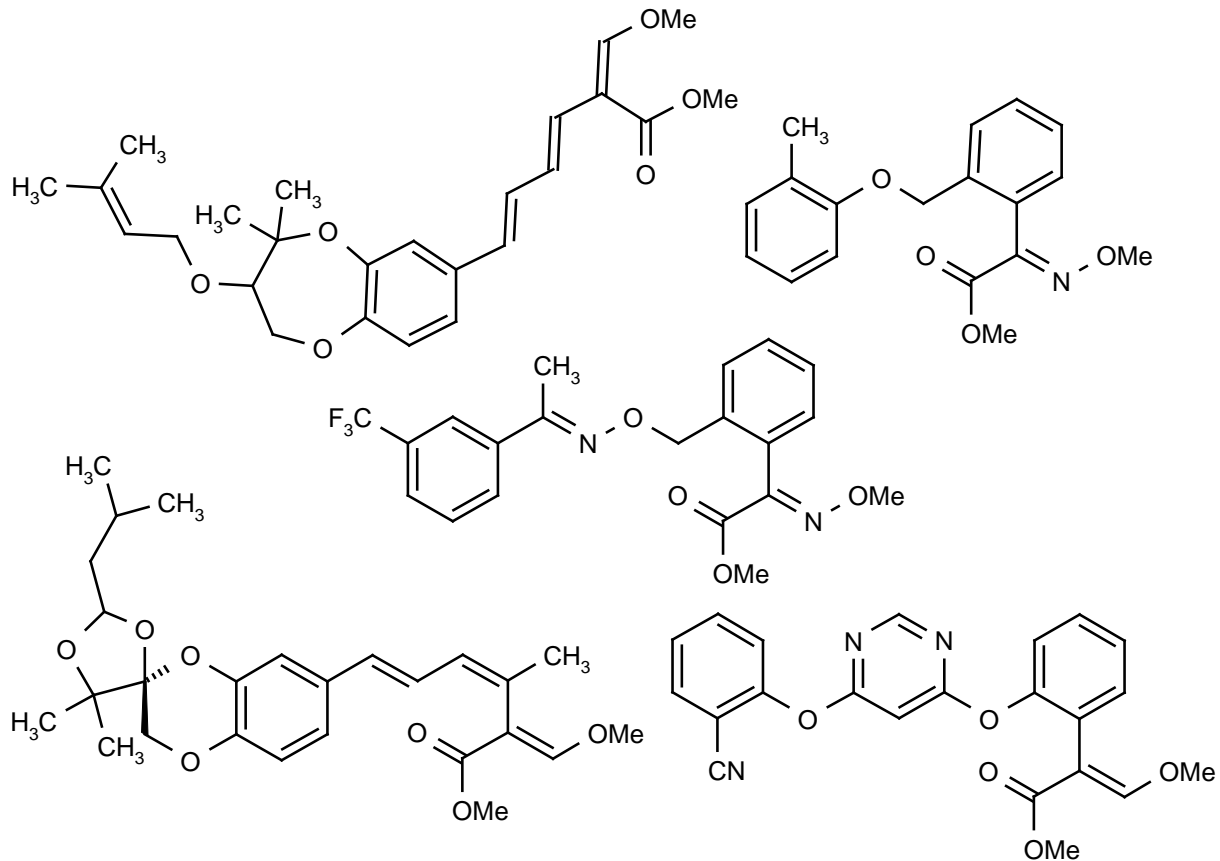


Abbildung 4: Basierend auf der Leitstruktur von Strobilurin A synthetisch aufgebaute Derivate: (oben links) Strobilurin G, (oben links) Kresoxim-methyl, (Mitte) Trifloxystrobin, (unten links) Strobilurin E, (unten rechts) Azoxystrobin

Vor dem Beginn des chemischen Pflanzenschutzes verwendete man Naturstoffe aus Pflanzen, meist als Extrakt zum Schutz vor Schädlingen und Krankheiten. Alte ‚Hausmittel‘ wie Knoblauch-, Brennnessel- und Schachtelhalmbrühe gegen pilzliche und bakterielle Schaderreger sowie Lavendel gegen Ameisen und Meerrettich gegen den Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) finden heute in erster Linie in Klein- und Hausgärten Verwendung (SCHMIDT & HENGELER, 1984). Durch die Förderung und der damit einhergehenden

Zunahme der ökologischen Landwirtschaft sowie der Regulierung der Kupferapplikation, nehmen Pflanzenextrakte auch in ackerbaulichen Kulturen zunehmend eine wichtigere Stellung ein:

Das wohl bekannteste Beispiel für die Verwendung von Pflanzenextrakten in landwirtschaftlichen Kulturen sind Extrakte aus Neembaum (*Azadirachta indica*), welche für ihre insektizide und nematizide Wirkung bekannt sind. Eine fungizide Wirkung gegen *Rhizoctonia solani* an Baumwolle, *Macrophomina phaseolina* an Sojabohne und *Ganoderma lucidum* an Kokosnuß wurde von JEYARAJAN et al. (1986) beschrieben. ROVESTI et al. (1992) berichteten weiterhin über eine fungizide Wirkung der Extrakte gegenüber *Erysiphe graminis* und *Puccinia recondita* an Getreide.

Über positive Eigenschaften eines Blattextraktes aus Knoblauch (*Allium sativum*) wurde von LAKSHMANAN et al., (1990) berichtet. Die Applikation des Extraktes reduzierte den Befall von *Thanatephorus cucumeris* an Bohnen. Untersuchungen bei *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Curvularia* spp. und *Phytophthora drechsleri* konnten eine Hemmung der Sporenkeimung nach Applikation von Extrakten aus *Allium sativum* nachweisen (SINGH et al., 1990; SINGH & CHAUHAN, 1992) Untersuchungen von MENON (1994) bestätigten die fungiziden Eigenschaften des Knoblauchextraktes gegen *Claviceps sorghi* an Hirse. Nach REIMERS et al. (1993) beruht die fungizide Wirkung von *Allium sativum* auf dem Inhaltsstoff Ajoen, einer von der Speichersubstanz Alliin abgeleiteten Verbindung. In Experimenten mit synthetisch hergestellten Ajoen ließ sich ein guter Bekämpfungserfolg des Erregers *Cladosporium fulvum* an Tomaten erzielen. Andererseits führte eine protektive Anwendung von Ajoen an Gurken gegen *Ulocladium cucurbitae* zu phytotoxischen Effekten, jedoch nicht zu einer Befallsminderung. Eine vollständige Bekämpfung der obligat biotrophen Erreger *Oidium lycopersicum* an Tomaten und *Sphaerotheca pannosa* an Rosen konnte durch die Applikation von 300 mg/L Ajoen erzielt werden. Dabei beruht die Wirkungsweise des Ajoens auf einer Keimhemmung der Sporen (BLAESER, 2002).

Bei Screening-Versuchen an 58 malaiischen Pflanzenarten von MOHAMED et al. (1996) zeigten Extrakte aus Betelpfeffer (*Piper betle*) ein sehr breites Wirkungsspektrum gegenüber diversen Pflanzenpathogenen. Die Extrakte hemmten das Wachstum von *Alternaria alternata*, *Botrydiplodia theobromae*, *Colletotrichum capsicii*, *Penicillium citrium*, *Phomopsis caricae-papayae*,

Fusarium pallidoroseum und *Aspergillus niger* bereits bei einer Konzentration von 10 mg/mL nahezu vollständig.

Obwohl die Untersuchung pflanzlicher Inhaltsstoffe schon eine lange Tradition aufweist, besitzen die in den letzten Jahren erfolgreich eingesetzten Substanzen ausschließlich insektizide Wirkung. Hier sind es vor allem die Inhaltsstoffe Pyrethrum aus den Blüten der Chrysanthemen (*Chrysanthemum cinerariifolium*) und das Azadirachtin aus dem Neembaum (*Azadirachta indica*), die im organischen Landbau eingesetzt werden (BLAESER, 2002). Eine wirtschaftliche Synthese dieser neuen Substanzklassen gelang indes nur am Beispiel des Pyrethrums, welches zur Etablierung der erfolgreichen Insektizidklasse der ‚Pyrethroide‘ maßgebend beitrug.

Leitstrukturen kommerziell verwendeter Naturstoffe mit fungizider Wirkung hingegen, stammen bisher ausschließlich aus mikrobieller Biosynthese.

1.12 Aufgabenstellung

Sowohl bakterielle als auch pflanzliche Sekundärmetaboliten stellen ein außerordentliches Reservoir an Stoffen dar, welche gegen Erkrankungen bei Säugetieren, aber auch zum Schutz von Pflanzen gegenüber Phytopathogenen genutzt werden können. Während die Suche nach praktisch nutzbaren Naturstoffen in Teilbereichen bereits seit Jahrzehnten intensiv betrieben wird, ist die biologische Funktion dieser Stoffe im natürlichen Habitat häufig völlig unbekannt. In der Phytopathologie verbinden sich die beiden Forschungsrichtungen, da Sekundärmetaboliten als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren von Krankheitserregern wirken und andere Naturstoffe als Leitsubstanzen für die Entwicklung von Pflanzenschutzmitteln dienen.

Die meisten bisherigen Untersuchungen zur Phytotoxizität von Streptomyceten beruhten auf der Annahme, dass die Virulenz des Organismus in erster Linie auf der Fähigkeit zur Bildung des Sekundärmetaboliten Thaxtomin A basiert. Neben phytopathologischen Untersuchungen zur Phytotoxizität von Thaxtomin A konnten ferner molekulargenetische Untersuchungen diesen Sachverhalt untermauern und stießen auf ein komplexes Geflecht an

Regulationsmechanismen: Hierauf aufbauend ist es das Ziel dieser Arbeit die Regulationsmechanismen der Sekundärmetaboliten pflanzenpathogener Streptomyceten näher zu beleuchten. Speziell die Aufgabe sowie die Funktion des NO-Synthase Inhibitors Iromycin A und der zeitliche Verlauf dessen Biosynthese bei *in vitro*- sowie *in vivo* Untersuchungen sollen näher untersucht werden. Ferner sollen die Funktion der Iromycine während des Penetrationsprozesses an Kartoffeln sowie die Auswirkungen auf die Wirtspflanze näher beleuchtet werden. Hierbei sollen neben klassischen phytopathologischen Pflanzenassays auch molekulargenetische- (Real-Time PCR) und biochemische Untersuchungen (HPLC, HPLC-MS, NMR) eingesetzt werden.

Langfristiges Ziel der Untersuchungen ist die Lokalisation des Iromycin Genclusters und der damit einhergehenden möglichen Verallgemeinerung für verschiedene Spezies phytopathogener Streptomyceten.

Neben den Untersuchungen zur Regulationsfähigkeit von Naturstoffen wurden im Rahmen dieser Arbeit einige Aufgabenstellungen der im Jahr 2006 abgeschlossenen Magisterarbeit nochmals aufgenommen und vertieft. Hierbei sollten die Wirkungsweisen verschiedener Pflanzenextrakte auf die Entwicklungsstadien der asexuellen Vermehrung des Falschen Mehltaus der Rebe (*Plasmopara viticola*) anhand eines dafür entwickelten Bioassays näher untersucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen im Speziellen die Extraktionsparameter bei der Extrakterstellung optimiert werden und dadurch eine höhere Ausbeute bzw. ein breites Spektrum an Naturstoffen aufgeschlossen werden. Ferner soll durch Etablierung eines Real-Time PCR Assays für *Plasmopara viticola* ermöglicht werden, Aussagen zur Wirkung der Pflanzenextrakte auf das intrazelluläre Wachstum des Schadpathogens zu treffen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Instrumentelle Analytik

2.1.1 Elektronenspektren (UV)

Spektrometer VARIAN Modell Cary 3E. Alle Spektren wurden mit Methanol als Lösungsmittel aufgenommen. Die Wellenlänge λ ist in Nanometern [nm] angegeben und bezieht sich im Allgemeinen auf das Absorptionsmaximum. In einigen Fällen sind zusätzlich „Schultern“ des Absorbanzpeaks angegeben (Abkürzung: sh).

Der molare dekadische Absorptionskoeffizient ε berechnet sich wie folgt:

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot d}$$

Hierbei bezeichnet A die Absorbanz, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Küvette.

Durch Umformen erhält man:

$$\varepsilon = \frac{A \cdot M \cdot V}{m \cdot d}$$

Dabei bezeichnet M die Molmasse der untersuchten Substanz und m deren Einwaage.

Die Probe (0.1-0.2 mg) wurde in einem Volumen von 10 mL gelöst. Die Schichtdicke der verwendeten Küvette betrug 1 cm. Die Werte für ε besitzen die Dimension $10^{-1} \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ und sind in dieser Arbeit logarithmiert angegeben.

Angabe Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: Pro Küvette mit 2 mL methanolischer Lösung wurde jeweils ein Tropfen 1 M Salzsäure bzw. 1 M Natronlauge hinzu gegeben.

UV/VIS Spektralphotometer

THERMO SCIENTIFIC Nanodrop 2000c; Spektraler Bereich: 190-840 nm; Adsorptionsbereich: 0,02-300; Xenon-Blitzlampe; Messbereich: 2,0 ng-15.000 ng dsDNA.

2.1.2 Infrarotspektren (IR)

IR-Spektrometer PERKIN-ELMER

Modell 1600; Alle IR-Spektren wurden als KBr-Presslinge aufgenommen.

2.1.3 Kernresonanzspektren

¹H-NMR-Spektren

VARIAN Inova-600 (600 MHz); VARIAN Mercury-300 (300 MHz); VARIAN Unity-300 (300 MHz). Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten [ppm] relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internen Standard angegeben. Kopplungskonstanten J sind in Hertz [Hz] angegeben. Alle ¹H-NMR-Spektren sind als Spektren erster Ordnung interpretiert, soweit Signalaufspaltung und Kopplungskonstanten angegeben sind.

Abkürzungen: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, ddd = Dublett vom doppelten Dublett, t = Triplett, td = Triplett vom Dublett, dq = Dublett vom Quartett, m = Multiplett.

¹³C-NMR-Spektren

VARIAN Inova-600 (150.8 MHz); VARIAN Inova-500 (125.7 MHz) ausgestattet mit VARIAN PFG Cold Probe (Heliumkühlung); VARIAN Mercury-300 (75.5 MHz); VARIAN Unity-300 (75.5 MHz). Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten [ppm] relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internen Standard angegeben.

Multiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett.

NOE-Differenzspektren

VARIAN Inova-600 (600 MHz).

2D-NMR-Spektren

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ - <u>C</u> orrelated <u>S</u> pectroscopy
HSQC	<u>H</u> eteronuclear <u>S</u> ingle <u>Q</u> uantum <u>C</u> oherence
HMBC	<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>B</u> ond <u>C</u> onnectivity

2.1.4 Massenspektren

Angegeben sind jeweils die Quotienten aus Masse zu Ladung (m/z) sowie die relativen Intensitäten bezogen auf den Basispeak.

Massenspektren

DCI-MS	FINNIGAN MAT 95, 200 eV, Reaktandgas: NH_3
EI-MS und HR-EI-MS	FINNIGAN MAT 95, 70 eV. Summenformeln wurden aus den gemessenen präzisen Massen berechnet (Abweichung < 5 ppm).
ESI-MS	FINNIGAN LCQ (Ionenfalle).
HR-ESI-MS	BRUKER Apex IV (FTICR-MS), 7 Tesla; BRUKER microTOF II (TOF-MS). Summenformeln wurden aus den gemessenen präzisen Massen berechnet (Abweichung < 1 ppm). Sofern nicht anders angegeben, erfolgten die Messungen am FTICR-MS.

2.2 Chromatographie

2.2.1 Lösungsmittel

Für die Chromatographie benötigten Lösungsmittel wurden zuvor destilliert. Für die HPLC finden analysenreine Lösungsmittel und Reinstwasser (MILLIPORE Milli-Q) Verwendung, welche zuvor im Ultraschallbad (10-15 min) bzw. mittels Verdrängung durch Helium (5-10 min) entgast wurden.

2.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC) und Anfärbereagenzien

Dünnschichtchromatographie

Kieselgel Fertigplatten	HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel (KG) 60 F ₂₅₄ , 10×10 cm, Schichtdicke 0,2 mm, MERCK.
Kieselgel DC Alufolien	DC-Alufolien, Kieselgel (KG) 60 F ₂₅₄ , 20×20 cm, Schichtdicke 0,2 mm, MERCK.
RP-Kieselgel DC Alufolien	DC-Alufolien, RP-18 60 F ₂₅₄ , 20×20 cm, Schichtdicke 0,2 mm, MERCK.

Angegeben sind R_f -Werte (Laufhöhe relativ zur Lösungsmittelfront).

Anfärbereagenzien

Anisaldehyd	1,0 mL Anisaldehyd in einer Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure.
Ehrlichs-Reagenz (Ehrlich)	1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Lösung aus 75 mL Methanol und 25 mL Salzsäure (36 %).

Nach dem Ansprühen wurden die DC-Platten auf ca. 100 °C erwärmt.

2.2.3 Säulenchromatographie (SC)

Für Schwerkraftsäulen wurde MACHEREY-NAGEL Kieselgel 60, 0,040-0,063 nm verwendet. Für die Gelchromatographie kam SIGMA-ALDRICH Sephadex LH-20 zum Einsatz.

2.2.4 Mitteldruckchromatographie (MPLC)

Pumpe KNAUER HPLC Pumpe 64. MERCK Lobar-RP-Fertigsäulen LiChroprep (40-63 µm): Typ A (240×10 mm), Typ B (310×25 mm), Typ C (450×50 mm).

2.2.5 Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC)

Analytische und Semipräparative HPLC mit DAD-Kopplung

Pumpe JASCO PU-2080plus; Mischkammer JASCO LG-2080-02; Entgaser JASCO DG-2080-53; PDA-Detektor JASCO MD-210plus; Säulenofen JASCO CO-2065 (Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt).

Analytisch: Autosampler JASCO AS-2055plus mit RHEODYNE 100 µL Auftragsschleife.

Semipräparativ: Manuelles Probenaufgabeeventil mit RHEODYNE 500 µL Auftragsschleife.

Software: JASCO Borwin mit Borwin-PDA Version 1.50 (Chromatographie); HSS-2000 Version 3.5.2 (Steuerung).

Analytische HPLC mit DAD-Kopplung und Lichtstreuendetektor

Pumpe: KONTRON 322, Mischkammer: KONTRON HPLC 360; Diode-Array-Detektor: KONTRON 440, Autosampler: KONTRON Sa 360 mit analytischer Auftragsschleife.

Verdampfungs-Lichtstreuendetektor: TECHLAB ELSD Sedex 85.

Software: KONTRON Kromasystem 2000 Version 1.60.

Präparative HPLC mit DAD-Kopplung

Pumpe und Mischkammer JASCO PU-1587; PDA-Detektor JASCO UV-1575; Manuelles Probenauftragsventil mit RHEODYNE 2 mL Auftragsschleife.

Software: JASCO Borwin mit Borwin-PDA Version 1.50, HSS-2000 Version 3.5.2 (Steuerung).

2.2.6 HPLC mit ESI-MS-Kopplung (HPLC-MS)

Analytische HPLC mit DAD- und ESI-MS-Kopplung (HPLC-MS)

Pumpe und Mischkammer FLUX INSTRUMENTS Rheos 4000; Entgaser FLUX INSTRUMENTS ERC-3415 α ; Autosampler JASCO 851-AS; PDA-Detektor FINNIGAN Surveyor; Massendetektor FINNIGAN LCQ (ESI-MS).

Software: *FLUX INSTRUMENTS* Janeiro Version 1.10.0 (Steuerung Pumpe); *THERMO/FINNIGAN* TunePlus Version 1.3 (Steuerung ESI-MS); *FINNIGAN* Xcalibur Version 1.3 (Chromatographie, Steuerung).

Analytische 1200 LC Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisations-Interface (HPLC-MS/MS)

1200 LC Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisations-Interface VARIAN, Autosampler ProStar 430 VARIAN, HPLC-System ProStar 210 Pumpen VARIAN, Säulenofen Mistral 510 VARIAN, Vakuumpumpe VWR .

2.2.7 HPLC Säulen, Programme und Laufmittelsysteme

Analytische HPLC Säulen

Säule 1	(Standard für Analytik und HPLC-MS): GROM (GRACE) Superspher RP-18 endc., 100 Å, 4 μ m, 100 \times 2 mm; Vorsäule: GROM (GRACE) Superspher Guard coulumn RP-18 endc., 100 Å, 10 \times 2 mm; Flussrate 0,3 mL/min.
Säule 2	MACHEREY-NAGEL Nucleodur Sphinx RP-18 endc., 5 μ m, 250 \times 3 mm; Vorsäule: MACHEREY-NAGEL ChromCart, 8 \times 3 mm; Flussrate 0,5 mL/min.

Semipräparative HPLC Säulen

Säule 2	MACHEREY-NAGEL Nucleodur (RP) C18 endc., 110 Å, 5 µm, 250×8 mm; Flussrate 2.5 mL/min. SecurityGuard AQ C18, 10×10mm; Flussrate 2,7 mL/min.
Säule 3	MACHEREY-NAGEL Nucleodur Sphinx RP-18 endc., 5 µm, 250×8 mm; Vorsäule: MACHEREY-NAGEL ChromCart 8×3 mm; Flussrate 2,5 mL/min.
Säule 4	GROM (GRACE) Superspher RP-18, 100 Å, 4 µm, 100×8 mm; Vorsäule: <i>Grom (Grace)</i> Saphir Guard coulumn C18, 110 Å, 5 µm, 10×8 mm; Flussrate 2,5 mL/min.

Präparative HPLC Säulen

Säule 7	JASCO Kromasil (RP) C18, 100 Å, 7 µm, 250×20 mm; Flussrate 17 mL/min.
Säule 8	Crom Superspher 100 C18, 4 µm, 100×20 mm; Flussrate 20 mL/min
Säule 9	MACHEREY-NAGEL Nucleodur 100-5 C18, 5 µm, 50×16mm, Flussrate 20 mL/min.

Programme und Laufmittelsysteme für die HPLC

Programm 1	(Standard für Analytik und HPLC-MS): Laufmittelsystem Wasser (A)/Methanol (B), jeweils mit 0.05 % Ameisensäure. Gradient: von 20 % auf 100 % B in 20 min, 10 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B. UV-Detektion bei 208, 254, 280 und 400 nm.
Programm 2	Laufmittelsystem Wasser (A)/Methanol (B), jeweils mit 0,1 % TFA. Gradient: von 20 % auf 100 % B in 25 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B. UV-Detektion bei 208, 280 und 400 nm.

Programme und Laufmittelsysteme für die HPLC Teil 2

Programm 3	Laufmittelsystem Wasser (A)/Acetonitril (B), Gradient: von 20 % auf 80 % B in 25 min; zum Spülen von 80 % auf 100 % B in 3 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 5 min bei 20 % B. UV-Detektion bei 208 bzw. 280 nm.
Programm 4	Laufmittelsystem Wasser (A)/Methanol (B), Gradient: von 20 % auf 70 % B in 20 min; zum Spülen von 70 % auf 100 % B in 3 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 5 min bei 20 % B. UV-Detektion bei 208 bzw. 280 nm.
Programm 5	Laufmittelsystem Wasser (A)/Methanol (B), jeweils 0.05 % Ameisensäure. Gradient: von 5 % auf 100 % B in 25 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 5 % B in 5 min, 5 min bei 5 % B. UV-Detektion bei 400 nm.
Programm 6	Laufmittelsystem Wasser (A)/Methanol (B), jeweils 0.05 % Ameisensäure. Gradient: von 5 % auf 100 % B in 25 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 5 % B in 5 min, 5 min bei 5 % B. UV-Detektion bei 400 nm.

2.3 Mikrobiologische und Molekulargenetische Geräte & Analytik

2.3.1 Fermentationseinheiten

Die Fermentation der *Streptomyceten* erfolgte in Flüssigkulturen. Hierbei kamen neben Erlenmeyerkolben auch unterschiedliche Fermenter zum Einsatz:

Bezeichnung	Füllvolumen	Hersteller
300 mL Erlenmeyerkolben	50-75 mL	SCHOTT
300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen	50-75 mL	SCHOTT
1 L Erlenmeyerkolben	250-300 mL	SCHOTT
1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen	250-300 mL	SCHOTT
Biostat-B Fermenter	2,5 L	BIOSTAT
Airlift Fermenter	10 L	UNIVERSITÄT DORTMUND

2.3.2 Inkubatoren

Um die Inkubationsbedingungen verschiedener Fragestellungen konstant zu halten, wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Inkubatoren verwendet:

Bezeichnung	Inkubation von	Hersteller
Brutschrank	Platten	RUBARTH
Inkubationsschüttelschrank BS1, BS4	Flüssigkulturen	B. BRAUN
Inkubationsschüttelschrank Certomat HK	Flüssigkulturen	B. BRAUN
Klimaschrank mit Beleuchtungseinheit	Bioassay	MYTRON
Rundschüttler Certomat U, RM	Flüssigkulturen	B. BRAUN
Thermomixer Compact	DNA-Extraktion	EPENDORF

2.3.3 Zentrifugen

Bezeichnung	HERSTELLER
Falcon-Zentrifuge mit Mikrotiterplattenrotor	THERMO ELECTRON
Typ Heraeus Labofuge 400R	CORPORATION WALTHAM
Tischzentrifuge 5415D	EPPENDORF
Vakuumzentrifuge 5301	EPPENDORF
Vakuumzentrifuge RVC 2-25	MARTIN CHRIST
Zentrifuge Typ Hettich Universal 30 RF	ANDREAS HETTICH
Zentrifugen 3K30, 4K10 und 4K15	SIGMA

2.3.4 Weitere Gerätschaften

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	SYSTEC
Dunkelkammer mit UV-Lampe und Kamera, digitales Darstellungssystem BioCaptMW	VILBER LOURMAT
Epifluoreszenzmikroskop DM RB	LEITZ
PCR-Haube	VILBER LOURMAT
pH-Meter	KNICK
Pipetten Labmate	INTERNATIONAL LABMATE
real-time Thermocycler, i-cycler 96	BIORAD
Spannungsgerät PowerPac 300	BIORAD
Sterilbank	HOLTEN LAMINAR AIR
Thermocycler gradient 96	EPPENDORF
Ultraschallbad, Sonorex RK 100	BANDELIN ELECTRONIC
Wasserbad	BÜCHI

2.4 Reagenzien, Nährmedien und organische Lösungsmittel

2.4.1 Reagenzien, Lösungen und organische Lösungsmittel

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
ACE-Lösung	75 % (v/v) Ethanol (99 %)	ROTH
	25 % (v/v) Chloroform (99,8%)	ROTH
	0,15% (v/v) Trichloressigsäure (99,5 %)	MERCK
Anilinblaulösung pH=9,8	0,05 % (m/v) Anilinblau (99 %)	
	67 mM Dikaliumhydrogenphosphat-lösung (K ₂ HPO ₄) (99 %)	MERCK
Blankophorlösung	0,1 % (w/v) Blankophor (99 %)	BAYER
	10 % (v/v) Ethanol (99 %)	ROTH
Chinosol W	9-Hydroxychinolinsulfat + Calcium-sulfat	HÖCHST
DMSO	99,5 % Dimethylsulfoxid	APPLICHEM
Kaliumhydroxid-lösung	1 M Kaliumhydroxidlösung (85 %)	MERCK
Lysozym-Lösung	20 mg/ml Lysozym	SIGMAALDRICH
Natriumchlorid	Natriumchlorid	ROTH
Natriumhypochlorit	3 % (v/v) Natriumhypochlorit (13 %)	SIGMAALDRICH
PBS-Puffer pH = 7,4	NaH ₂ PO ₄ 2,07g/L	SIGMAALDRICH
	NaCl 5,84 g/L	SIGMAALDRICH
	Na ₂ HPO ₄ 12,06 g/L	SIGMAALDRICH
TAE-Puffer pH = 8,0	Tris 145,37 g/L	SIGMAALDRICH
	EDTA 11,16 g/L	SIGMAALDRICH
	Eisessig 36,4 mL/L	ROTH

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
TE-Puffer	Tris 121,1g/L	SIGMAALDRICH
pH = 8,0	EDTA 3,72g/L	SIGMAALDRICH
	Borat 51,52 g/L	SIGMAALDRICH
Zitronensäure	Zitronensäure wasserfrei	APPLICHEM

Für mikrobiologische und chemische Untersuchungen benötigte Lösungsmittel wurden, sofern nicht genauer angegeben, zuvor destilliert.

Bei ethylalkoholischen Lösungsmitteln wurde, sofern nicht weiter erwähnt, auf 99 % Ethanol + MEK (ROTH, Karlsruhe) zurück gegriffen.

Wässrige Verdünnungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit demineralisiertem Wasser durchgeführt. Für molekulargenetischen Arbeiten fanden analysenreine Lösungsmittel und Reinstwasser (MILLIPORE Milli-Q) Verwendung, welche zuvor im Ultraschallbad (10-15 min) bzw. mittels Verdrängung durch Helium (5-10 min) entgast wurden.

2.4.2 Nährmedienbestandteile und Nährmedien

2.4.2.1 Nährmedienbestandteile

Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:

Bezeichnung	Hersteller
Agar Agar	DIFCO
Bacto Nutrient Broth	DIFCO
Caseinpepton	MERCK
Cellobiose (98 %)	ABCR
Cornsteep Powder	MARCOR
D-Glucose	ROTH
D-Mannit	RIEDEL-DEHAËN
Fleischextrakt	MERCK

Bezeichnung	Hersteller
Glycerin wasserfrei	APPLICHEM
Haferkleie	NEUFORM, ALNATURA
Haferkorn (mit und ohne Spelze)	UNIVERSITÄT GÖTTINGEN, ALNATURA
Hafermehl	NEUFORM, ALNATURA
Hefeextrakt	OXOID
Leberextrakt	MERCK
Malzextrakt	MERCK
Sojamehl (fettarm – und vollfett)	HENSELWERK
Stärke (aus Kartoffeln)	ROTH

2.4.2.2 Nährmedien

Für alle Nährmedien wurde, sofern nicht anders angegeben, Leitungswasser verwendet und der pH-Wert vor dem Autoklavieren mit 0,5 M Salzsäure bzw. 0,5 M Natronlauge eingestellt (sofern angegeben). Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20 g/L Agar zugesetzt. Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren (feuchte Hitze, 121 °C, 1 bar Überdruck, 30 min) sterilisiert.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf ein Endvolumen von einem Liter:

Bezeichnung	Nährmedienbestandteile	Mengenangabe je Liter
Hafer (HF1)	Hafermehl	20 g
	Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘	2,5 mL
		pH = 7,0
Hafer (HF2)	Haferkleie	20 g
	Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘	2,5 mL
		pH = 7,0
Hafer (HF3)	Haferkorn	20 g
	Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘	2,5 mL
		pH = 7,0

Bezeichnung	Nährmedienbestandteile	Mengenangabe je Liter
NL 1187	Stärke	10 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g
	NaCl	1 g
	CaCO ₃	2 g
	Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘	5 mL
NL 1358	Glycerin	30 g
	Caseinpepton	2 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	NaCl	1 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
	Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘	5 mL
		pH = 7,0
YMG, YMG+	Malzextrakt	10 g
	Hefeextrakt	4 g
	D-Glucose	4 g
	YMG+ zusätzlich: CaCO ₃	0,5 g
		pH = 7,0
SGG	D-Glucose	10 g
	Glycerin	10 g
	Stärke aus Kartoffeln	10 g
	Caseinpepton	5 g
	CaCO ₃	3 g
	Cornsteep-Powder	2,5 g
	Hefeextrakt	2 g
	NaCl	1 g
	pH = 7,0	
MS Medium	Murashige and Skoog medium	2,2 g
	Sucrose	15 g
		pH = 5,8-6,0

Bezeichnung	Nährmedienbestandteile	Mengenangabe je Liter
Medium S	Stärke aus Kartoffeln	10 g
	Glycerin	4 g
	Caseinpepton	4 g
	Hefeextrakt	500 mg
	Fleischextrakt	500 mg
	Leberextrakt	500 mg
	Natriumchlorid	1 g
		pH = 7,0
SM-Medium	Sojamehl (fettarm)	20 g
	Mannit	20 g
		pH = 7,0
Spur 11 (Spurenelementlösung)	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	3 g
	Fe(III)-citrat	1 g
	MnSO ₄	200 mg
	ZnCl ₂	200 mg
	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	25 mg
	Na ₂ B ₄ O ₇ × 10 H ₂ O	20 mg
	Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	10 mg
CoCl ₂	4 mg	

2.5 Versuchspflanzen (Anzucht, Pflanzenschutz, Sterilisation)

2.5.1 Weinrebe (*Vitis vinifera* L. cv ‚Müller-Thurgau‘)

Für Labor- und Gewächshausuntersuchungen wurde aus Kostengründen unterschiedliches Pflanzenmaterial zur Anzucht verwendet:

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Versuchspflanzen und deren Herkunft für Labor- und Gewächshausversuche 2009

Bezeichnung	Beschreibung, Herkunft
Zweiaugenstecklinge	<i>Vitis vinifera</i> L. cv ‚Müller-Thurgau‘ (paraffiniert) WEINGUT GERHARD LEISS, Weinsberg-Gellmersbach
Pfropfreben	<i>Vitis vinifera</i> L. cv ‚Müller-Thurgau‘ (paraffiniert), Unterlage 5BB REBENVEREDLUNG WAGNER-ARNOLD, Gundelsheim
Pfropfreben	<i>Vitis vinifera</i> L. cv ‚Müller-Thurgau‘ (paraffiniert), Unterlage Börner, FORSCHUNGSANSTALT GEISENHEIM

2.5.1.1 Pflanzenanzucht

Aus Vermehrungsanlagen wurden in den Wintermonaten zunächst einjährige Ruten der Sorte ‚Müller-Thurgau‘ geschnitten und später zu Zweiaugenstecklingen eingekürzt. Die Lagerung der Stecklinge erfolgte bei -18°C. Für die Quellung der Stecklinge wurden diese zunächst für 4 Stunden in Wasser gelegt. Die folgende Desinfektion erfolgte für 24 Stunden in 0,5 % Chinosol W (m/v). Zur Anzucht wurden die Stecklinge paraffiniert und in sandgefüllte Pikierschalen gesteckt. Sobald die Jungpflanzen eine ausreichende Kallusschicht- bzw. Wurzelgewebe gebildet haben, wurden sie in Einheitserde (FRÜHDORFER Typ T25), Sand und Humus im Verhältnis 2:1:1 umgetopft. Die Pfropfreben wurden aufgrund des vorhandenen Wurzelballens mit demselben Erdengemisch direkt in Topfbeutel gepflanzt.

2.5.1.2 Kulturführung

Alle Versuchspflanzen wurden im Gewächshaus unter konstanten Bedingungen angezogen (25 °C, 60-80 % relative Luftfeuchtigkeit). Um Tageslängen von durchschnittlich 16 Stunden



Abbildung 5: Pflanzenaufzucht von *Vitis vinifera* L. Pfropfreben im Gewächshaus

zu gewährleisten, erfolgte eine Zusatzbeleuchtung bei 10.000 lx mittels Natrium-Dampfleuchten. Die Bewässerung erfolgte, je nach Bedarf manuell mit Weichwasser.

Nach zwei Wochen wurden die Pflanzen mit Rankhilfen versehen und überzählige Triebe ausgebrochen. Ab der vierten Standwoche konnten die Versuchspflanzen für Gewächshaus- und Laborversuche genutzt werden. Aufgrund der starken Wuchskraft, speziell der Pfropfreben wurde bei den Pflanzen ein regelmäßiger Rückschnitt durchgeführt. Dies verbesserte die Belüftung der Laubwand und erhöhte die Nutzungsdauer der Pflanzen. Ab der achten Woche erfolgte neben der üblichen Bewässerung

eine wöchentliche Düngung mit Hakaphos soft ultra 182·18 (COMPO, Münster) in einer Konzentration von 0,2%. Aufgrund starken Befalls durch Ephemem Mehltau (*Uncinula necator*) und Kräuselmilben (*Calepitrimerus vitis* Nal.), war es speziell in den Sommermonaten notwendig, einen begleitenden chemischen Pflanzenschutz durchzuführen.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Pflanzenschutzmittel, Wirkstoffe und Indikation im Versuchsjahr 2009

Präparat	Wirkstoff	Indikation, Konzentration
Netzschwefel	Schwefel	Echter Mehltau (0,5 %)
Vento	Myclobutanil, Quinoxifen	Echter Mehltau (0,25 %)
Prosper	Spiroxamine	Echter Mehltau (0,25 %)
Vertimec	Abamecin	Spinn- und Kräuselmilben (0,025 %)
Kiron	Fenpyroximat	Spinn- und Kräuselmilben (0,15 %)
E 605	Parathion	Spinn- und Kräuselmilben (0,2 %)
Tamaron	Methamidophos	Tripse (0,15 %)

2.5.2 Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L. cv ‚Krone‘ und ‚Cilena‘)

Zu Beginn der Untersuchungen wurde zunächst anhand unterschiedlicher Kartoffelsorten ein Bioassay zur Testung verschiedener phytopathogener *Streptomyces* entwickelt. Hierbei waren starke Sortenunterschiede zu erkennen. Diese bezogen sich in erster Linie auf die Verarbeitung beim Bioassay, der Oxidierungsneigung sowie der Stabilität des Knollengewebes bei mehrtägiger Inokulation.

Für die Laboruntersuchungen im Rahmen des Bioassays wurde auf die Sorte ‚Krone‘ zurückgegriffen, welche aus biologischem Anbau stammte. Die Knollen wurden von Herrn DR. SVEN KEIL (LfL, Freising) zur Verfügung gestellt.

Lediglich für die abschließende Fermentationskurve musste auf die Sorte ‚Cilena‘ zurückgegriffen werden, welche ebenfalls aus ökologischem Anbau stammte. Um den Einfluss einer natürlichen Schorfpopulation auf den Knollen auszuschließen wurden diese zunächst gründlich gewaschen und auf Schorf bonitiert. Stark befallene Knollen wurden aussortiert. Um den Einfluss natürlichen Schorfes weiter zu minimieren, wurden nur innere Bestandteile der Kartoffelknolle zur Untersuchung herangezogen.

2.5.2.1 Sterilisation von Kartoffelscheiben und Vorbereitung des Bioassays

Zu Beginn der Verarbeitung der Kartoffeln wurden diese gründlich unter fließendem Wasser gewaschen und schadhafte Knollen, bzw. Knollen mit starkem Schorfbefall aussortiert. Im Anschluss wurden die Kartoffeln für 1 Minute bei 80 °C im Wasserbad und anschließend für 2 Minuten in 70 % Ethanol oberflächenbehandelt. Die weitere Sterilisation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Hierbei wurden die Knollen in gleichmäßige 5 mm dicke Scheiben geschnitten und runde, 25 mm im Durchmesser starke Scheiben ausgestanzt. Anschließend wurden diese mittels Pinzette in 70 % Ethanol getaucht und in sterilem Leitungswasser gewaschen. Die abschließende Inkubation in steriler 0,5 % Zitronensäure (m/v) erfolgte ebenfalls als Tauchbad. Im Anschluss an die Sterilisation wurden die Kartoffelscheiben in eckige Petrischalen (10x10 cm) gelegt, deren Boden mit 1 mm (Ø) sterilem Glasperlen bedeckt war. Zur Oberflächentrocknung wurden die Petrischalen mit leicht geöffnetem Deckel unter sterilen Bedingungen 30 Minuten stehen gelassen.

2.5.3 Radieschen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus*, 'Sora')

Bei der Sortenwahl der Radieschen wurde auf kommerziell erhältliche Radieschensamen zurückgegriffen, welche keine Resistenz gegenüber dem Kartoffelschorf aufweisen. In Vorversuchen zeigte vor allem die Sorte 'Sora' die einheitlichste Keimungsrate und wurde daher für den Bioassay herangezogen.

2.5.3.1 Sterilisation von Radieschensamen

Bei der Sterilisation der Samen wurde auf das Standardprotokoll (SPLIVALLO et al., 2009) zur Sterilisation von *Arabidopsis thaliana* zurück gegriffen und nur leicht modifiziert:

Zunächst wurden die Samen in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 20 mL 70 % Ethanol für zwei Minuten gewaschen und anschließend die alkoholische Lösung entfernt. Im Weiteren wurden 6 mL einer 3 % Natriumhypochloritlösung (v/v) zugegeben, diese mit 18 mL bidestilliertem Wasser verdünnt und der Ansatz für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung der Desinfektionslösung wurden die Samen drei Mal mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Hierbei wurden an der Oberfläche schwimmende Samen entfernt. Das Leitungswasser wurde abschließend dekantiert und die Samen in eine sterile Petrischale gegossen, mit Parafilm verschlossen und für 48 Stunden bei 4°C fertilisiert. Die weitere Verarbeitung der Samen im Bioassay ist in Kapitel 2.10.6 näher beschrieben.

2.5.4 Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*, 'Columbia Zero')

Für die Untersuchungen mit *Arabidopsis thaliana* wurde auf einen Wildtyp 'Columbia Zero' des Acker-Schmalwandes zurückgegriffen.

2.5.4.1 Sterilisation von Acker-Schmalwandsamen

Bei der Sterilisation der Samen wurde auf das Standardprotokoll (SPLIVALLO et al., 2009) zur Sterilisation von *Arabidopsis thaliana* verwendet.

Zunächst wurde die Samen in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 5 mL 70 % Ethanol für eine Minute gewaschen und anschließend die alkoholische Lösung entfernt. Im Anschluss wurden 3 mL einer 3 % Natriumhypochloritlösung (v/v) zugegeben, diese mit

9 mL bidestilliertem Wasser verdünnt und der Ansatz für 20 bis 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung der Desinfektionslösung wurden die Samen drei Mal mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Hierbei wurden an der Oberfläche schwimmende Samen entfernt. Das Leitungswasser wurde abschließend dekantiert und die Samen in eine sterile Petrischale mit Filterpapiereinlage gegossen, mit Parafilm verschlossen und für 72 Stunden fertilisiert. Alternativ wurde der Samen nach dem Waschen mit 200 µL sterilem Wasser aufgenommen und in 2 mL 0,12 % Wasseragar suspendiert.

Die weitere Verarbeitung der Samen im Bioassay ist in Kapitel 2.10.7 näher beschrieben.

2.6 Mikroorganismen (Inokulation und Stammhaltung)

2.6.1 Oomyceten

2.6.1.1 Inokulation und Vermehrung von *Plasmopara viticola*

Vorbereitung des Pflanzenmaterials und Inokulation

Als pflanzliches Vermehrungsmaterial zur Anzucht von *P. viticola* dienen Blätter von *Vitis vinifera* L. cv 'Müller-Thurgau'. Die Blattentnahme erfolgte im Gewächshaus ausschließlich aus dem oberen Teil der Pflanze (drittes bis siebtes entfaltetes Blatt unterhalb der Triebspitze). Für den Transport wurden die Blätter in kaltes Leitungswasser gelegt. Anschließend wurden die Blattstiele entfernt und verworfen. Zur Desinfektion wurde die Blattspreite tropfnass mit 70 % Ethanol (v/v) besprüht und anschließend dreimal mit sterilem, demineralisiertem Wasser gewaschen. Für die anschließende Inokulation mit *P. viticola* wurden die Blätter jeweils mit der Blattunterseite nach oben auf zuvor präparierte 0,8 % Wasseragarplatte (m/v) in einer Petrischale (10x10 cm) gelegt (KÖSSLER, 2006).

„Allen Versuchen liegt eine Population von *Plasmopara viticola* (BERK. & CURT) BERL. & DE TONI, welche vom STAATLICHEN WEINBAUINSTITUT Freiburg isoliert wurde, als Inokulum zugrunde. Zur Vermehrung des pathogenen Materials wurde das Inokulum in demineralisiertem Wasser suspendiert und die Konzentration der Sporangienlösung mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt“ (KÖSSLER, 2006). Durch Verdünnung mit Wasser wurde die Konzentration auf 10.000 Sporangien je Milliliter eingestellt.

Im nächsten Schritt wurden auf die Rebblätter mehrere kleine Inokulationstropfen zu je 50 μL pro Tropfen auf die Blattunterseite abgesetzt. Nach einer Wartezeit von 10-20 Minuten wurden die Blätter umgedreht um eine gleichmäßige Benetzung durch das Inokulum zu erzielen. In Anschluss an die Keimungs- und Enzystierungsphase – mindestens vier Stunden bei Dunkelheit, 25 °C – wurden die Blätter umgedreht und zur ‚Trocknung‘ für 15-30 Minuten in der Sterilbank offen stehen gelassen. Zur Inkubation wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und für vier Tage bei 25 °C und acht Stunden Dunkelheit pro Tag im Klimaschrank (Beleuchtung: 4x40 W, ~ 40 cm Abstand) gelagert (KÖSSLER, 2006).

Ernte des Vermehrungsmaterials

In Anschluss an die 4- tägige Inkubationszeit wurden die gebildeten Sporangien mittels Sporensauger ‚geerntet‘. Hierzu wurde durch den Deckel eines 1,5 mL Reaktionsgefäßes ein



Abbildung 6: Sporangiensauger mit Eppendorffbeutel und stark sporulierendem Rebblatt

dünnes HPLC-Tubing gesteckt, welcher an eine Vakuumpumpe angeschlossen und innerhalb des Gefäßes mit einem luftdurchlässigen Elasthan-Vlies verschlossen war. Ein zweites Tube wurde ebenfalls durch den Deckel des Gefäßes eingeführt. Das Eppendorfgefäß diente somit als ‚Staubsaugerbeutel‘, während das zweite Tube als ‚Saugrüssel‘ diente, welcher die Sporangien vom Blatt saugen konnte (KÖSSLER, 2006). Die gesammelte

Sporangien wurde damit direkt in das Eppendorfgefäß überführt. Zur Lagerung wurde das mit Sporangien gefüllte Gefäß mit Parafilm verschlossen und im Gefrierschrank bei -18 °C gelagert.

2.6.2 Streptomyceten

Für die Labor- und Klimakammeruntersuchungen wurden verschiedene Streptomyceten unterschiedlicher Herkunft verwendet:

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Streptomyceten-Stämme

Bezeichnung	Bezug
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	IOBC, Georg-August-Universität Göttingen
<i>Streptomyces bottropensis</i> DSMZ 40800	DSMZ, Braunschweig
<i>Streptomyces bottropensis</i> DSMZ 40262	DSMZ, Braunschweig
<i>Streptomyces scabies</i> 123	DNPW, Universität Göttingen
<i>Streptomyces scabies</i> 124	DNPW, Universität Göttingen
<i>Streptomyces scabies</i> 1/3	DNPW, Universität Göttingen

2.6.2.1 Stammerhaltung

Zur kurzzeitigen Stammerhaltung das Medium YMG + Calcium in Petrischalen. Die Inokulation erfolgte durch Ausstreichen der Sporen mittels ausgeglühter Impföse. Im Anschluss an die Inokulation wurden die Platten bei 28 °C für 7 bis 10 Tage bei Dunkelheit inkubiert. Zur weiteren Lagerung wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und sind bei 4 °C im Kühlschrank für mehrere Wochen lagerfähig.

2.6.2.2 Langzeiteinlagerung

Glycerineinlagerung

Für längerfristige Einlagerungen wurden 100 mL einer sterilen YMG- Flüssigkultur mit 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte inokuliert und für 48 Stunden (28 °C, 220 rpm, Dunkelheit) inkubiert. Im Vorfeld wurde 1 mL Glycerin in ein 2 mL Kryoröhrchen pipettiert, verschlossen und autoklaviert. Nach der Inkubation wurde 1 mL der stark bewachsenen Streptomyceten-Kultur steril zu dem Glycerin pipettiert, gemischt und anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte wahlweise bei -75 °C bzw. -18 °C. Die gefrorenen Proben können so für mehrere Monate

gelagert werden. Vor Verwendung der Glycerineinlagerungen wurden diese langsam im Kühlschrank aufgetaut.

Einlagerung in flüssigem Stickstoff

Für Dauereinlagerungen wurde aus einer stark bewachsenen Agarplatte (YMG + Calcium) mehrfach mit einem sterilen PVC-Halm eingestochen und somit pathogenes Material aufgenommen. Anschließend wurden die Enden des PVC-Röhrchens mit einer heißen Pinzette verschlossen und in einen weiteren Strohhalm geschoben. Dieser wurde mit einem Bleigewicht versehen und ebenfalls an den Enden verschlossen. Der gesamte Ansatz wurde abschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Die so gelagerten Proben sind für mehrere Jahre haltbar.

Gefriertrocknung

Eine weitere Möglichkeit der Dauereinlagerung von Mikroorganismen ist die

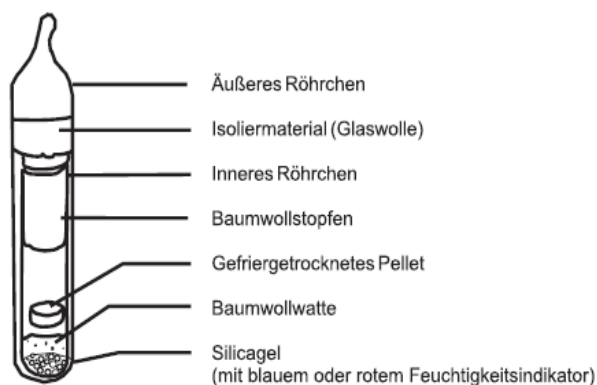


Abbildung 7: Unter Vakuum verschlossene Doppelampulle zur Langzeitlagerung von Mikroorganismen (DSMZ, 2009)

Gefriertrocknung mit anschließender „Verglasung“ unter Vakuum. Hierzu wird eine stark bewachsene Kultur (YMG Medium) zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Im Folgenden wird das Mycel mehrmals unter Kühlung mit TE-Puffer gewaschen und schließlich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Mycel wird anschließend gefriergetrocknet. Um die

Probe langfristig von Umwelteinflüssen abzusichern wird das Mycel zu einem Pellet gepresst und analog zu Abbildung 7 verglast.

2.6.2.3 Medienwahl zur Fermentation phytopathogener Streptomyceten

Bei der Fermentation von Mikroorganismen spielt die Wahl der Kultivierungsparameter, speziell beim Metabolitenspektrum, eine entscheidende Rolle. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Variation der Kultivierungsparameter bei begabten Sekundärstoffproduzenten die Bildung von Metaboliten induziert werden kann (OSMAC: One Strain Many Compounds) (BODE et al., 2002).

Die Fermentation der *Streptomyceten* erfolgte in Flüssigkulturen. Bei der Wahl des Mediums sowie den Fermentationsbedingungen konnte teilweise auf Vorarbeiten von OLIVER WAGNER, JAN VON FRIELING sowie FRANK SURUP zurückgegriffen werden:

Tabelle 4: Beispiel für die erfolgreiche Anwendung des OSMAC-Verfahrens an *Streptomyces bottropensis* Dra 17 bei der Wahl der geeigneten Fermentationsmedien (BITZER, 2005)

Stamm	Vorkultur	Hauptkultur	Metaboliten
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	Hafer	Hafer	Thaxtomin A
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	SGG	Medium S	Iromycin A, Iromycin B

2.6.2.4 Fermentation von phytopathogenen Streptomyceten

Vorkulturen: Die Fermentation der Vorkulturen erfolgte im 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen. Die Kolben wurden mit 100 mL Medium gefüllt, autoklaviert und wurden anschließend mit einer 1 cm² großen, gut bewachsenen Agarplatte inokuliert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte im Inkubationsschüttelschrank für 48 Stunden (220 rpm, 28 °C und Dunkelheit).

Die weitere Fermentation in einer Hauptkultur wurde wahlweise in Fermentern bzw. erneut in Erlenmeyerkolben durchgeführt:

Erlenmeyerkolben: Die Fermentation erfolgte je nach Maßstab des Fermentationsansatzes in, 300 mL bzw. 1000 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen. Die Kolben wurden mit 100 mL

bzw. 300 mL Medium gefüllt, autoklaviert und mit 5 % Vorkultur, bemessen am Füllvolumen der Hauptkultur, inokuliert. Die Inkubation erfolgte im Inkubationsschüttelschrank für 72 Stunden (220 rpm, 28 °C und Dunkelheit).

BIOSTAT-B-Fermenter: Im 2,0 L BIOSTAT-B-Fermentergefäß wurden 1800 mL Medium mit einigen Tropfen 10 % Niaxlösung (10ml Niax + 90 mL 70 % Ethanol) autoklaviert. Die Inokulation erfolgte mit 7,5 % Vorkultur, bemessen am Volumen der Hauptkultur. Die Fermentation wurde bei 28 °C, 500 U/min sowie einer Belüftung von 3,2 L/min durchgeführt. Der pH-Wertes wurde durch automatische Zugabe von Zitronensäure bzw. Natronlauge bei Überschreitung der pH-Grenzen von 5,5 und 7,5 korrigiert.

AIRLIFT-Fermenter: Zur Kultivierung im AIRLIFT-Fermenter wurden 9,2 L Medium sowie 3 mL Niaxlösung (10ml Niax + 90 mL 70 % Ethanol) autoklaviert. Die Inokulation erfolgte mit 10 % Vorkultur, bemessen am Volumen der Hauptkultur. Die Fermentation erfolgte bei 28 °C, 5 bar Überdruck und einer Belüftung von 5 vvm. Auf eine Regulierung des pH-Wertes wurde verzichtet.

Die weitere Aufarbeitung der Fermentationsansätze wird im Kapitel „Versuchssubstanzen“ näher dargestellt.

2.7 Versuchssubstanzen

2.7.1 Pflanzenextrakte

Das verwendete Pflanzenmaterial wurde als geschnittene Trockenware vom KRÄUTERHAUS HACKENBERG in Düsseldorf bezogen. Aus Gründen der ‚Verschreibungspflicht‘ von bioaktiven Teedrogen wurde die zerkleinerte Faulbaumrinde bei der ROSENAPOTHEKE in Göttingen bestellt.

Tabelle 5: Familienname, Artenliste und verwendete Pflanzenteile zur Extrakterstellung

Familie	lat. Bezeichnung	dt. Bezeichnung	
<i>Araliaceae</i> (Efeugewächse)	<i>Hedera helix</i>	Efeu	<i>Hedera folium</i>
<i>Fagaceae</i> (Buchengewächse)	<i>Quercus petraea</i>	Eiche	<i>Quercus cortex</i>
<i>Lamiaceae</i> (Lippenblütler)	<i>Salvia officinalis</i>	Salbei	<i>Salvia folium</i>
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosmarin	<i>Rosmarinus folium</i>
<i>Primulaceae</i> (Primelgewächse)	<i>Primula officinalis</i>	Schlüsselblume	<i>Primula radix</i>
<i>Rhamnaceae</i> (Kreuzdorngewächse)	<i>Rhamnus frangula</i>	Faulbaum	<i>Rhamnus cortex</i>
<i>Salicaceae</i> (Weidengewächse)	<i>Salix ssp.</i>	Weide	<i>Salix cortex</i>

2.7.1.1 Extraktionsverfahren

Die Extraktion der Pflanzenteile erfolgte, ähnlich der Herstellung eines ‚Teeaufgusses‘, durch Zugabe verschiedener Lösungsmittel. Unterscheidungskriterien waren neben der Wahl des Lösungsmittels, die Extraktionstemperatur, die Extraktionsdauer sowie die weitere Behandlung im Ultraschallbad:

Bei allen Versuchsansätzen wurden 30 g pflanzlicher Trockensubstanz in einen 1000 mL Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 300 mL Lösungsmittel versetzt. Die weitere Verfahrensweise wird in Tabelle 6 ersichtlich. Im Anschluss wurde der Ansatz durch eine Vakuumnutsche mit Vlieseinlage filtriert und gefriergetrocknet. Das erhaltene Pflanzengranulat wurde eingewogen und die Substanzmenge anhand des Gewichtes

miteinander verglichen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die getrockneten Extrakte bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Tabelle 6: Extraktionsverfahren zur Herstellung von Pflanzenextrakten

Lösungsmittel	rpm	Temperatur	Extraktionsdauer	Ultraschallbad
Wasser	180	60 °C	72 h	nein
20 % Ethanol (v/v)	180	60 °C	72 h	nein
Aceton	180	RT	4 h	10 min
Ethanol	180	RT	4 h	10 min
Methanol	180	RT	4 h	10 min
Aceton : Methanol (1:1) (v/v)	180	RT	4 h	10 min
20 % Ethanol (v/v) + Aceton : Methanol (1:1) (v/v)	180	40°C	4 h	nein
Aceton : Methanol (1:1) (v/v)	0	RT	20 Minuten	10 Minuten

2.7.2 Sekundärmetaboliten phytopathogener *Streptomyces*

2.7.2.1 Isolierung von Thaxtominen

Bei der Isolierung von Thaxtominen wurde zunächst Celite-Pulver mit Wasser aufgeschlämmt und durch eine Vakuumnutsche mit Filtereinsatz filtriert. Der entstandene Celitekuchen diente hierbei als zusätzliche Filterschicht. Im Weiteren wurde der Fermentationsansatz ebenfalls mit Celitepulver vermischt und durch die Celitefilterschicht mittels Vakuum filtriert. Die entstandenen zwei Komponenten – Kulturfiltrat und Mycel (vermischt mit Celite) wurden zunächst voneinander getrennt bearbeitet:

Kulturfiltrat: Der pH-Wert des Kulturfiltrates wurde auf einen Wert von 5,0 mittels verdünnter Salzsäure korrigiert. Anschließend wurde das Filtrat drei Mal mit einem Überschuss an Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde im Vakuum eingeeengt.

Mycel: Das Celite-Mycelgemisch wurde in Methanol/Aceton 1:1 resuspendiert und für 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Die Suspension wurde dann mittels Faltenfilter oder Vakuumnutsche mit Filtereinlage getrennt und die organische Phase im Vakuum eingeeengt. Im Weiteren wurden sowohl das Kulturfiltrat sowie das Mycelextrakt vereinigt und chromatographisch aufgereinigt.

Kulturfiltrat und Mycel: Die chromatographische Aufreinigung erfolgte zunächst durch FlashChromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 7:3 → 1:1 bzw. Cyclohexan/Essigester/Methanol 10:5:1). Der Erfolg der Trennung wurde im Dünnschichtchromatogramm kontrolliert. Eine weitere Trennung erfolgte mittels Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mit Methanol als mobiler Phase.

Die abschließende Aufreinigung der Thaxtomine wurde mit Hilfe von Mitteldruckchromatographie (Methanol/Wasser 7:3 → 9:1) bzw. präparativer HPLC (Programm 5 oder 6, Säule 9 oder 10) durchgeführt.

2.7.2.2 Isolierung von Iromycinen

Die Vorbehandlung mit Celite-Pulver erfolgte bei der Isolation von Iromycinen analog zur Aufreinigung der Thaxtomine. Das erhaltene Kulturfiltrat sowie das Celite-Mycelgemisch wurden unabhängig voneinander aufgearbeitet:

Kulturfiltrat: Der pH-Wert des Kulturfiltrat wurde zunächst auf einen Wert von 5,0 mittels verdünnter Salzsäure korrigiert. Anschließend wurde das Filtrat drei Mal mit einem Überschuss an Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und im Vakuum eingengt. Die chromatographische Aufreinigung der Essigester-Extrakte erfolgte zunächst durch FlashChromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1 → 3:1 bzw. Cyclohexan/Essigester/Methanol 10:5:1). Der Erfolg der Trennung wurde im Dünnschichtchromatogramm kontrolliert. Eine weitere Trennung erfolgte mittels Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mit Methanol als mobiler Phase.

Die abschließende Aufreinigung der Iromycine wurde mit Hilfe von Mitteldruckchromatographie (Methanol/Wasser 7:3 → 9:1) bzw. präparativer HPLC (Programm 3 oder 4, Säule 9 oder 10) durchgeführt.

Mycel: Das Celite-Mycelgemisch wurde zunächst in Methanol/Aceton 1:1 resuspendiert und für 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Die Suspension wurde dann mittels Faltenfilter oder Vakuumnutsche mit Filtereinlage getrennt und die organische Phase im Vakuum eingengt. Die weitere chromatographische Aufreinigung des Myceleextraktes erfolgte analog zum Kulturfiltrat.

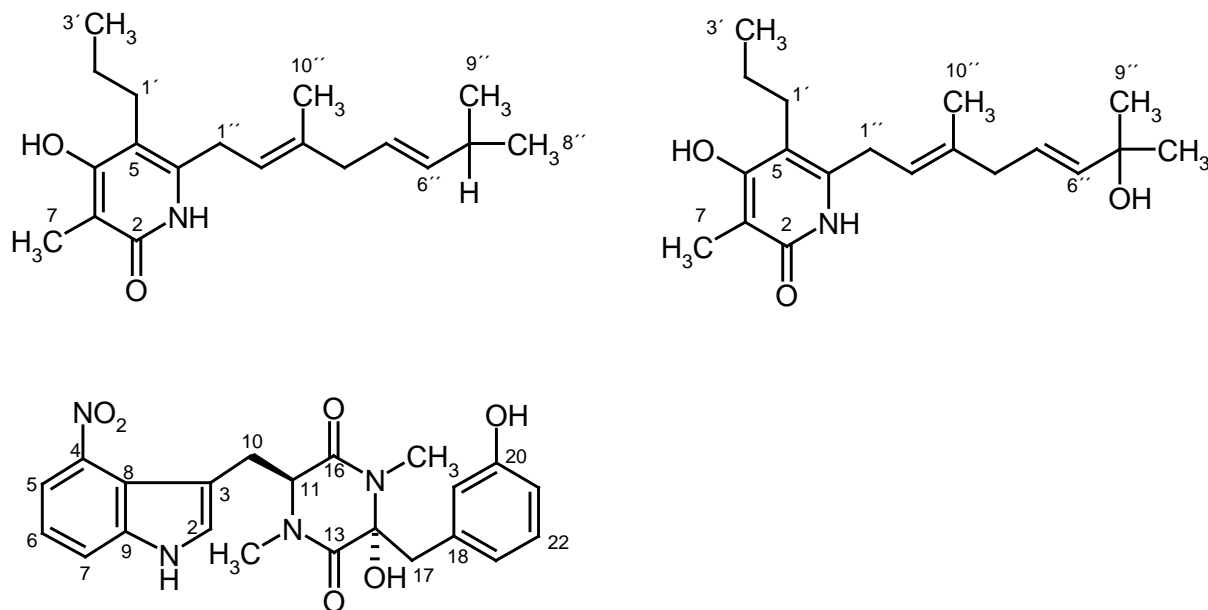


Abbildung 8: Strukturformeln von Iromycin A (oben links), Iromycin B (oben rechts) und Thaxtomin A (unten)

2.7.2.3 Überprüfung des Isolationserfolges mittels chemischer Analytik

Die Überprüfung des Isolationserfolges von Iromycinen und Thaxtominen erfolgte durch die in Kapitel 2.1 angegebene chemische Analytik.

Die Struktur wurde in erster Linie anhand von NMR-Spektroskopie (^{13}C -NMR-Spektren, ^1H -NMR-Spektren, 2D-NMR-Spektren) abgesichert, die Überprüfung der exakten Masse erfolgte anhand von Massenspektren (HR-ESI-MS, ESI-MS). Auf eine eingehende Darstellung der Probenvorbereitung sowie der Darstellung der dabei eingesetzten Reagenzien soll an dieser Stelle verzichtet werden.

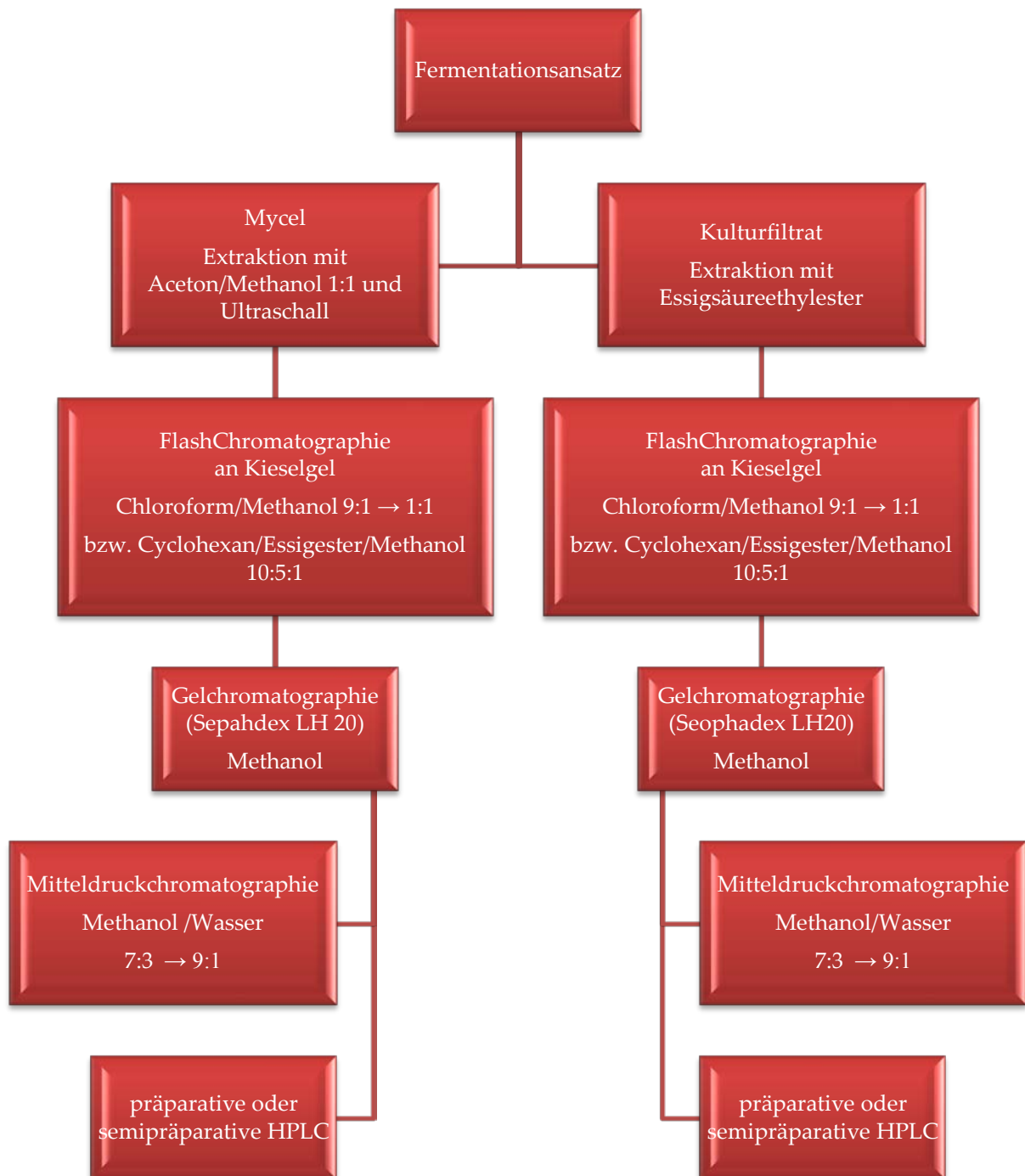


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Isolierung von Iromycinen aus einem Fermentationsansatz des Bakteriums *Streptomyces* spp. Die Größe der Säulen bei der Chromatographie an Kieselgel richtete sich nach der Substanzmenge der Rohprodukte.

2.8 Methoden zur Testung der Wirkung von Pflanzenextrakten auf die Entwicklung von *Plasmopara viticola*

Grundlage des Bioassays, welcher bereits im Rahmen der Magisterarbeit (KÖSSLER, 2006) entwickelt wurde, sind verschiedene Untersuchungen, welche sich an dem Entwicklungszyklus von *Plasmopara viticola* orientieren. Das Augenmerk fiel dabei auf die einzelnen Stadien der ungeschlechtlichen Vermehrung, welche im Freiland maßgeblich die Epidemiologie beeinflusst. Hier dargestellte Methoden stellen Weiterentwicklungen sowie Optimierung des 2006 erstellten Bioassays dar.

2.8.1 Vorbereitung des Pflanzenmaterials

Analog der Vermehrung des pathogenen Materials (2.6.1.1) verhielt sich auch die Infektion von Blattscheiben. Hierfür wurden Blätter geerntet, desinfiziert und Blattscheiben mit einem Durchmesser von 17 mm ausgestanzt.

2.8.2 Verdünnung und Applikation der Pflanzenextrakte

Um die Extrakte auf das Pflanzenmaterial aufzubringen, war es notwendig die einzelnen Präparate in wässriger Lösung vorzulegen. Hierzu wurde das aus der Gefriertrocknung erhaltende Pulver auf die entsprechende Konzentration mit Leitungswasser verdünnt. Da nicht alle Bestandteile der Extrakte wasserlöslich waren, wurde zunächst in Vorversuchen der Unterschied zwischen Extraktlösung, Extrakt sediment und Rohextrakt ermittelt. Für das Rohextrakt wurde hierzu das Extraktpulvers mit 500 µL Dimethylsulfoxid aufgenommen und mit Leitungswasser auf die Zielkonzentration (3 % Trockensubstanz (TS)) eingestellt.

Die Applikation der Versuchssubstanzen erfolgte als Tauchbad. Hierbei wurden die zuvor sterilisierten Blattscheiben kurz in das Pflanzenextrakt eingetaucht, abgeklopft und zur Trocknung wieder auf die Wasseragarplatten zurückgelegt. Terminbezogen erfolgte die Applikation protektiv vor der Inokulation (KÖSSLER, 2006).

2.8.3 Inokulation von Blattscheiben

Die Inokulation der Blattscheiben erfolgte analog zur Infektion des Vermehrungsmaterials mittels Inokulationstropfen ($\sim 80 \mu\text{L}$ pro Tropfen und Blattscheibe, zentral aufgetragen, 10.000 Sporangien je mL). Die Petrischalen mit den inokulierten Blattscheiben wurden mit Parafilm abgedichtet und für 16 Stunden bei konstanten Bedingungen im Klimaschrank ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, 8 Stunden Dunkelheit; Beleuchtung: 4x40 W, 40 cm Abstand) inkubiert. Im Weiteren wurde der Inokulationstropfen steril abgenommen und unter entsprechenden Versuchsbedingungen weiter inkubiert (KÖSSLER, 2006).

2.8.4 Sporulationsintensität

Bei den Untersuchungen zur Sporulationsintensität auf dem Wirtsgewebe wurden die Blattscheiben protektiv mit den Pflanzenextrakten behandelt.

Hierzu wurden die Proben 48 Stunden vor der Inokulation in die entsprechend verdünnten Pflanzenextrakte eingetaucht und ‚getrocknet‘. Im Anschluss an die Inokulationszeit wurden jeweils vier Blattscheiben pro Prüfsubstanz visuell auf die Befallsstärke bonitiert. Hierbei wurde das Boniturschema aus Abbildung 10 zu Grunde gelegt (KÖSSLER, 2006).

Die erhobenen Daten wurden gemittelt statistisch ausgewertet und die Befallsstärke errechnet. Zur Kontrolle der visuellen Boniturergebnisse wurden dieselben Blattscheiben mittels Pinzette in jeweils ein Eppendorfgefäß überführt. Unter Zugabe von 1 mL Wasser wurde das Gefäß für 30 Sekunden gevortext. Anschließend wurde die Blattscheibe entfernt, das Eppendorfgefäß nochmals kurz gevortext um die gelösten Sporangien gleichmäßig zu verteilen. Die Auswertung der gebildeten Sporangienzahl je Milliliter erfolgte mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (KÖSSLER, 2006).

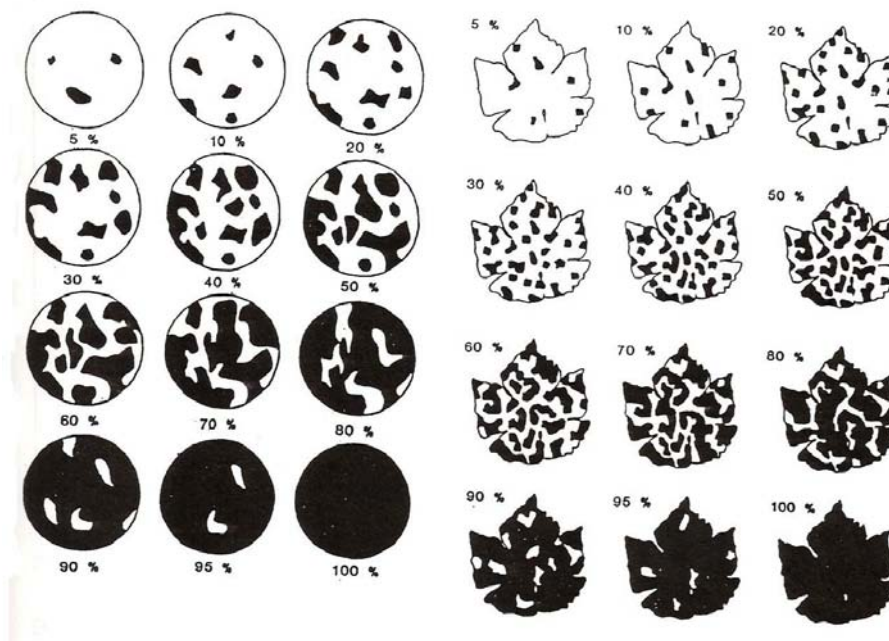


Abbildung 10: Boniturschema für ausgestanzte Blattscheiben (links) und für Blätter (rechts) der Rebsorte Müller-Thurgau. Die dunklen Bereiche entsprechen der von Sporangienträgern bedeckten Fläche der Blattunterseite (Abbildung: TILCHER, 1995).

2.8.5 Real-Time PCR Untersuchungen zur Biomassenbestimmung von *Plasmopara viticola* im Wirtsgewebe

Neben der Untersuchung der Sporulation von *P. viticola* mittels visueller Bonitur der Blattscheiben sowie dem Auszählen der abgeschwämmten Sporen, sollen die Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR zusätzliche Aufschlüsse über die Auswirkungen der Pflanzenextrakte auf die Entwicklung von *P. viticola* im Inneren des Rebblattes liefern. Ferner ist es anhand der Untersuchungsergebnisse ebenfalls möglich, bisherige Resultate quantitativ abzusichern.

2.8.5.1 DNA-Extraktion aus Sporangien von *P. viticola* als Standard für die Real-Time PCR

Die DNA-Extraktion aus Sporangien von *Plasmopara viticola* erfolgte auf einer CTAB basierenden Methode. Hierbei wurden 100 mg Sporenmaterial zunächst mittels fünf Wolframcarbidge-Kugeln in der Kugelmühle für zehn Minuten physikalisch aufgeschlossen.

Dem Ansatz wurden je 1 mL CTAB Puffer, 2 μ L Mercaptoethanol sowie 1 μ L Proteinase K zugegeben. Die Proben wurden für je 10 Minuten im Thermomixer bei 42 °C und später bei 65 °C und 150 rpm inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden 800 μ L Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt, kurz gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 10 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Aus dem entstandenen dreiphasigen System wurden 750 μ L der oberen Phase entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die 20 minütige Fällung der DNA erfolgte mit 210 μ L Polyethylenglycol (PEG) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 15 Minuten bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 μ L 70 % Ethanol gewaschen. Im Weiteren wurde die Probe erneut für 5 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei 30 °C in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Abschließend wurde das Pellet mit 100 μ L TE-Puffer resuspendiert und bis zur vollständigen Lösung für 12 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Vor der weiteren Verwendung in der PCR wurde die in TE-Puffer aufgenommene DNA für zwei bis vier Stunden im Wasserbad bei 42 °C inkubiert.

Zur weiteren Aufreinigung der DNA für die PCR wurde auf das ‚High Pure PCR Template Preparation Kit‘ (ROCHE Applied Science) zurück gegriffen und das Protokoll leicht modifiziert: Hierbei wurden der gelösten DNA 100 μ L bidestilliertes Wasser und 25 μ L Proteinase K zugesetzt. Die Proben wurden bei 50 °C für 10 Minuten im Thermoshaker (150 rpm) inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz für 1 min bei 15.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und mit 4 μ L aktivierter RNase-A-Lösung (100 mg/mL) versetzt. Nach kurzer Durchmischung erfolgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Dem Ansatz wurden 400 μ L ‚Bindingbuffer‘ zugegeben und die Proben durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Der Ansatz wurde durch ein Spinfilter zentrifugiert (2 min, 10.000 rpm) und dieser anschließend in ein neues Receptortube gesetzt. Im Folgenden wurde abwechselnd ‚Waschlösung A‘ (500 μ L), zugegeben, zentrifugiert und erneut ‚Waschlösung B‘ (750 μ L) zupipettiert. Nach erneutem Wechsel des Receptortubes und weiterer Zentrifugation wurde das Spin in ein neues Tube gesetzt und 100 μ L Eluierungspuffer in die Mitte des Spin Filters pipettiert. Nach einer 3

minütigen Inkubation wurde der Ansatz abschließend bei 6.000 rpm zentrifugiert und zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.8.5.2 DNA-Quantifizierung mittels UV/VIS Spektralphotometer

Um eine Quantifizierung mittels Real-Time PCR realisieren zu können, musste zunächst aus der Sporangien-DNA eine Standardreihe hergestellt werden. Hierzu wurde die Konzentration der extrahierten DNA mittels Nanodrop 2000c bestimmt und auf 5 µg/µL eingestellt. Im Anschluss wurde die DNA mehrfach in 1:10 Stufen mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Abschließend wurden die Verdünnungsstufen bis zur Detektionsgrenze, ebenfalls mittels Nanodrop 2000c verifiziert.

2.8.5.3 Inokulation und Probenaufbereitung

Die Inokulation der Blattscheiben erfolgte analog zur Probenvorbereitung bei den Untersuchungen zum Sporulationsintensität. Hierzu wurden je Prüffextrakt insgesamt 16 Blattscheiben 48 Stunden vor Inokulation protektiv behandelt. Im Anschluss an eine 4-tägige Inkubation wurden für jede Prüfvariante jeweils vier Blattscheiben in vier Petrischalen gelegt und für 12 Stunden eingefroren. Die Blattscheiben wurden in gefrorenem Zustand für 48 Stunden gefriergetrocknet und in 2 mL Reaktionsgefäße überführt. Zusammen mit fünf Wolframcarbid-Kugeln wurden die Blattscheiben in der Kugelmühle für 10 Minuten gemahlen. Zur anschließenden DNA-Extraktion wurden je Prüfvariante (n=4) jeweils 200 mg in ein frisches Reaktionsgefäß eingewogen und bei -28 °C gelagert.

2.8.5.4 Gesamt-DNA-Extraktion von *P. viticola* aus Rebblättern

Für die Etablierung einer spezifischen Real-Time PCR Methode für *Plasmopara viticola* wurde die Gesamt-DNA der einzelnen Prüfvarianten, auf einer ebenfalls CTAB basierenden Methode der DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial, isoliert (BRANDFASS & KARLOVSKY, 2006). Hierfür wurden 200 mg gefriergetrocknete inokulierte Blattscheiben in ein Reaktionsgefäß eingewogen. Die weitere DNA Isolation erfolgte analog zur DNA-Extraktion aus Sporangien (Kapitel 2.8.5.1).

2.8.5.5 Gelelektrophorese

Die Kontrolle der Konzentration sowie der Qualität der isolierten DNA erfolgte mittels Gelelektrophorese. Auf ein 0,8 % Agarosegel wurden je 4 μL Probe mit 2 μL Beschwerungspuffer aufgetragen. Zusätzlich wurde 1 μL λ -Phagen-DNA (25 ng/ μL) mit 2 μL Beschwerungspuffer als Größenmaßstab aufgetragen. Die Spannung betrug 4 V cm^{-1} bei einer Laufzeit von 60 Minuten. Die Anfärbung des Agarosegels erfolgte für 10 Minuten in Ethidiumbromid (2 mg/L). Nach weiteren 10 Minuten im Wasserbad wurden das Gel in einer Dunkelkammer unter UV-Licht sowie einem digitalen Darstellungssystem dokumentiert.

2.8.5.6 Spezifikationen zur Real-Time PCR Methode für *Plasmopara viticola*

Für die Quantifizierung der Oomyceten Biomasse in Rebblättern wurden die spezifischen Primer KP-PV-III-fow und KP-PV-III-rev, welche von VALSESIA et al. (2005) abgeleitet wurden, verwendet. Diese wurden auf Basis der IST 1 von 30 verschiedenen Oomyceten abgeleitet. Für die Real-Time PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse wurde das Reaktionsgemisch sowie das Protokoll von VALSESIA et al. (2005) verwendet und den Spezifikationen der verwendeten Geräte angepasst. Für die Standardreihe wurde aufgereinigte DNA von *Plasmopara viticola* in TE-Puffer mehrfach verdünnt und in den DNA-Mengen 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg und 50 fg je Reaktionsansatz eingesetzt.

Tabelle 7: Reaktionsgemisch zur Untersuchung der Biomasse von *Plasmopara viticola* aus Rebblättern mittels quantitativer real-time-PCR

Bezeichnung	Konzentration	Endkonzentration
NH4 Reaktionspuffer, BIOLINE	10x	1x
Magnesiumchlorid, BIOLINE	50 mM	2 mM
dNTP, BIOLINE	2,5 mM	150 µM
Primer KP-PV-III-fow.	10 µM	0,5 µM
Primer KP-PV-III-rev.	10 µM	0,5 µM
Fluorescein	1 µM	10 n;
SybrGreen Mol Probes	10x	0,1 x
BioTaq DNA Polymerase, BIOLINE	5 U/µL	0,5 U
Target DNA		1 µL

Tabelle 8: Protokoll der quantitativen Bestimmung der Biomasse von *P. viticola* in Rebblättern mittels Real-Time PCR

Cycle	Bezeichnung	Temperatur	Minuten
Cycle 1	initiale Denaturierung	94 °C	2:30
Cycle 2	Denaturierung	94 °C	0:30
45x	Hybridisierung	64 °C	1:00
	Elongation	72°C	0:30
Cycle 3	finale Elongation	72°C	10:00
Cycle 4	Denaturierung (Schmelzkurve)	95°C	1:00
Cycle 5	Abkühlung (Schmelzkurve)	55°C	1:00
Cycle 6	Schmelzkurve	65 °C → 100°C	0:20
	70 x 0,5 °C Steps		
Cycle 7		15 °C	HOLD

2.9 Fütterungsversuche an phytopathogenen Streptomyceten

2.9.1 Fütterung von NOS-Inhibitoren bei *S. bottropensis* Dra 17

Zur Kontrolle der inhibitorischen Effekte von Iromycin A wurden in eine Flüssigkultur von *Streptomyces bottropensis* Dra 17 unterschiedliche Mengen an Iromycin A zugefüttert. Da Iromycin A eine bekannte inhibitorische Aktivität gegenüber humaner NO-Synthasen aufweist (SURUP, 2007), wurde die Hypothese aufgestellt, dass somit auch Effekte auf die Thaxtomin A Produktion zu vermuten sind. Hintergrund dieser Hypothese belegen Biosynthesestudien zu Thaxtomin A, welche eine Beteiligung einer NO-Synthase beschreiben. Als Positivkontrolle dienten die bekannten NO-Synthaseinhibitoren *N*-Nitro-L-Arginin (NMA) und *N*-Methyl-L-Arginin (NMMA).

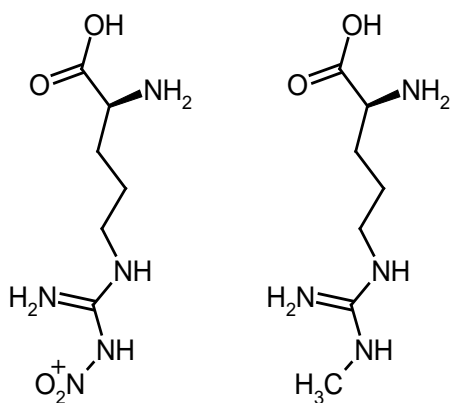


Abbildung 11: Strukturformeln von *N*-Nitro-L-Arginin (NNA) (links) und *N*-Methyl-L-Arginin (NMA) (rechts)

2.9.1.1 Optimierung der Medien zur Thaxtomin A Produktion

Zur Optimierung der Thaxtominproduktion wurde zunächst versucht, die Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A in verschiedenen Medien zu optimieren: Hierzu wurden vier 1000 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane, durch 20 mL einer *Streptomyces bottropensis* Dra 17 SGG Vorkultur inokuliert. Als Nährmedien dienten neben dem Hafer zusätzlich YMG-Medium sowie die Medien 1157S und 1358. Die Inkubation erfolgte über 72 Stunden bei 28°C, 250 rpm und Dunkelheit. Zur Aufbereitung wurden zunächst Kulturfiltrat und Mycel der einzelnen Proben durch Zentrifugation voneinander getrennt. Das Filtrat wurde über XAD-16 extrahiert und später mit Methanol eluiert,

Tabelle 9: Eingesetzte Medien zur Optimierung der Thaxtomin A-Produktion an *S. bottropensis* Dra 17

Stamm	Medium Vorkultur	Medium Hauptkultur	Kolbengröße/ Füllmenge
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	SGG	Hafer	1000mL/ 200 mL
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	SGG	YMG	1000mL/ 200 mL
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	SGG	1157S	1000mL/ 200 mL
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	SGG	1358	1000mL/ 200 mL

während das Mycel mit 200 mL Methanol/Aceton 1:1 im Ultraschall aufgeschlossen wurde. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wurden die Proben einzeln mit 6 mL analysenreinem Methanol aufgenommen und analytisch auf Iromycine und Thaxtomine an der HPLC mit UV-Detektion (Programm 2, Säule 1) gemessen.

2.9.1.2 Optimierung der Fermentationsbedingungen zur Thaxtomin A Produktion

Analog zur Medienoptimierung wurde der Einfluss von Füllhöhe, Kolbengröße, Schikanen und Schüttelgeschwindigkeit auf die Thaxtomin A Produktion von *Streptomyces bottropensis* Dra 17 untersucht. Die Kolben waren hierbei einheitlich mit Hafermedium gefüllt. Eine ausführliche Darstellung der einzelnen Varianten findet sich in Tabelle 10.

Als Vorkultur wurden 250 mL Hafermedium in einem 1000 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen, durch ein 1 cm² großes Stück einer gut bewachsener Hafermediumplatte inokuliert. Im Anschluss an die Vorfermentation (48 Stunden, 250 rpm, Dunkelheit) wurde die Hauptkultur unter Zugabe von 5 % Vorkultur beimpft. Die Kultivierung erfolgte unter den in Tabelle 10 dargestellten Bedingungen, sowie gleichbleibend bei 28 °C und Dunkelheit für 72 Stunden. Zur Aufbereitung wurde zunächst das Kulturfiltrat und Mycel der einzelnen Proben durch Zentrifugation getrennt und das Mycel verworfen. 30 mL des Kulturfiltrates wurden drei Mal mit 15 mL Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Vakuum eingengt. Zur abschließenden Quantifizierung der Thaxtominproduktion wurden die Proben mit 500 µL analysenreinem Methanol aufgenommen und analytisch an der HPLC mit UV-Detektion (Programm 2, Säule 1) bestimmt.

Tabelle 10: Kombinatorische Darstellung der Einzelvarianten bei Einbeziehung unterschiedlicher Füllhöhen, Kolbengrößen, Schikanen und Schüttelgeschwindigkeit zur Optimierung der Thaxtomin A Produktion (n=2)

Bezeichnung	Kolbenvolumen (mL)	Schikane	Füllmenge (mL)	rpm
KP-FB-1000-1	1000	ja	300	120
KP-FB-1000-2	1000	ja	150	120
KP-FB-1000-3	1000	ja	75	120
KP-FB-1000-4	1000	nein	300	120
KP-FB-1000-5	1000	nein	150	120
KP-FB-1000-6	1000	nein	75	120
KP-FB-1000-7	1000	ja	300	180
KP-FB-1000-8	1000	ja	150	180
KP-FB-1000-9	1000	ja	75	180
KP-FB-1000-10	1000	nein	300	180
KP-FB-1000-11	1000	nein	150	180
KP-FB-1000-12	1000	nein	75	180
KP-FB-1000-13	1000	ja	300	250
KP-FB-1000-14	1000	ja	150	250
KP-FB-1000-15	1000	ja	75	250
KP-FB-1000-16	1000	nein	300	250
KP-FB-1000-17	1000	nein	150	250
KP-FB-1000-18	1000	nein	75	250
KP-FB-300-1	300	ja	100	120
KP-FB-300-2	300	ja	75	120
KP-FB-300-3	300	ja	50	120
KP-FB-300-4	300	nein	100	120
KP-FB-300-5	300	nein	75	120
KP-FB-300-6	300	nein	50	120
KP-FB-300-7	300	ja	100	180
KP-FB-300-8	300	ja	75	180
KP-FB-300-9	300	ja	50	180
KP-FB-300-10	300	nein	100	180
KP-FB-300-11	300	nein	75	180
KP-FB-300-12	300	nein	50	180
KP-FB-300-13	300	ja	100	250
KP-FB-300-14	300	ja	75	250

Bezeichnung	Kolbenvolumen (mL)	Schikane	Füllmenge (mL)	rpm
KP-FB-300-15	300	ja	50	250
KP-FB-300-16	300	nein	100	250
KP-FB-300-17	300	nein	75	250
KP-FB-300-18	300	nein	50	250
KP-FB-100-1	100	ja	30	120
KP-FB-100-2	100	ja	15	120
KP-FB-100-3	100	nein	30	120
KP-FB-100-4	100	nein	15	120
KP-FB-100-5	100	ja	30	180
KP-FB-100-6	100	ja	15	180
KP-FB-100-7	100	nein	30	180
KP-FB-100-8	100	nein	15	180
KP-FB-100-9	100	ja	30	250
KP-FB-100-10	100	ja	15	250
KP-FB-100-11	100	nein	30	250
KP-FB-100-12	100	nein	15	250

2.9.1.3 Erstellung von Eichkurven zur Berechnung der Metabolitenkonzentration

Zur Bestimmung der Produktionsrate der einzelnen Fermentationen wurde deren Flächenintegral mit dem Integral von Proben bekannter Konzentration verglichen. Eichmessungen erfolgten an der analytischen HPLC mit UV-Detektion bei Wellenlängen von 288 nm für Iromycin A und B und 404 nm für Thaxtomin A. Die zu Grunde liegenden Konzentrationen der Sekundärmetaboliten betragen 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL sowie 1 µg/mL.

2.9.1.4 Erstellung einer Fermentationskurve von Thaxtomin A aus *Streptomyces bottropensis* Dra 17

Zur Aufnahme des zeitabhängigen Produktionsverlaufs von Thaxtomin A wurde *Streptomyces bottropensis* Dra 17 in 300 mL Erlenmeyerkolben fermentiert. Als Inokulum dienten 5 % einer Hafervorkultur (48 Stunden, 250 rpm, Dunkelheit), welche einer 75 mL Haferhauptkultur zugegeben wurden. Diese wurde für 162 Stunden bei 28 °C, 250 rpm und Dunkelheit inkubiert. Im fünf bis zehn Stundenzyklus nach Inokulation wurden jeweils zwei

Kolben aus dem Versuchsansatz entnommen und der Inhalt bei -18°C eingefroren. Zur Aufbereitung wurde der pH-Wert der einzelnen Ansätze bestimmt und diese anschließend vereinigt und zentrifugiert. Die Zellen wurden dabei verworfen. Im Anschluss wurden 30 mL des Kulturfiltrates drei Mal mit 15 mL Ethylacetat extrahiert. Abschließend wurde die organische Phase im Vakuum eingeeengt, mit 500 μL analysereinem Methanol aufgenommen und an der analytischen HPLC mit UV-Detektion (Programm 2, Säule 1) auf die Produktion von Thaxtomin A hin untersucht.

2.9.1.5 Fütterung von NOS-Inhibitoren an *Streptomyces bottropensis* Dra 17

Der Fütterungsversuch wurde unter identischen Bedingungen wie die Fermentationskurve durchgeführt. Iromycin A wurde für die Fütterungsversuche in fünf unterschiedlichen Mengen (6 mg, 2 mg, 0,6 mg, 0,2 mg und 0,02 mg) in jeweils 2 mL analysereinem Methanol gelöst. Um die Enzym-Inhibierung vergleichen zu können, wurden je 2 mg der NO-Synthase-Inhibitoren *N*-Nitro-*L*-Arginin (NNA) und *N*-Methyl-*L*-Arginin (NMA) in 2 mL analysereinem Methanol bzw. Wasser gelöst und auf identische Weise zugefüttert. In Wasser gelöste Substanzen (NMMA) wurden vor der Fütterung steril filtriert. Als Negativkontrolle dienten Kolben bei denen analysenreines Methanol zugefüttert wurde.

Zur Bestimmung des Einflusses von NO-Synthase-Inhibitoren auf die Thaxtomin A Produktion von *Streptomyces bottropensis* Dra 17 wurden 300 mL Erlenmeyerkolben mit 75 mL Hafermedium gefüllt. Die Inokulation der Hauptkultur erfolgte, analog zur Fermentationskurve, mit 5 % einer Hafervorkultur (48 Stunden, 250 rpm, Dunkelheit), bemessen am Füllvolumen der Hauptkultur. Die Kultivierung erfolgte über 72 Stunden bei 28°C , 250 rpm und Dunkelheit. Die Fütterung erfolgte im ‚Impulsefeeding-verfahren‘, um den oxidativen Abbau von Iromycin A zu Iromycin B entgegenzuwirken und die Konzentration von Iromycin A möglichst stabil zu halten. Die Fütterung der in Tabelle 11 angegebenen Inhibitoren erfolgte jeweils zur 14., 18., 22. und 30. Stunde nach Inokulation in einem Volumen von 250 μL . Zur 39., 47., und 54. Stunde nach Inokulation erfolgten weitere Gaben in einem Volumen von 333 μL . Die Fütterungen erfolgten mittels Einwegspritze mit Kanüle, welche durch die Schaumstoffkappe des Kolbens gestochen wurden. Zur Aufbereitung wurden die jeweiligen Ansätze vereinigt, der pH-Wert bestimmt und der

Ansatz zentrifugiert. Die Zellen wurden dabei verworfen. Im Anschluss wurden 30 mL des Kulturfiltrates drei Mal mit 15 mL Ethylacetat extrahiert. Abschließend wurde die organische Phase im Vakuum eingengt, mit 500 μ L analysereinem Methanol aufgenommen und mittels analytischer HPLC mit UV-Detektion (Programm 2, Säule 1) auf die Produktion von Thaxtomin A, Iromycin A und Iromycin B untersucht.

Tabelle 11: Massen der NOS-Inhibitoren zum Fütterungsversuch bei *Streptomyces bottropensis* Dra 17 unter Angabe des entsprechenden Lösungsmittels.

Bezeichnung	Wiederholung (n)	Masse Inhibitor [mg/Kolben]	Lösungsmittel
Iromycin A	4	6	Methanol
Iromycin A	4	2	Methanol
Iromycin A	4	0,6	Methanol
Iromycin A	4	0,2	Methanol
Iromycin A	4	0,02	Methanol
NNA	4	2	Methanol
NMMA	4	2	Wasser
negativ Kontrolle	4	0	Methanol

Fütterung von NOS-Inhibitoren an *Streptomyces scabies* 1/3

Zur Optimierung der Fütterungszeitpunkte, wurde bei *Streptomyces scabies* 1/3 zunächst eine Fermentationskurve bezüglich der Thaxtominproduktion aufgenommen.

Auf eine separate Untersuchung der Produktionsbedingungen (Optimierung der Fermentationsparameter) wurde hingegen verzichtet.

Additiv zu dem vorangehenden Fütterungsexperiment wurde eine zusätzliche Fütterung mit totalsynthetisch gewonnenem Iromycin S (v. ZEZSCHWITZ, Universität Marburg) in den Versuchsaufbau aufgenommen. Die Kontrollvarianten NNA und NMA wurden beibehalten. Als zusätzliche Neuerung wurden bei dieser Fermentation Varianten von NOS-Inhibitoren mit Zusatz von Ancymidol, einem bekannten P₄₅₀-Oxidase-Inhibitor, gefüttert. Somit sollte der oxidative Abbau von Iromycin A zu Iromycin B verlangsamt werden.

2.9.1.6 Untersuchungen zur Optimierung des Hafermediums

Für die Optimierung des Hafermediums wurde eine 48 Stunden Vorkultur mit Hafermehl von *Streptomyces scabies* 1/3 angesetzt und bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit inkubiert.

Für die Hauptkultur kamen vier unterschiedliche ‚Haferquellen‘ (Hafermehl, Haferkleie, Haferkorn und Haferkorn mit Spelze) zum Einsatz. Diese wurden alle zu 20 g/L eingewogen und mit 5 mL Spur 11-Lösung versetzt und mit Leitungswasser aufgefüllt. Zur Vergrößerung der Oberfläche- speziell der Varianten mit Haferkörnern wurden alle Medienansätze mittels Ultratorax zerkleinert. In jeweils zwei 1000 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane wurden 200 mL Medium gefüllt, autoklaviert und im Anschluss mit 5 % Vorkultur, in Abhängigkeit des Volumens der Hauptkultur, inokuliert. Die Fermentation erfolgte über 72 Stunden bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit.

Bei der Aufarbeitung wurde zunächst das Kulturfiltrat durch Zentrifugation vom Mycel getrennt, der pH auf 5,0 korrigiert und anschließend zweimal mit 250 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde im Vakuum eingengt und schließlich in 2 mL Methanol aufgenommen. Die Überprüfung der Thaxtominproduktion erfolgte dünnschichtchromatographisch mit einer definierten Auftragsmenge von 10 µL je Probe.

2.9.1.7 Erstellung einer Fermentationskurve von Thaxtomin A an *S. scabies* 1/3

Zur Aufnahme des zeitabhängigen Produktionsverlaufs von Thaxtomin A wurde *Streptomyces scabies* 1/3 in 300 mL Erlenmeyerkolben fermentiert. Als Inokulum dienten 5 % einer Hafervorkultur (48 Stunden, 250 rpm, Dunkelheit), welche einer 75 mL Haferhauptkultur zugegeben wurden. Diese wurde für 144 Stunden 28 °C, 250 rpm und Dunkelheit inkubiert. In einem Abstand von je 4 Stunden nach Inokulation wurden jeweils zwei Kolben aus dem Versuchsansatz entnommen und der Inhalt bei -18°C eingefroren. Zur Aufbereitung wurde der pH-Wert bestimmt die beide Ansätze vereinigt und zentrifugiert. Die Zellen wurden dabei verworfen. Im Anschluss wurden 100 mL des Kulturfiltrates mit 150 mL Ethylacetat extrahiert. Abschließend wurde die organische Phase im Vakuum eingengt, mit 2 mL analysereinem Methanol aufgenommen und dünnschichtchromatographisch auf die Thaxtomin A Produktion untersucht.

2.9.1.8 Fütterung von NOS-Inhibitoren an *Streptomyces scabies* 1/3

Der Fütterungsversuch wurde unter identischen Bedingungen wie die Erstellung der Fermentationskurve, dreifach wiederholt angelegt. Iromycin A und Iromycin S wurden zu den in Tabelle 12 angegebenen Mengen eingewogen und in jeweils 3 mL analysereinem Methanol gelöst.

Um die Enzym-Inhibierung vergleichen zu können, wurden 2 mg der NO-Synthase-Inhibitoren *N*-Nitro-*L*-Arginin (NNA) und *N*-Methyl-*L*-Arginin (NMA) in 3 mL analysereinem Methanol bzw. Methanol/Wasser 1:1 gelöst und auf identische Weise zugefüttert. In Methanol/Wasser gelöste Zusätze (NMA) wurden vor der Fütterung steril filtriert. Als Negativkontrolle dienten Kolben welche mit analysereinem Methanol gefüttert wurden.

Als zusätzliche Variante wurden bei zwei der drei Wiederholungen 22,5 mg Ancymidol im Fütterungsdetergenz gelöst. Eine ausführliche Darstellung der Fütterungsadditive ist in Tabelle 12 dargestellt.

Die Fermentation erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben, welche mit 75 mL Hafermedium gefüllt waren. Die Inokulation der Hauptkultur erfolgte, analog zur Fermentationskurve, mit 5 % einer Hafervorkultur (48 Stunden, 250 rpm, Dunkelheit), bemessen am Füllvolumen der Hauptkultur. Die Kultivierung erfolgte über 72 Stunden bei 28 °C, 250 rpm und Dunkelheit. Die Fütterung erfolgte etappenweise, um den oxidativen Abbau von Iromycin A zu Iromycin B entgegenzuwirken und die Konzentration von Iromycin A möglichst stabil zu halten. Die Fütterung erfolgte jeweils zur 4., 8., 12., 21., 28., 36., und 48. Stunde nach Inokulation in einem Volumen von 375 µL. Die Fütterungen erfolgten mittels Einwegspritze mit Kanüle, welche durch die Schaumstoffkappe des Kolbens gestochen wurden.

Zur Aufbereitung wurde der pH-Wert der einzelnen Proben bestimmt und je 1 mL der Fermentationsansätze steril in ein Kryoröhrchen pipettiert und zur weiteren Bestimmung des CFU-Wertes weiterbearbeitet. Nachfolgend wurde die restliche Flüssigkultur zentrifugiert und die Zellen verworfen. 60 mL des Ansatzes wurden in Folge zwei Mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Abschließend wurde die organische Phase im Vakuum eingengt, in 2000 µL analysereinem Methanol aufgenommen und an der analytischen

HPLC mit UV-Detektion (Programm 2, Säule 1) auf die Produktion von Thaxtomin A, Iromycin A und Iromycin B hin untersucht.

Tabelle 12: Fütterungsdetergenzien, Lösungsmittel und Anzahl der Wiederholungen zum Fütterungsversuch von NOS-Inhibitoren bei *Streptomyces scabies* 1/3

Bezeichnung NOS-Inhibitor	Wieder- holungen (n)	NOS-Inhibitor [mg/Kolben]	Ancymidol [mg/Kolben]	Lösungsmittel
Iromycin A	1	0,67	0	Methanol/Wasser
Iromycin A	2	0,67	22,5	Methanol/Wasser
Iromycin A	1	1,33	0	Methanol/Wasser
Iromycin A	2	1,33	22,5	Methanol/Wasser
Iromycin A	1	2,66	0	Methanol/Wasser
Iromycin A	2	2,66	22,5	Methanol/Wasser
Iromycin A	2	5,52	22,5	Methanol/Wasser
Iromycin S	1	1,33	0	Methanol/Wasser
Iromycin S	2	1,33	22,5	Methanol/Wasser
Iromycin S	1	2,66	0	Methanol/Wasser
Iromycin S	2	2,66	22,5	Methanol/Wasser
NNA	1	1,33	0	Methanol/Wasser
NNA	2	1,33	22,5	Methanol/Wasser
NMA	1	1,33	0	Methanol/Wasser
NMA	2	1,33	22,5	Methanol/Wasser
Methanol/Wasser	1	0	0	Methanol/Wasser
Methanol/Wasser	2	0	22,5	Methanol/Wasser

2.9.1.9 Untersuchungen zum Einfluss von NO-Synthase Inhibitoren auf die Lebendzellzahl (CFU)

Um neben dem Einfluss der NOS-Inhibitoren auf die Thaxtominproduktion eventuelle Wechselwirkungen, hervorgerufen durch zytotoxische Effekte, auszuschließen, wurde die Anzahl der lebenden Zellen im Ansatz bestimmt. Hierzu wurde je Variante 1 mL des Fermentationsansatzes in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:1000, 1:10.000; n=5) auf YMG+-Platten ausplattiert und für 7 Tage bei 28 °C und Dunkelheit inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden auf den Platten die Anzahl entstandener Kolonien gezählt und statistisch ausgewertet:

Hierzu wurde ermittelt, ob bei den eingegebenen Parametern eine Normalverteilung vorliegt. Ferner überprüft der nachgeschaltete Barlett-Test, ob die Varianten gleich weit streuen. Zusammen mit Chi-Quadrat wurden anschließend die Voraussetzungen für die Varianzanalyse getestet, während der Newman-Keuls-Test die einzelnen Varianten paarweise miteinander verglich, um zu ermitteln, welche Fütterungspräparate einen unterschiedlichen Einfluss auf die Anzahl der Kolonien hatten.

Software: Statistica 8

2.9.2 Untersuchungen zum Einfluss cellobiosehaltiger Medien auf die Biosynthese von Iromycinen und Thaxtominen

Der literaturbekannte Einfluss des Disaccharides Cellobiose auf die Produktion von Thaxtominen wurde erstmals von JOSHI et al. (2007) beschrieben. Hierbei dient Cellobiose als

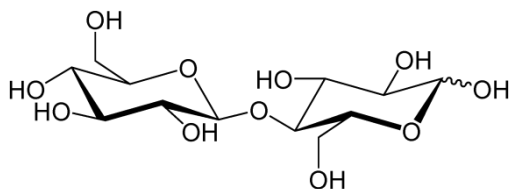


Abbildung 12: Strukturformel von Cellobiose

Aktivator eines AraC/XylS-Genes, welches sich auf der pathogenen Insel (PAI) des Thaxtomin A Genclusters befindet.

Zur Überprüfung der Auswirkungen des Disaccharides auf die Produktion von Thaxtominen und Iromycinen, wurde eine Fütterung bei *Streptomyces bottropensis* Dra 17 durchgeführt.

2.9.2.1 Versuche zur Thermostabilität von Cellobiose

Um die Auswirkungen von feuchter Hitze beim Autoklavieren des Mediums auf die Regulationsaktivität der Cellobiose zu untersuchen, wurden zunächst Vorversuche mit autoklaviertem Cellobiose-Hafer Medium und Hafermedium mit steril filtrierter Cellobioselösung angestellt. Für die Vorversuche wurde zunächst eine Vorkultur (300 mL EMK mit Schikane, 75 mL Hafermedium) mit 1,5 mL einer *Streptomyces scabies* 1/3 YMG-Glycerineinlagerung inokuliert und für 48 Stunden bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit fermentiert. Die jeweilige Hauptkultur wurde mit 5 % Vorkultur in Abhängigkeit des Volumens der Hauptkultur inokuliert. Die Zugabe der Cellobiose erfolgte in einem Fall vor dem Autoklavieren, im anderen Fall steril filtriert (Membranfilter MiniSart 2 µm, SARTORIUS), nach dem Autoklavieren, gelöst in 5 mL Leitungswasser. Neben der unterschiedlichen Zugabe des Additivs wurde zudem die Konzentration von Cellobiose variiert. Hierbei kamen Konzentrationen von 0 g/L, 3,5 g/L, 7 g/L und 14 g/L Cellobiose zum Einsatz. Die Fermentation der Hauptkultur erfolgte für 72 Stunden bei 28°C, 220 rpm und Dunkelheit. Die Aufarbeitung der Fermentationen erfolgte zunächst durch Trennung von Kulturfiltrat und Mycel. Das Mycel wurde verworfen, während 60 mL des Kulturfiltrates in Folge zwei Mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert wurden. Abschließend wurde die organische Phase im Vakuum eingeengt, mit 2000 µL analysereinem Methanol aufgenommen. Die analytische Auswertung des Fütterungsversuches erfolgte dünnschichtchromatographisch.

2.9.2.2 Untersuchungen zum Einfluss von Cellobiose auf die Biosynthese von Iromycinen und Thaxtominen

Der Einfluss von cellobiosehaltigen Medien wurde analog zu den Vorversuchen an *Streptomyces bottropensis* Dra 17 untersucht. Hierbei wurden folgende Medien mit und ohne Cellobiosezusatz untersucht: Als Vorkultur wurden einheitlich 75 mL SGG-Medium mit 1,5 mL einer *Streptomyces bottropensis* Dra 17 Glycerineinlagerung (YMG-Medium) in einem 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane inokuliert. Die Inkubation erfolgte für 48 Stunden bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit.

Tabelle 13: Medien und Konzentrationen der Cellobiosefütterung bei *Streptomyces bottropensis* Dra 17

Stamm	Hauptkultur Medium	Cellobiose (g/L)
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	Hafer	7,0
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	Hafer	0
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	YMG	7,0
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	YMG	0
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	SM	7,0
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	SM	0
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	S	7,0
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	S	0

Die Inokulation der Hauptkultur (75 mL Medium, 300 mL EMK mit Schikane) wurde mit 5 % Vorkultur, in Abhängigkeit des Volumens der Hauptkultur durch geführt. Die Zugabe der Cellobiose erfolgte vor dem Autoklavieren. Die Inkubation erfolgte für 72 Stunden bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit.

Zur weiteren Aufarbeitung erfolgte zunächst eine Trennung des Fermentationsansatzes in Mycel und Kulturfiltrat mittels Zentrifugation. Hierbei wurde das Mycel zunächst in Methanol/Aceton 1:1 für 20 Minuten extrahiert und anschließend filtriert. Die Aufarbeitung des Kulturfiltrates erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Ethylacetat. Die Organische Phase wurde jeweils im Vakuum eingengt und das Extrakt in 2 mL Methanol aufgenommen. Die abschließende Auswertung erfolgte teilweise mittels HPLC und DAD-Detektor (Programm 2, Säule 1) sowie dünnschichtchromatographisch.

2.10 Untersuchungen zur Regulierungsaktivität von Iromycinen

Um die Effekte der Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces bottropensis* Dra 17 auf dessen Pathogenität näher zu untersuchen, wurden verschiedene Untersuchungen an Kartoffeln, Rettichen und Pflanzen des Acker-Schmalwandes durchgeführt:

2.10.1 Real-Time PCR Untersuchungen zur Biomassebestimmung an *Streptomyces* spp.

2.10.1.1 Gesamt-DNA-Extraktion aus Kartoffeln

Für die Etablierung einer spezifischen Real-Time PCR Methode für *Streptomyces* sp. wurde die Gesamt-DNA der einzelnen Prüfvarianten, auf einer CTAB basierenden Methode der DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial, isoliert (BRANDFASS & KARLOVSKY, 2006).

Hierfür wurden je Probe zunächst gefriergetrocknet, gemörsert und in der Kugelmühle gemahlen. Jeweils 200 mg TM wurden mit 1 mL CTAB Puffer, 2 µL Mercaptoethanol sowie 1 µL Proteinase K versehen. Die Proben wurden je für 10 Minuten im Thermomixer bei 42 °C und später bei 65 °C und 150 rpm inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden 800 µL Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt, kurz gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 10 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Aus dem entstandenen dreiphasigen System wurden 750 µL der oberen Phase entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die 20 minütige Fällung der DNA erfolgte mit 210 µL PEG bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 15 Minuten bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde im Folgenden verworfen und das Pellet mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen. Im Weiteren wurde die Probe erneut für 5 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei 30 °C in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Abschließend wurde das Pellet mit 100 µL TE-Puffer resuspendiert und bis zur vollständigen Lösung für 12 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Vor der weiteren Verwendung in der PCR wurde die in TE-Puffer aufgenommene DNA für zwei bis vier Stunden im Wasserbad bei 42 °C inkubiert.

2.10.1.2 Untersuchungen mittels Gelelektrophorese

Die Kontrolle der Konzentration sowie der Qualität der isolierten DNA erfolgte mittels Gelelektrophorese. Auf ein 0,8 % Agarosegel wurden je 4 µL Probe mit 2 µL Beschwerungspuffer aufgetragen. Zusätzlich wurde 1 µL -Phagen-DNA (25 ng/µL) mit 2 µL Beschwerungspuffer als Größenmaßstab aufgetragen. Die Spannung betrug 4 V cm⁻¹ bei einer Laufzeit von 60 Minuten. Die Anfärbung des Agarosegels erfolgte für 10 Minuten

in Ethidiumbromid (2 mg/L). Nach weiteren 10 Minuten im Wasserbad wurde das Gel in einer Dunkelkammer unter UV-Licht sowie einem digitalen Darstellungssystem dokumentiert.

2.10.1.3 DNA-Extraktion aus Flüssigkulturen von *Streptomyces* spp.

(DNA-Standard für die quantitative Real-Time PCR)

Aus einer 24 Stunden YMG-Streptomycetenkultur wurden 500 μL in ein 2 mL Reaktionsgefäß pipettiert und bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 500 μL PBS-Puffer gewaschen. Hierbei war darauf zu achten, dass sich das Pellet vollständig resuspendiert. Die Probe wurde erneut zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette komplett entfernt. Der zweite Waschschritt erfolgte mit 500 μL TE-Puffer. Auch hier wurde das Pellet vollständig resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette entfernt. Das entstandene Pellet wurde nach Zugabe von 200 μL TE-Puffer und 15 μL Lysozymlösung (20 mg/mL in TE) erneut resuspendiert. Die Proben wurden anschließend im Thermomixer (37 °C, 300 rpm) inkubiert, bis eine deutliche Lyse eintrat. Im Folgenden wurden der Probe 200 μL Lysepuffer und 25 μL Proteinase K zugegeben und 5 Sekunden durch mehrmaliges Vortexen gemischt. Die Proben wurden für mindestens 15 Minuten bei 50 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Um unverdaute Anteile der Probe zu entfernen, wurden im Anschluss an die Inkubationszeit für 60 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde im Folgenden verworfen, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 4 μL aktivierter RNase-Lösung (100 mg/mL) versetzt und für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzer Durchmischung erfolgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Dem Ansatz wurden folgend 400 μL ‚Bindingbuffer‘ zugegeben und die Proben durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Der Ansatz wurde durch einen Spinfilter zentrifugiert (2 min, 10.000 rpm) und dieser anschließend in ein neues ‚Receivertube‘ gesetzt. Im Folgenden wurde abwechselnd ‚Waschlösung A‘ (500 μL), zugegeben, zentrifugiert und erneut ‚Waschlösung B‘ (750 μL) zugegeben. Nach erneutem Wechsel des ‚Receivertubes‘ und weiterer Zentrifugation wurde der Spin in ein neues Tube gesetzt und 100 μL

Eluierungspuffer in die Mitte des Spins pipettiert. Nach einer 3 minütigen Inkubation wurde der Ansatz bei 6.000 rpm zentrifugiert und zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.10.1.4 DNA-Quantifizierung mittels UV/VIS Spektralphotometer

Um eine Quantifizierung mittels Real-Time PCR realisieren zu können, musste zunächst aus der *Streptomyces*-DNA eine Standardreihe hergestellt werden. Hierzu wurde zunächst die Konzentration der extrahierten DNA mittels Nanodrop 2000c bestimmt und im Anschluss mehrfach in 1:10 Stufen mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Abschließend wurden die Verdünnungsstufen, ebenfalls mittels Nanodrop 2000c verifiziert.

2.10.1.5 Spezifikationen einer Real-Time PCR Methode für *Streptomyces* spp.

Für die Quantifizierung der bakteriellen Biomasse in Kartoffeln wurden die spezifischen Primer SM-fow-9-KP und SM-rev-9-KP, welche von RINTALA & NEVALAINEN (2006) abgeleitet wurden, verwendet. Die Primer sind auf Basis verschiedener Bakterienstämme, in erster Linie *Streptomyces*, abgeleitet. Für die Real-Time PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse wurde das Reaktionsgemisch sowie das Protokoll von RINTALA & NEVALAINEN (2006) verwendet und an die verwendeten Geräte angepasst.

Für die Standardreihe wurde aufgereinigte DNA von *Streptomyces bottropensis* Dra17 in TE-Puffer mehrfach verdünnt und in den DNA-Mengen 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg und 50 fg je Reaktionsansatz eingesetzt. Proben unterhalb dieser Standardreihe wurden als 0 fg DNA geführt.

Tabelle 14: Reaktionsgemisch zur Untersuchung der bakteriellen Biomasse von *Streptomyces* spp. aus Rebblättern mittels quantitativer real-time-PCR.

Bezeichnung	Konzentration	Endkonzentration
NH ₄ Reaktionspuffer, BIOLINE	10x	1x
Magnesiumchlorid, BIOLINE	50 mM	2,5 mM
dNTP, BIOLINE	2,5 mM e	150 µM
Primer SM-fow-9-KP	10 µM	0,3 µM
Primer SM-rev-9-KP	10 µM	0,3 µM
Fluorescein	1 µM	10 nM
SybrGreen Mol Probes	10x	0,1 x
BioTaq DNA Polymerase, BIOLINE	5 U/µL	0,7 U
Target DNA		1 µL

Tabelle 15: Protokoll der quantitativen Bestimmung der Biomasse von *Streptomyces* spp. mittels Real-Time PCR.

Cycle	Bezeichnung	Temperatur	Minuten
Cycle 1	initiale Denaturierung	95 °C	0:30
Cycle 2	Denaturierung	94 °C	0:30
40x	Hybridisierung	61 °C	0:30
	Elongation	72°C	0:30
Cycle 3	finale Elongation	72°C	5:00
Cycle 4	Denaturierung (Schmelzkurve)	95°C	1:00
Cycle 5	Abkühlung (Schmelzkurve)	55°C	1:00
Cycle 6	Schmelzkurve	65 °C → 100°C	0:20
	70 x 0,5 °C Steps		
Cycle 7		15 °C	HOLD

2.10.2 Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Kartoffeln

Zur Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Kartoffelscheiben wurden die inokulierten und inkubierten Kartoffelscheiben zunächst eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Folgend wurden die Kartoffelscheiben in einem Mörser zerrieben und das Pulver in 50 mL Falcontubes umgefüllt. Die chemische Extraktion erfolgte durch zweimaliges Ausschütteln mit 35 mL Ethylacetat sowie kurzer Inkubation im Ultraschallbad. Abschließend wurden einheitlich 50 mL des Essigester-Extraktes im Vakuum eingengt.

2.10.3 Inokulation und Inkubation von Kartoffelscheiben

Im Vorfeld der Untersuchungen musste die Inokulation und Inkubation der Kartoffelscheiben optimiert werden. Die Sterilisation der Kartoffelscheiben erfolgte, gemäß der Sterilisation von Pflanzenteilen, mit 70 % Ethanol. Lediglich die Vorbehandlung mit Heißwasser zur Oberflächensterilisation sowie das abschließende Tauchbad in steriler 0,05 % Zitronensäure wurde als zusätzlicher Oxidationsschutz („Anlaufen“ der Kartoffelscheiben) in die Versuchsanordnung aufgenommen.

Medienwahl: Die weitere Lagerung der Kartoffelscheiben während der Inokulation erfolgte jeweils auf mehreren Medien. Hierbei kamen jeweils steriler Sand, Quarzsplit, Steinwolle, Einheitserde, Wasseragar und Glasperlen zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte bei 24 °C und Dunkelheit.

Inokulationsweise: Die Inokulation der Kartoffelscheiben erfolgte durch drei unterschiedliche Methoden. Zum einen wurden die Kartoffelscheiben mittels mehrerer Inokulationstropfen, des Weiteren über Tauchbäder infiziert. Bei Letzterem wurde zwischen Tauchbad der ganzen Kartoffelscheibe und einer Kartoffelseite unterschieden. Die Inkubation erfolgte hierbei bei 24 °C auf Glasperlen. Als Medium diente eine 48 Stunden alte YMG-Vorkultur.

Inokulationsmedium: Zur Optimierung des Inokulationsmediums wurden Kartoffelscheiben auf „Glasperlen“ mittels Inokulationstropfen beimpft und bei 24 °C

inkubiert. Hierbei kamen 48 Stunden alte Vorkulturen (28 °C, 220 rpm, Dunkelheit) der Medien Hafer, YMG und Medium S zum Einsatz, welche alle mit einer 1 cm² Agarplatte inokuliert wurden.

Inkubationstemperatur: Die Untersuchungen zur Optimierung der Inkubationstemperatur wurden auf ‚Glasperlen‘ mit Inokulationstropfen eines YMG-Mediums durchgeführt. Hierbei wurden Temperaturen von 10 °C, 16 °C, 20 °C, 24 °C und 28 °C bei Dunkelheit untersucht.

2.10.4 Erstellung einer Fermentationskurve auf Kartoffelscheiben

Um die zeitliche Abfolge der Biosynthese von Iromycinen und Thaxtominen auf Kartoffelscheiben näher zu untersuchen, wurde eine Fermentationskurve – analog zu den Schüttelkulturen angelegt.

Hierzu wurden die Kartoffeln der Sorte ‚Cilena‘, wie in Kapitel 2.5.2.1 zunächst sterilisiert und jeweils vier Kartoffelscheiben in mit Glasperlen gefüllte Petrischalen gelegt. Als Inokulum diente eine 48 Stunden alte YMG-Flüssigkultur aus *Streptomyces bottropensis* Dra 17 (300 mL EMK mit Schikane, 75 mL Füllvolumen, 28 °C, 220 rpm, Dunkelheit), welche mit 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte angeimpft wurde. Die Inokulation der Kartoffelscheiben erfolgte unter sterilen Bedingungen mittels 5 Inokulationstropfen (Gesamtvolumen 200 µL), welche gleichmäßig auf der Kartoffelscheibe verteilt wurden. Nach erfolgter Inokulation wurden die Petrischalen für 20 Minuten in der Sterilbank offen stehen gelassen um die Kartoffeloberfläche abtrocknen zu lassen. Die weitere Inkubation erfolgte zunächst für 6 Stunden bei 28 °C, später bei 20 °C jeweils bei Dunkelheit. Im Folgenden wurden für 6 Tage im 4 Stundenzyklus jeweils vier Petrischalen aus dem Gesamtansatz entnommen und bei -28 °C eingefroren.

Zur weiteren Aufarbeitung wurden die gefrorenen Kartoffelscheiben in der Gefriertrocknung für 48 Stunden lyophilisiert. Im Anschluss wurden jeweils vier Scheiben gemeinsam gemörsert und 200 mg der Mischprobe in ein 2 mL Reaktionsgefäß gefüllt. Die beiden Ansätze der Probe wurden im Folgenden der DNA-Extraktion (Kapitel 2.10.1.1) sowie der chemischen Extraktion (Kapitel 2.10.2) unterzogen.

2.10.5 Untersuchungen zur Virulenz verschiedener *Streptomyces* spp.

Zur Bestimmung der Phytopathogenität verschiedener *Streptomyces*-Stämme wurden verschiedene Thaxtomin-A-Produzenten durch chemisches und biologisches Screening untersucht.

2.10.5.1 Untersuchungen zur Virulenz verschiedener *Streptomyces* sp. auf Kartoffeln

Die Kartoffelscheiben wurden, wie in Kapitel 2.5.2.1 zuvor sterilisiert und in Glasperlengefüllte Petrischalen gelegt. Die Vorkulturen erfolgten in YMG-Flüssigkulturen (300 mL EMK mit Schikane, 75 mL Medium), welche mit 1,5 mL einer Glycerineinlagerung angeimpft und im Anschluss für 48 Stunden bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit inkubiert wurden. Die hierfür verwendeten Stämme sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Darstellung der verwendeten Stämme zur Kontrolle der Produktion von Thaxtomin, Iromycinen sowie deren Phytopathogenität.

Bezeichnung	Medium zur Produktion von Iromycinen	Medium zur Produktion von Thaxtominen
<i>Streptomyces bottropensis</i> Dra 17	Medium S	Hafer
<i>Streptomyces bottropensis</i> 40800	Medium S	Hafer
<i>Streptomyces bottropensis</i> 40262	Medium S	Hafer
<i>Streptomyces scabies</i> 123	Medium S	Hafer
<i>Streptomyces scabies</i> 124	Medium S	Hafer
<i>Streptomyces scabies</i> 1/3	Medium S	Hafer

Die Inokulation erfolgte durch 5 Inokulationstropfen mit einem Gesamtvolumen von 200 µL. Je Stamm wurden 3 Petrischalen zu je vier Kartoffelscheiben beimpft. Nach erfolgter Inokulation wurden die Petrischalen für 20 Minuten in der Sterilbank offen stehen gelassen, um die Kartoffeloberfläche abtrocknen zu lassen. Die weitere Inkubation erfolgte zunächst für 6 Stunden bei 28 °C, später für 6 Tage bei 20 °C jeweils bei Dunkelheit. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Kartoffelscheiben zunächst für 12 Stunden eingefroren und

anschließend gefriergetrocknet. Im Anschluss wurde jede Petrischale einzeln aufgearbeitet. Hierzu wurden die Kartoffeln zunächst gemörsert und 200 mg Kartoffelpulver in Reaktionsgefäße zur anschließenden DNA-Extraktion umgefüllt (vgl. Kapitel 2.10.1.1). Das übrige Kartoffelmehl wurde zur chemischen Extraktion verwendet (vgl. Kapitel 2.10.2). Die molekularbiologische Quantifizierung der DNA sowie die chemische Analytik der Gesamtextrakte erfolgte mittels Real-Time-PCR und HPLC mit UV-Detektion (Programm 2, Säule 1 und HPLC-MS (Programm 1, Säule 1).

2.10.5.2 Screening phytopathogener *Streptomyces* auf die Produktion von Iromycinen und Thaxtominen in Flüssigkulturen

Analog zum Screening auf Kartoffelscheiben wurden die in Tabelle 16 beschriebenen *Streptomyces bottropensis* und *Streptomyces scabies* Stämme parallel auf die Produktion von Thaxtomin und Iromycinen in Flüssigmedien untersucht. Hierbei wurde bei der Medienwahl auf die Optimierungsversuche bei *S. bottropensis* Dra 17 zurückgegriffen.

Produktion von Thaxtominen: Als Vorkultur dienten 75 mL Hafermedium in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane, welche mit jeweils 1,5 mL einer Glycerineinlagerung (YMG-Medium) angeimpft wurden. Die Inkubation erfolgte für 48 Stunden bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit. Die anschließende Hauptkultur (300 mL EMK mit Schikane, 75 mL Hafermedium) wurde mit 5 % der Vorkultur, gemessen am Füllvolumen der Hauptkultur inokuliert und für 72 Stunden bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit inkubiert.

Die Aufarbeitung erfolgte zunächst durch Trennung des Kulturfiltrates vom Mycel, einer pH-Korrektur des Kulturfiltrates auf einen Wert von 5,0 sowie einer zweifachen Extraktion des Kulturfiltrates mit 100 mL Ethylacetat. Die organische Phase wurde anschließend im Vakuum eingengt und mit 2 mL analysereinem Methanol aufgenommen. Die abschließende Analytik erfolgte zunächst dünnschichtchromatographisch sowie mittels HPLC (Programm 2, Säule 1).

Produktion von Iromycinen: Als Vorkultur dienten 75 mL SGG-Medium in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane, welche mit jeweils 1,5 mL einer Glycerineinlagerung (YMG-Medium) angeimpft wurden. Die Inkubation erfolgte für 48 Stunden bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit. Die anschließende Hauptkultur (300 mL EMK mit Schikane, 75 mL Medium S)

wurde mit 5 % der Vorkultur, gemessen am Füllvolumen der Hauptkultur inokuliert und für 72 Stunden bei 28 °C, 250 rpm und Dunkelheit inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte zunächst durch Trennung des Kulturfiltrates vom Mycel, einer pH-Korrektur des Kulturfiltrates auf einen Wert von 5,0 sowie einer zweifachen Extraktion des Kulturfiltrates mit 100 mL Ethylacetat. Das Mycel wurde zunächst mit Methanol/Aceton 1:1 im Ultraschall für 20 Minuten aufgeschlossen und filtriert. Die organischen Phasen wurden anschließend im Vakuum eingengt und jeweils mit 2 mL analysereinem Methanol aufgenommen. Die abschließende Analytik erfolgte zunächst dünnschichtchromatographisch sowie mittels HPLC (Programm 2, Säule 1).

2.10.6 Untersuchungen zum Einfluss von Iromycin A und Thaxtomin A auf die Keimung von Radieschen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus*, 'Sora')

Neben der Pathogenität verschiedener *Streptomyces* bei Kartoffeln wurde im Weiteren der Einfluss der Reinsubstanzen Thaxtomin A und Iromycin A auf die Keimung von Radieschen untersucht. Als weiterer Wirt verschiedener phytopathogener *Streptomyces* eignen sich Kreuzblütengewächse ausdrücklich.

2.10.6.1 Vorbereitungen der Mikrotiterplatten

Als Grundlage des Bioassays zum Einfluss von Sekundärmetaboliten auf die Keimung von Pflanzen dienten Untersuchungen von SPLIVALLO et al. (2009) welche den Einfluss von Sekundärmetaboliten auf die Keimung und das Wurzelwachstum an *Arabidopsis thaliana* näher beleuchteten. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit der Metaboliten aus *Streptomyces bottropensis* Dra 17 musste der Bioassay zunächst miniaturisiert werden.

Hierzu wurden in sterile 96 Vial Mikrotiterplatten zunächst je Vial 200 µL flüssiges MS-Medium pipettiert und dieses unter sterilen Bedingungen abgekühlt. Zum Aufbringen der Sekundärmetaboliten wurden diese in analysereinem Methanol aufgenommen und konzentrationsabhängig auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Als Positivkontrolle wurde analog der Fütterungsversuchen zur NOS der Inhibitor *N*-Methyl-L-Arginin (NMA) untersucht. Als Negativkontrolle diente reines Methanol. Nach dem Aufbringen der

Sekundärmetaboliten sowie der Kontrollen wurden die Platten für zwei Stunde bei offenem Deckel in der Sterilbank inkubiert um das Methanol abzdampfen.

Tabelle 17: Konzentrationen von Sekundärmetaboliten zur Untersuchung des Einflusses auf die Keimung von *Raphanus sativus* ssp. *sativus* ‚Sora‘

	Iromycin A (n)	Thaxtomin A (n)	NMMA (n)
Thaxtomin A	0	0 – 0,05 mM	0
Iromycin A	0 – 0,05 mM	0	0
NMMA	0	0	0 – 0,05 mM
Iromycin A + Thaxtomin A	5 µM	0 – 0,05 mM	0
NMMA + Thaxtomin A	0	0 – 0,05 mM	5 µM

Um eine gleichmäßige Verteilung der Prüfsubstanzen im Agar zu gewährleisten wurden diese im Anschluss mit Parafilm verschlossen und 3 Tage bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.10.6.2 Präparation der Samen und Inkubation

Vor der Aufbringung der Radieschensamen wurden diese, wie in Kapitel 2.5.3.1 beschrieben, sterilisiert. Mit einer sterilen Pinzette wurden die einzelnen Samen in die einzelnen Vials der Mikrotiterplatte gelegt. Um einen gleichmäßigen Kontakt zum Nährmedium sowie zu den aufgetragenen Sekundärmetaboliten zu gewährleisten, wurde die Platte anschließend bei 5000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und zusätzlich in eine Plastikfolie mit etwas sterilem Leitungswasser eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte für 6 Tage im Klimaschrank (25 °C, 8 Stunden Dunkelheit; Beleuchtung: 4x40 W, 40 cm Abstand). Während der Inkubation wurden die Mikrotiterplatten regelmäßig auf den Fortschritt der Keimung visuell bonitiert und dokumentiert.

2.10.6.3 Chlorophyllbestimmung und Ermittlung der Biomasse

Nach Ablauf der sechstägigen Keimung wurden die Keimlinge einzeln entnommen, der Agarplug mittels Pinzette entfernt, das Frischgewicht bestimmt und einzeln in zuvor

ausgewogene 2 mL Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden zunächst eingefroren und dann mit geöffnetem Deckel für 48 Stunden gefriergetrocknet. Im Weiteren wurden die Reaktionsgefäße erneut ausgewogen und so die Trockenmasse der Einzelpflanzen bestimmt. Zur weiteren Untersuchung wurden die Reaktionsgefäße mit den Keimlingen mit drei Wolframcarbidgekugeln versehen und das Pflanzenmaterial in der Kugelmühle für 10 Minuten gemahlen. Zur Extraktion des Chlorophylls wurden 200 µL 80 % (v/v) wässriges Aceton den Reaktionsgefäßen zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert und 100 µL des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert. Die abschließende Messung des Gehaltes von Chlorophyll A erfolgte mittels Nanodrop 2000c bei einer Wellenlänge von 643 nm.

2.10.7 Untersuchungen zum Einfluss von Iromycin A und Thaxtomin A auf die Keimung des Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*)

Zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse, wurde der Versuch unter identischen Voraussetzungen am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ‚Columbia Zero‘ wiederholt. Die Sterilisation der Samen erfolgte analog zu Kapitel 2.5.4.1. Hierbei wurden die Samen im Anschluss an die Sterilisation in 2 mL 0,12 % Wasseragar aufgenommen und schwammen aufgrund der Viskosität der Agarlösung frei umher. Dies hatte den Vorteil, dass einzelne *Arabidopsis thaliana* Samen mittels 10 µL Pipette angesaugt und in einzelne Vials der Mikrotiterplatte pipettiert werden konnten. Einzig die Inkubationszeit der Pflanzen wurde, im Gegensatz zu den Radieschensamen von 6 Tagen auf 14 Tage verlängert, um ausreichend Biomasse zu erhalten. Die weitere Aufarbeitung und Analytik der Keimlinge erfolgte wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben.

2.11 Statistische Datenauswertung

Es sollte überprüft werden, ob sich die Ergebnisse der Untersuchungen hinsichtlich der untersuchten Parameter unterscheiden. „Hierzu wurde ermittelt, ob bei den eingegebenen Parametern eine Normalverteilung vorliegt. Ferner überprüft der nachgeschaltete Barlett-Test, ob die Varianten gleich weit streuen. Zusammen mit Chi-Quadrat werden anschließend die Voraussetzungen für die Varianzanalyse getestet, während der Newman-Keuls-Test die einzelnen Varianten paarweise miteinander vergleicht, um zu ermitteln“ (KÖSSLER, 2006), welche Varianten sich statistisch unterscheiden. Software: Statistica 8.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse zur Anzucht und Handhabung der Versuchspflanzen

3.1.1 Weinrebe (*Vitis vinifera* L. cv ‚Müller-Thurgau‘)

Insgesamt wurden aus Kostengründen, drei verschiedene Ausgangspflanzen zur Anzucht verwendet. Bei den verwendeten Stecklingen wurden Anwuchsraten von etwa 70 % erreicht, die Kallus- und Wurzelbildung trat nach etwa vier Wochen ein. Auch das Schwellen der Knospen trat erwartungsgemäß zwei Wochen nach dem Stecken ein. Mit dem Schwellen der Knospen begann auch die Entwicklung der unter der Knospenschuppe überwinternden Eier, der Kräuselmilbe (*Calepitrimerus vitis* Nal.). Regelmäßige Pflanzenschutzmaßnahmen (vgl. Material und Methoden) konnten den Befall jedoch eindämmen und ein befallsarmes Pflanzenmaterial gewährleisten (KÖSSLER, 2006).

Um die durch den Kräuselmilben hervorgerufene anfängliche Wuchsschwäche speziell während der Bewurzelungsphase zu überbrücken, wurden ferner auf ‚vorfertige‘ Pfropfbem der Sorte ‚Müller-Thurgau‘ zurückgegriffen. Um einen Befall durch Echten Mehltau entgegen zu wirken wurden speziell in den Sommermonaten regelmäßige Fungizidapplikationen (Netzschwefel, Vento, Prosper) durchgeführt. Die hierbei eingesetzten Präparate haben keine Auswirkungen auf *Plasmopara viticola*, eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse ist hierdurch nicht gegeben (KÖSSLER, 2006).

3.1.2 Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L. cv ‚Krone‘ und ‚Cilena‘)

Insgesamt wurden bei den Voruntersuchungen zur Etablierung des Bioassays fünf verschiedene Kartoffelsorten unterschiedlichen Alters untersucht.

Hierbei waren neben den Sortenunterschieden auch die Unterschiede zwischen frischen und überwinterten Knollen auffällig. So oxidierte die Oberfläche junger Knollen nach dem Anschnitt weitaus schneller und stärker als jene bei Lagerkartoffeln. Auch die Stabilität des Knollengewebes nach mehrtägiger Inokulation war bei Lagerkartoffeln erhöht. Bei jungen Knollen löste sich der Zellverband teilweise bereits nach zwei bis drei Tagen auf, was die weitere Verarbeitung erschwerte. Bei der dünnenschichtchromatographischen Kontrolle konnten keine Unterschiede bei der Bildung von Thaxtominen detektiert werden.

Bei der Wahl der Kartoffelsorte wurde darauf geachtet, dass alle Kartoffeln aus biologischem Anbau stammten. So konnte ein eventueller Einfluss chemischer Pflanzenschutzmittel ausgeschlossen werden. Die Eigenschaften der Kartoffelsorten beim Bioassay sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Einfluss von Sorte, Reifezeitpunkt und Resistenz gegenüber dem Erreger des Kartoffelschofs auf die Oxidation sowie die Pathogenität von *Streptomyces scabies* (BUNDESSORTENAMT, 2009)

Sorte (Herkunft)	Reifezeit	Resistenz gegen Kartoffelschorf*	Oxidations- neigung	Pathogenität von <i>S. scabies</i>
‚Krone‘ (D)	mittelfrüh	keine	niedrig	hoch
‚Cilena‘ (D)	früh	hoch	mittel	schwach
‚Linda‘ (D)	mittelfrüh	keine	mittel	sehr hoch
‚Nicola‘ (D)	mittelfrüh	mittel	hoch	schwach
‚Bintje‘ (NL)	mittelfrüh	keine	mittel	sehr hoch

Ein Einfluss des Reifezeitpunktes konnte anhand der gewählten Sorten nicht bestätigt werden, gleiches galt für das Oxidationsverhalten nach dem Anschnitt. Um diesen Parameter auszuschließen, wurden die Kartoffeln nach der Sterilisation in 0,5 % Zitronensäure getaucht wodurch die Oberflächenoxidation stark vermindert werden konnte.

Erwartungsgemäß hoch war hingegen der Einfluss der Resistenz gegenüber dem Kartoffelschorf. So war es zwar möglich alle Kartoffelknollen mit den Bakterien *Streptomyces scabies* und *Streptomyces bottropensis* zu infizieren, doch zeigte sich bei der Sorte ‚Nicola‘ eine Entwicklungsverzögerung des Pathogens, welche durch verlangsamte Nekrotisierung deutlich wurde.

3.1.3 Radieschen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus* ‚Sora‘) und Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana* ‚Columbia Zero‘)

Bei der Sortenwahl der Radieschen wurde, wie bereits im Teil Material und Methoden erwähnt, auf kommerziell erhältliche Samen zurückgegriffen. Hierbei wurde in erster Linie auf eine einheitliche Keimungsfähigkeit Wert gelegt. Bei Keimungsversuchen auf Wassergarplatten zeigte die Sorte ‚Sora‘ eine Keimungsrate von über 98% und wurde daher für weiterführende Versuche herangezogen.

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Sekundärmetaboliten auf die Keimung von *Arabidopsis thaliana* wurde auf Vorversuche verzichtet und auf die Sorte ‚Columbia Zero‘ zurück gegriffen.

3.2 Optimierung der Inokulation sowie der Stammerhaltung von Versuchsorganismen

3.2.1 Oomyceten

Bei der Inokulation sowie der Vermehrung von *Plasmopara viticola* konnte auf Erfahrungen bei der Magisterarbeit (KÖSSLER, 2006) zurück gegriffen werden. Erste Inokulationen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass sich neben dem Falschen Rebenmehltau auch die Graufäule (*Botrytis cinerea*) auf der Blattunterseite entwickeln konnte. Inkubationsversuche bei nicht inokulierten Blättern zeigten hingegen keine Entwicklung der Graufäule. Die Kontamination konnte daher nur aus dem Inokulum stammen. Die Gewinnung einer Reinkultur von *Plasmopara viticola* konnte aufgrund der zügigeren Entwicklung des Falschen Rebenmehltaus gegenüber dem Erreger der Graufäule durch wenige Vereinzlungsschritte

erfolgen. Durch mehrere Vermehrungsansätze konnten im Weiteren 800 mg reines Sporenmateriale von *P. viticola* gewonnen werden. Somit konnte sichergestellt werden, dass für die Untersuchungen im Rahmen des Bioassays stets auf dasselbe Sporenmateriale zurück gegriffen werden konnte.

3.2.2 Streptomyceten

Analog zur Stammerhaltung von *Plasmopara viticola* wurden die verwendeten *Streptomyceten*-Stämme regelmäßig auf Reinheit und ihre Produktion von Sekundärmetaboliten überprüft. Hierbei war festzustellen, dass durch häufiges Überimpfen von Agarplatten zur Stammerhaltung, die Iromycinproduktion bei *Streptomyces bottropensis* Dra 17 stetig zurück ging bzw. die Biosynthese komplett zum Erliegen kam. Ein Einfluss auf die Thaxtomin A Produktion hingegen wurde nicht festgestellt. Aus diesem Grund wurden für Teile der Fütterungsexperimente sowie den Untersuchungen zur Regulationsaktivität der Iromycine auf alte Stickstoffeinlagerungen zurück gegriffen, bei welchen weiterhin eine Produktion von Iromycinen nachweisbar war. Ferner wurde im Folgenden die Stammhaltung komplett auf Glycerin-, Stickstoffeinlagerung umgestellt. Dies hatte zudem den Vorteil, dass sämtliche für die Untersuchungen benötigten Vorkulturen mit Glycerineinlagerungen derselben Kultur inokuliert werden konnten.

Zur langjährigen Sicherung der Stämme, wurde neben Stickstoffeinlagerungen auch gefriergetrocknetes Mycel unter Vakuum in Glas eingeschweißt.

3.3 Optimierung der Extraktion von Pflanzenextrakten sowie Charakterisierung von Einzelmetaboliten

3.3.1 Optimierung der Extraktion von Pflanzenextrakten

Die Extraktion der Pflanzenextrakte erfolgte mit Hilfe verschiedener organischer Lösungsmittel sowie variablen Extraktionstemperaturen und -zeiten. Hintergrund der Überlegungen war, dass durch eine kürzere Extraktionszeit und einer gleichzeitigen Verringerung der Extraktionstemperatur, aktive thermolabile Substanzen weniger stark angegriffen werden und somit eine Verbesserung der Wirksamkeit pflanzlicher Extrakte erreicht werden kann. Eine kürzere Exposition der Extrakte mit Lösungsmitteln sollte diesen Effekt zusätzlich verstärken. Ferner sollten durch die Wahl von Lösungsmitteln mit einem breiteren Polaritätsspektrum bisher aus den Pflanzen ungelöste Metaboliten in die organische Phase überführt werden.

Die Pflanzenteile (Tabelle 5) wurden analog der Extraktionsansätze, welche in Tabelle 6 dargestellt sind, bearbeitet und anschließend gefriergetrocknet. Die Pflanzengranulate wurden eingewogen und der Extraktionserfolg zunächst anhand der Substanzmengen verglichen. Stellvertretend sind im Folgenden die Ergebnisse von vier Pflanzenextraktionen dargestellt.

Tabelle 19: Darstellung des Extraktionserfolges anhand der Substanzmenge bei Efeublättern, Eichenrinde, Schlüsselblumenwurzeln und Salbeiblättern mittels unterschiedlicher Extraktionsverfahren (US = Ultraschall)

Pflanze	Extraktionsverfahren	Bedingungen	Ausbeute TS in [mg]
Efeublätter	Wasser	180 rpm, 60°C, 72 h	465
Efeublätter	20 % Ethanol (v/v)	180 rpm, 60°C, 72 h	534
Efeublätter	Aceton	180 rpm, RT, 4 h, US	964 (ölig)
Efeublätter	Ethanol	180 rpm, RT, 4 h, US	564
Efeublätter	Methanol	180 rpm, RT, 4 h, US	612
Efeublätter	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	180 rpm, RT, 4 h, US	912 (ölig)

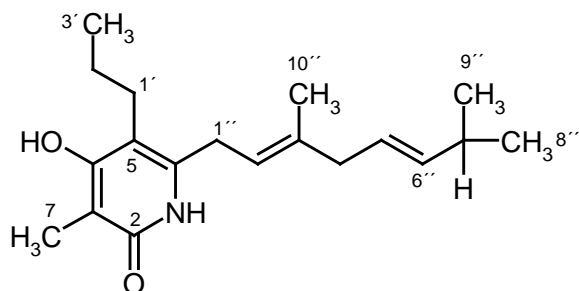
Pflanze	Extraktionsverfahren	Bedingungen	Ausbeute TS in [mg]
Efeublätter	20 Ethanol (v/v) +	180 rpm, 40°C, 4 h	1046 (ölig)
	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	RT, 20 min, US	
Eichenrinde	Wasser	180 rpm, 60°C, 72 h	367
Eichenrinde	20 % Ethanol (v/v)	180 rpm, 60°C, 72 h	428
Eichenrinde	Aceton	180 rpm, RT, 4 h, US	472
Eichenrinde	Ethanol	180 rpm, RT, 4 h, US	378
Eichenrinde	Methanol	180 rpm, RT, 4 h, US	481
Eichenrinde	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	180 rpm, RT, 4 h, US	476
Eichenrinde	20 Ethanol (v/v) +	180 rpm, 40°C, 4 h	518
	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	RT, 20 min, US	
Schlüsselblume	Wasser	180 rpm, 60°C, 72 h	307
Schlüsselblume	20 % Ethanol (v/v)	180 rpm, 60°C, 72 h	418
Schlüsselblume	Aceton	180 rpm, RT, 4 h, US	565 (ölig)
Schlüsselblume	Ethanol	180 rpm, RT, 4 h, US	256
Schlüsselblume	Methanol	180 rpm, RT, 4 h, US	318
Schlüsselblume	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	180 rpm, RT, 4 h, US	482
Schlüsselblume	20 Ethanol (v/v) +	180 rpm, 40°C, 4 h	624 (ölig)
	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	RT, 20 min, US	
Salbeiblätter	Wasser	180 rpm, 60°C, 72 h	445
Salbeiblätter	20 % Ethanol (v/v)	180 rpm, 60°C, 72 h	501
Salbeiblätter	Aceton	180 rpm, RT, 4 h, US	836 (ölig)
Salbeiblätter	Ethanol	180 rpm, RT, 4 h, US	528
Salbeiblätter	Methanol	180 rpm, RT, 4 h, US	687
Salbeiblätter	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	180 rpm, RT, 4 h, US	873 (ölig)
Salbeiblätter	20 Ethanol (v/v) +	180 rpm, 40°C, 4 h	856 (ölig)
	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	RT, 20 min, US	

Der Erfolg der einzelnen Extraktionsverfahren stellt sich bei den einzelnen Pflanzen als äußerst uneinheitlich dar. Zwar zeigt die Extraktion mit reinem Wasser tendenziell die geringsten Ausbeuten, doch lässt ein Vergleich der übrigen Lösungsmittel keinen eindeutigen Schluss zu. Speziell die acetonhaltigen Lösungsmittel zeigen eine starke Extraktion von Ölen und Fetten aus den Pflanzenmaterialien, welche sich bei der Gefriertrocknung nicht vollständig entfernen ließen. Dünnschichtchromatographische Auswertungen der Extrakte (5 mg/mL gelöst in Methanol/Aceton/Wasser 1:1:1, Laufmittel: Ethylacetat/Hexan 2:1 bzw. Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 5:10:1) zeigten keine Unterschiede bei den einzelnen Extraktionsverfahren – ausgenommen der unpolaren Substanzen bei den acetonhaltigen Auszügen. Auf eine Aufreinigung und Entfettung der Extrakte sowie einer Auswertung mittels HPLC mit UV-Detektion wurde daher verzichtet. Für die weiteren Untersuchungen im Rahmen des Bioassays wurde die Kombinationsextraktion aus 20 % Ethanol (v/v) und Aceton/Methanol 1:1 (v/v) gewählt, da dieses Extrakt den größten Polaritätsbereich abdeckte und somit gut mit den Ergebnissen aus der Magisterarbeit (Extrakt aus 20 % Ethanol (v/v)) vergleichbar ist.

3.3.2 Charakterisierung von Sekundärmetaboliten aus phytopathogenen Streptomyceten

Die Isolierung von Sekundärmetaboliten aus phytopathogenen *Streptomyceten* erfolgte analog des in Kapitel 2.7.2 dargestellten Protokolls. Kleine Anpassungen beispielsweise beim Verhältnis der Laufmittel bei chromatographischen Trennungen konnten bei den einzelnen Isolationen nicht ausgeschlossen werden. Die Überprüfung des Isolierungserfolges erfolgte durch die in Kapitel 2.1 angegebene Analytik und ergab die im Folgenden dargestellte Charakterisierung von Iromycin A, Iromycin B sowie Thaxtomin A. Die dazugehörigen Angaben stammen teilweise aus Arbeiten, welche im Vorfeld der eigenen Untersuchungen an den Sekundärmetaboliten durchgeführt wurden (SURUP, 2007).

3.3.2.1 Charakterisierung von Iromycin A



6-(3,7-Dimethyl-octa-2,5-dienyl)-4-hydroxy-3-methyl-5-propyl-1H-pyridin-2-on

$C_{19}H_{29}NO_2$ (303,45)

R_f-Wert: 0,30 (CHCl₃/MeOH 9:1)
0,76 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)
0,03 (Methanol/Wasser 7:3)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

EI-MS m/z (%) = 303 (38) [M]⁺, 274 (12) [M-C₂H₅]⁺, 260 (17) [M-C₃H₇]⁺, 234 (100) [M-C₅H₉]⁺, 220 (69), 192 (25), 164 (21), 71 (13), 55 (17), 43 (38).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3432, 2960, 1707, 1628, 1458, 1423, 1383, 1286, 1220, 1170, 1117, 1053, 1027, 975 cm⁻¹.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 205 (0.768), 294 (0.198);

(MeOH/HCl): λ_{max} (lg ϵ) = 205 (0.957), 274 (0.196), 309 (0.119) nm;

(MeOH/NaOH): λ_{max} (lg ϵ) = 201 (0.638), 204 (0.643), 220 (0.747), 280 (sh) nm.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 3H, 3'-H₃), 0.95 (d, J = 7.0 Hz, 6H, 8''-H₃, 9''-H₃), 1.47 (tq, J = 8.0, 7.0 Hz, 2H, 2'-H₂), 1.70 (s, 3H, 10''-H₃), 1.95 (s, 3H, 7-H₃), 2.23

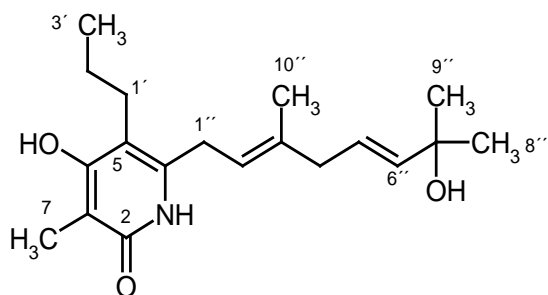
(dq, $J = 7.0, 7.0, 7.0$ Hz, 1H, 7''-H), 2.40 (dt, $J = 8.0$ Hz, $J = 2$ Hz, 2H, 1'-H₂), 2.67 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, 4''-H₂), 3.30 (dd, $J = 6.5$ Hz, $J = 2$ Hz, 2H, 1''-H₂), 5.14 (dt, $J = 7.0, 1.0$ Hz, 1H, 2''-H), 5.30 (ddd, $J = 15.0, 6.5, 1.0$ Hz, 1H, 5''-H), 5.42 (dtd, $J = 15.0, 6.5, 1.0$ Hz, 1H, 6''-H).

Das Signal der CH₂-Gruppe 1''-H₂ liegt unter dem Methanol-Signal.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.7$ (q, C-7), 14.6 (q, C-3'), 16.5 (q, C-10''), 23.0 (q, C-8'', C-9''), 24.1 (t, C-2'), 28.0 (t, C-1'), 30.4 (t, C-1''), 32.3 (s, C-7''), 43.7 (t, C-4''), 106.0 (s, C-3), 113.7 (s, C-5), 121.0 (d, C-2''), 125.7 (d, C-5''), 138.8 (s, C-3''), 140.8 (d, C-6''), 143.0 (s, C-6), 165.9 (s, C-2), 166.0 (s, C-4).

Die Charakterisierung erfolgte gemäß der Arbeiten durch WAGNER und SURUP, Datensatz entnommen aus SURUP (2007)

3.3.2.2 Charakterisierung von Iromycin B



4-Hydroxy-6-(7-hydroxy-3,7-dimethyl-octa-2,5-dienyl)-3-methyl-5-propyl-1H-pyridin-2-on

C₁₉H₂₉NO₃ (319,45)

Schmelzpunkt: 51 °C

R_f-Wert: 0,15 (CHCl₃/MeOH 9:1)

0,50 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

0,24 (Methanol/Wasser 7:3)

Anfärbeverhalten: blau (Anisaldehyd)

EI-MS m/z (%) = 319 (4) $[M]^+$, 317 (5) $[M-2H]^+$, 304 (15) $[M-CH_3]^+$, 301 (11) $[M-H_2O]^+$, 274 (37), 220 (88), 164 (12), 129 (14), 43 (100).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3404, 2964, 2930, 2871, 1700, 1629, 1457, 1430, 1376, 1286, 1240, 1220, 1157, 1114, 1052, 972 cm^{-1} .

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 207 (1.680), 291 (0.407);

(MeOH/HCl): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 205 (2.093), 274 (0.439);

(MeOH/NaOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 220 (1.640), 278 (0.407) nm.

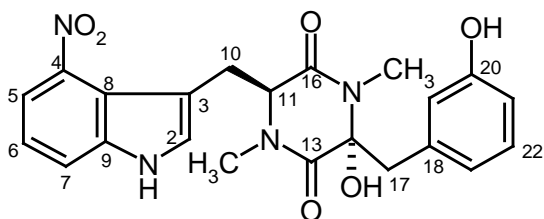
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = 0.94 (t, J = 7.5 Hz, 3H, 3'-H₃), 1.24 (s, 6H, 8''-H₃, 9''-H₃), 1.47 (tq, J = 8.0, 7.0 Hz, 2H, 2'-H₂), 1.72 (d, J = 1.0 Hz, 3H, 10''-H₃), 1.95 (s, 3H, 7-H₃), 2.41 (dt, J = 8.0 Hz, J = 2.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 2.72 (d, J = 5.5 Hz, 2H, 4''-H₂), 5.18 (dt, J = 7.0, 1.5 Hz, 1H, 2''-H), 5.57 (td, J = 15.5, 6.0 Hz, 1H, 5''-H), 5.62 (d, J = 15.5 Hz, 1H, 6''-H).

Das Signal der CH₂-Gruppe 1''-H₂ liegt unter dem Methanol-Signal.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD): δ = 8.7 (q, C-7), 14.5 (q, C-3'), 16.6 (q, C-10''), 24.1 (t, C-2'), 27.9 (t, C-1'), 29.9 (q, C-8'', C-9''), 30.4 (t, C-1''), 43.3 (t, C-4''), 71.1 (s, C-7''), 106.0 (s, C-3), 113.7 (s, C-5), 121.3 (d, C-2''), 125.3 (d, C-5''), 138.5 (s, C-3''), 141.2 (d, C-6''), 142.9 (s, C-6), 165.9 (s, C-2), 166.0 (s, C-4).

Die Charakterisierung erfolgte gemäß der Arbeiten durch WAGNER und SURUP, Datensatz entnommen aus SURUP (2007)

3.3.2.3 Charakterisierung von Thaxtomin A



$C_{22}H_{22}N_4O_6$ (438.44)

Schmelzpunkt: 220 °C

R_f-Wert: 0,18 (CHCl₃/MeOH 9:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 420.0 (2) ($M^+ - H_2O$), 303 (4), 270 (9), 246 (31), 176 (9) ($C_9H_8N_2O_2$), 175 (8) ($C_9H_7N_2O_2$), 162 (100) ($C_8H_6N_2O_2$), 116 (67) (C_8H_6N), 107 (36) (C_7H_7O), 89 (23) (C_7H_5).

ESI-MS (negative Ionen): 437 (100) [$M-H$]⁻, 875 (67) [2 $M-H$]⁻, 1313 (15) [3 $M-H$]⁻.

ESI-MS (positive Ionen): 461 (34) [$M+Na$]⁺, 899 (100) [2 $M+Na$]⁺.

IR: $\bar{\nu}$ = 3370, 2940, 1650, 1600, 1510, 1455, 1325, 1285, 1075, 995, 735 cm^{-1} .

UV: (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): 398 (2500), 368 (2235), 338 (2060), 214 (35300).

(MeOH + HCl) λ_{max} nm (ϵ): 398 (2150), 368 (1975), 338 (1620), 214 (32575).

(MeOH + NaOH) λ_{max} nm (ϵ): 402 (2060), 368 (1755), 338 (1535), 207 (40820).

CD (MeOH) λ_{extr} nm ($[\theta]^{20}$) = 212 (- 6500), 227 (+ 31180), 280 (+1680), 322 (-650), 404 (+ 2630).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.62 (dd, J = 8.5, 14.0 Hz, 1 H, 10- H_a), 2.40 (dd, 6.5, 14.0 Hz, 1 H, 10- H_b), 2.62 (s, 3 H, $\text{N}_{12}\text{-CH}_3$), 2.85 (s, 3 H, $\text{N}_{15}\text{-CH}_3$), 2.98 (d, J = 13.5 Hz, 1 H, 17- H_a), 3.13 (d, J = 13.5 Hz, 17- H_b), 3.65 (dd, J = 6.5, 8.5 Hz, 1 H, 11-H), 6.55 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, 23-H), 6.62 (s, 1 H, 19-H), 6.65 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 21-H), 6.90 (s, 1 H, 2-H), 7.16 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1 H, 22-H), 7.20 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1 H, 6-H), 7.75 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.79 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, 5-H), 9.55 (s, breit, NH), 11.80 (s, breit, phenol. OH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ = 27.4 (q, $\text{N}_{15}\text{-CH}_3$), 31.6 (t, C-10), 32.9 (q, $\text{N}_{12}\text{-CH}_3$), 42.5 (t, C-17), 62.7 (d, C-11), 85.9 (s, C-14), 109.0 (s, C-3), 114.2 (d, C-21), 116.95 (d, C-5), 117.2 (d, C-19), 117.9 (s, C-9), 118.4 (d, C-7), 119.8 (d, C-6), 121.0 (d, C-23), 129.5 (d, C-22), 130.9 (d, C-2), 136.2 (s, C-18), 139.1 (s, C-8), 141.8 (s, C-4), 157.3 (s, C-20), 163.9 (s, C-16), 165.8 (s, C-13) ppm.

Die Charakterisierung erfolgte gemäß der Arbeiten durch WAGNER und SURUP, Datensatz entnommen aus SURUP (2007)

3.4 Darstellung der Wirkung von Pflanzenextrakten auf die Entwicklung von *Plasmopara viticola*

3.4.1 Auswirkung der Extraktionsmethode auf die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten

Neben den Untersuchungen zur Ausbeute der unterschiedlichen Extraktionsmethoden wurden die Pflanzenextrakte weiterhin auf ihre Wirksamkeit gegenüber der Entwicklung des Falschen Mehltaus der Rebe untersucht.

Bei den Untersuchungen zur Sporulationsintensität wurden jeweils vier Blattscheiben protektiv 48 Stunden vor Inokulation behandelt und durch Abschwemmen die Anzahl an Sporangien bestimmt:

Tabelle 20: Sporulationsintensität (5 dpi) von *Plasmopara viticola* bezogen auf die Blattfläche von Blattscheiben der Rebsorte Müller-Thurgau nach der protektiver Applikation verschiedener Pflanzenextrakte (3 % TS). Die Extrakte aus Efeu und Rosmarin wurden hierbei in einer Konzentration von 2 % appliziert. Sporulation je mm²: Signifikante Unterschiede der einzelnen Extrakte untereinander sind nach dem Newman-Keuls-Test durch entsprechende Buchstaben kenntlich gemacht (n = 4).

Teedroge	Extraktionsverfahren	Mittelwert Sporangien je mm ²	Signifikanz- stufe
Efeu	Wasser	20,5	A
Efeu	20 % Ethanol (v/v)	11,75	AB
Efeu	Aceton	12,5	AB
Efeu	Ethanol	14,25	AB
Efeu	Methanol	10,5	B
Efeu	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	11,75	AB
Efeu	20 Ethanol (v/v) + Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	10	B

Teedroge	Extraktionsverfahren	Mittelwert Sporangien je mm²	Signifikanz- stufe
Rosmarin	Wasser	17	A
Rosmarin	20 % Ethanol (v/v)	13	A
Rosmarin	Aceton	12,25	A
Rosmarin	Ethanol	14,5	A
Rosmarin	Methanol	9,75	A
Rosmarin	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	10,75	A
Rosmarin	20 Ethanol (v/v) + Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	6,26	A
Eiche	Wasser	23	A
Eiche	20 % Ethanol (v/v)	21,25	AB
Eiche	Aceton	21	AB
Eiche	Ethanol	28,5	AB
Eiche	Methanol	26,5	AB
Eiche	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	21,75	AB
Eiche	20 Ethanol (v/v) + Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	19,5	B
Schlüsselblume	Wasser	30,25	A
Schlüsselblume	20 % Ethanol (v/v)	28,75	A
Schlüsselblume	Aceton	29,75	A
Schlüsselblume	Ethanol	32,5	A
Schlüsselblume	Methanol	29,75	A
Schlüsselblume	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	27,5	A
Schlüsselblume	20 Ethanol (v/v) + Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	26,75	A

Teedroge	Extraktionsverfahren	Mittelwert Sporangien je mm²	Signifikanz- stufe
Faulbaum	Wasser	37,75	A
Faulbaum	20 % Ethanol (v/v)	30,5	A
Faulbaum	Aceton	34,5	A
Faulbaum	Ethanol	36,25	A
Faulbaum	Methanol	39,25	A
Faulbaum	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	30,25	A
Faulbaum	20 Ethanol (v/v) + Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	28,5	A
Salbei	Wasser	41	A
Salbei	20 % Ethanol (v/v)	30,5	A
Salbei	Aceton	34,5	A
Salbei	Ethanol	36,25	A
Salbei	Methanol	39,25	A
Salbei	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	30,25	A
Salbei	20 Ethanol (v/v) + Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	28,5	A
Weide	Wasser	56,75	A
Weide	20 % Ethanol (v/v)	58,25	A
Weide	Aceton	51	A
Weide	Ethanol	51,5	A
Weide	Methanol	46,75	A
Weide	Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	31,75	B
Weide	20 Ethanol (v/v) + Aceton/Methanol 1:1 (v/v)	28,75	B

Die Auswirkungen unterschiedlich hergestellter Teedrogen auf die Sporulationsintensität von *Plasmopara viticola* zeigen einen nur sehr marginalen Effekt. Zwar kann man anhand der Mittelwerte eine gewisse Tendenz zwischen den Herstellungsmethoden einzelner Extrakte ableiten, doch sind diese aus statistischer Sicht nicht haltbar. Ausschließlich bei Extrakten aus Eiche, Weide und Efeu zeigen sich auch signifikante Unterschiede bei der Extrakterstellung: so konnten Extrakte welche durch die Extraktion mittels 20 % Ethanol (v/v) sowie einer anschließenden Extraktion mit Aceton/Methanol 1:1 (v/v) gewonnen wurden, eine verstärkte Hemmung auf die Entwicklung des Falschen Rebenmehltaus aufweisen.

3.4.2 Biologische Wirkung unterschiedlicher „Extraktformen“

Da bei der Lösung der Extrakte in Wasser nicht alle Inhaltsstoffe in Lösung gehen, sondern teilweise als Suspension vorliegen, wurden Rohextrakte, Extraktlösungen und Extraktseimente einzelner Teedrogen auf ihre Wirksamkeit gegenüber *Plasmopara viticola* untersucht. Hierbei wurde auf die Extrakte zurückgegriffen, welche durch Kombinationsextraktion aus 20 % Ethanol (v/v) und Aceton/Methanol 1:1 (v/v) hergestellt wurden. In Abbildung 13 wird ersichtlich, dass es bei sämtlichen Extrakten kaum Unterschiede zwischen Rohprodukt und Extraktlösung gab. Die Applikation des in Wasser gelösten Extraktseimentes hingegen scheint nur wenig Einfluss auf die Entwicklung von *Plasmopara viticola* nehmen zu können. Nur die Extraktseimente aus Weide und Salbei können die Sporulationsintensität gegenüber der Wasserkontrolle signifikant beeinflussen. Der Großteil der biologisch aktiven Substanzen scheint aber auch bei diesen Extrakten in Lösung vorzuliegen.

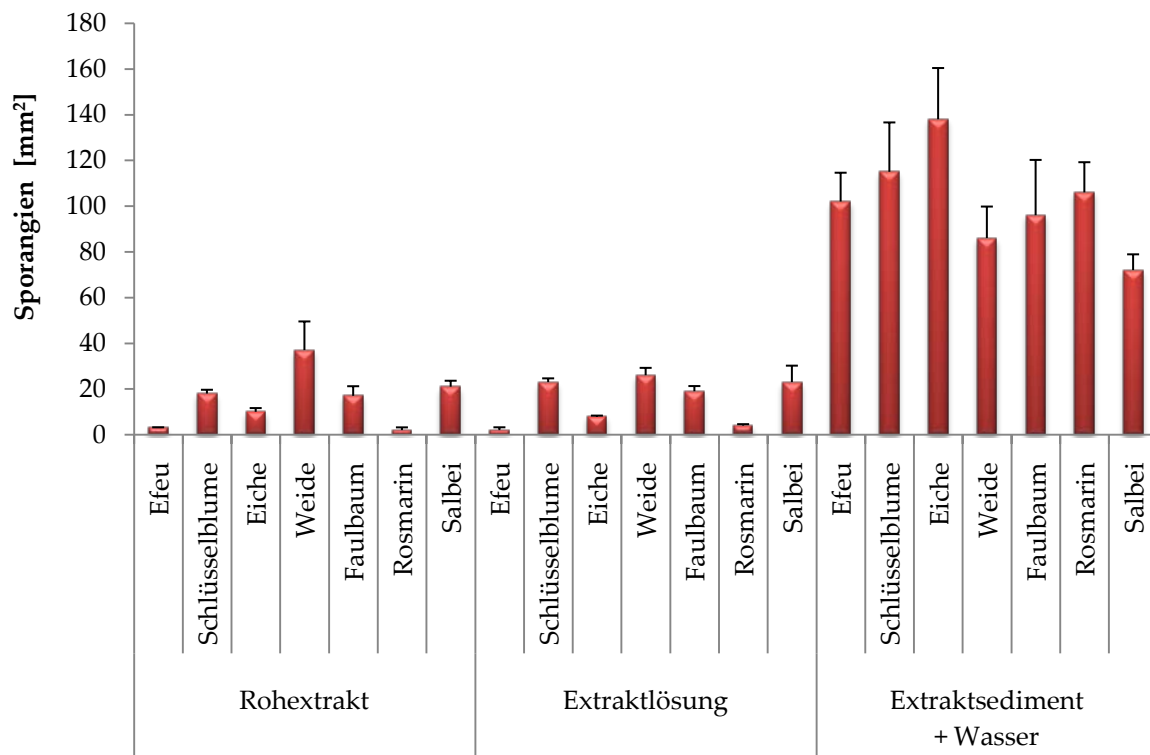


Abbildung 13: Wirkung unterschiedlicher Extraktformen (3% TS) auf die Sporulationsintensität von *Plasmopara viticola* (5 dpi) Rohextrakt: Gesamtextrakt incl. aller suspendierten Bestandteile; Extraktlösung: nur gelöste Inhaltsstoffe; Extrakt sediment: in Wasser resuspendierte unlösliche Bestandteile. Das Extrakt wurde unter Verwendung von 20 % EtOH sowie Aceton Methanol 1:1 hergestellt. (n=4).

3.4.3 Einfluss von Lösungs- und Netzmitteln auf die Wirksamkeit

Der Einfluss der Lösungsmittelzusätze und Netzmittel (MEK, DMSO) auf die Wirksamkeit der Extrakte gegenüber *P. viticola* wurde bereits im Rahmen der Magisterarbeit (KÖSSLER, 2006) untersucht.

3.4.4 Besiedlungsintensität des Wirtsgewebes

3.4.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Bei den Untersuchungen zur Besiedlungsintensität des Wirtsgewebes, welche im Rahmen der Magisterarbeit durchgeführt wurden, sollten mikroskopische Bonituren Aufschluss über das intrazelluläre Wachstum von *P. viticola* geben. Problematisch bei diesem Verfahren war, dass eine visuelle Bonitur vergleichbar mit einer Blattscheibe nicht möglich war. Aufgrund starker Interferenzen seitens der Fluoreszenz und der begrenzten Darstellung des Pathogens im Blattgewebe konnten keine signifikanten Unterschiede bei den Prüfvarianten ausgemacht werden (KÖSSLER, 2006). Weiterführende Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von *Plasmopara viticola* im Rahmen dieser Arbeit, erfolgten daher mittels quantitativer Real-Time PCR (vgl. Kapitel 3.4.4.2).

3.4.4.2 Real-Time PCR Untersuchungen zur Biomassebestimmung von *Plasmopara viticola* im Wirtsgewebe

Wie bereits im Kapitel 3.4.4 beschrieben, konnten anhand der Fluoreszenzüberlagerung keine eindeutigen Ergebnisse der Besiedlungsgeschwindigkeit des Wirtsgewebes erhoben werden. Um dennoch den Einfluss der Pflanzenextrakte auf das intrazelluläre Wachstum zu beurteilen wurde auf die Biomassebestimmung von *P. viticola* durch Real-Time PCR basierte Untersuchungen zurück gegriffen. Da in der Literatur ein bereits optimiertes Protokoll zur Detektion von Oomyceten mittels PCR vorlag (VALSESIA et al., 2005), konnte auf das Primerdesign sowie auf die Optimierung des PCR Protokolls verzichtet werden. Bei den PCR-Untersuchungen kamen daher lediglich geringfügige Anpassungen beim Reaktionsgemisch zum tragen.

Bei der Untersuchung der gebildeten Biomasse von *P. viticola* in Rebblättern konnten kaum signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Prüfsubstanzen festgestellt werden. Einzig die pathogene Biomasse bei dem eingesetzten Extrakt aus Schlüsselblumenwurzeln unterschied sich signifikant von den übrigen Extrakten und wies einen Gehalt an pilzlicher Biomasse von knapp 150 µg/mg auf. Bei

Extrakten aus Rosmarin, Efeu, Weidenrinde, Eichenrinde und Faulbaumrinde konnte eine Biomasse von *P. viticola* von 30 – 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ errechnet werden, doch sind aufgrund der Streuung keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

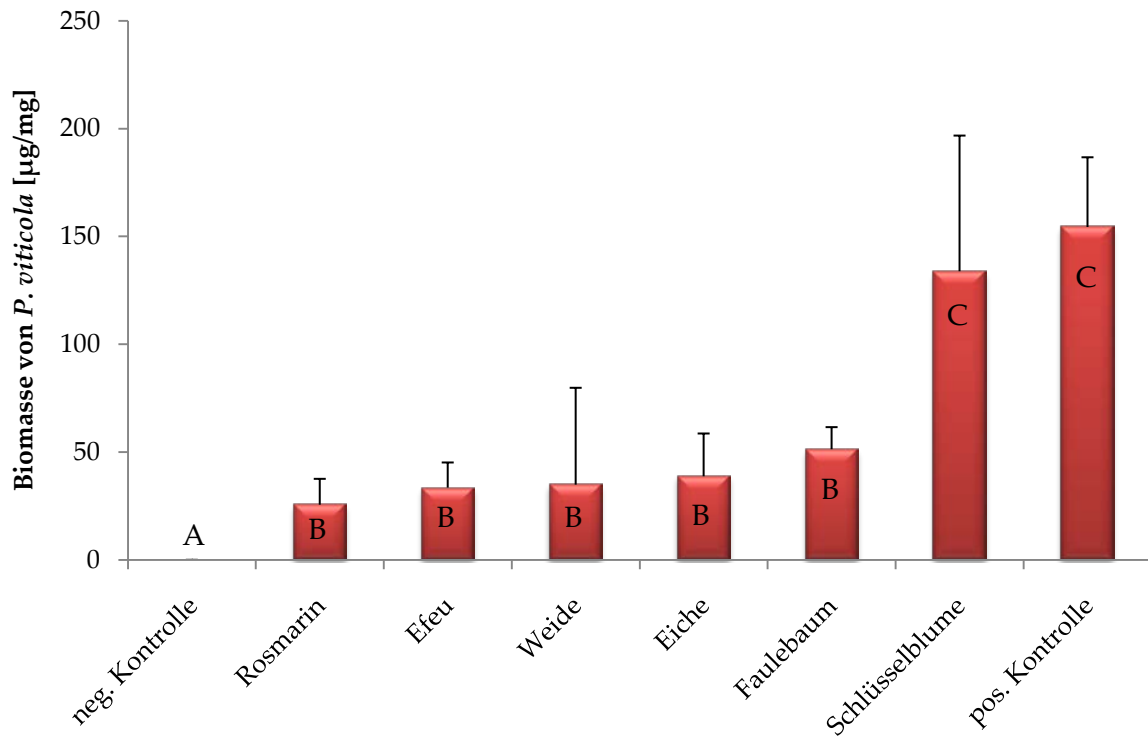


Abbildung 14: Produktion von pilzlicher Biomasse von *Plasmopara viticola* auf Reblättern der Sorte ‚Müller-Thurgau‘ in [$\mu\text{g}/\text{mg}$] nach 4 dpi, ermittelt durch quantitative Real-Time PCR. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind in vereinfachter Form mit den entsprechenden Buchstaben kenntlich gemacht (n=3).

3.5 Fütterungsversuche mit phytopathogenen Streptomyceten

3.5.1 Fütterung von NOS-Inhibitoren bei *S. bottropensis* Dra 17

Im Vorfeld der Fütterungsversuche an *S. bottropensis* Dra 17 wurden Vorversuche zur Optimierung der Thaxtomin A-Produktion durchgeführt:

3.5.1.1 Optimierung der Medien zur Thaxtomin A Produktion

Um eine stabile Thaxtomin A-Produktion zu gewährleisten, wurde zunächst der Stamm *Streptomyces bottropensis* Dra 17 in vier verschiedenen Medien unter gleichen Bedingungen kultiviert und auf die Produktion von Iromycin A, Iromycin B sowie Thaxtomin A durch HPLC mit UV-Detektion untersucht.

Tabelle 21: Produktion von Thaxtomin A, Iromycin A und Iromycin B in unterschiedlichen Medien. Die Inokulation erfolgte mittels 5 % einer 48 h SGG Vorkultur. Die Inkubation fand bei 28 °C, 250 rpm und Dunkelheit für 72 Stunden statt. Zeichenerklärung: (++) hohe Produktion (+) mäßige Produktion (o) kaum Produktion (-) keine Produktion

Medium	Thaxtomin A	Iromycin A	Iromycin B
YMG	+	-	+
Hafer	++	o	+
1187S	o	-	+
NL 1358	+	+	+++

Nach einheitlicher Aufarbeitung aller Proben konnte in allen Varianten Thaxtomin A nachgewiesen werden. Die höchste Produktion konnte im Hafer-Medium nachgewiesen werden. Die zweithöchste Ausbeute wurde in YMG-Medium sowie in NL 1358 erreicht. Im Medium 1187S konnte kaum Thaxtomin A nachgewiesen werden. Iromycin A konnte nur in Mycel von Hafer und Medium NL 1358 nachgewiesen werden. Im Kulturfiltrat konnte in keinem der getesteten Medien Iromycin A detektiert werden. Eine Produktion von Iromycin B konnte in allen Medien, sowohl im Kulturfiltrat als auch im Mycel, dokumentiert werden.

3.5.1.2 Optimierung der Fermentationsbedingungen zur Thaxtomin A Produktion

Analog zur Medienoptimierung wurde der Einfluss von Füllhöhe, Kolbengröße, Belüftung durch Schikanen und Schüttelgeschwindigkeit auf die Thaxtomin A Produktion von *Streptomyces bottropensis* Dra 17 untersucht. Die Kolben waren hierbei einheitlich mit Hafermedium gefüllt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Kulturfiltrate mit Ethylacetat extrahiert und durch HPLC mit UV-Detektion (Programm 2, Säule 1) analysiert.

Tabelle 22: Kombinatorische Darstellung der Einzelvarianten unter Einbeziehung unterschiedlicher Füllhöhen, Kolbengrößen, Schikanen und Schüttelgeschwindigkeit zur Optimierung der Thaxtomin A Produktion (n=2). Die Angabe der Konzentration c wurde anhand einer Eichkurve aus den entsprechenden Integralen der Fläche errechnet. Auf statistische Berechnungen wurde verzichtet.

Bezeichnung	Kolben- volumen [mL]	Schikanen	Füllvolumen [mL]	rpm	Fläche über d. Integrals	c Thaxtomin [mg/L]
KP-FB-1000-1	1000	ja	300	120	8095274	20
KP-FB-1000-2	1000	ja	150	120	8630295	21
KP-FB-1000-3	1000	ja	75	120	10181310	25
KP-FB-1000-4	1000	nein	300	120	1330637	3
KP-FB-1000-5	1000	nein	150	120	6472580	16
KP-FB-1000-6	1000	nein	75	120	8600788	21
KP-FB-1000-7	1000	ja	300	180	6296646	16
KP-FB-1000-8	1000	ja	150	180	10034805	25
KP-FB-1000-9	1000	ja	75	180	7595851	19
KP-FB-1000-10	1000	nein	300	180	5565954	14
KP-FB-1000-11	1000	nein	150	180	9548774	24
KP-FB-1000-12	1000	nein	75	180	9583735	24
KP-FB-1000-13	1000	ja	300	250	10123288	25
KP-FB-1000-14	1000	ja	150	250	10715189	27
KP-FB-1000-15	1000	ja	75	250	10154029	25
KP-FB-1000-16	1000	nein	300	250	6139897	15
KP-FB-1000-17	1000	nein	150	250	8838514	22
KP-FB-1000-18	1000	nein	75	250	10441311	26
KP-FB-300-1	300	ja	100	120	4192369	10
KP-FB-300-2	300	ja	75	120	5444180	14

Bezeichnung	Kolben- volumen [mL]	Schikanen	Füllvolumen [mL]	rpm	Fläche des Integrals	c Thaxtomin [mg/L]
KP-FB-300-3	300	ja	50	120	6820731	17
KP-FB-300-4	300	nein	100	120	3225647	8
KP-FB-300-5	300	nein	75	120	4067441	10
KP-FB-300-6	300	nein	50	120	5233908	13
KP-FB-300-7	300	ja	100	180	7070288	18
KP-FB-300-8	300	ja	75	180	6188320	15
KP-FB-300-9	300	ja	50	180	9507239	24
KP-FB-300-10	300	nein	100	180	5990725	15
KP-FB-300-11	300	nein	75	180	5596122	14
KP-FB-300-12	300	nein	50	180	11024498	27
KP-FB-300-13	300	ja	100	250	8475731	21
KP-FB-300-14	300	ja	75	250	10743305	27
KP-FB-300-15	300	ja	50	250	12462005	31
KP-FB-300-16	300	nein	100	250	9169460	23
KP-FB-300-17	300	nein	75	250	9603555	24
KP-FB-300-18	300	nein	50	250	8116273	20
KP-FB-100-1	100	ja	30	120	3150301	8
KP-FB-100-2	100	ja	15	120	3322080	8
KP-FB-100-3	100	nein	30	120	3283179	8
KP-FB-100-4	100	nein	15	120	3703504	9
KP-FB-100-5	100	ja	30	180	4156500	10
KP-FB-100-6	100	ja	15	180	5118633	13
KP-FB-100-7	100	nein	30	180	5158235	13
KP-FB-100-8	100	nein	15	180	4022345	10
KP-FB-100-9	100	ja	30	250	6575251	16
KP-FB-100-10	100	ja	15	250	7101344	18
KP-FB-100-11	100	nein	30	250	6264106	16
KP-FB-100-12	100	nein	15	250	10382139	26

Es zeigte sich, dass hohe Schüttelgeschwindigkeiten, speziell bei kleinen Kolben zu einer erhöhten Produktion an Thaxtomin A führten. Ferner war bei 100 mL Erlenmeyerkolben kein Unterschied zwischen den Varianten mit und ohne Schikanen erkennbar. Bei 300 mL Kolben bestätigt sich die Produktionssteigerung bei hohen Schüttelgeschwindigkeiten. Ein

Unterschied zwischen Kolben mit und ohne Schikane ist nicht auszumachen. Ein Einfluss der Füllhöhe ist bei keiner der Varianten erkennbar. Ebenso scheint es bei großen Kolben (1000 mL) auch keinen signifikanten Unterschied der Produktion von Thaxtomin A bei verschiedener Schüttelgeschwindigkeit zu geben.

Aus praktischen Gesichtspunkten wurde daher entschieden, weitere Untersuchungen im Rahmen der Thaxtomininhibition mit 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane, einer Füllhöhe von 75 mL und hohen Schüttelgeschwindigkeiten (220 bis 250 rpm) durchzuführen.

3.5.1.3 Eichkurven zur Bestimmung der Metaboliten-Konzentration

Zur Bestimmung der Produktionsrate der einzelnen Fermentationen wurde deren Flächenintegral mit dem Integral von Proben bekannter Konzentration verglichen. Anhand der Kurvensteigung konnte daher auf die im Rohprodukt befindliche Sekundärmetabolitenkonzentration geschlossen werden.

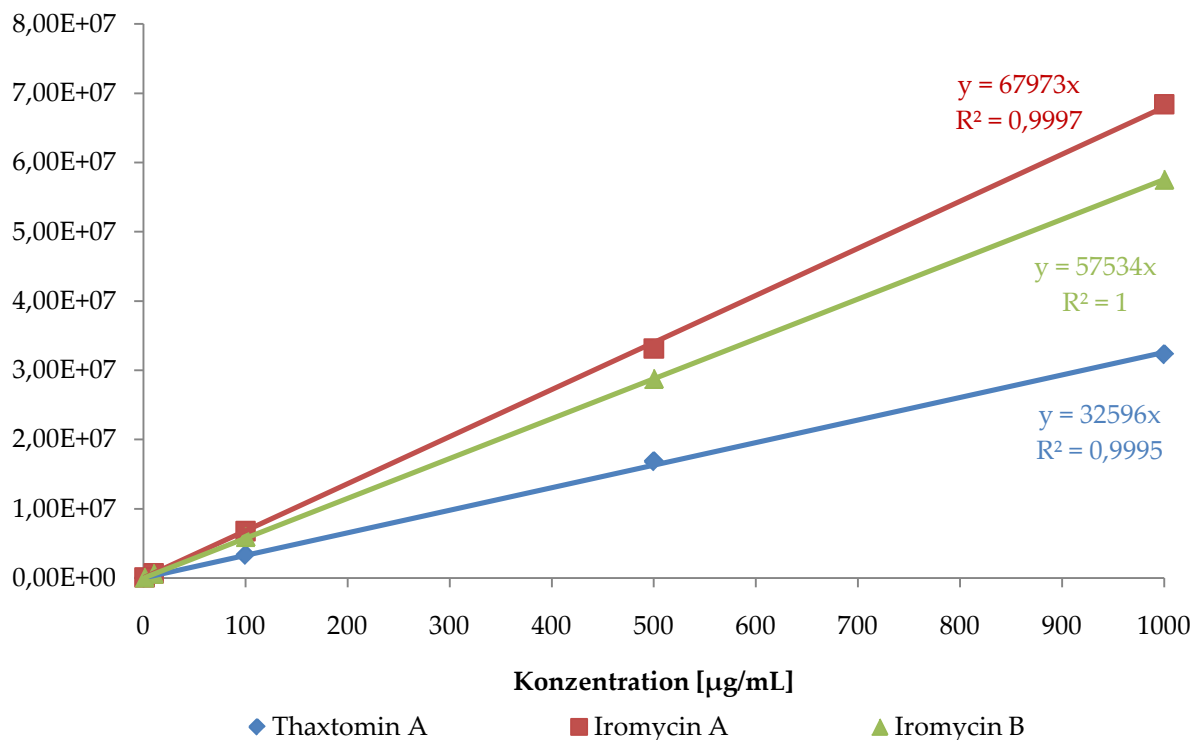


Abbildung 15: Darstellung der Eichgeraden für die Sekundärmetaboliten Thaxtomin A, Iromycin A und Iromycin B unter Angabe der Funktion mit zugehöriger Steigung. R^2 stellt hierbei das Bestimmtheitsmaß der Trendlinie dar. Anlage: Kontron

3.5.1.4 Fermentationskurve von Thaxtomin A bei *S. bottropensis* Dra 17

Zur Aufnahme des zeitabhängigen Produktionsverlaufs von Thaxtomin A wurde *Streptomyces bottropensis* Dra 17 in 300 mL Schüttelkolben im Hafermedium ohne Schikane kultiviert. Die Probeentnahme fand hierbei im fünf bis zehn Stundenzyklus statt, bei dem jeweils zwei Kolben entnommen und nach vergleichender pH-Kontrolle vereinigt wurden.

Die Produktion von Thaxtomin A erfolgte ab der 15. Stunde nach Inokulation und verlief stetig bis zur 60. Stunde. Der pH-Wert fiel im gleichen Zeitabschnitt von 5,8 auf 4,6. Nach 60 hpi verlangsamte sich die Thaxtomin A Produktion und der pH-Wert stagnierte. Der weitere Abfall der Thaxtomin A Konzentration im Zeitfenster zwischen 100 und 160 Stunden nach Inokulation könnte sich durch einen enzymatischen Abbau erklären. Der pH-Wert blieb während dieser Zeit nahezu unverändert.

Für die folgende Fütterung von NO-Synthase Inhibitoren wurden anhand der zuvor erhaltenen Ergebnisse die Fütterungszeitpunkte im Zeitraum 16 bis 60 hpi festgelegt.

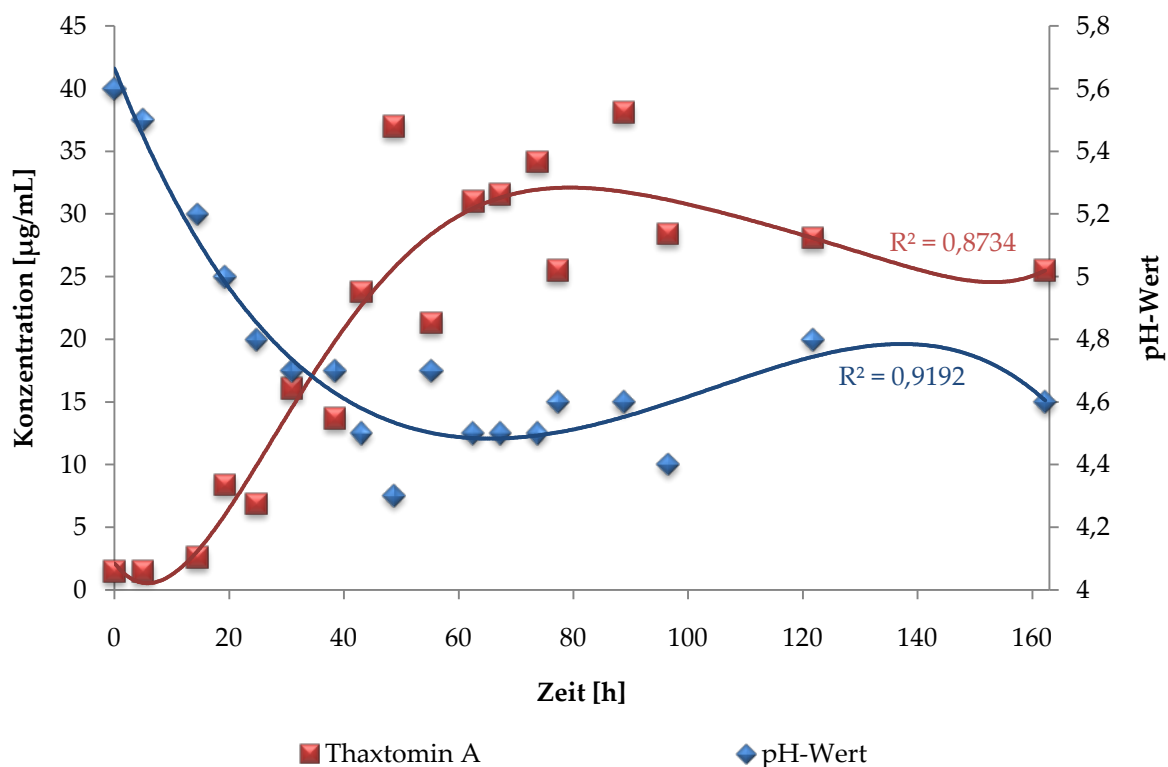


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Produktion von Thaxtomin A sowie die Darstellung des pH-Wertes einer Kultur von *Streptomyces bottropensis* Dra 17 bei der Fermentation (28 °C, 250 rpm, Dunkelheit) in 300 mL EMK ohne Schikane in Hafermedium.

3.5.1.5 Fütterung von NOS-Inhibitoren bei *Streptomyces bottropensis* Dra 17

Der Fütterungsversuch unterschiedlicher NO-Synthase Inhibitoren bei *S. bottropensis* Dra 17 erfolgte unter identischen Bedingungen wie bei der Aufnahme der Fermentationskurve. Die in Methanol bzw. Wasser gelösten Fütterungsdetergenzien (Iromycin, NNA und NMA) wurden mittels Einwegspritze manuell zugegeben.

Die Proben wurden, wie im Kapitel Material und Methoden beschriebenen einzeln aufgearbeitet, die Produktion von Thaxtomin A, Iromycin A und Iromycin B in den Rohextrakten wurde durch Analyse mittels HPLC-DAD-Kopplung bestimmt.

Bei Fütterungsvarianten mit dem ‚stammeigenen‘ Iromycin A konnten nur sehr geringe Effekte auf die Bildung des Phytotoxins Thaxtomin A festgestellt werden. Nur eine Fütterung von 6 mg Iromycin A je 75 mL Kolbenvolumen bewirkte eine Reduktion der Thaxtominproduktion um 35 %. Alle anderen Fütterungen mit Iromycin A unterschieden sich anhand des Thaxtomin A Gehaltes nicht von der Negativkontrolle. Gleichzeitig konnte Iromycin A nur in einem Rohprodukt (Zugabe von 6 mg Iromycin A) mittels der HPLC detektiert werden. In allen anderen Fütterungsvarianten konnte Iromycin A nicht nachgewiesen werden. Dagegen war die Menge an Iromycin B, speziell in den Varianten mit hoher Iromycin A-Zugabe stark erhöht. Hierbei konnten teilweise Konzentrationen von durchschnittlich 350 % (bei Fütterung von 6 mg Iromycin A) bzw. 200 % (bei Fütterung von 2 mg Iromycin A) aufgezeigt werden. Niedriger dosierte Iromycin A-Zugaben hatten keinen Effekt auf die Konzentration von Iromycin B im Rohprodukt.

Bei der Fütterung der starken NO-Synthase Inhibitoren NNA und NMA konnte ein Rückgang der Thaxtomin A Produktion auf durchschnittlich 30 % festgestellt werden. Beide Varianten unterschieden sich statistisch nicht. Eine Detektion von Iromycin A war bei beiden NOS-Inhibitoren, wie auch bei der Negativkontrolle, nicht möglich. Die Produktion von Iromycin B lag bei den Positiv- und Negativkontrollen auf demselben Niveau.

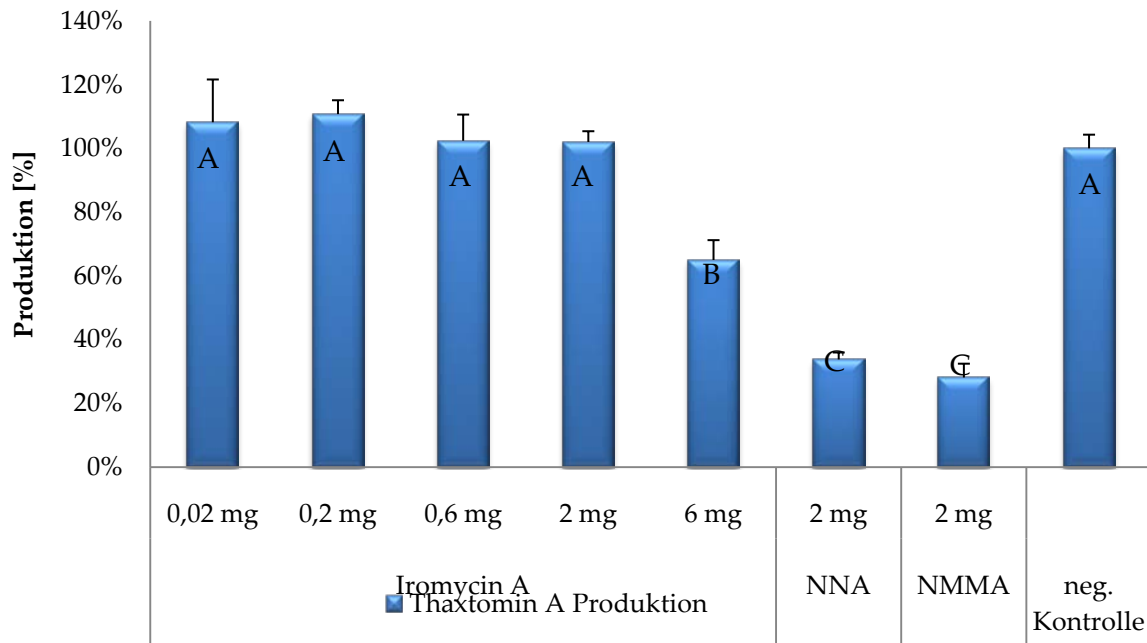


Abbildung 17: Produktion des Phytotoxins Thaxtomine A durch *Streptomyces bottropensis* Dra 17 nach Fütterung unterschiedlicher NO-Synthase Inhibitoren und Methanol als Negativkontrolle. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind durch entsprechende Buchstaben kenntlich gemacht (n = 4).

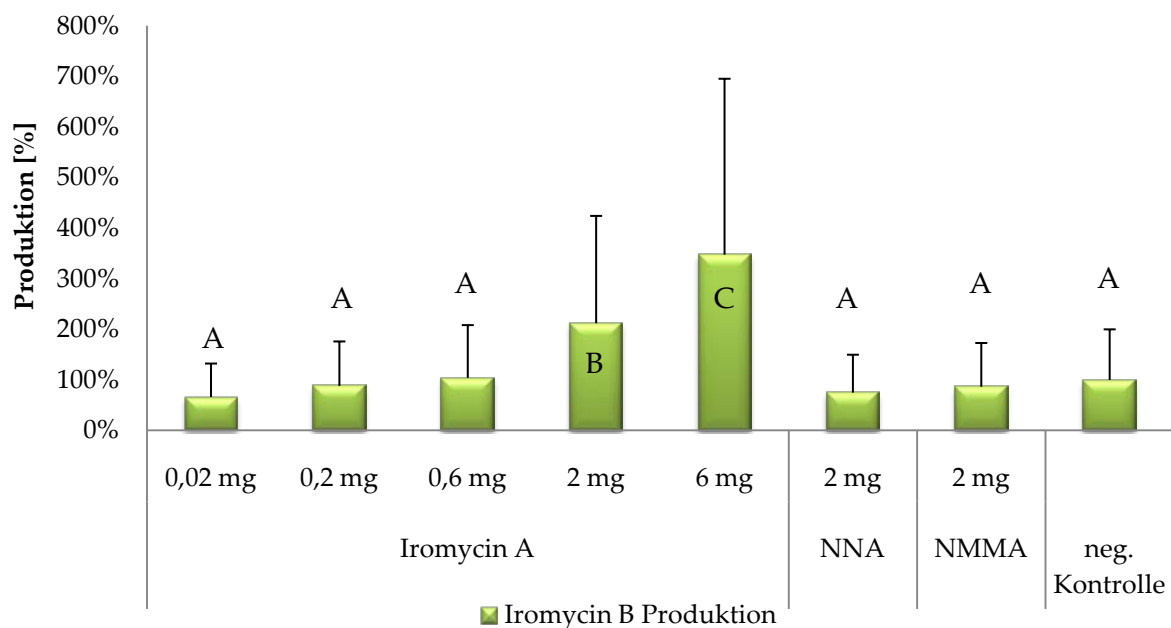


Abbildung 18: Bestimmung der Iromycin B Konzentration im Kulturfiltrat von *Streptomyces bottropensis* Dra 17 nach Fütterung unterschiedlicher NO-Synthase Inhibitoren und der Negativkontrolle Methanol. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind durch entsprechende Buchstaben kenntlich gemacht (n = 4).

3.5.2 Fütterungen von NOS-Inhibitoren bei *Streptomyces scabies* 1/3

3.5.2.1 Untersuchungen zur Optimierung des Hafermediums

Bei den Vorversuchen zur Optimierung des Hafermediums zur Fermentation von *Streptomyces scabies* 1/3 wurden unterschiedliche Haferquellen (jeweils 20 g/L) identisch

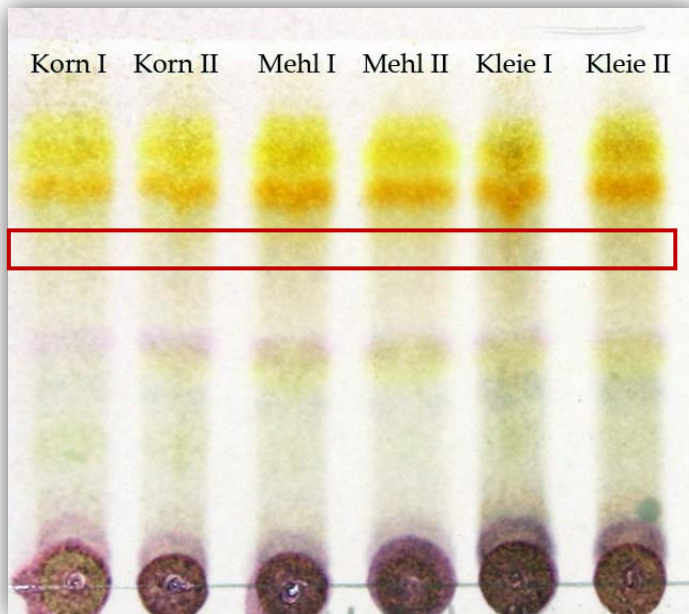


Abbildung 19: Fermentation von *Streptomyces scabies* 1/3 in unterschiedlichen Hafermedien. Dünnschichtchromatogramm RP-Kieselgel RP-18 F₂₅₄, Laufmittel Methanol/Wasser 7:3 + 0,1 % HCOOH, Anfärbung: Anisaldehyd. Bezeichnungserklärung: Korn I = Haferkorn ohne Spelze; Korn II = Haferkorn mit Spelze; Mehl I = NEUFORM; Mehl II = ALNATURA; Kleie I = NEUFORM; Kleie II = ALNATURA..

aufbereitet, autoklaviert und mit einer Hafervorkultur des Stammes inokuliert.

Die Auswertung erfolgte zunächst dünnschichtchromatographisch mit einer definierten Auftragsmenge von 10 µL je Probe. Hierbei wiesen alle Haferquellen ein ähnliches Metabolitenmuster auf. Auch bei der Thaxtominproduktion gab es nur geringe Unterschiede. Tendenziell wurde jedoch in beiden Haferkornvarianten weniger Thaxtomin A gebildet. Aufgrund der besseren Handhabbarkeit wurden für weitere Untersuchungen Hafermehl (NEUFORM) der Haferkleie (NEUFORM) vorgezogen.

3.5.2.2 Fermentationskurve von Thaxtomin A bei *Streptomyces scabies* 1/3

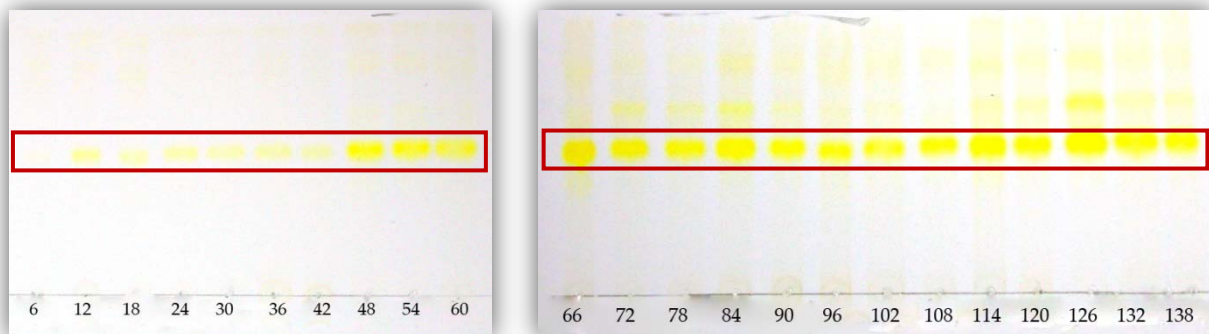


Abbildung 20: Fermentationsverlauf von *Streptomyces scabies* 1/3 in Hafermedium. Dünnschichtchromatogramm Kieselgel (KG) 60 F₂₅₄, Laufmittel Chloroform/Methanol 9:1 + 0,1 % HCOOH, ohne Anfärbung. Angegebene Zahlen beziehen sich auf den Zeitpunkt der Probenentnahme (hpi). Thaxtomin A ist auf dem Dünnschichtchromatogramm mittels rotem Rahmen kenntlich gemacht.

Zur Aufnahme des zeitabhängigen Produktionsverlaufes von Thaxtomin A wurde *Streptomyces scabies* 1/3 in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane kultiviert. Die Probeentnahme fand hierbei über 144 Stunden in einem sechs Stundenzyklus statt. Die Produktion von Thaxtomin A erfolgte ab der 12. Stunde nach Inokulation. Der weitere Produktionsverlauf ist, analog zu *Streptomyces bottropensis* Dra 17, bis zur 66. Stunde stetig. Eine Einschätzung bezüglich des weiteren Verlaufes der Thaxtomin A Produktion ist mittels Dünnschichtchromatogramm nicht möglich. Auffällig indes ist die Produktion weiterer Thaxtamine ebenfalls ab der 66. Stunde.

Für die folgende Fütterung mit NO-Synthase Inhibitoren wurden anhand der Ergebnisse Fütterungszeitpunkte im Zeitraum 4 bis 48 hpi festgelegt. Iromycin A und B konnte auch nach Anfärbung mittels Anisaldehyd auf dem Dünnschichtchromatogramm nicht detektiert werden.

3.5.2.3 Fütterung von NOS-Inhibitoren bei *Streptomyces scabies* 1/3

Der Fütterungsversuch wurde unter identischen Bedingungen wie die Aufzeichnung der Fermentationskurve dreifach wiederholt angelegt. Entsprechende Mengen von Iromycin A, Iromycin S, *N*-Nitro-*L*-Arginin (NMA) und *N*-Methyl-*L*-Arginin (NMA) wurden in Methanol gelöst und mittels Einwegspritze zu den angegebenen Zeiten den Kulturen zugegeben.

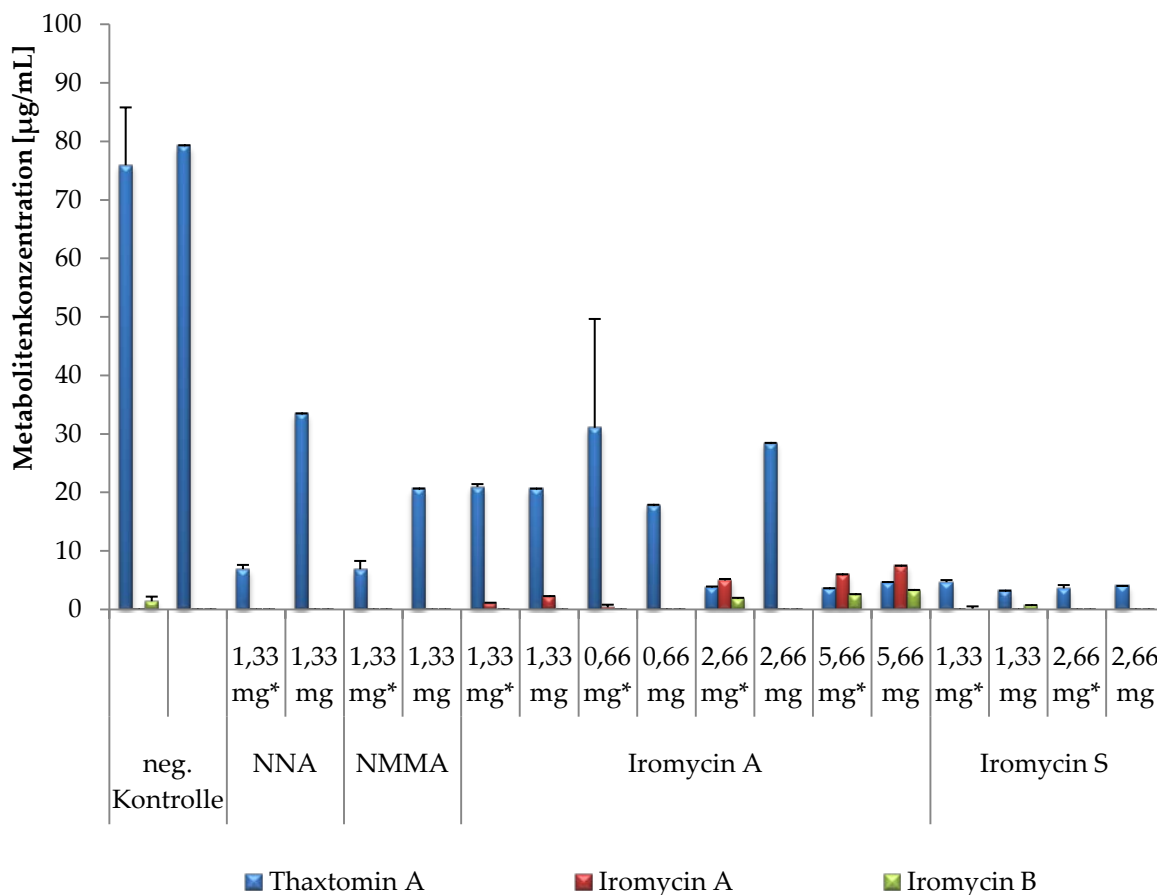


Abbildung 21: Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A sowie Iromycin A und B durch *Streptomyces scabies* 1/3 nach Fütterung unterschiedlicher NO-Synthase Inhibitoren und der Negativkontrolle Methanol/Wasser 1:1. Auf statistische Datenauswertung wurde in diesem Versuch verzichtet. Mit ‚*‘ gekennzeichnete Varianten enthalten zudem 22,5 mg Ancymidol (n=2), Varianten ohne ‚*‘ enthalten das reine Fütterungsdetergenz (n=1).

Die Fütterung unterschiedlicher Iromycin A Konzentrationen bei *Streptomyces scabies* 1/3 zeigte, im Gegensatz zu *Streptomyces bottropensis* Dra 17, einen starken Einfluss auf die Bildung des Phytotoxins Thaxtomin A. Bereits Konzentrationen von 0,66 mg bzw. 1,33 mg pro Kolben konnten die Thaxtomin A Produktion um 60 % reduzieren. Die Zugabe von 2,66 mg bzw. 5,66 mg Iromycin A je Kolben konnte die Biosynthese von Thaxtomin A bis 70µg/mL senken. Varianten mit Ancymidol konnten diesen Effekt deutlich verstärken. Einzig bei der Iromycin A Fütterung von 0,66 mg war dieser Effekt nicht zu beobachten. Ein direkter Einfluss von Ancymidol kann ausgeschlossen werden, da sich beide Negativkontrollen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Ferner wurden ähnliche Effekte bereits durch Fütterungsexperimente mit Ancymidol bei *Streptomyces bottropensis* Dra 17 durch SURUP (2007) belegt.

Vergleichbare Ergebnisse lieferten die beiden Positivkontrollen NNA und NMA. Auch hier enthielten die Rohprodukte mit Ancymidol weniger Thaxtomin als die vergleichbare Variante ohne Zusatz. Diese konnten die Thaxtomin A Menge um durchschnittlich 80 % reduzieren. Bei der Zugabe von synthetisch hergestellten Iromycin S zeigte Ancymidol keine Effekte. Beide Varianten in Konzentrationen von 1,33 mg und 2,66 mg konnten die Produktion des Phytotoxins um etwa 90 % reduzieren.

Im Gegensatz zum Fütterungsexperiment bei *Streptomyces bottropensis* Dra 17 konnte in den hier untersuchten Kulturfiltraten nur wenig bzw. kein Iromycin B detektiert werden. Iromycin S konnte im Rohprodukt nicht mehr nachgewiesen werden. Ein Einfluss von Ancymidol konnte nicht festgestellt werden.

3.5.2.4 Einfluss von NO-Synthase Inhibitoren auf die Zellzahl (CFU)

Um neben dem Einfluss der NO-Synthase Inhibitoren auf die Thaxtomin A Produktion eine Wechselwirkung – hervorgerufen durch zytotoxische Effekte gegenüber *Streptomyces scabies* 1/3 – auszuschließen, wurde die Anzahl der lebenden Zellen im Ansatz bestimmt.

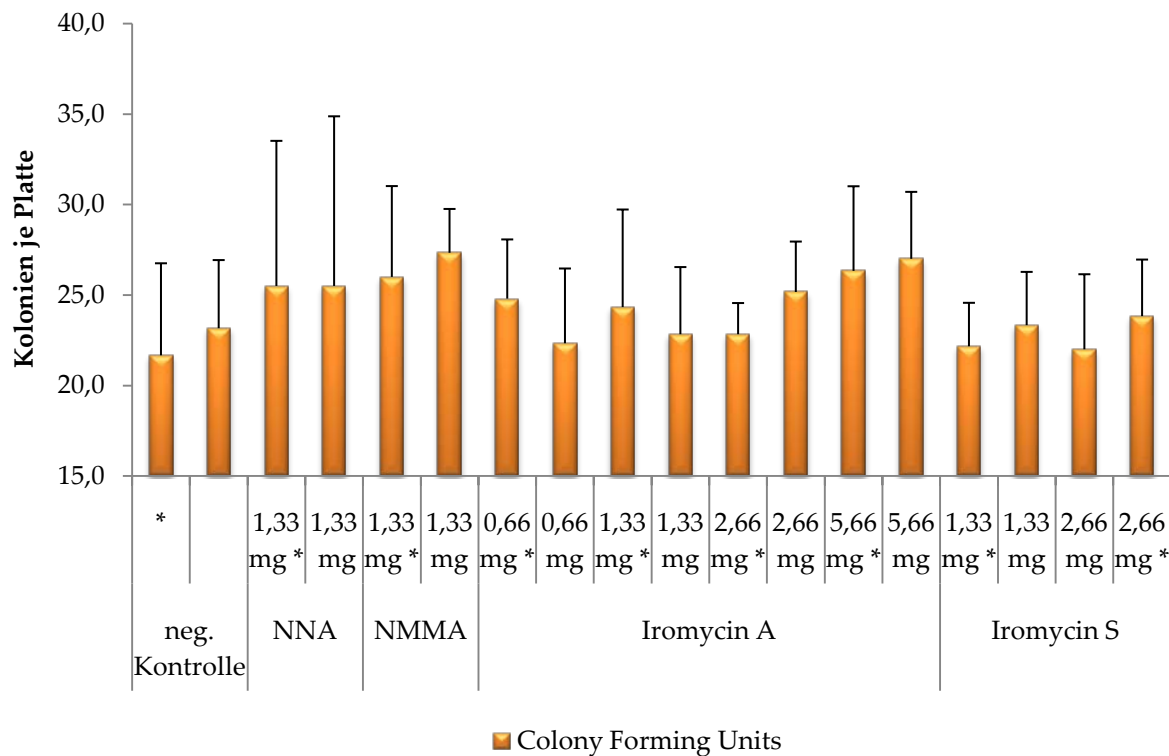


Abbildung 22: Einfluss von NOS-Inhibitoren sowie der Negativkontrolle Methanol/Wasser 1:1 auf das Wachstum von *Streptomyces scabies* 1/3 (Verdünnung 1:10.000). Mit ,*' gekennzeichnete Varianten enthalten zudem 22,5 mg Ancyimidol (n=2), Varianten ohne ,*' enthalten das reine Fütterungsdetergenz (n=1). Signifikante Unterschiede nach dem Newman-Keuls-Test konnten nicht ermittelt werden und sind somit nicht in dieser Abbildung dargestellt (n = 5).

Unabhängig des Fütterungsdetergenzes konnten auf allen Platten durchschnittlich 22 bis 27 Kolonien ausgewertet werden. Aufgrund der Streuung der Einzelwerte waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testmetaboliten ermittelbar. Daher kann ein direkter Einfluss der NOS-Inhibitoren auf das Wachstum von *Streptomyces scabies* 1/3 ausgeschlossen werden.

3.5.3 Einfluss cellobiosehaltiger Medien auf die Biosynthese von Iromycinen und Thaxtominen

Der literaturbekannte Einfluss des Disaccharids Cellobiose auf die Biosynthese des Phytotoxins Thaxtomin A wurde erstmals von JOSHI et al. (2007) beschrieben. Zur Überprüfung der Auswirkungen des Zuckers auf die Produktion von Iromycinen und Thaxtominen wurden Fütterungen bei *Streptomyces bottropensis* Dra 17 und *Streptomyces scabies* 1/3 durchgeführt.

3.5.3.1 Vorversuche zur Thermostabilität von Cellobiose

Bei den Vorversuchen zur Thermostabilität von Cellobiose beim Autoklavieren wurden in Tabelle 23 angegebene Mengen Cellobiose eingewogen und entsprechend weiterverarbeitet. Die Fermentation von *S. scabies* 1/3 erfolgte im Hafermedium für 72 Stunden bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit.

Tabelle 23: Thermostabilität von Cellobiose bei Einwirkung von feuchter Hitze (Autoklavieren) sowie konzentrationsabhängiger Einfluss von Cellobiose auf die Biosynthese von Thaxtomin A bei einer Flüssigkultur von *Streptomyces scabies* 1/3 Die Inkubation erfolgte bei 28 °C, 250 rpm und Dunkelheit für 72 Stunden. Zeichenerklärung: (+++) sehr hohe Produktion (++) hohe Produktion (+) mäßige Produktion (o) kaum Produktion (-) keine Produktion (n=2).

Cellobiose [g/L]	autoklaviert	steril filtriert	Thaxtomin A Produktion
0	ja		+
3,5	ja		++
7	ja		+++
14	ja		+++
3,5		ja	++
7		ja	+++
14		ja	+++

Analog zu den Ergebnissen von JOSHI et al. (2007) ist die Thaxtominproduktion abhängig von der Konzentration der Cellobiose in der Fermentationskultur. Ab einer Aufwandmenge von 7 mg/L Cellobiose konnte keine weitere Steigerung der Produktion an Thaxtomin A detektiert werden. Im Weiteren scheint das Autoklavieren der Cellobiose in Lösung ebenfalls keinen Einfluss auf die Thaxtomin A Produktion zu haben. Zwar ist das Medium nach dem Autoklavieren dunkler als jenes mit steril filtrierter Cellobioselösung, doch scheint sich auch diese Karamelisierungsreaktion nicht negativ auf die Thaxtomin A Produktion auszuwirken.

3.5.3.2 Einfluss von Cellobiose auf die Biosynthese von Iromycinen und Thaxtominen

Vergleichbar zum vorhergehenden Versuch, wurden unterschiedliche Medien mit 7 mg/L Cellobiose versehen und autoklaviert. Ziel war es, neben dem bereits erwiesenen Einfluss auf die Thaxtomin A Produktion bei *S. scabies* 1/3, Auswirkungen auf die Biosynthese von Thaxtominen und Iromycinen bei *S. bottropensis* Dra 17 darzustellen.

Tabelle 24: Auswirkungen von Cellobiose auf die Biosynthese von Thaxtomin A, Iromycin A und Iromycin B Die Inokulation erfolgte mittels 5 % einer 48 h SGG Vorkultur. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C, 250 rpm und Dunkelheit für 72 Stunden. Zeichenerklärung: (+++) sehr hohe Produktion (++) hohe Produktion (+) mäßige Produktion (o) kaum Produktion (-) keine Produktion

Hauptkultur Medium	Cellobiose [g/L]	Thaxtomin A	Iromycin A	Iromycin B
Hafer	0	++	o	+
Hafer	7	+++	o	+
YMG	0	o	-	+
YMG	7	+	o	++
SM	0	--	--	--
SM	7	o	-	o
Medium S	0	--	++	++
Medium S	7	o	++	++

3.6 Untersuchungen zur Regulierungsaktivität von Iromycinen *in planta*

Um die regulatorischen Auswirkungen der Iromycine näher zu beleuchten, wurden *in planta* Untersuchungen an Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), Rettichen (*Raphanus sativus* L.) sowie an Pflanzen des Acker-Schmalwandes (*Arabidopsis thaliana*) durchgeführt.

3.6.1 Optimierung Inokulation und Inkubation von Kartoffelscheiben

Analog zum Kapitel 2.10.3 wurden die Kartoffelscheiben zunächst mit heißem Wasser, 70 % Ethanol (v/v), 0,05 % Zitronensäure (m/v) sterilisiert.

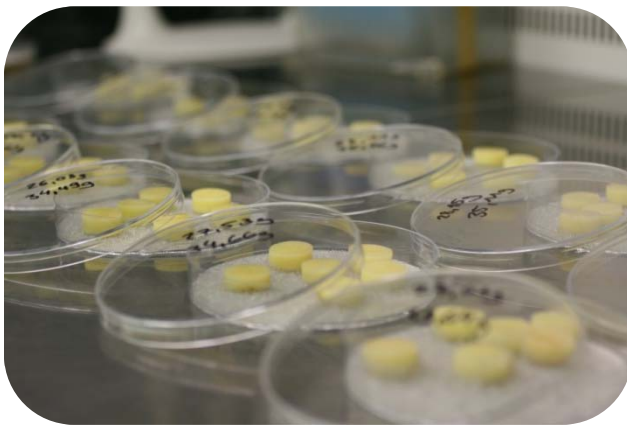


Abbildung 23: Kartoffelscheiben auf Glasperlen vor der Inokulation.

Bei der Medienwahl zur Inkubation der Kartoffelscheiben kamen in Vorversuchen jeweils steriler Sand, Quarzsplit, Steinwolle, Einheitserde, Wasseragar sowie Glasperlen zum Einsatz. Hierbei wurden die Kartoffelscheiben im nicht inokulierten Zustand für mehrere Tage bei 24°C und Dunkelheit inkubiert.

Die Varianten Sand, Einheitserde und Wasseragar wiesen hierbei binnen kurzer

Zeit eine ‚schleimige Konsistenz‘ auf der Unterseite der Kartoffelscheiben auf, welche auf eine Kontamination mit Hefen zurückzuführen war. Hintergrund hierfür war eine mangelnde Belüftung der Kartoffelscheiben auf der Unterseite. Bei der Variante mit Quarzsplit war es aufgrund der unterschiedlich großen Körnung nicht möglich, die Kartoffelscheiben waagrecht auszurichten ohne die Unterseite durch die scharfen Kanten zu verletzen. Ferner bestand die Gefahr, dass aufgrund der Neigung der Inokulationstropfen von der Kartoffelscheibe ablaufen würde. Bei der Inkubation auf Steinwolle bzw. auf Glasperlen waren keine negativen Einflüsse durch das Medium auffällig. Einzig die einfachere Verarbeitung der Glasperlen (einfaches Einschütten in eine Petrischale) gab hierbei den Ausschlag.

Die Vorversuche zur Inkubation der Kartoffelscheiben wurden in mit Glasperlen bedeckten Petrischalen durchgeführt. Hierbei kamen drei unterschiedliche Inokulationsmethoden zum



Abbildung 24: Inokulierte Kartoffelscheiben der Sorte Krone mit *Streptomyces bottropensis* Dra 17 (58 hpi).

unzureichende Infektion der Kartoffelscheibe, während größere Mengen von der Kartoffelscheibe abliefen und so zu einer starken, aber undefinierten Infektion auch der Unterseite führten.

Einsatz: Inokulationstropfen, Tauchbad der Kartoffelscheibe sowie Tauchbad nur einer Kartoffelseite. Letztere Varianten zeigten zwar den stärksten Inokulationserfolg, konnten aber aufgrund der schlechten Dosierbarkeit der Menge an Inokulat nicht für die Versuchsanordnung herangezogen werden. Bei der Optimierung der Inokulation mittels Inokulationstropfen stellte sich 200 μ L als optimales Volumen heraus. Geringere Volumina zeigten nur eine

Bei der Wahl des Inokulationsmediums wurden Streptomyceten in Hafer, YMG und Medium S angezogen. Alle drei Medien wurden auf identische Weise mittels Inokulationstropfen auf die Kartoffelscheiben aufgebracht. Bei allen verwendeten Streptomyceten zeigte sich unter Verwendung von YMG-Medium der beste Inokulationserfolg (visuelle Bonitur). Einzig der Stamm *Streptomyces bottropensis* Dra 17 zeigte bei der Fermentation Verwendung von Medium S die stärkste Nekrosenbildung auf der Kartoffeloberseite.

Bei Untersuchungen zur Optimierung der Inkubationstemperatur wurde anhand der vorliegenden Ergebnisse auf eine Inokulation mit YMG-Medium zurückgegriffen. Hierbei wurden Temperaturen von 10 °C, 16 °C, 20 °C, 24 °C und 28 °C näher untersucht. Im unteren Temperaturbereich (10 °C, 16 °C) konnte ein sehr langsames Wachstum des Pathogens auf der Kartoffeloberfläche beobachtet werden. Auch die Nekrotisierung des Kartoffelgewebes trat mit deutlicher zeitlicher Verzögerung, verglichen mit der Variante bei 28 °C, auf. Die

Inkubation im mittleren und hohen Temperaturbereich zeigte hingegen kaum Unterschiede beim Bakterienwachstum sowie der Nekrotisierung. Einzig das zügigere „Anwachsen“ auf dem Kartoffelsubstrat war bei einer Temperatur von 28 °C auffällig. Dem entgegenzusetzen ist ein gleichmäßigeres Wachstum der Streptomyceten im Temperaturfenster von 20 °C bis 24 °C. Daher wurden für die weiteren Versuche die Kartoffelscheiben zunächst für 6 Stunden bei 28 °C inkubiert, um ein zügiges Anwachsen zu gewährleisten und anschließend bei 20 °C weiter inkubiert.

3.6.2 Fermentationskurve auf Kartoffelscheiben

Um die zeitliche Abfolge der Produktion von Iromycinen und Thaxtominen auf Kartoffelscheiben näher zu untersuchen, wurde eine Fermentationskurve – analog zu den Schüttelkulturen angelegt. Neben der Extraktion der Sekundärmetaboliten erfolgte zudem die Extraktion der Gesamt-DNA sowie die eine quantitative Real-Time PCR zur Ermittlung der bakteriellen Biomasse.

3.6.2.1 Gesamt-DNA-Extraktion aus Kartoffeln und Gelelektrophorese

Die DNA-Extraktion inokulierter Kartoffeln erfolgte aus einer 200 mg Mischprobe von vier Kartoffelscheiben, welche zuvor gefriergetrocknet und gemörsert wurden. Das übrige Kartoffelmehl wurde in Falcontubes gelagert und für die spätere Extraktion mit Ethylacetat eingefroren. Auch die CTAB basierte DNA-Extraktion erfolgte bei allen Proben auf identische Art und Weise. Zur Kontrolle des Extraktionserfolges wurden alle Proben mittels Gelelektrophorese getrennt und die Intensität der Anfärbung überprüft. Die Proben wiesen hierbei ein äußerst einheitliches Bild auf, wodurch auf eine uniforme Extraktion geschlossen werden konnte.

3.6.2.2 DNA-Extraktion aus Flüssigkulturen von *Streptomyces* spp. (DNA-Standard für die quantitative real-time PCR)

Die DNA-Extraktion der Streptomyceten DNA erfolgte anhand einer Flüssigkultur in YMG-Medium. Vorreinigung der Zellen mit PBS-Puffer lieferte ein weißes Zellpellet, welches nur sehr geringe Restmengen an Medienbestandteilen enthielt. Die weitere DNA-Extraktion

erfolgte anleitungsgemäß mittels ‚High Pure PCR Template Preparation Kit‘ (ROCHE Applied Science). Lediglich beim ersten Lyseschritt mittels Lysozymlösung wurde die Konzentration auf 20 mg/mL in TE-Puffer erhöht. Je nach Streptomyccetenstamm betrug die Inkubationszeit zwischen 30 Minuten (*Streptomyces scabies* 1/3) und 3 Stunden (*Streptomyces bottropensis* Dra 17).

3.6.2.3 DNA-Quantifizierung mittels UV/VIS Spektralphotometer

Für die Erstellung einer Standardreihe wurde die Konzentration an Streptomycceten-DNA mittels Nanodrop 2000c (THERMO SCIENTIFIC) mehrfach bestimmt und der Mittelwert errechnet.

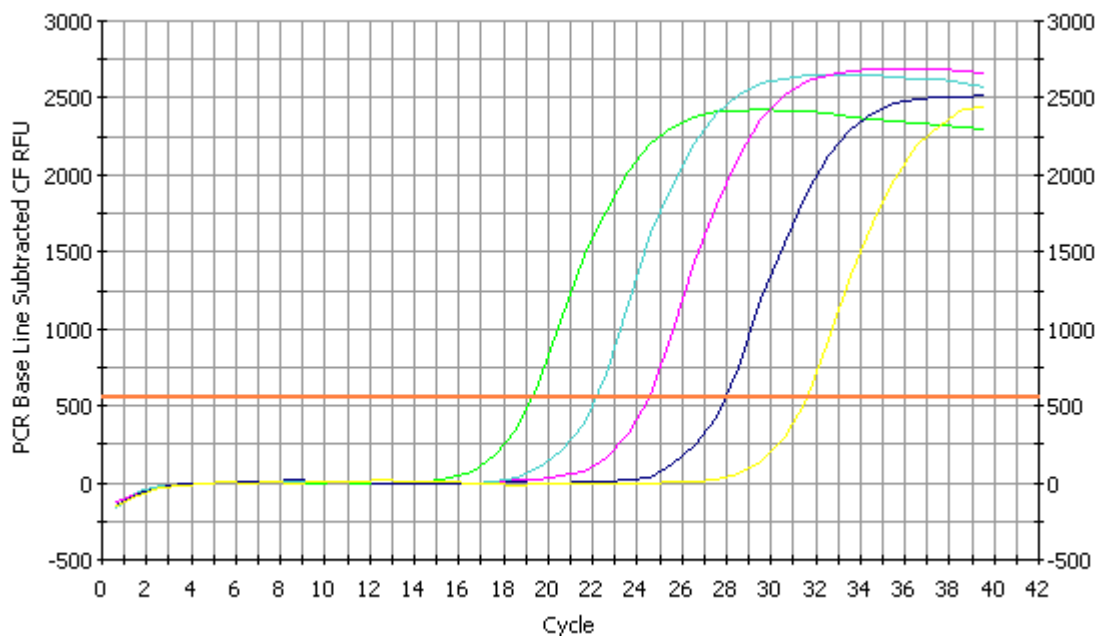


Abbildung 25: Überprüfung der Standardreihe zur DNA-Quantifikation mittels Real-Time PCR für DNA Mengen zwischen 5 µg/mL und 500 ng/mL aus *Streptomyces bottropensis* Dra 17

Im Anschluss wurde die DNA fünf mal in 1:10 Stufen verdünnt. Die abschließende Verifizierung der Verdünnungsreihen erfolgte bis zur Detektionsgrenze ebenfalls spektralphotometrisch und bestätigte die einzelnen Verdünnungsstufen. Die Kontrolle der Verdünnungen außerhalb der Detektionsgrenze erfolgte mittels Real-Time PCR.

3.6.2.4 Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Kartoffeln

Zur Extraktion der Kartoffelscheiben wurden im Vorfeld unterschiedliche Verfahren angewendet: Hierbei wurden die Kartoffelscheiben im Anschluss an die Inokulation in 50 mL Falcontubes überführt und mit 35 mL Aceton-Methanol 1:1 aufgefüllt. Die Zerkleinerung der Kartoffeln im organischen Lösungsmittel erfolgte mittels Ultrathorax. Die anschließende Extraktion erfolgte für 20 Minuten im Ultraschallbad. Hierbei war festzustellen, dass die Zerkleinerung der Kartoffeln stark von der Textur und dem Befallsgrad anhängig waren. Schwach befallene Kartoffelscheiben konnten mittels Ultrathorax nur schwer zerkleinert werden, was die anschließende Extraktion im organischen Lösungsmittel erschwerte. Ferner wurden bei der eigentlichen Extraktion durch das kartoffeleigene Wasser große Mengen an Stärke in das Eluat eingeschleppt. Diese Stärke musste daher vor der chemischen Analytik mittels Extraktion durch Ethylacetat bzw. Chloroform entfernt werden.

Um dieses Problem zu vermeiden, wurden die Kartoffelscheiben nach der Probenahme direkt eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Dies hatte ferner den Vorteil, dass die Kartoffelscheiben einzeln gemörsert auch direkt für die weitere Anwendung bei der DNA-Extraktion zum Einsatz kommen konnten. Die Extraktion der gefriergetrockneten und gemörserten Kartoffelscheiben erfolgte zwei Mal mittels Ethylacetat im Ultraschall. Die im Vakuum eingegangenen Proben wurden einheitlich für die anschließende Untersuchung mittels HPLC bzw. HPLC-MS in 2 mL LC-MS Grade Methanol aufgenommen. Analog zur ursprünglichen Extraktionsvariante war bei der Wahl des Lösungsmittels darauf zu achten, stets frisch destilliertes Ethylacetat bzw. Ethylacetat p.a. zu verwenden, da anderenfalls erhöhte Wassermengen im Lösungsmittel eine Verschleppung von Stärke zur Folge hatten.

3.6.2.5 Zeitlicher Verlauf der Produktion von Sekundärmetaboliten auf Kartoffelscheiben

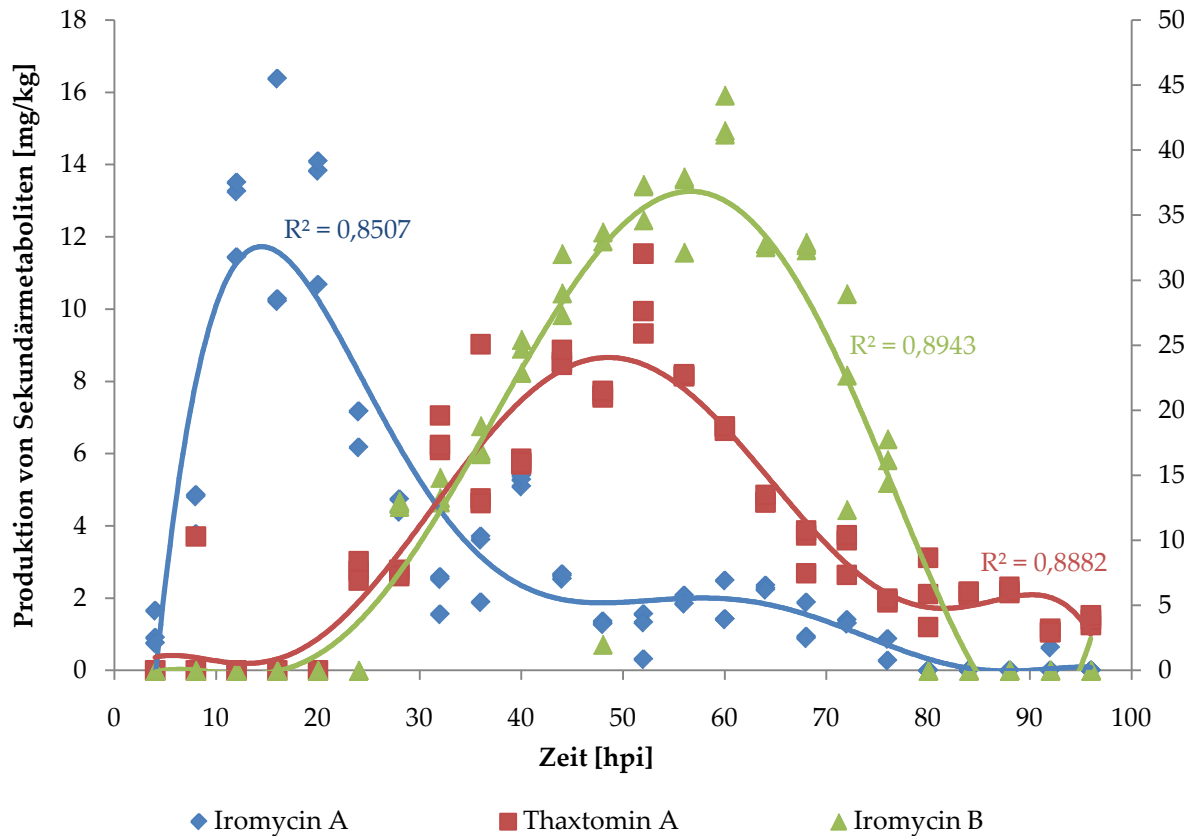


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Produktion der Sekundärmetaboliten Thaxtomin A (rot), Iromycin A (blau) und Iromycin B (grün) des Stammes *Streptomyces bottropensis* Dra 17 auf Kartoffelscheiben der Sorte ‚Cinena‘ in [mg/kg] (n=3). Die Produktionsraten von Iromycin A sowie Thaxtomin A sind hierbei auf der primären Vertikalachse, Iromycin B auf der sekundären Vertikalachse aufgetragen.

Der zeitliche Verlauf der Bildung der einzelnen Sekundärmetaboliten zeigt eine deutliche Differenzierung. Aus Abbildung 27 wird ersichtlich, dass der Gehalt von Iromycin A binnen der ersten 16 Stunden stark ansteigt und bis zur 40. Stunde nach Inokulation in ähnlich starkem Maße wieder abfällt. Zeitlich analog mit der Abnahme von Iromycin A nach etwa 16 Stunden ist das Oxidationsprodukt Iromycin B in Kartoffelscheiben detektierbar. Parallel zur Oxidation von Iromycin A zu Iromycin B ist ferner ein Anstieg der Thaxtomin A Produktion feststellbar, welches bis dahin nur in Spuren nachweisbar war. Das Maximum

der Gehalte von Thaxtomin A wird nach 50 Stunden erreicht, während Iromycin A bis etwa zur 60. Stunde zu Iromycin B oxidiert wird und der Stamm ferner weiterhin das Oxidationsprodukt zu synthetisieren scheint. Der stetige Rückgang aller Einzelmetaboliten bis zur 85. Stunde nach Inokulation manifestiert sich im weiteren zeitlichen Verlauf.

3.6.2.6 Zeitlicher Verlauf der Nachweisbarkeit bakterieller Biomasse auf Kartoffelscheiben

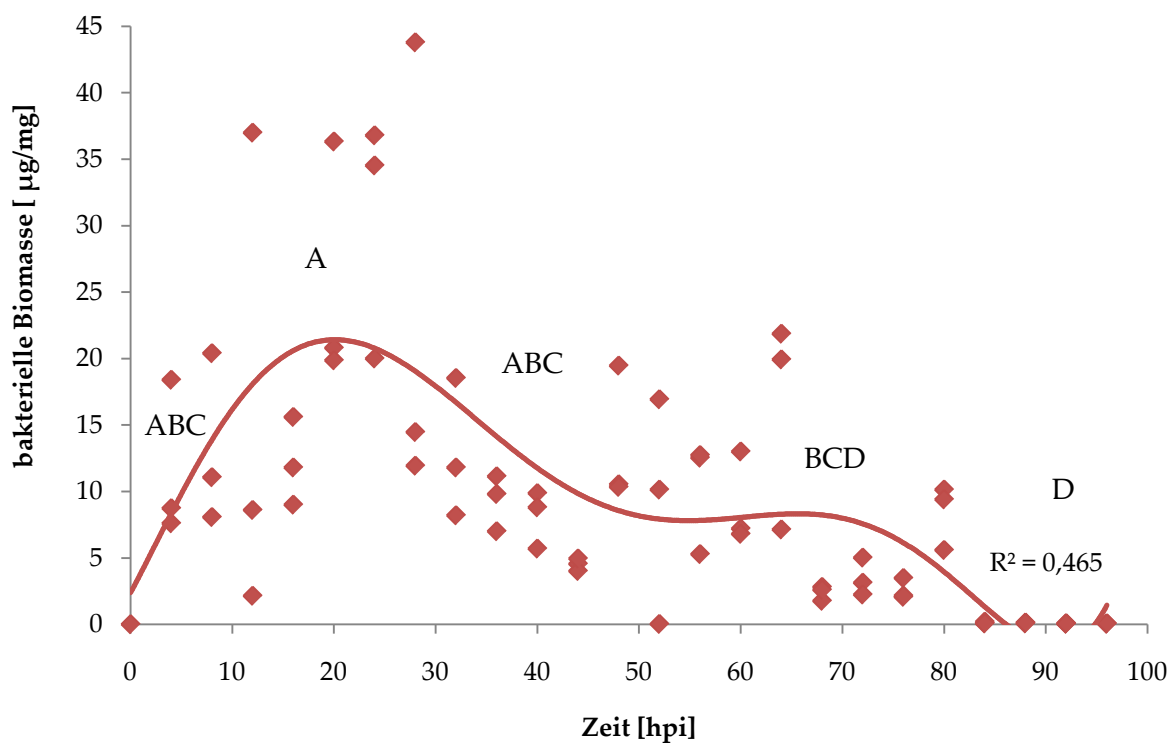


Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der bakteriellen Biomasse des Stammes *Streptomyces bottropensis* Dra 17 auf Kartoffelscheiben der Sorte ‚Cilena‘ in [µg/mg], ermittelt durch quantitative Real-Time PCR. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind in vereinfachter Form mit den entsprechenden Buchstaben kenntlich gemacht (n=3).

Der zeitliche Verlauf der Biomassenproduktion auf Kartoffelscheiben zeigt eine deutliche Abgrenzung in einzelne Wachstumsstadien. Aus Abbildung 28 wird ersichtlich, dass sich die bakterielle Biomasse binnen der ersten 20 Stunden nach Inokulation nahezu verzehnfacht und für weitere 5 Stunden stagniert. Binnen der folgenden 25 Stunden ist ein linearer Rückgang der Biomasse auf etwa 10 µg/mg festzustellen, welcher für weitere 25 Stunden konstant bleibt. An der 80. Stunde verringert sich die bakterielle Biomasse zusehends und ist ab der 85. Stunde nicht mehr nachweisbar.

Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der Biomassenproduktion mit der Biosynthese der gemessenen Sekundärmetaboliten, so ist eine direkte Korrelation der Synthese von Iromycin A und der bakteriellen Biomasse zu vermuten. Weiterhin ist im weiteren Verlauf feststellbar, dass die Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A offenbar keinen Einfluss auf das weitere Wachstum des Pathogens zu haben scheint.

3.6.3 Phytopathogenität verschiedener Streptomyceten Stämme

Um eine allgemeine Aussage zur Phytopathogenität verschiedener Thaxtomin A Produzenten treffen zu können wurden diese auf Kartoffelscheiben angezogen und nach 72 Stunden einer Analyse (HPLC, Real-Time PCR) unterzogen.

3.6.3.1 Produktion von Sekundärmetaboliten auf Kartoffelscheiben verschiedener Streptomyceten

Aus Abbildung 29 wird ersichtlich, dass es sich bei allen untersuchten Streptomyceten um Thaxtomin A Produzentenstämme handelt. Einzige Ausnahme hierbei bildet der Stamm *Streptomyces bottropensis* DSMZ 40262, welcher auf Kartoffelscheiben offenbar nicht in der Lage war, das Phytotoxin zu bilden. Bei der Thaxtominproduktion ist auffällig, dass die getesteten *Streptomyces bottropensis* Stämme signifikant weniger Thaxtomin A bilden als die untersuchten *Streptomyces scabies* Stämme. Die statistisch stärkste Produktion des Phytotoxins war beim Stamm *Streptomyces scabies* 1/3 zu beobachten. Neben der Produktion von Thaxtomin A wurden die untersuchten Streptomyceten auch auf die Synthese der Iromycine hin untersucht. Hierbei war festzustellen, dass ausschließlich der Stamm

Streptomyces bottropensis Dra 17 in der Lage ist, sowohl Iromycin A als auch Iromycin B zu produzieren. In wie weit die anderen Streptomyceten zum Zeitpunkt 72 hpi Iromycine bereits abgebaut haben kann anhand der vorliegenden Daten nicht definitiv geklärt werden.

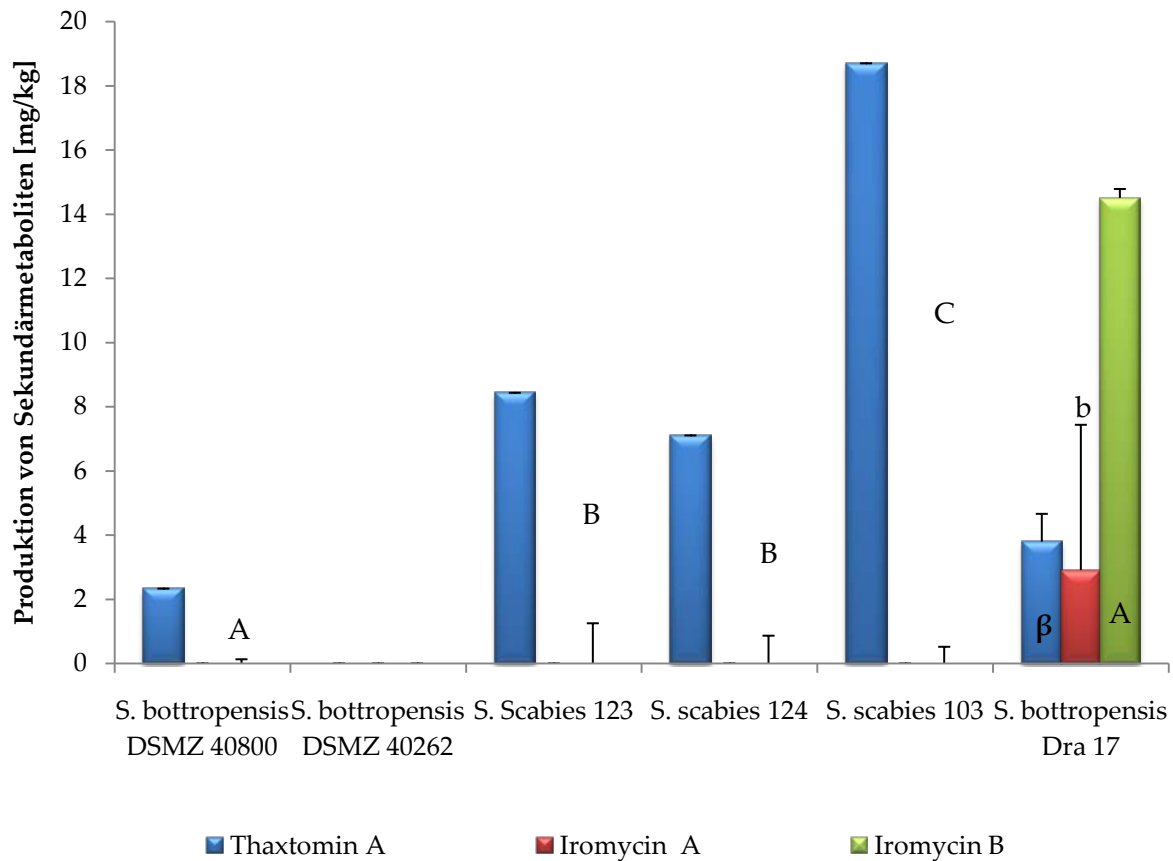


Abbildung 28: Produktion der Sekundärmetaboliten Thaxtomin A (grün), Iromycin A (blau) und Iromycin B (rot) durch verschiedener Streptomyceten auf Kartoffelscheiben der Sorte ‚Krone‘ in [mg/kg] nach 3 dpi. Signifikante Unterschiede nach dem Newman-Keuls-Test konnten nicht ermittelt werden und sind somit nicht in dieser Abbildung dargestellt (n = 5).

3.6.3.2 Quantifizierung bakterieller Biomasse auf Kartoffelscheiben

Bei den Untersuchungen zur Quantifizierung der bakteriellen Biomasse auf Kartoffelscheiben zeigt sich, dass mit Ausnahme der Stämme *S. scabies* 1/3 und *S. bottropensis* Dra 17 kaum eine Biomassenproduktion zu verzeichnen ist. In wie weit die Biomasse zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits abgebaut war, kann anhand der Real-Time-PCR

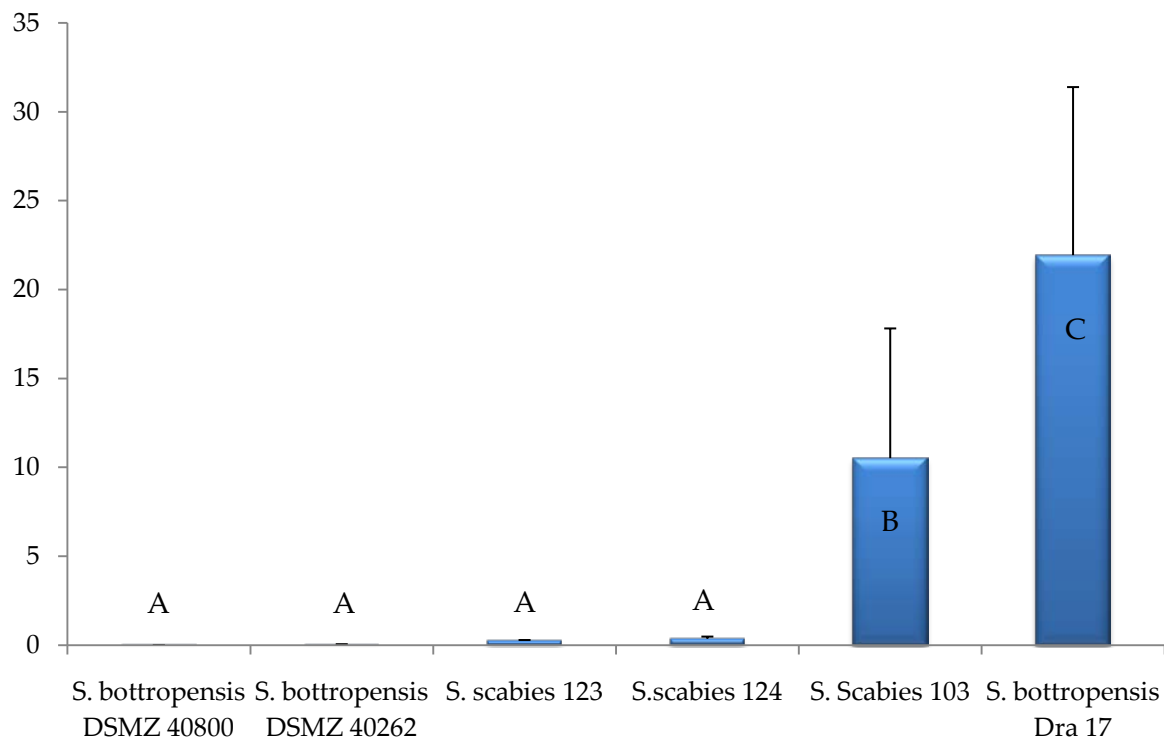


Abbildung 29: Produktion von bakterieller Biomasse durch verschiedene Streptomyceten auf Kartoffelscheiben der Sorte ‚Krone‘ in [µg/mg] nach 3 dpi, ermittelt durch quantitative Real-Time PCR. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind mit den entsprechenden Buchstaben kenntlich gemacht (n=6).

Daten nicht ermittelt werden. Dieses ist jedoch wahrscheinlich, da zum Zeitpunkt der Probeentnahme Nekrosen auf der Kartoffeloberseite erkennbar waren. Diese waren, verglichen mit den Stämmen *S. scabies* 1/3 und *S. bottropensis* Dra 17 weitaus schwächer ausgeprägt (vgl. Abbildung 34) waren. In wieweit ausschließlich Stämme mit einer vergleichsweise starken Thaxtomin A Produktion in der Lage sind, diesen Selektionsvorteil in bakterielle Biomasse umzusetzen, kann anhand der Thaxtomin A Produktion von *S. bottropensis* Dra 17 nicht bestätigt werden. Dieser ist als einziger in der Lage neben vergleichbar geringen Mengen Thaxtomin A auch Iromycine zu produzieren und gleichzeitig eine starke Biomassenproduktion zu gewährleisten.



Abbildung 30: *S. bottropensis* DSMZ 40262 (links), *S. scabies* 1/3 (mitte), *S. bottropensis* Dra 17 (rechts) auf Kartoffelscheiben der Sorte ‚Krone‘, 58 hpi (n=6)

3.6.4 Screening phytopathogener Streptomyceten auf die Produktion von Iromycinen und Thaxtominen in Flüssigkulturen

Analog zum Screening auf Kartoffelscheiben wurden die in Tabelle 15 beschriebenen *Streptomyces bottropensis* und *Streptomyces scabies* Stämme auf die Produktion von Thaxtominen und Iromycinen in Flüssigkulturen untersucht. Die Fermentationsansätze wurden routinemäßig mit Ethylacetat extrahiert und an der HPLC mit UV-Detektion detektiert.

Bei der Analyse der Thaxtominproduktion war festzustellen, dass alle Produzentenstämme – mit Ausnahme von *Streptomyces scabies* 1/3 in etwa dieselbe Menge des Phytotoxins im Hafermedium produzierten. Analog konnte bei Fermentation in Medium S keine Thaxtominproduktion detektiert werden. Der Stamm *S. scabies* 1/3, welcher bereits auf Kartoffelscheiben die größte Thaxtominproduktion gezeigt hatte, wies als Flüssigkultur in Medium S eine mäßige und in Hafer eine sehr hohe Produktion auf.

Analog zur Fermentation auf Kartoffeln konnten auch in der Flüssigfermentation keine Iromycine nachgewiesen werden. Ausnahme hierbei war der bereits als Iromycinproduzent bekannte Stamm *S. bottropensis* Dra 17.

Tabelle 25: Produktion der Sekundärmetaboliten Thaxtomin A, Iromycin A und Iromycin B durch verschiedene Streptomycceten. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C, 220 rpm und Dunkelheit für 72 Stunden. Zeichenerklärung: (++) hohe Produktion (+) mäßige Produktion, (o) kaum Produktion (-) keine Produktion.

Stamm	Medium	Iromycin A aus Mycel	Iromycin B aus Filtrat	Thaxtomin A aus Filtrat
<i>S. bottropensis</i> Dra 17	Hafer	-	+	+
	Medium S	++	++	-
<i>S. bottropensis</i> 40262	Hafer	-	-	+
	Medium S	-	-	-
<i>S. bottropensis</i> 40800	Hafer	-	-	+
	Medium S	-	-	-
<i>S. scabies</i> 123	Hafer	-	-	+
	Medium S	-	-	-
<i>S. scabies</i> 124	Hafer	-	-	+
	Medium S	-	-	-
<i>S. scabies</i> 1/3	Hafer	-	-	++
	Medium S	-	-	o

3.6.5 Einfluss von Iromycin A und Thaxtomin A auf die Keimung von Radieschen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus*, 'Sora')

Neben der Pathogenität verschiedener Streptomycceten bei Kartoffeln sind Kreuzblütengewächse ein weiterer Wirt phytopathogener Streptomycceten. Aus diesem Grund wurde ein Keimungsassay im Mikrotiterplattenmaßstab entwickelt, um die Auswirkungen von Iromycin A und Thaxtomin A bzw. deren Kombination auf das Keimungsverhalten von Samen zu untersuchen. Als Pathogenitätsindex wurden Veränderungen bei der gebildeten Biomasse als Trockenmasse 6 Tage alter Keimlinge vorausgesetzt. Bei der Untersuchung der Auswirkungen von reinen Thaxtomin A wurde der Sekundärmetabolit im Konzentrationsbereich von 50 nm bis 100 µM in Agar eingesetzt.

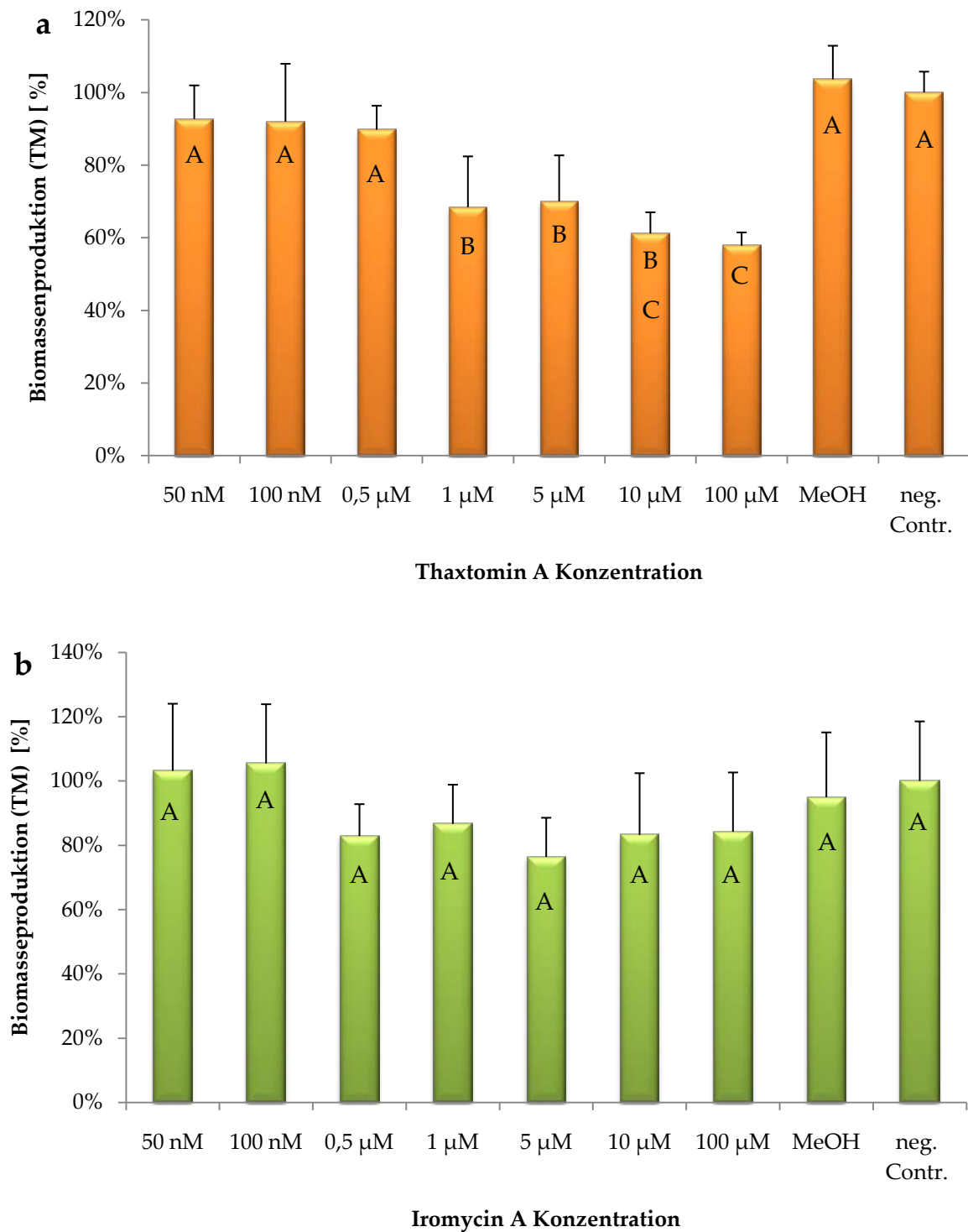


Abbildung 31: Biomasseproduktion (TM) in Prozent bezogen auf die Negativkontrolle von Radieschensamen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus*, 'Sora') nach 6-tägiger Inkubation im Klimaschrank (25 °C, 8 Stunden Dunkelheit, Beleuchtung 4x40 W, 40 cm Abstand) sowie unterschiedlichen Thaxtomin A (a) und Iromycin A (b) Konzentrationen im Nährmedium. Als Kontrolle diente eine Leerformulierung mit MS-Medium. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind mit den entsprechenden Buchstaben kenntlich gemacht (n=6).

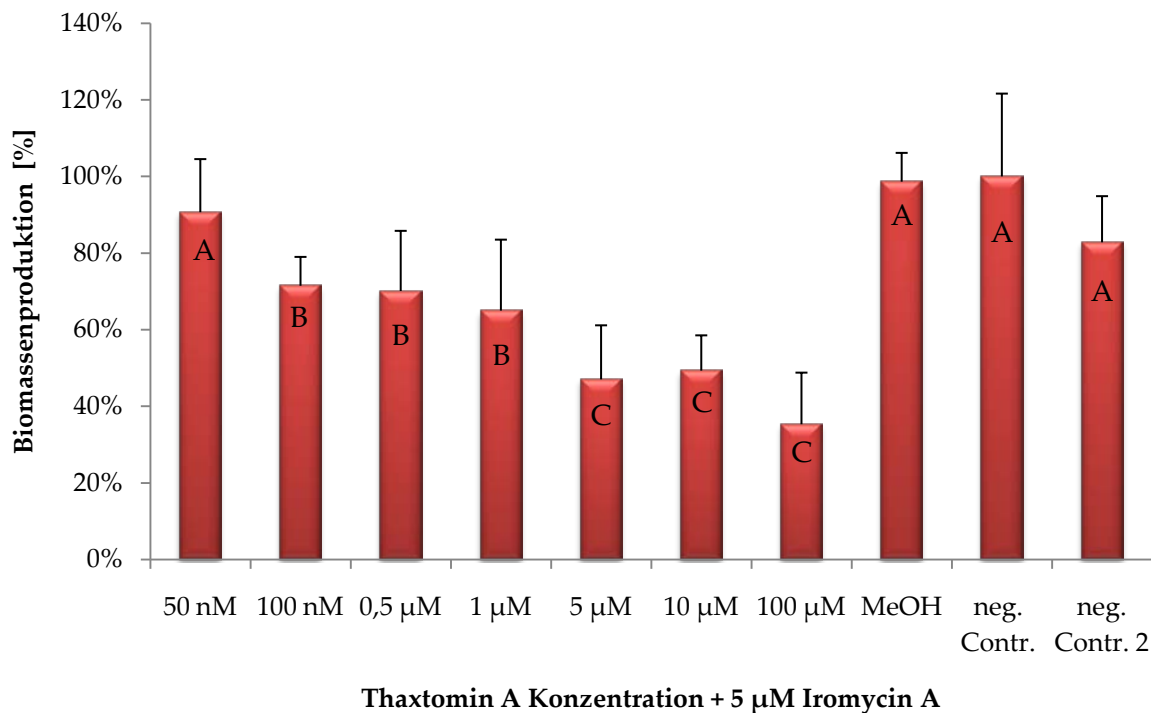


Abbildung 32: Biomassenproduktion (TM) in Prozent bezogen auf die Negativkontrolle von Radieschensamen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus* ‚Sora‘) nach 6-tägiger Inkubation im Klimaschrank (25 °C, 8 Stunden Dunkelheit, Beleuchtung 4x40 W, 40 cm Abstand) sowie unterschiedlichen Thaxtomin A Konzentrationen + 5 µM Iromycin A im Nährmedium. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind mit den entsprechenden Buchstaben kenntlich gemacht (n=6).

Konzentrationen von 1 µM Thaxtomin A bewirkten bereits eine signifikante Hemmung der Biomassenbildung um etwa 30 % und führten mit Erhöhung der Konzentration zu einer Reduzierung der Biomasse um 40 % (Abbildung 44a). Konzentrationen unter 1 µM schienen keinen Einfluss auf die Biomassenbildung auszuüben.

Analog zur Untersuchung auf den Einfluss von Thaxtomin A wurden die Auswirkungen von Iromycin A auf die Keimung von *Raphanus sativus* ssp. geprüft (Abbildung 44). Hierbei wurde ersichtlich, dass Iromycin A alleine offenbar keinerlei Einfluss auf die Keimung von Radieschen aufzuweisen hat. Zwar konnte ein Rückgang der Biomasse bei einer Iromycin A Konzentration von 5 µM ermittelt werden, doch konnte sich diese nicht signifikant von der Leerkontrolle unterscheiden. Auf Iromycin A haltigen Medium zeigten die Sämlinge jedoch eine deutliche Chlorose der Keimblätter. Diese trat bereits bei Konzentrationen von 500 nm

auf. Ferner wurde eine zeitliche Verzögerung der Keimung von 12 bis 24 Stunden bei Samen bonitiert, welche sich auf Medien mit mehr als 10 μM Iromycin A entwickelten.

Abschließende Untersuchungen zur Kombination von Iromycin und Thaxtomin hingegen verstärkten den inhibitorischen Effekt von reinem Thaxtomin signifikant. Bereits Konzentrationen von 100 nM Thaxtomin A in Kombination mit 5 μM Iromycin A konnte das Wachstum der Keimlinge signifikant beeinflussen. Ab einer Konzentration von 5 μM Iromycin und Thaxtomin lag die Hemmung der Biomassenproduktion bereits bei 50 %. Neben der Reduktion der Biomasse konnten auch die Chlorose-Effekte, analog zur Untersuchung der Iromycine, bonitiert werden. Diese traten in der Kombinationsvariante mit Thaxtomin A allerdings bereits in Konzentrationen von 100 nM auf. Ferner trat, wie bereits bei der reinen Iromycin A Untersuchung eine Keimungsverzögerung von 24 Stunden bei Sämlingen auf, welche sich auf Medien von mehr als 100 nM Thaxtomin A + 5 μM Iromycin A entwickelten.

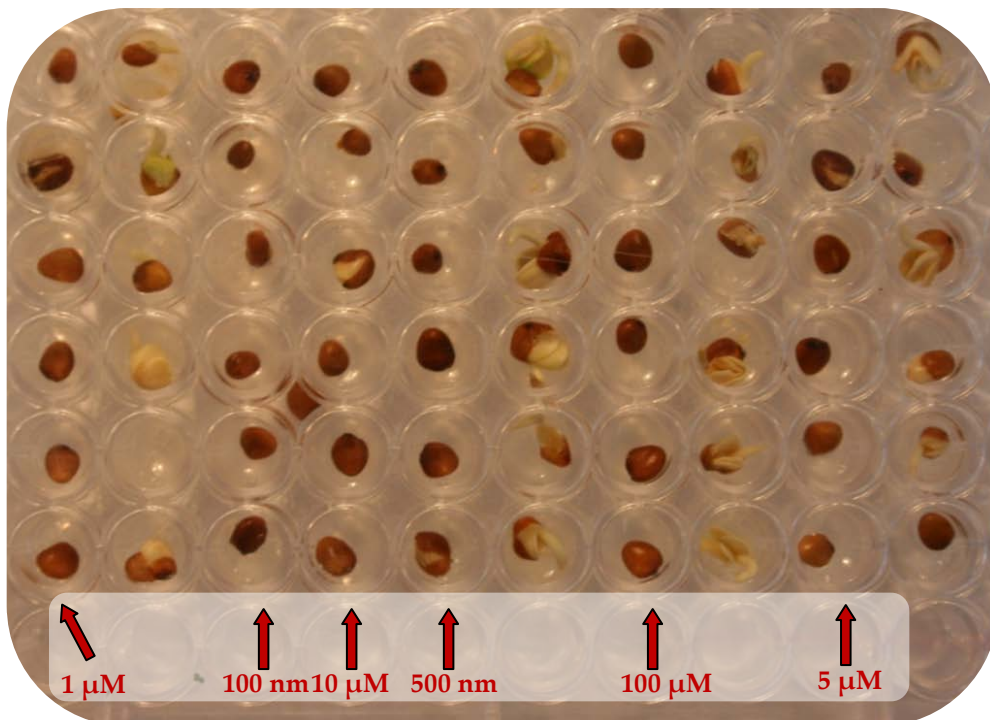


Abbildung 33: Zeitliche Verzögerung der Keimung von Radieschensamen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus* ‚Sora‘) auf thaxtominhaltigem Medium + 5 μM Iromycin A nach 36 h Inkubation im Klimaschrank (25 °C, 8 Stunden Dunkelheit, Beleuchtung 4x40 W, 40 cm Abstand) (n=6).

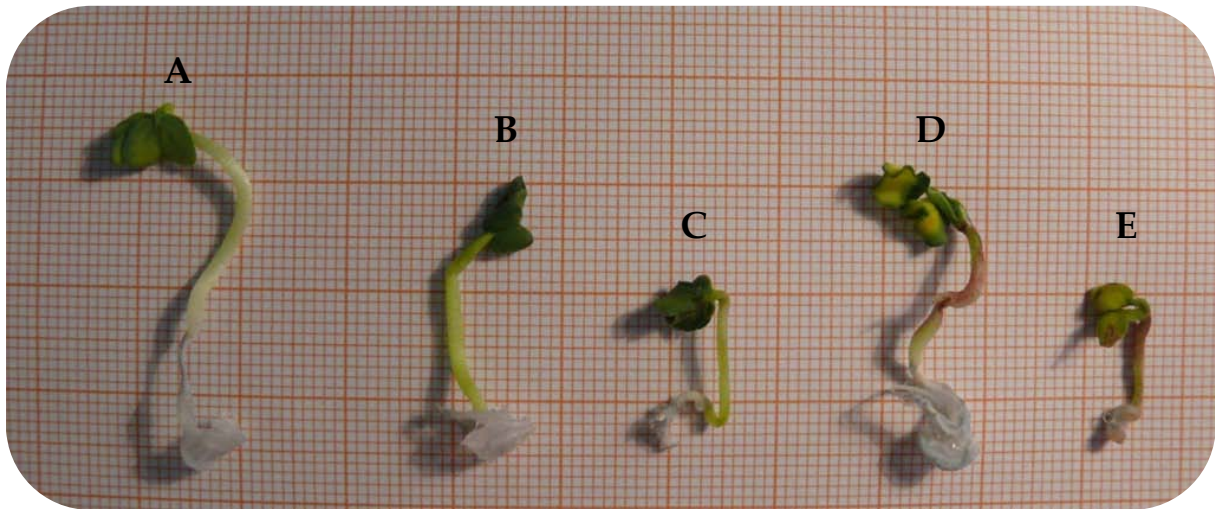


Abbildung 34: Einfluss von Iromycinen und Thaxtominen auf das Wachstum von Radieschensamen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus* ‚Sora‘) nach 6 tägiger Inkubation (25°C, 8 Stunden Dunkelheit, Beleuchtung 4x40W, 40 cm Abstand). (A) Negativkontrolle MeOH (B) 5 µM Thaxtomin A (C) 100 µM Thaxtomin A (D) 10 µM Iromycin A (E) 5 µM Thaxtomin A + 5 µM Iromycin A

Neben den Untersuchungen mit dem NO-Synthase-Inhibitor Iromycin A zur Keimung von Radieschensamen wurde derselbe Untersuchungsansatz zusätzlich mit dem literaturbekannten NOS-Inhibitor *N*-Methyl-L-Arginin (NMA) durchgeführt. Hierbei konnten jedoch keine inhibitorischen Effekte bezüglich der Biomassenproduktion festgestellt werden. Auch eine Kombination mit dem Phytotoxin Thaxtomin A (im selben Verhältnis wie die Kombination von Iromycin A und Thaxtomin A) erzielte, bis auf leichte chlorotische Effekte sowie eine Keimungsverzögerung von etwa 12 Stunden, keinerlei Abnahme der pflanzlichen Biomasse. Auf eine Darstellung der Daten im Rahmen dieser Arbeit wird daher verzichtet.

3.6.5.1 Einfluss von Thaxtomin A und Iromycin A auf den Chlorophyll-Gehalt von Radieschenkeimlingen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus* ‚Sora‘)

Zur Ermittlung der chlorotischen Effekte der eingesetzten Sekundärmetaboliten wurden die einzelnen Keimlinge nach der Gefriertrocknung mittels Kugelmühle gemahlen und anschließend in 80 % Aceton (v/v) extrahiert. Das gewonnene Pflanzenextrakt wurde anschließend spektralphotometrisch auf den Chlorophyll A Gehalt hin untersucht.

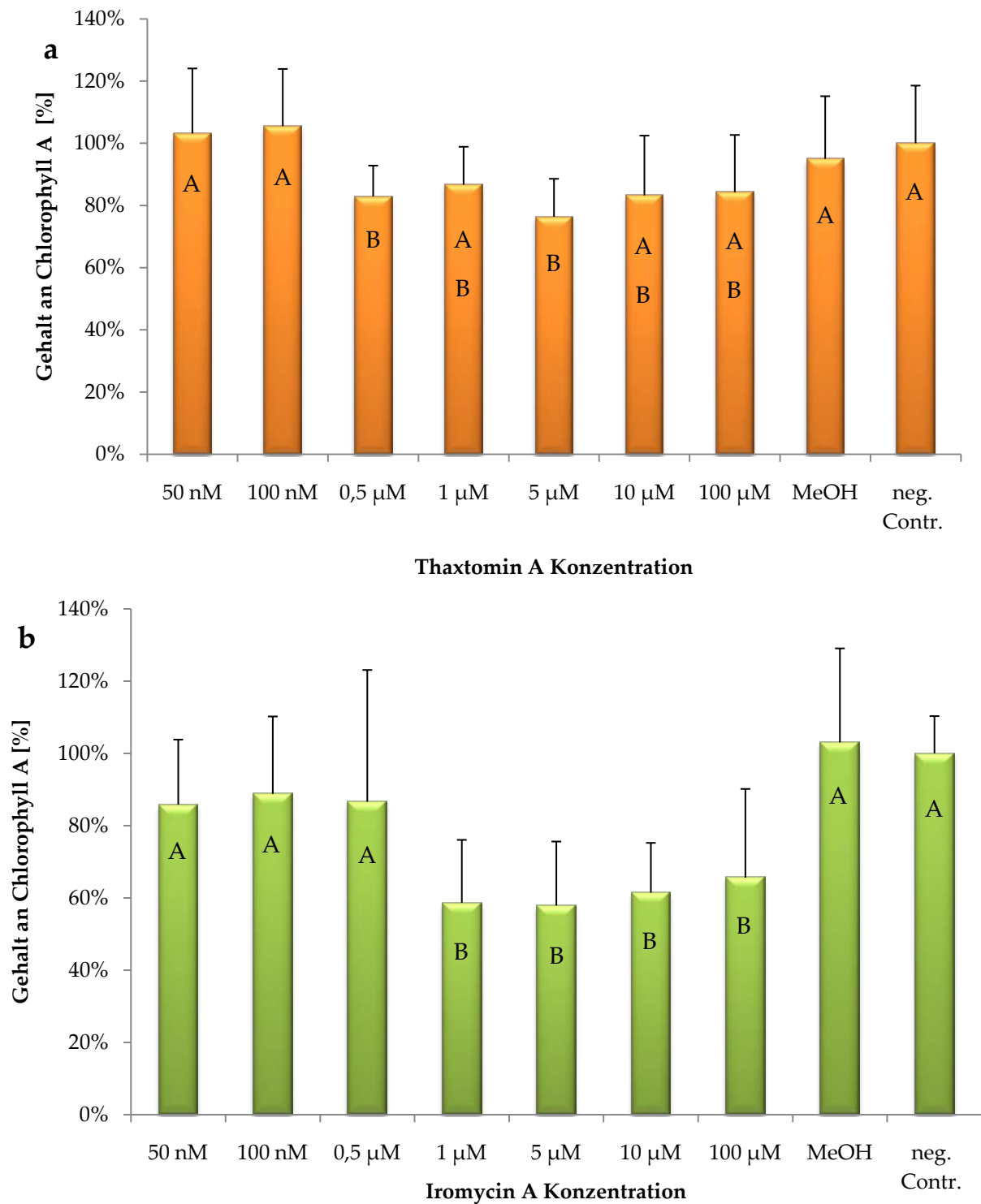


Abbildung 35: Chlorophyll A-Gehalt in Prozent bezogen auf die Negativkontrolle von Radieschensamen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus* ‚Sora‘) nach 6-tägiger Inkubation im Klimaschrank (25 °C, 8 Stunden Dunkelheit, Beleuchtung 4x40 W, 40 cm Abstand) sowie unterschiedlichen Konzentrationen von Thaxtomin A (a) und Iromycin A (b) im Nährmedium. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind mit den entsprechenden Buchstaben kenntlich gemacht (n=6).

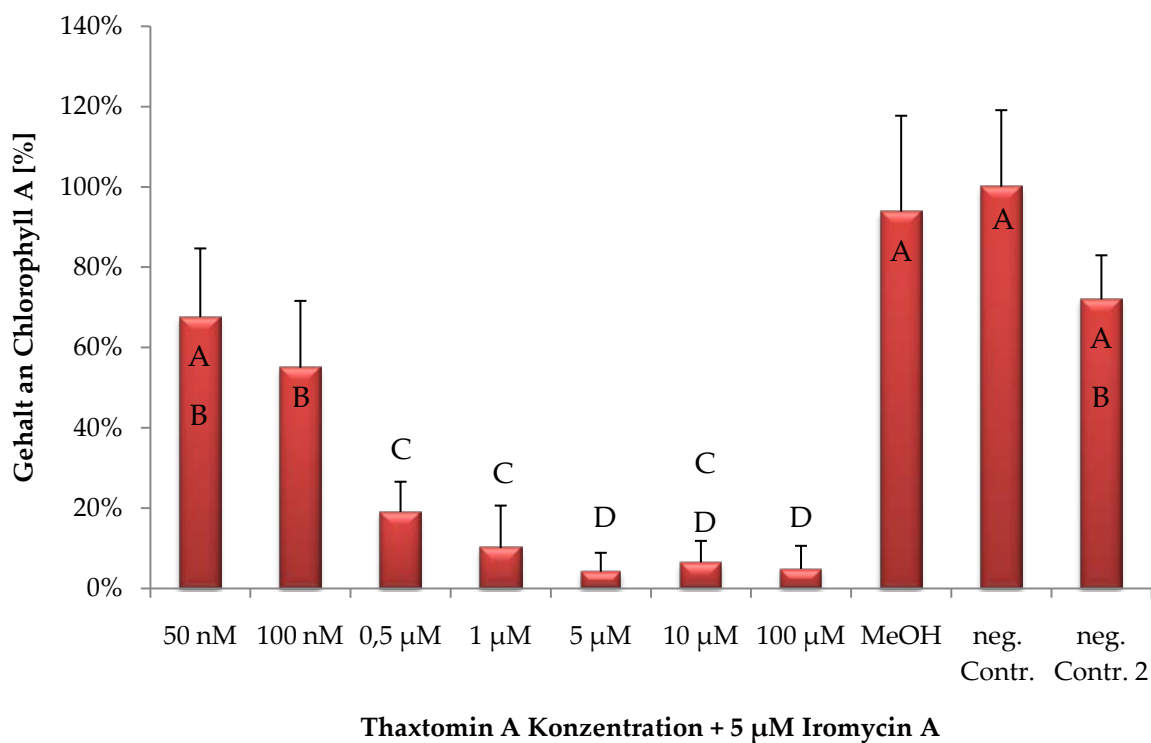


Abbildung 36: Chlorophyll A-Gehalt in Prozent bezogen auf die Negativkontrolle von Radieschensamen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus* ‚Sora‘) nach 6-tägiger Inkubation im Klimaschrank (25 °C, 8 Stunden Dunkelheit, Beleuchtung 4x40 W, 40 cm Abstand) sowie unterschiedlichen Konzentrationen von Thaxtomin A + 5 µM Iromycin A im Nährmedium. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind mit den entsprechenden Buchstaben kenntlich gemacht (n=6).

Aus Abbildung 48 wird ersichtlich, dass die alleinige Wirkung verschiedener Sekundärmetaboliten im Nährmedium kaum Einfluss auf die Bildung des Photosynthesefarbstoffes Chlorophyll aufweist. Einzig Konzentrationen von 0,5 µM sowie 5 µM konnten den Gehalt an Chlorophyll A signifikant vermindern. Da jedoch bei einer Konzentration von 100 µM keinerlei Effekt feststellbar war, müssen diese Effekte nicht zwangsläufig der Wirkung von Thaxtomin A zugeordnet werden.

Dem hingegen konnten unterschiedliche Konzentrationen von Iromycin A den Gehalt an Chlorophyll A trotz gleichbleibender Biomasse nachhaltig beeinflussen. Ab einer Konzentration von 1 µM reduzierte sich der Gehalt von Chlorophyll A um etwa 40 %. Eine

Erhöhung der Konzentration bewirkte hingegen keine weitere signifikante Reduktion des Chlorophyll A-Gehaltes.

Beim kombinatorischen Medium mit Thaxtomin A und 5 μM Iromycin A sind die Effekte, ähnlich, wie bei der Bildung der Biomasse potenziert (Abbildung 37). Bereits bei Konzentrationen von 100 nM Thaxtomin A + 5 μM Iromycin A wurde der Gehalt von Chlorophyll A um 40 % reduziert. Mit steigender Thaxtomin Konzentration ist eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung erkennbar. Diese inhibiert die Chlorophyllbiosynthese bereits ab einer Konzentration von 5 μM Thaxtomin A + 5 μM Iromycin A um über 90 %.

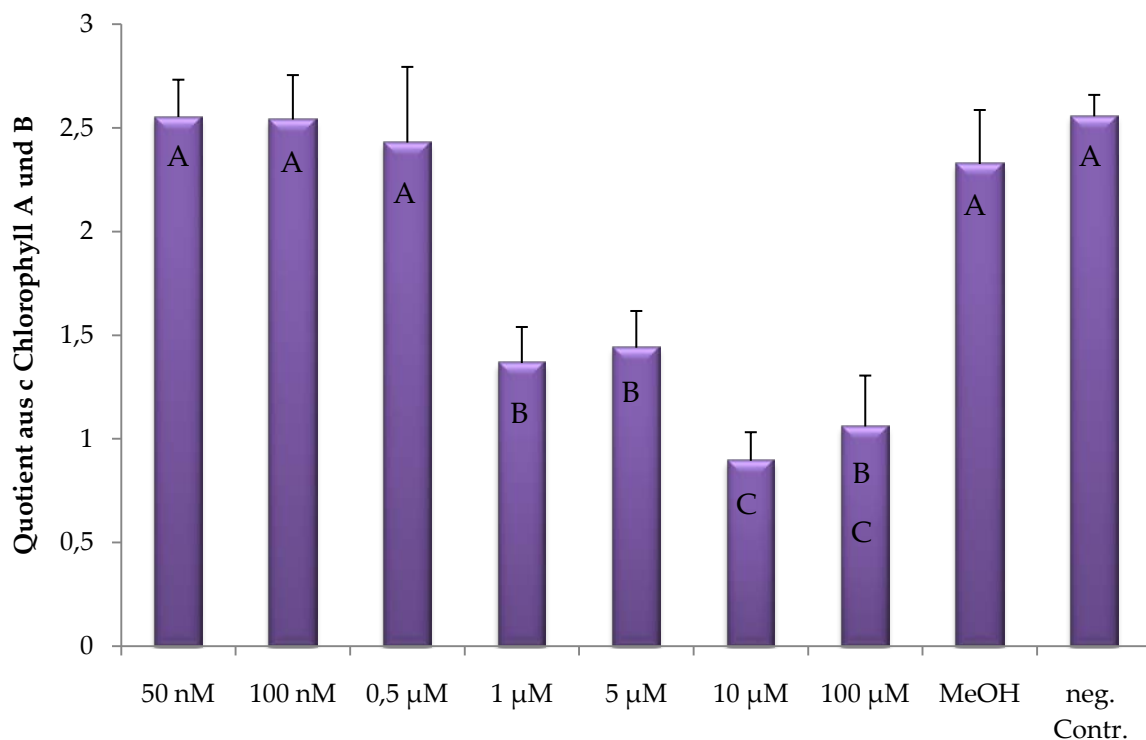


Abbildung 37: Quotient aus den Gehalten von Chlorophyll A und Chlorophyll B gekeimter Radieschensamen (*Raphanus sativus* ssp. *sativus*, 'Sora') nach 6 tägiger Inkubation im Klimaschrank (25°C, 8 Stunden Dunkelheit, Beleuchtung 4x40W, 40 cm Abstand) sowie unterschiedlichen Konzentrationen von Iromycin A im Nährmedium. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind mit den entsprechenden Buchstaben kenntlich gemacht (n=6).

Neben den direkten Auswirkungen auf die Bildung von Chlorophyll A wurde bei der Kombinationsvariante aus Thaxtomin A und Iromycin B ferner eine deutliche Verschiebung der Art des Blattfarbstoffes festgestellt (Abbildung 38). Der Quotient aus dem Gehalt von Chlorophyll A und Chlorophyll B verschiebt sich von 2,5 bei den Kontrollvarianten auf Werte von bis zu 1,0 bei Thaxtomin A Konzentrationen von 10 μM Iromycin A. Aussagen über die Effekte der Einzelkomponenten können nicht getroffen werden, da bei der Messung der Chlorophyll B Gehalte eine sehr große Varianz der Werte aufgetreten ist und daher eine signifikante Aussage nicht getroffen werden kann.

3.6.6 Einfluss von Iromycin A und Thaxtomin A auf die Keimung des Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*, Columbia Zero')

Um die gewonnenen Erkenntnisse bei der Keimung von Radieschensamen zu überprüfen wurde der Versuch am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* wiederholt. Einzig die Inkubationszeit im Klimaschrank wurde aufgrund des langsameren Wachstums von *Arabidopsis thaliana* auf 14 Tage erhöht. Ferner mussten aufgrund des extrem geringen Gewichtes getrockneter Keimlinge des Ackerschmalwandes auf eine Auswertung der Trockenmassen verzichtet werden. Eine alternative Auswertung der Frischmassen kam im Fall von *Arabidopsis* ebenfalls nicht in Frage, da das Herauslösen der jungen Pflanzen aus dem feuchten Agar mit der Beschädigung der Wurzeln einhergegangen wäre. Dies hätte das Ergebnis unwiederbringlich verfälscht. Daher werden im Folgenden ausschließlich Ergebnisse der Chlorophyll A Gehalte dargestellt.

Ähnlich der Auswirkungen von Thaxtomin A auf Radieschensamen, konnten bei der Kultivierung des Ackerschmalwandes auf thaxtominhaltigen Medien nur geringe Effekte auf die Bildung von Chlorophyll A festgestellt werden. Im Fall von *Arabidopsis* konnte ferner eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden. Signifikante Effekte, wie in Abbildung 39 dargestellt, konnten ab Thaxtomin A Konzentrationen von 10 μM und höher ausgewiesen werden.

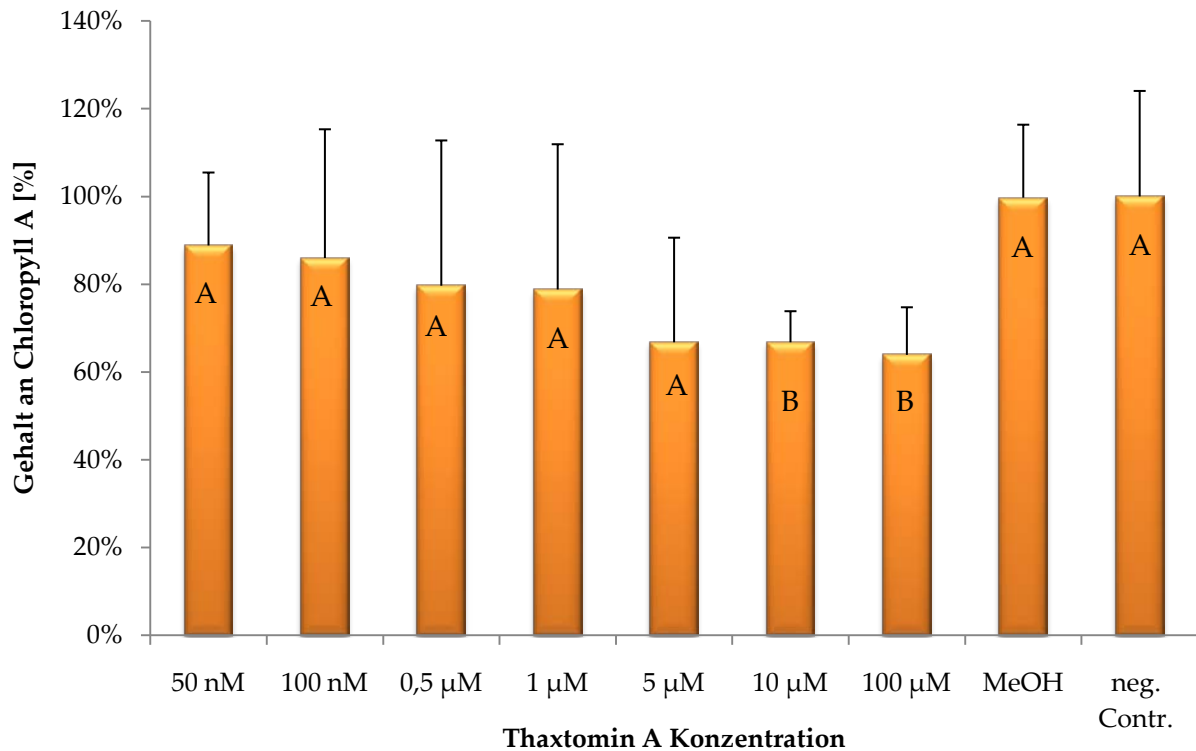


Abbildung 38: Chlorophyll A-Gehalt in Prozent bezogen auf die Negativkontrolle von Samen des Ackerschmalwandes (*Arabidopsis thaliana* ‚Columbia Zero‘) nach 14 tägiger Inkubation im Klimaschrank (25°C, 8 Stunden Dunkelheit, Beleuchtung 4x40W, 40 cm Abstand) sowie unterschiedlichen Konzentrationen von Thaxtomin A + 5 µM Iromycin A im Nährmedium. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind mit den entsprechenden Buchstaben kenntlich gemacht (n=6).

Stärkere Effekte konnten beim Sekundärmetaboliten Iromycin A beobachtet werden (Abbildung 40a). Messungen des Chlorophyll A Gehaltes zeigten eine signifikante Reduktion um 60 % des Blattfarbstoffes bereits bei einer Konzentration von 0,5 µM des NOS-Inhibitors. Stärkere Effekte bei erhöhten Iromycin A Gehalten konnten nicht festgestellt werden. Die Kombination beider Sekundärmetaboliten im Medium konnte, analog zu Radieschensamen, bei *Arabidopsis* die Chlorophyll-Inhibition verstärken. In Konzentrationsbereichen von 50 nM bis 0,5 µM Thaxtomin A + 5 µM Iromycin A waren die inhibitorischen Effekte vergleichbar zu jenen mit Iromycin A alleine. Ein Effekt der Beimengung von Thaxtomin A konnte nicht festgestellt werden. Höhere Gehalte an Thaxtomin A bei gleichbleibender Menge an Iromycin A führten zu einer Inhibition um bis zu 90 % (Abbildung 40b).

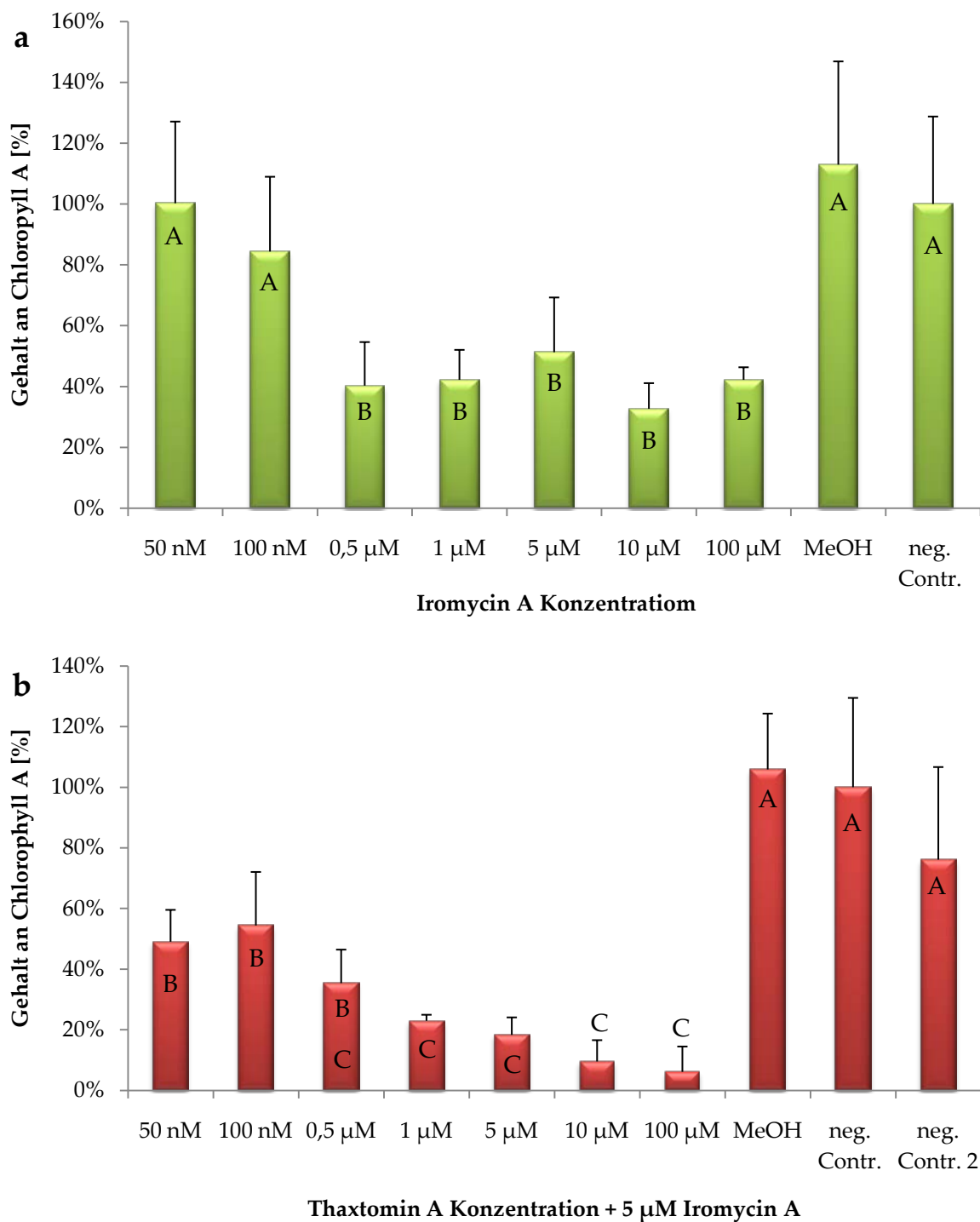


Abbildung 39: Chlorophyll A-Gehalt in Prozent bezogen auf die Negativkontrolle von Samen des Ackerschmalwandes (*Arabidopsis thaliana*, 'Columbia Zero') nach 14 tägiger Inkubation im Klimaschrank (25 °C, 8 Stunden Dunkelheit, Beleuchtung 4x40 W, 40 cm Abstand) sowie unterschiedlichen Konzentrationen von (a) Iromycin A bzw. (b) Thaxtomin A + 5 µM Iromycin A im Nährmedium. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten nach dem Newman-Keuls-Test sind mit den entsprechenden Buchstaben kenntlich gemacht (n=6).

Beobachtungen zur zeitlichen Verzögerung der Keimung bei Iromycinhaltigen Medien konnten bei *Arabidopsis thaliana* ebenfalls festgestellt werden.

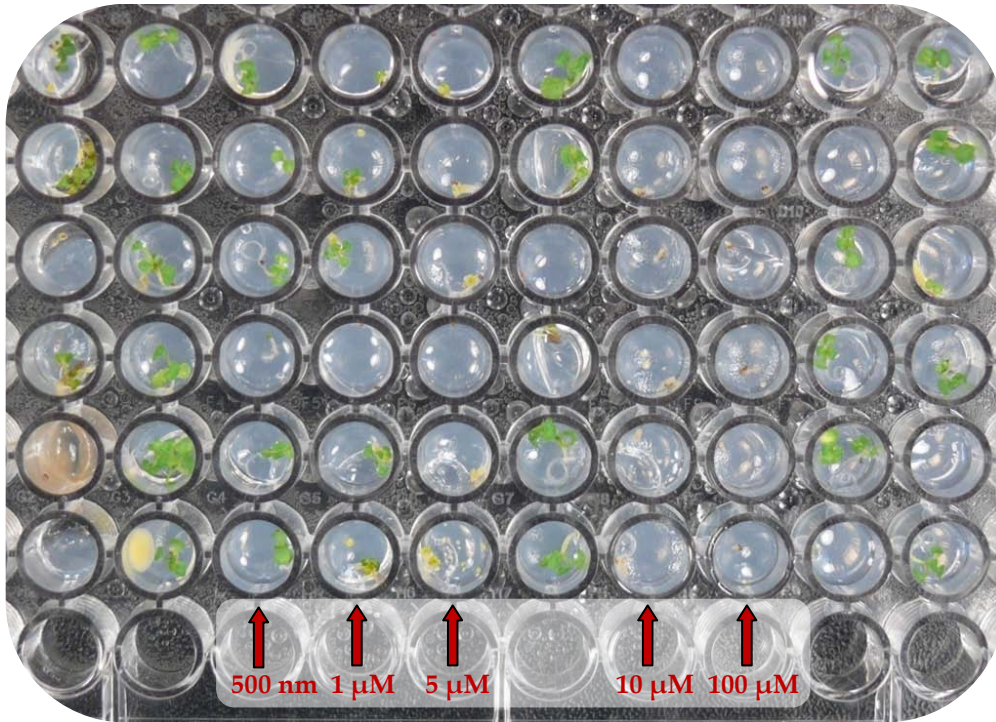


Abbildung 40: Zeitliche Verzögerung der Keimung von *Arabidopsis thaliana* ‚Columbia Zero‘ auf Iromycinhaltigem Medium nach 7 dpi Inkubation im Klimaschrank (25°C, 8 Stunden Dunkelheit, Beleuchtung 4x40W, 40 cm Abstand) (n=6).

Hierbei war eine starke Dosis-Wirkungsbeziehung festzustellen. Die Keimung verzögerte sich je nach Iromycin A Konzentration um wenige Tage bis hin zu einer Woche. Eine Wachstumsdepression lies sich hingegen nicht feststellen. Zwar waren später gekeimte Pflanzen tendenziell etwas kleiner als beispielsweise Pflanzen aus der Negativkontrolle, doch konnten jene Pflanzen aufgrund des starken Wachstums nach der Keimung bis zum Ende der Inkubationszeit (14 dpi) fast wieder aufholen. Ein Einfluss auf den Gehalt an Chlorophyll A war somit minimiert.

4 DISKUSSION

Zu Beginn der Diskussion soll darauf hingewiesen werden, dass zum Zwecke der besseren Übersichtlichkeit und Verständnis der präsentierten und diskutierten Ergebnisse ein ‚getrennter Aufbau‘ gewählt wurde. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die beiden bearbeiteten Themenblöcke „Nutzung von Pflanzenextrakten am Beispiel von *Plasmopara viticola*“ sowie „Regulation der Biosynthese am Beispiel von *Streptomyces bottropensis*“ völlig unterschiedliche Fragestellungen darstellen.

Daher wurden für die einzelnen Themengebiete relevante Fragestellungen in der Literatur sowie dem jetzigen Stand der Forschung zunächst in der Diskussion zusammengefasst und die eigenen Ergebnisse anhand dieser Literaturübersicht separat diskutiert.

4.1 Praktische Nutzung von Pflanzenextrakten am Beispiel von *Plasmopara viticola*

4.1.1 Pflanzenstärkungsmittel eine Alternative im ökologischen Weinbau?

Speziell durch die verstärkte Diskussion um Verbraucher- und Umweltschutz in der Landwirtschaft ist auch das Thema Kupfer und deren Ersatzstoffe im ökologischen Landbau verstärkt in den Medien vertreten.

Durch ein Verbot von Kupfer als Pflanzenschutzmittel wären in erster Linie ökologisch wirtschaftende Betriebe betroffen – wirksame Alternativen, speziell bei hohem Befall sind entweder noch im Entwicklungsstadium oder sind in der Praxis nur bedingt einsetzbar. (KÖSSLER, 2006).

Im ökologischen Weinbau müssen daher aufgrund weniger wirkungsstarker Produkte im Vergleich zum integrierten Rebschutz kürzere Applikationsintervalle eingehalten werden. Dennoch wäre auch hier eine Reduzierung der Anwendungen wünschenswert. Dies gilt besonders für den Einsatz kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel. Seit mehreren Jahren wird eine drastische Reduzierung des Kupfereintrags von Seiten der Bundesregierung sowie der Europäischen Union gefordert (BODE 2003, KÜHNE 2008). Derzeit liegt in Europa die maximal zulässige Menge für den ökologischen Weinbau bei 6 kg Cu/ha pro Jahr bzw. bei 30 kg Cu/ha in fünf Jahren (Verordnung EWG Nr. 2092/91 Anhang II B, seit 01.01.2009 Verordnung (EG) Nr. 834/2007). Die deutschen Verbände für ökologischen Weinbau haben den Grenzwert weiter verschärft und auf 3 kg Cu/ha pro Jahr bzw. 15 kg Cu/ha in fünf Jahren reglementiert. Die Einhaltung dieser Grenzwerte kann unter den Anbaubedingungen nördlich gelegener Anbauggebiete (Deutschland, Luxemburg, Elsass) jedoch nur durch die Kombination mit Pflanzenstärkungsmitteln bzw. bioaktiven Substanzen natürlichen Ursprungs erreicht werden (HEIBERTSHAUSEN, 2009). Diese Präparate können in erster Linie in weniger anfälligen Entwicklungsstadien der Weinrebe sowie bei geringem Befallsdruck den Kupfereinsatz ersetzen. Zu Zeiten mit hoher Applikationsfrequenz, in denen die Rebe hoch anfällig ist, müssen ökologisch wirtschaftende Betriebe jedoch weiterhin auf kupferhaltige Pflanzenschutzmittel zurückgreifen.

Um die steigende Nachfrage nach ökologisch angebauten Produkten auch in Zukunft zu sichern, gehen derzeitige Schätzungen davon aus, dass sich die dazu benötigte Anbaufläche in Deutschland nahezu verdoppelt wird (KAUER 2008). Vor diesem Hintergrund nimmt im Umkehrschluss auch die Gesamtkupferapplikation auf deutschen Anbauflächen in den nächsten Jahren zu.

In ökologisch integriert wirtschaftenden Betrieben wird im Rahmen des Kupfermanagements daher nach neuen wirkortspezifischen (site-specific) Präparaten gesucht. Diese weisen zwar im Gegensatz zu Kupfer eine bessere Ökobilanz auf, sind aber

stark von der Ausbildung resistenter Pathogenpopulation betroffen. Häufig werden diese daher in den letzten Jahren mit multi-site Wirkstoffen ergänzt (z.B. Mancozeb und Folpet) (GISI & SIEROTZKI, 2008). Auch in diesem Fall könnten anstatt der eingesetzten multi-site Präparate, potente Pflanzenstärkungsmittel bzw. bioaktive Stoffe natürlichen Ursprungs den Anwender beim Resistenzmanagement gezielt unterstützen.

Durch den von BERNSTEIN et al. (2007) prognostizierten Temperaturanstieg, die höhere Variabilität der Niederschlagsereignisse sowie die vorhergesagte Zunahme von Starkregen gepaart mit warmen Trockenperioden wird der Pflanzenschutz im Weinbau zukünftig an Bedeutung zunehmen – dies gilt gleichermaßen für den integrierten und den ökologischen Rebschutz. Die Bereitstellung kupferarmer oder sogar kupferfreier Substanzen für den ökologischen Weinbau ist daher nötiger denn je. Diese Produkte können nur dann termingerecht und epidemiologisch sinnvoll ausgebracht werden, wenn neben der Wirkungsweise das Eindämpfungspotential genau bekannt ist.

4.1.2 Auswahl der Pflanzen zur Extraktbereitung

Pflanzen sind nicht nur in jüngerer Zeit, aufgrund ihres Sekundärstoffwechsels, einen vielversprechender Pool an Inhaltsstoffen. Diese stellen eine weitgehend ungenutzte Quelle für die Auffindung wirksamer Substanzen dar, welche im Pflanzenschutz gegenüber phytopathogenen Pilzen eingesetzt werden können (FUGMANN et al. 1991; PLIMMER, 1993). Trotz der Tatsache, dass Untersuchungen von pflanzlichen Inhaltsstoffen und Pflanzenextrakten eine lange Tradition aufweisen, existieren bisher nur wenige Biozide, welche auf ‚Naturstoffe‘ aus Pflanzen zurückzuführen sind. Gleiches gilt für kommerziell erhältliche Extrakte für die ökologische Landwirtschaft. Die meisten dieser Pflanzenextrakte und Substanzen besitzen zudem eine ausschließlich insektizide Wirkung. Hierbei sind in erster Linie der Inhaltsstoff Pyrethrum aus *Chrysanthemum cinerariifolium* sowie Azadirachtin aus dem Neembaum (*Azadirachta indica*) zu nennen (BUCHENAUER, 1996).

Dass Pflanzenextrakte dennoch eine erfolgsversprechende und potentielle Quelle für fungizide Wirkstoffe darstellen, kann beispielsweise durch Arbeiten von KLINGAUF & HERGER (1985) belegt werden. Bei der Untersuchung von über 100 Extrakten zeigte über die Hälfte dieser Extrakte eine Wirkung gegen den Echten Mehltau an Gerste. Auch bei der

Bekämpfung des Falschen Mehltaus der Rebe (*Plasmopara viticola*) konnte im Rahmen eines Screenings bei über 50 Extrakten eine Wirkung festgestellt werden (KÖSSLER et al., 2004). Grundlage der Pflanzenauswahl lag hierbei auf Gewächsen mit nachgewiesener Wirkung im humanmedizinischen als auch im phytomedizinischen Bereich. Einige Beispiele hierfür sind die nachgewiesenen antimykotischen und antibakteriellen Wirkungen von Efeuextrakten bei Pflanzen bzw. Säugetieren: Salbeiextrakte wirken als Antihydrotikum (wasserbindend) und könnten somit gerade bei Oomyzeten effektiv sein. Exemplarisch sind zudem Extrakte aus Rosmarin zu nennen, welche als Konservierungsmittel antimykotisch und antimikrobiell wirksam wird. (WICHTEL et al., 2002).

4.1.3 Extraktion von Inhaltsstoffen aus pflanzlichem Gewebe

Die Extraktionsbedingungen haben einen entscheidenden Einfluss auf die Isolierung von Substanzgruppen aus verschiedenen pflanzlichen Geweben. Durch Veränderungen des Temperaturbereiches, der Polarität der Lösungsmittel oder des Extraktionsverfahrens kann durch die Veränderung des Metabolitenspektrums eine nachhaltige Veränderung der Wirksamkeit eines Rohextraktes eintreten. (HOFMANN, 2005).

Auch für eine spätere Isolierung und Strukturaufklärung aktiver Reinsubstanzen ist die Quantität und Qualität der Gewinnung eines Rohextraktes entscheidend. (BLAESER, 1999) (BLAESER, P., 1999, Isolierung und Charakterisierung von Pflanzeninhaltsstoffen mit fungizider Wirkung, Dissertation, Friedrich-Willhelm Universität, Bonn).

Die in der Literatur häufig als geeignete Methode zur Herstellung von Pflanzenextrakten beschriebene Soxhlet-Extraktion (HERGER, 1991, KOWALEWSKI, 1992, LATTEN, 1994) zeigt jedoch deutliche Nachteile (BLAESER, 2002). So konnten Untersuchungen zur Wirksamkeit eines Extraktes aus *Cannamomum camphora* gegenüber *P. infestans* eine deutlich schwächere Wirkung aufweisen als ein Extrakt, welches im 60 °C Wasserbad hergestellt wurde. Forschungen von JAGLAN (1997) unterstreichen hierbei die Berichte von BLAESER (2002). Der Wirksamkeitsverlust der Extrakte lässt sich hierbei im Wesentlichen auf die höheren Extraktionstemperaturen bei der Soxhlet-Methode und der damit einhergehenden Zersetzung der bioaktiven Stoffen zurückführen.

Für diesen Verlust der Wirksamkeit kann man eine geringe Thermostabilität wirksamer Substanzen eines Extraktes verantwortlich machen (HERGER, 1991, CHUNG, 1995).

Eigene Untersuchungen hingegen zeigten keine Temperaturabhängigkeit bei der Wirksamkeit der Substanzen. So konnte bei keinem der untersuchten Extrakte, welche bei einer Temperatur von 60 °C extrahiert wurden, eine signifikante Verschlechterung der Wirkung auf den Falschen Mehltau der Rebe festgestellt werden im Vergleich zu den Extrakten, die bei 40°C bzw. Raumtemperatur hergestellt wurden.



Abbildung 41: Pflanzliche Rohstoffe zur Extraktgewinnung: (oben links), Faulbaumrinde gehackt, (oben rechts) Schlüsselblumenwurzel gehackt, (unten links) Efeublätter geschnitten, (unten rechts) Rosmarinnadeln

Hierbei ist anzumerken, dass verglichen mit der Soxhlet-Extraktionsmethode die eingesetzten Temperaturen von 20 °C (RT), 40 °C und 60 °C noch immer vergleichsweise gering und daher ‚extraktschonend‘ angesetzt waren. Ähnliche Effekte wurden auch bei CHUNG et al. (1995) beschrieben, der keinen negativen Effekt von höheren Temperaturen auf die Wirksamkeit bei Extrakten aus Luzernen ermitteln konnte.

Die Extraktion des Pflanzenmaterials mit Hilfe unterschiedlicher Lösungsmittel hingegen zeigte deutliche Unterschiede bei der Ausbeute, welche anhand der extrahierten Trockenmasse detektiert wurde. Speziell Lösungsmittelgemische mit einem sehr breitem Polaritätsspektrum (20 % Ethanol (v/v) + Aceton/Methanol 1:1 (v/v)) lieferten die größten Ausbeuten. Acetonhaltige Lösungsmittel hatten hierbei den Nachteil auch Öle und Fette aus den Pflanzenteilen zu extrahieren, welche sich im Vakuum nicht bis zur Trockenheit einengen ließen. Ferner gingen diese Bestandteile nur unter Verwendung von Dimethylsulfoxid sowie Wärmezufuhr und Ultraschall in Lösung bzw. in Suspension.

Bei den Untersuchungen zur Wirkung unterschiedlich hergestellter Pflanzenextrakte konnten kaum Unterschiede auf das Sporulationsverhalten von *P. viticola* festgestellt werden. Während LATTEN (1994), MATTINA et al. (1997) und PINTO et al. (1998) Pflanzenextrakten, welche mit sehr polaren Lösungsmitteln hergestellt wurden, die stärkste Wirkung bescheinigen, konnten bei eigenen Untersuchungen nur einige Extrakte (Eiche, Efeu, Weide) hergestellt mit einem weiten Polaritätsspektrum (20 % Ethanol (v/v) + Aceton/Methanol 1:1 (v/v)) einen signifikant Unterschied auf die Sporulation von *P. viticola* aufweisen.

Weitere Parameter, wie beispielsweise eine Verkürzung der Extraktionszeit von 72 Stunden auf 4 Stunden und die damit einhergehende geringere thermische Belastung der Rohextrakte, zeigten ebenfalls keinerlei Einfluss auf die Wirksamkeit der Extrakte. Auch der Einsatz des Ultraschallbades führte zu keiner verbesserten Extraktion von aktiven Inhaltsstoffen.

Vergleicht man hierzu den Extraktionsverlauf, welcher exemplarisch an einem Extrakt aus Efeublättern anhand des elementaren Kohlenstoffs veraschter Proben ermittelt wurde, kann man davon ausgehen, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkt die meisten aktiven Naturstoffe aus der Pflanzenmatrix extrahiert wurden. Der Anstieg des elementaren Kohlenstoffs bis zur 50. Stunde geht demnach in erster Linie auf gelöste Fette und Öle zurück, welche aus den Abschlussgeweben von Wurzeln, Blättern und Samen der Extraktpflanzen in Lösung bzw. in Suspension gehen. Zwar werden derartigen Inhaltsstoffen fäulnishemmenden Eigenschaften nachgesagt (HOFMANN et al., 1995) doch scheinen diese auf den Falschen Mehltau der Rebe keinerlei Wirkung auszuüben.

4.1.4 Untersuchungen zur Wirkung pflanzlicher Extrakte auf die Entwicklung von *Plasmopara viticola*

4.1.4.1 Einfluss der Prüfmittel auf das interzellulare Wachstum von *Plasmopara viticola*

Bei Untersuchungen zur Biologie des Falschen Mehltaus der Rebe wurden im Rahmen von KASSEMAYER, 2003 sowie KÖSSLER, 2006 Planosporen als primärer Schwachpunkt des Pathogens identifiziert. Laut Darstellung des STAATLICHEN WEINBAUINSTITUTS sind Planosporen vom Schlupf bis zur Enzystierung für biogene Hemmstoffe besonders zugänglich. Mit der Ausbildung des substomatären Vesikels und der Abtrennung der Spore von der Oberfläche durch ein Septum ist keine Wirkung oberflächlich applizierter biogener Wirkstoffe mehr zu erwarten. Da das intrazelluläre Wachstum von *P. viticola* mikroskopisch schwer zu erfassen ist wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Ansätze zur molekulargenetischen Quantifizierung der pilzlichen Biomasse mittels Real-Time-PCR durchgeführt.

So wurde verglichen mit der Negativkontrolle, die Bildung der pathogenen Biomasse in behandelten Blättern stark gehemmt. Einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Extrakten konnte hierbei nicht festgestellt werden. Einzig der Extrakt aus Schlüsselblumen übte keinerlei Effekt auf das intrazelluläre Wachstum aus. In wieweit die Pflanzenextrakte hierbei das Wachstum lediglich verlangsamen konnten, müssen Untersuchungen an der Wachstumskurve aufzeigen. Ferner lässt sich anhand der Ergebnisse aufgenommen zu einem einzigen Zeitpunkt auch nicht abschätzen, in wieweit die Hemmung innerhalb des Wirtsgewebes Einfluss auf die anschließende Sporulation sowie auf die Fertilität der im Anschluss gebildeten Sporangien hat.

Einzig der stark verminderte Unterschied zwischen den einzelnen Prüfvarianten, im Vergleich zum Sporulationsunterschied lässt auf einen verminderten Einfluss der Extrakte auf das substomatäre Wachstum schließen. Die Hypothese, dass es aufgrund ‚geringerer Konkurrenz‘ durch eine schwächere Infektion zu einem Ausgleich beim intrazellulären Wachstum kommen kann, wurde durch KEIL (2009) bestätigt.

4.1.5 Ausblick

Der vorliegende Arbeitsabschnitt bestätigt zusammen mit der Masterarbeit (KÖSSLER, 2006) das Potential pflanzlicher Substanzen und Teedrogen zur Bekämpfung des Falschen Mehltaus der Rebe (*Plasmopara viticola*). Methodische Überlegungen zur Weiterführung des beschriebenen Projektes teilen sich in zwei Aufgabenbereiche. Zum einen könnten potentielle wirksame Inhaltsstoffe der Teedrogen eingegrenzt, aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen *P. viticola* anhand des Bioassays charakterisiert werden. Jene Inhaltsstoffe, welche auch als Einzelmetaboliten eine hohe Wirksamkeit zeigen, könnten einer Strukturaufklärung unterzogen und somit als ‚Leitstruktur‘ für neue Pflanzenschutzmittel dienen.

Neben der Wirkung von *P. viticola* könnten diese Stoffe ferner auf die Wirkung gegenüber anderer phytopathogenen Pilzen sowie Bakterien überprüft werden

In wieweit diese Stoffe dann auch, aufgrund ihres natürlichen Ursprungs der ökologischen Landwirtschaft zugänglich gemacht werden muss in den entsprechenden Verbänden diskutiert werden. Eine Isolierung dieser Inhaltsstoffe aus natürlichem Rohmaterial erscheint allerdings für nicht sinnvoll, da dies mit immensen Kosten einhergehen würde.

Im zweiten Aufgabenbereich wäre die Anwendbarkeit der Pflanzenextrakte als Pflanzenstärkungsmittel, unter Einbeziehung von additiven Netz- und Haftmitteln, gegen den Falschen Mehltau in Feldversuchen zu prüfen. Auch Kombinationen verschiedener Pflanzenextrakte oder Kombinationen mit anderen Pflanzenstärkungsmitteln mit unterschiedlicher Wirkungsweise könnten die Wirkungen entscheidend verbessern.

4.2 Regulation der Biosynthese von Sekundärmetaboliten am Beispiel von *Streptomyces bottropensis*

4.2.1 Taxonomie von *Streptomyces* sp. Dra 17

Der Stamm *Streptomyces* sp. Dra 17 wurde aus einer Erdprobe auf einer Magerkalkwiese am Drakenberg in der Nähe von Göttingen entnommen und am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen isoliert (WAGNER, 2000). Charakteristische morphologische Merkmale des Stammes sind das hellgraue Substratmycel, sowie das weiße, nach längerer Inkubation auf YMG-Medium stark ausgeprägte, Luftmycel mit einer spiralähnlichen Ende der Sporenkette. Ein derartiger Aufbau des Luftmycels ist bei Streptomyceten weit verbreitet und ist häufig medienabhängig (HÜTTER, 1962). Nach längerer Inkubation ist zudem ein Einwachsen des Streptomyceten sowie eine damit einhergehende dunkelbraune Verfärbung des Agars erkennbar.

Der Stamm wurde im Jahr 2006 durch die DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH (DSMZ) in Braunschweig taxonomisch bestimmt (KLOPPENSTEDT, 2006). Hierbei wurde LL-Diaminopimelinsäure in Ganzzell-Hydrolysaten gefunden. Ferner produziert der Stamm eine Mischung aus iso/anti-iso verzweigten Fettsäuren, aber nur einen sehr geringen Anteil von unverzweigten gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Weiterhin fehlen Hydroxyl- und 10-Methyl-verzweigte Fettsäuren bzw. sind diese nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Dieses Fettsäuremuster ist für die Vertreter der Gattung *Streptomyces* diagnostisch (SURUP, 2007).

Zur Bestimmung der Spezies wurde das Gen der 16S ribosomalen Ribonucleinsäure (rRNA) sequenziert und mit vorliegenden 16S rDNA Sequenzen verglichen (RAINEY et al., 1996).

Obwohl die Bestimmung der 16S rRNA derzeit die zuverlässigste Methode der Bakterien-Taxonomie darstellt, können nicht alle Vertreter der Gattung *Streptomyces* allein mit Hilfe dieser Methode identifiziert werden. Um das Ergebnis der vergleichenden 16S rRNA Sequenzierung zu verifizieren, wurden die nächsten Verwandten gleicher Gattung herangezogen, um weitere diagnostische Merkmale zu untersuchen (KÄMPFER et.al., 1991):

- „International Streptomyces Project“-Kriterien:
 - Sporenketten Morphologie,
 - Farbe der Kolonien,
 - diagnostische Färbung der Rückseite der Kolonien (Substrat Mycel),
 - Produktion von Exopigmenten,
 - Melanin-Bildung auf spezifischen Kultur-Medien,
 - Verwertung von neun diagnostisch relevanten Zuckern.
- Verwertung von 96 diagnostischen Substraten und Vergleich des Verwertungsmusters mit den Daten von 821 Streptomyces- Typen und Referenz-Stämmen.
- Vergleich des Fettsäuremusters des Isolates mit den in der Fettsäure-Datenbank niedergelegten Mustern (SHIRLING & GOTTLIEB, 1969).
- Vergleich des rRNA- Restriktionsmusters.

4.2.2 Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces bottropensis* Dra 17

Die vergleichende Sequenzierung der 16S rDNA ergab eine Simultanität von 100% zu *Streptomyces bottropensis* bzw. zu dessen Synonym *Streptomyces europaeiscabies*. Auch der Vergleich der Fettsäuremuster des Isolates sowie die Verwertung der 96 diagnostischen Substrate lieferten vergleichbare Ergebnisse. Einzige Ausnahme bildete hierbei das rRNA Restriktionsmuster. Daher konnte der Stamm *Streptomyces* sp. Dra 17 eindeutig *Streptomyces bottropensis* zugeordnet werden – einem direkten Verwandten des Phytopathogens *Streptomyces scabies* – dem Auslöser des Kartoffelschorfs (SURUP, 2007).

Ein weiteres Indiz für die Verwandtschaft von *S. bottropensis* Dra 17 und *S. scabies* ist die jeweilige Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A. Dieser Tatsache sei angemerkt, dass nicht alle *S. bottropensis* Stämme in der Lage sind, das Phytotoxin zu bilden und ihnen daher ein wesentlicher ‚Baustein der Phytotoxizität‘ fehlt (LORIA et al., 2006).

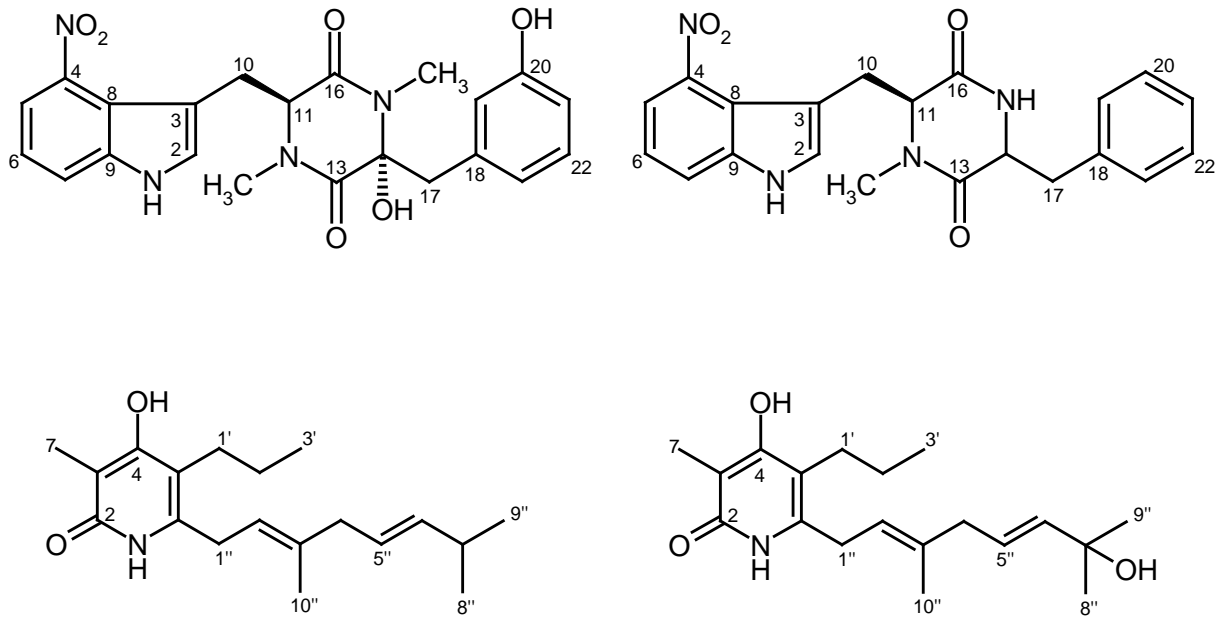


Abbildung 42: Darstellung der Strukturformeln von Thaxtomin A (oben links), Thaxtomin C (oben rechts), Iromycin A (unten links) und Iromycin B (unten rechts)

Neben dem bekannten Pathogenitätsfaktor Thaxtomin A konnten aus Flüssigkulturen des Stammes *S. bottropensis* Dra 17 ferner Spuren von zwei mit Anisaldehyd blau anfärbenden Verbindungen isoliert werden. Diese konnten durch WAGNER (2000) als Iromycin A und Iromycin B identifiziert werden. Iromycine gehören zur Familie der seltenen α -Pyridon Metaboliten und bestehen aus einem N-heterocyclischen Kern mit zwei Seitenketten als Substituenten (SURUP et al., 2007).

Desweiteren konnten aus der Kultur weitere Nebenkomponten nachgewiesen werden, welche jedoch nicht weiter charakterisiert wurden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Stamm *S. bottropensis* für die Naturstoffforschung zu weiteren Biosyntheseleistungen ‚kompetent‘ ist (WAGNER, 2000).

4.3 Iromycin – ein neuer bioaktiver α -Pyridon Metabolit

4.3.1 Iromycin als Inhibitor des Komplex I der Atmungskette

Ein Mitochondrium enthält neben seiner äußeren zusätzlich eine innere Membran. Der Raum zwischen beiden Membranen wird als Intermembranraum oder auch als Cytosol bezeichnet. Die Atmungskette besteht aus fünf Komplexen, die für eine Reaktionskaskade an Redoxreaktionen verantwortlich ist. Vier der fünf Komplexe der Atmungskette durchspannen die innere Mitochondrienmembran vollständig, wozu auch der Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) gehört.

In der Natur existiert die oxidative Phosphorylierung sowohl bei prokaryotischen als auch bei eukaryotischen Lebewesen: Bei Eukaryoten findet sie in den Mitochondrien in der inneren Mitochondrienmembran, bei Prokaryoten in der Zellmembran statt. Bei Eukaryoten sind an der Reaktion nacheinander die Enzym-Komplexe I bis V und die Wasserstoff- bzw. Elektronenüberträger Ubichinon (Coenzym Q) und Cytochrom c, die in die innere Mitochondrienmembran eingelagert sind, beteiligt.

Die Atmungskette, auch Elektronentransportkette bzw. oxidative Phosphorylierung genannt stellt einen wichtigen Teil des Energiestoffwechsels von aeroben Lebewesen dar. Sie beruht auf einer Reaktionskaskade von nacheinander stattfindenden biochemischen Redoxreaktionen, in welchen Elektronen transportiert werden. Der Elektronentransport erfolgt durch Aufnahme und Abgabe der Elektronen durch verschiedene hintereinander geschaltete Redoxsysteme.

Der Multienzymkomplex I reduziert mittels NADH, Ubichinon zum Ubihydrochinon. Hierbei benötigt der Enzymkomplex flavinhaltige Nucleotide sowie Eisen-Schwefel-Zentren, worüber die Elektronen weitergegeben werden. Alleine in dem Komplex I werden pro oxidiertem NADH+H⁺ jeweils netto vier Protonen in den Intermembranraum transportiert. Diese Protonen werden im späteren Verlauf der Atmungskette für die Synthese von ATP benötigt (SARASTE, 1999).

Während des Elektronentransports durch die fünf Komplexe werden Protonen aus der Matrix der Mitochondrien in den Intermembranraum gepumpt. Hierbei entsteht ein elektrochemischer Protonengradient (Chemiosmotisches Modell nach Mitchell). Die Energie, welche durch die Translokation der Protonen freigesetzt wird, wird zur ATP-Synthese genutzt. Dabei wird ATP aus ADP sowie anorganischen Phosphat gebildet. Aufgrund dieser Fähigkeit, den sehr wichtigen Energieträger ATP herstellen zu können, wird das Mitochondrium auch als Kraftwerk der Zelle bezeichnet.

Bei Inhibitionsmessungen des Komplexes I der Atmungskette zeigte Iromycin A einen IC_{50} -Wert von 140 ng/mL. Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die NADH-Oxidation am Rinderherzen in submitochondrialen Partikeln reduziert und damit gehemmt wurde. Im Vergleich dazu liegt der Standard für solche Messungen dem literaturbekannten Piericidin A bei 2.1 ng/mL. Hierbei konnten starke Unterschiede bei unterschiedlichen Iromycinen festgestellt werden (SURUP, 2007; SURUP et al., 2008).

4.3.2 Iromycin als Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)

Das Enzym der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin. Das Enzym der Stickstoffmonoxid-Synthase ist in der Natur in den Eukaryoten als auch in vielen Prokaryoten auffindbar. NO hat in Organismen, in Abhängigkeit von Struktur und Konzentration, eine Vielzahl an physiologischen Aufgaben. Aufgrund der sehr begrenzten Halbwertszeit muss es ständig neu hergestellt werden (UNIPROT, 2007). Bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten sind drei unterschiedliche Isoformen der NO-Synthase bekannt (SURUP, 2007).

Die neuronale nNOS liegt im Cytoplasma konstitutiv exprimiert vor und wird erst durch einen Einstrom von Calcium aktiviert. Die endotheliale eNOS ist ebenfalls calciumabhängig und liegt konstitutiv exprimiert vor. Dabei ist die eNOS membrangebunden. Die induzierbare iNOS hingegen ist unabhängig vom Vorhandensein eines Ca^{2+} Einstromes und kann nach ihrer Induktion sehr große Mengen an NO freisetzen, welche zu cytotoxischen Schäden führen kann.

4.3.2.1 Bakterielle NOS

Wie bereits erwähnt, konnten auch in Prokaryoten NOS-ähnliche Proteine identifiziert werden. Einige Vertreter hierbei sind *Deinococcus rariodurans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus halodurans*, *Staphylococcus aureus*, *Geobacillus stearothermophilus* sowie *Streptomyces turgidiscabies*. Die bakterielle NOS enthält hierbei die meisten Schlüsselemente der humanen NOS Oxygenase-Domäne. Die katalytischen Eigenschaften ähneln ebenfalls der Säuger-NOS Oxygenase, verfügen aber über eine geringere NO-Dissoziationsrate. Dies limitiert die NO-Freisetzung und ermöglicht die Nitrierung von Substratmolekülen (WANG et al., 2007). Als Beispiel ist hierbei die Nitrierung von Tryptophan bei der Biosynthese des Phytotoxins Thaxtomin A zu nennen (LORIA et al. 2008).

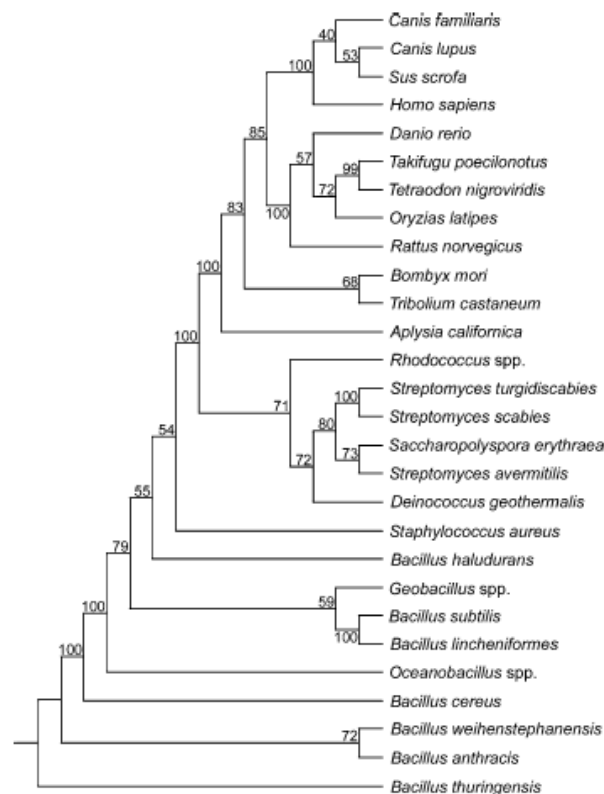


Abbildung 43: Phylogenetischer Baum der Verwandtschaftsbeziehungen unter verschiedenen NOS Proteinen unterschiedlicher Spezies (Abbildung: LORIA et al. 2008).

4.3.2.2 Pflanzliche NOS

In Pflanzen wurden zwei nicht verwandte NOS-ähnliche Enzyme identifiziert: eine pathogeninduzierte iNOS aus *Arabidopsis thaliana* sowie Tabak und eine hormon-aktivierte NOS, ebenfalls aus *A. thaliana* (AtNOS) (ZEIDLER, D. et al., 2004, SURUP, 2007). Die iNOS zeigt hierbei eine typische NOS Aktivität, und ist für die unspezifische Immunantwort verantwortlich (CHANDOK, 2003). Abwehrreaktionen von Pflanzen werden hierbei durch das Zusammenspiel vieler Signalsubstanzen ausgelöst. Dies führt in manchen Fällen zur Bildung von Phytoalexinen sowie in manchen Fällen zu einem programmierten Zelltod einzelner Pflanzenbestandteile. Dieses wird auch als hypersensitive Reaktion bezeichnet (HALLMANN et al., 2007). An diesen sehr unterschiedlichen Abwehrreaktionen sind mehrere Signalsubstanzen beteiligt, deren Wirkung untereinander stark vernetzt sind. Nach einem Pathogenbefall sowie nach abiotischem Stress erfolgt eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol der Zelle. Hierdurch werden wiederum Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen aktiviert welche ihrerseits eine Kaskade von Proteinkinasen aktivieren. Schließlich wird die Genexpression über die Modulation von Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Weiterhin können sich bereits in frühen Reaktionen reaktive Sauerstoffspezies bzw. H_2O_2 bilden, welche durch eine in der Plasmamembran lokalisierte NADPH-Oxidase ausgelöst werden.

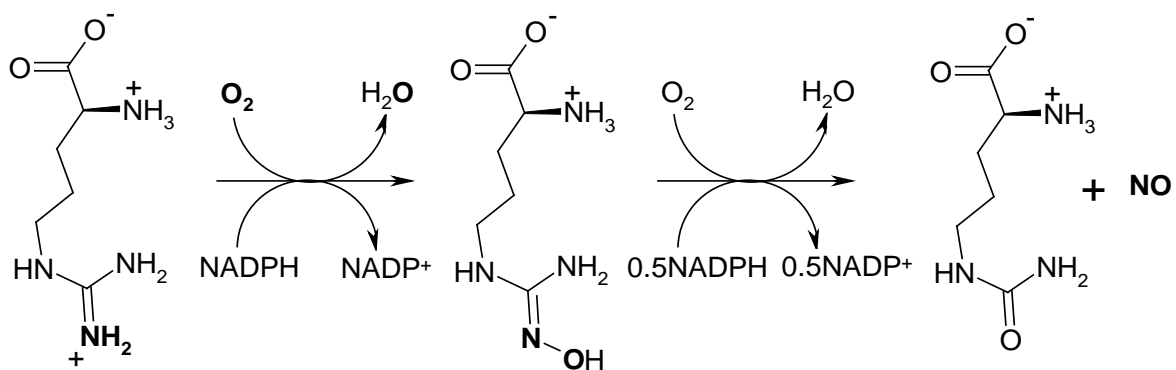


Abbildung 44: Bildung von NO durch die NO Synthase. NOS katalysierten die Bildung von NO aus L-Arginin durch zwei Monooxygenierungen. Das Stickstoffatom des NO stammt aus einer Guanidino-Gruppe des Arginin, das Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff

Beide Produkte werden auch als ractive oxigen spezies (ROS) bezeichnet. ROS sind daher zum einen eine direkte ‚chemische Waffe‘ um Pathogene direkt zu bekämpfen, zum anderen dienen sie als Botensubstanzen, um Signalkaskaden zur Bildung von Abwehrsubstanzen auszulösen. Parallel hierzu bildet die Pflanze Stickstoffmonoxid (NO). Dieses kann sowohl durch die Nitratreduktase als auch durch die Oxidation von Arginin durch Sauerstoff gebildet werden. Im letzten Fall wird diese Reaktion durch eine NO-Synthase katalysiert, welche einer P₄₅₀-Monooxygenase vermittelten Reaktion gleicht. Es ist allerdings unklar, ob die Bildung von NO direkt durch einen Rezeptor nach Pathogenbefall ausgelöst wird, oder indirekt durch die zuvor gebildeten ROS. Daneben dient NO in Pflanzen als wichtige Botensubstanz bei der Bildung von Phytoalexinen sowie als Auslöser eines plötzlichen Zelltod.

Ferner wird angenommen, dass durch NO die Synthese von Salicylsäure stimuliert wird. Diese hat in der Pathogenabwehr eine zentrale Funktion. Salicylsäure stimuliert ferner die Synthese der β -1,3-Glucanase, welche in der Lage ist, die Zellwand von zahlreichen Pathogenen anzugreifen. Auch die Lipoxygenase, ein Enzym der Jasmonsäure-Synthase, wird maßgeblich durch das Vorhandensein von Salicylsäure beeinflusst (HELDT, 2003, GUO et al., 2003). Somit stellen NO-Synthasen bei Pflanzen ein zentrales Element der Immunabwehr dar und sind daher potentiell anfällig für inhibitorische Angriffe eines Pathogens.

4.3.3 Bekannte selektive NOS-Inhibition von Iromycinen

In Arbeiten von SURUP et al. (2007) wurde in Kooperation mit SCHLEICHER und OESS (Universität Frankfurt) die Inhibition von Iromycin A und Iromycin B sowie Iromycin C auf die nNOS sowie eNOS Isoformen untersucht.

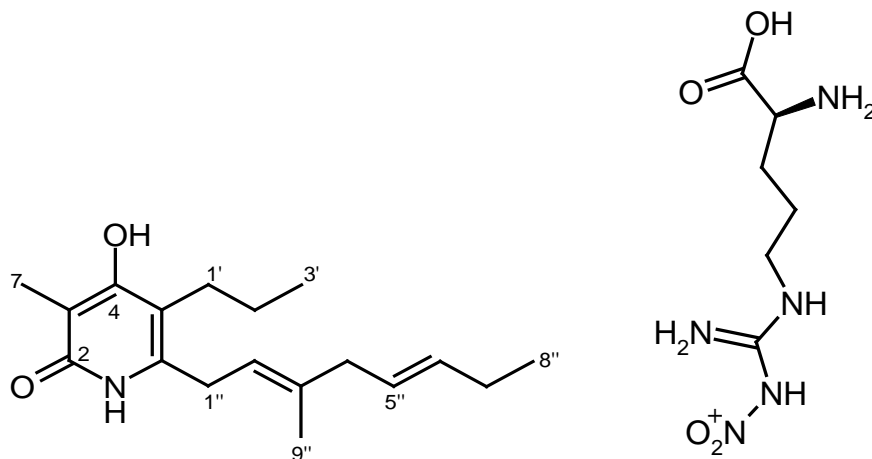


Abbildung 45: Strukturformeln von Iromycin C (links) und N-Nitro-L-Arginin (NNA) (rechts)

Dazu wurden Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (*Cricetulus*), die humane eNOS und nNOS exprimieren, mit einem Ca^{2+} -Ionophor (A23187) in Gegenwart oder Abwesenheit von Iromycinen stimuliert. Beim Zellaassay zur eNOS zeigte Iromycin A eine starke inhibitorische Aktivität, welche durch eine Konzentrations-Bestimmung des Reaktionsproduktes Citrullin nachgewiesen werden konnte (NUSZKOWSKI, 2001, SCHLEICHER, 2005). Hierbei war Iromycin A deutlich potenter als Iromycin B bzw. Iromycin C. Als Kontrolle wurde die Produktion von Citrullin in stimulierten Zellen mit bzw. ohne den bekannten Inhibitor der NOS N-Nitro-L-Arginin (NNA) genutzt.

Im Gegensatz dazu wurde keine signifikante Aktivität der Iromycine auf die nNOS Isoform festgestellt. Daher wird Iromycin A als selektiver Inhibitor der eNOS postuliert. (SURUP et al., 2007; SUKENAGA et al., 1998).

4.4 Thaxtomin A – ein Phytotoxin als Virulenzfaktor

Die phytopathogenen Spezies *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* und *S. niveiscabiei* sind literaturbekannte Produzenten des Phytotoxins Thaxtomin A und zählen damit zu den phytopathogenen Streptomyceten (LORIA et al., 2003). Die Struktur sowie die biologische Aktivität von Thaxtomin A wurde erstmals von KING et al. (1989) beschrieben. Hierbei wurde Thaxtomin A zunächst aus dem Gewebe befallener Kartoffeln isoliert. Erst später gelang es aus Reinkulturen von *Streptomyces scabies* Thaxtomin A aus Hafermehl-Medium aufzureinigen. Hierdurch konnten neben der Hauptkomponente auch Minderkomponenten sowie Vorläufer der Thaxtomin A Biosynthese charakterisiert werden (SHIOMI et al., 2006).

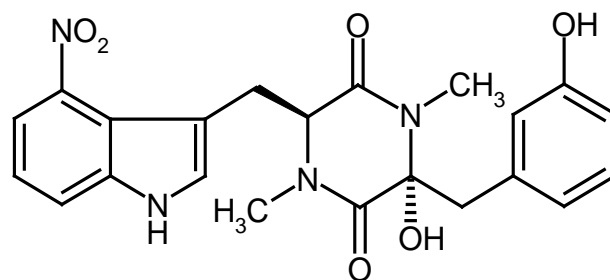


Abbildung 46: Strukturformel von Thaxtomin A

KING et al. berichten bereits (1996) über eine ausgeprägte Korrelation zwischen Phytopathogenität von *S. scabies* auf Wirtspflanzen und deren Fähigkeit, unterschiedliche Mengen an Thaxtomin A zu produzieren. Diese Ergebnisse konnten auch in Flüssigkulturen untermauert werden. Weitere phytopathologische Untersuchungen zeigten, dass Thaxtamine generell in der Lage sind, Nekrosen auf Kartoffelscheiben zu induzieren. Hierbei wurden durch Thaxtomin A die größten Effekte erzielt.

Die Gemeinsamkeit der Thaxtomin-Produktion vieler phytopathogener Stämme aus verschiedensten geographischen Regionen und das Fehlen der Produktion von Thaxtomin A bei saprophytischen *Streptomyces* sp. unterstützten die Hypothese, dass es sich bei der Thaxtomin A Produktion um den entscheidenden Faktor in der Phytopathogenität handeln könnte. Endgültigen Aufschluss über die Rolle von Thaxtomin A bei der Besiedlung des

Wirtsgewebes konnten Untersuchungen von GOYER et al. (1998) und KERS et al. (2005) zeigen. Hierbei wurde die Produktion von Thaxtomin A sowohl bei phytopathologischen Untersuchungen als auch bei Untersuchungen von Knock-out Mutanten als Hauptvirulenzfaktor phytopathogener Streptomyceten beschrieben.

In weiteren Untersuchungen wurde vermutet, dass Thaxtomin A als Cellulose-Biosynthese-Inhibitor die Zellwandsynthese unterbricht, da nach Inkubation die Inkorporation von ^{14}C -markierter Glukose in die Zellwand der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* stark reduziert war (SCHEIBLE et al., 2003). Später wurde abgeleitet, dass die rasche pathogene Veränderung des Aufbaus und der Organisation der Zellwand einen programmierten Zelltod (PCD) auslösen kann. Dieser ist wie die Apoptose durch aktive Genexpression, *de novo*-Proteinsynthese und Fragmentierung der Kern-DNA gekennzeichnet (DUVAL et al., 2005).

Dagegen wurde von TEGG et al. (2005) vermutet, dass Thaxtomin A einen Ca^{2+} -Einstrom durch Öffnung von Ionenkanälen induziert, der zu einem erhöhten Protonenausstoß und Übersäuerung der Zellen führt. Untersuchungen mit *Arabidopsis thaliana* und Tomaten führten zu der Vermutung, dass Thaxtomin A durch Einstrom von Ca^{2+} eine Signalkaskade auslöst.

Bei *in vitro*-Untersuchungen von SURUP (2007) zum Test der biologischen Aktivität zeigte Thaxtomin A in Plattendiffusionstest keinerlei Effekte gegenüber den Pathogenen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Candida albicans*. Auch Untersuchungen der Firma XXX (Name darf nicht genannt werden) an *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium amycolatum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida glabrata* erbrachten keine erkennbare biologische Aktivität. Es war des Weiteren keine Cytotoxizität gemäß der NCI-Richtlinien gegen die Krebszelllinien HM02 (Magenkarzinom), HepG2 (Leberkarzinom) und MCF7 (Mammakarzinom) festzustellen (WAGNER, 2000, SURUP, 2007).

4.4.1 Biosynthese von Thaxtomin A

Erste Untersuchungen zur Thaxtomin A Biosynthese basierten auf Fütterungsexperimenten mit ^{14}C -markierten Aminosäuren. Hierbei konnte der Beweis erbracht werden, dass es sich bei Tryptophan, Phenylalanin sowie Methionin um Vorläufer von Thaxtomin A handelt. (LAUZIER, 2002).

Molekulargenetische Experimente an *Streptomyces turgidiscabies* von HEALY et al. (2000) zeigten, dass das Biosynthesegencluster von Thaxtomin A aus vier Genen (*txtA*, *txtB*, *txtC*, *nos*) besteht. Hierbei kodieren die Gene *txtA* und *txtB* nichtribosomale Peptidsynthasen (NRPS) mit einer Länge von 1458 bp bzw. 1505 bp. Sie verfügen beide über Adenylierungs-, Thioloierungs- sowie Kondensationsdomänen. Zusätzlich enthalten sind zwischen den A- und T-Domänen der NRPS weitere S-Adenosylmethionin-abhängige N-Methyltransferase-Domänen (M) eingebaut, die den Einbau der N-Methylgruppen katalysieren.

Das Gen *txtC* kodiert zudem eine Cytochrom P₄₅₀-Monooxygenase. Durch knock-out Experimente konnte bewiesen werden, dass das Enzym die zweifache Oxidation von Thaxtomin D über Thaxtomin B zu Thaxtomin A katalysiert (HEALY et al., 2000, Kers et al., 2004).

Das *nos*-Gen kodiert ein Enzym, welches zu den humanen NO-Synthasen eine hohe Homologie aufweist. Untersuchungen von KERS (2004) zeigten eine völlig unterschiedliche Funktion: während humane-NOS das Signalmolekül Stickstoffmonoxid freisetzen, überträgt die bakterielle NO-Synthase von *S. turgidiscabies* dieses auf die Aminosäure Tryptophan und bewirkt damit eine direkte Nitrierung. Auch der freie Metabolit 4-Nitrotryptophan, welcher aus Fermentationsansätzen durch KING & LAWRENCE (1995) bekannt ist, spricht für eine Nitrierung vor dem eigentlichen Aufbau des Thaxtomin-Grundgerüsts.

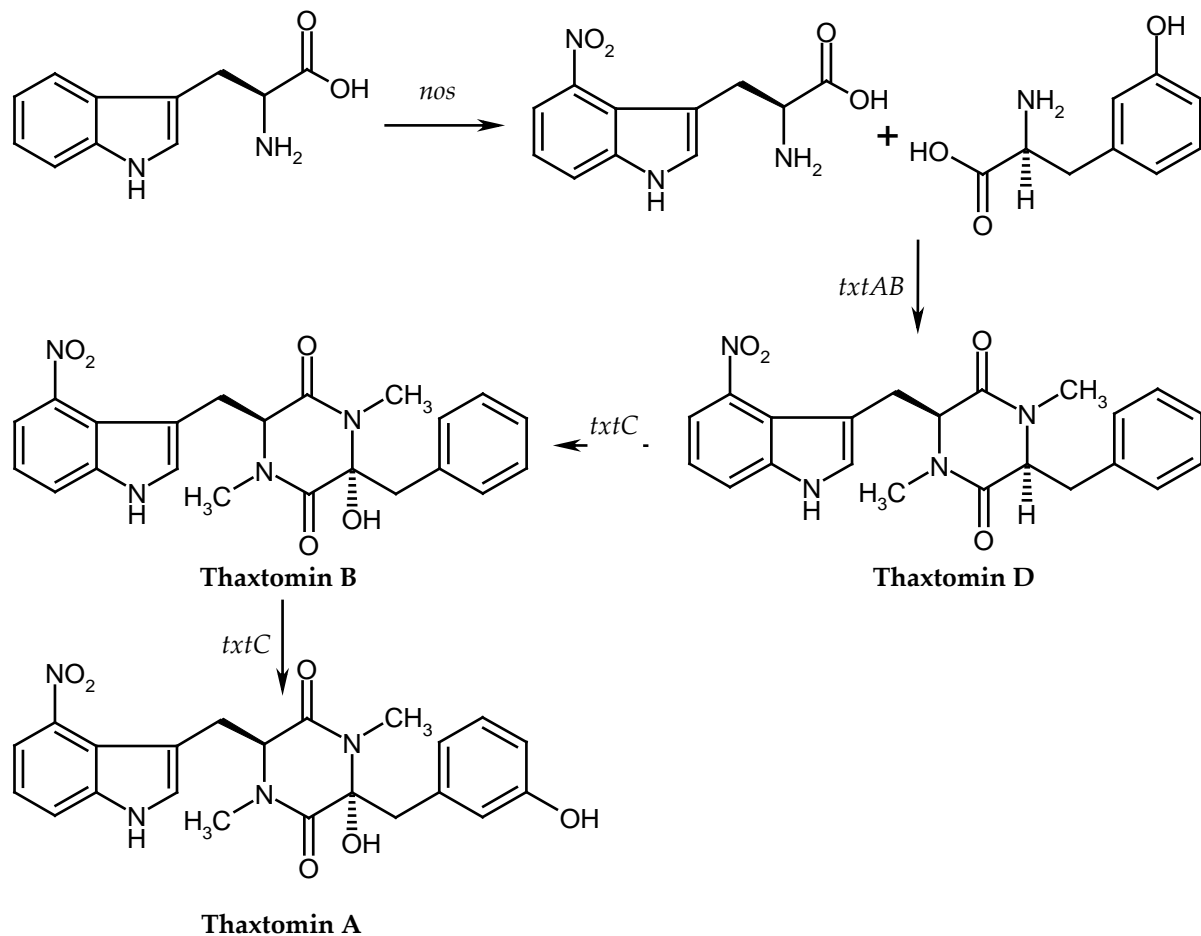


Abbildung 47: Schema für die Biosynthese des Phytotoxins Thaxtomin A

Die Entstehung von nitrierten Anthranilsäure-Derivaten dürfte hingegen auf die unspezifische Wirkung des Enzyms zurückzuführen sein. (KING et al., 1996, 1998, 2003).

4.4.2 Konservierung des Thaxtomin-Genclusters auf einer Pathogenen Insel (PAI)

Untersuchungen zur Gensequenz an *S. turgidiscabies* durch BUKHALID et al. (1997) sowie BUKHALID & LORIA, (2002) ergaben, dass der durchschnittliche GC-Gehalt des Gesamtgenoms bei etwa 72% liegt. Einzig eine hochkonservierte Region um das Thaxtomin Gencluster weist lediglich einen GC-Gehalt vor 54% auf. Diese Region enthält neben den im Kapitel 4.4.1 beschriebenen Genen *txtA-C* zahlreiche weitere Gene (vgl. Abbildung 49), welche für die Pathogenität des Streptomyceten von Bedeutung sind.

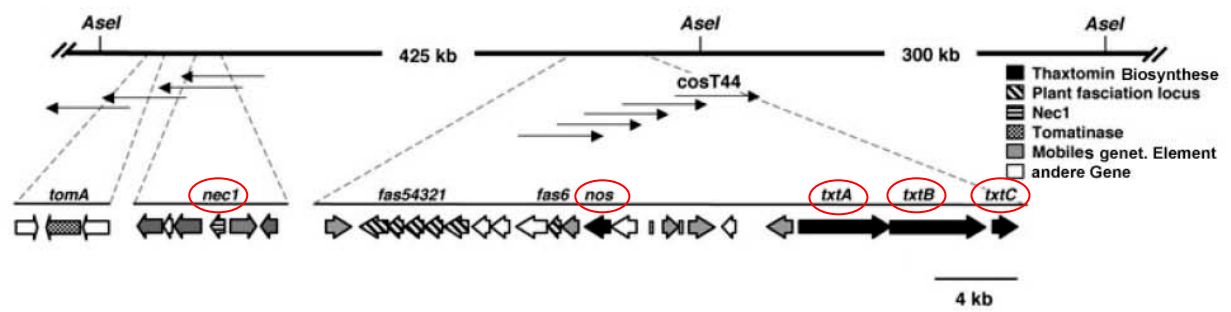


Abbildung 48: Organisogramm der Pathogenen Insel (PAI) von *Streptomyces turgidiscabies* (Abbildung: KERS et al., 2005).

Experimente zur Expression des *nec1*-Gens in *Streptomyces lividans* erlaubt diesem sonst nicht pathogenen Organismus Kartoffelscheiben zu kolonisieren und zu nekrotisieren (BUKHALID & LORIA, 2002). Da das Ausschalten des Genes Thaxtomin Biosynthese nicht beeinflusst, kann von einer unabhängigen Aktivität ausgegangen werden. Das Protein Nec1 scheint hierbei ein bislang nicht identifiziertes Zellangriffsziel besitzen. Neuere Untersuchungen von LORIA et al. (2008) lassen jedoch auf eine aktive Hemmung bzw. Suppression der pflanzlichen Immunabwehr schließen. Durch die seit kurzem verfügbare Genomsequenz von *S. scabies* kann von einer raschen Einordnung des *nec1* Gens sowie dem damit einhergehenden Nec1-Protein gerechnet werden.

Weitere Untersuchungen zum Thaxtomin-Gencluster zeigen eine Regulierung der Thaxtomin A Produktion auf genetischer Ebene (Joshi et al., 2007). Hierbei werden jene Gene, welche an der Thaxtomin Biosynthese beteiligt sind auf transkriptioneller Ebene reguliert. Das hierbei beteiligte Gen *txtR* ist ebenfalls auf der PAI konserviert. Ferner ist es hierdurch mit dem Biosynthesegencluster eng verzahnt. Es gehört zu Familie der AraC/XylS Regulatoren, welche eng an abiotische Umwelteinflüsse gekoppelt sind. Das Protein TxtR bindet hierbei spezifisch an Cellobiose, welcher für die Induktion der Thaxtomin A Biosynthese bekannt ist. Gleichzeitig wird Cellobiose zur Expression der Biosynthesegene benötigt und somit die Thaxtomin A Produktion reguliert.

Neben Genen, welche einen direkten Einfluss auf die Biosynthese bzw. die Regulation von Thaxtominen ausüben, wurden ferner einige Gene entdeckt, welche offenbar anderen Aufgaben beim Penetrationsprozess zukommen. Hierzu zählen sechs homologe Gene des pflanzlichen fasciation (*fas*)-Operons von *Rhodococcus fascians*. In *R. fascians* codieren diese Gene Enzyme für die Biosynthese eines Zytokins, das eine Blatt-Gallenbildung bei Pflanzen verursacht. Da eine Thaxtomin-Defektmutante von *S. turgidiscabies* auf *Arabidopsis* ebenfalls Gallen verursacht, kann vermutet werden, dass *S. turgidiscabies* Zytokine mit ähnlicher Aktivität produziert (LORIA et al., 2006, SURUP, 2007).

Außerdem konnte ein Gen identifiziert werden (*tomA*), welches homolog zur Tomatinase ist. Dieses gut charakterisierte Enzym phytopathogener Pilze entgiftet das Solanin. Solanin ist ein vor allem durch Nachtschattengewächse produziertes anti-mikrobielles Alkaloid, welches zu einer Störung der Signalprozesse bei der pflanzlichen Abwehr führt. (BOUARAB et al., 2002, SURUP, 2007).

Neben den beschriebenen Genen auf der PAI konnten ferner mehrere putative Transposasen nachgewiesen werden. Diese können für eine Translokation der umliegenden DNA sorgen (HEALY, 1999).

Die dargestellten Fakten sprechen für eine „Pathogene Insel“, die mobilisiert und in andere Spezies eingebaut werden kann. Zur experimentellen Überprüfung wurde ein 660 kb großes Stück der PAI aus *S. turgidiscabies* in *S. lividans* und *S. diastatochromogenes* überführt. Während *S. lividans*-Transkonjuganten keinen phytopathogenen Phänotyp entwickelten, waren *S. diastatochromogenes*-Transkonjuganten in der Lage, das Phytotoxin Thaxtomin A zu bilden und nekrotische Symptome auf Kartoffelscheiben ähnlich wie *S. turgidiscabies* hervorzurufen. (KERS et al. 2005).

4.5 Fütterungsversuche zu phytopathogenen Streptomyceten

4.5.1 Fütterung von NOS-Inhibitoren an *S. bottropensis* Dra 17

Iromycin A ist als unspezifischer Inhibitor von humanen NO-Synthase Isoformen patentiert (Japan Pat., 1998) (Japan Patent, 98, 237, 044, CA, 129, 244203s). Wie bereits in den Kapiteln zur Biosynthese sowie zu genetischen Untersuchungen zum Thaxtomin A Gencluster beschrieben, weisen die humane und bakterielle NOS eine hohe Similarität auf (WANG et al., 2007, LORIA et al., 2008). Hierauf aufbauend entstand die Hypothese, dass Iromycin A aus *Streptomyces bottropensis* Dra 17 bei der Biosynthese des Phytotoxins Thaxtomin A regulative Aufgaben zukommen könnten (SURUP, 2007). Aus diesem Grund wurde zu einer Kultur des Stammes in einem für die Thaxtomin A Produktion optimiertem Medium in regelmäßigen Zeitabständen Iromycin A zugefüttert. Hierbei wurde der Effekt auf die Thaxtomin A Produktion mittels Dünnschichtchromatographie, HPLC bzw. HPLC-MS Messungen beobachtet.

Im Vorfeld der Untersuchungen wurden hierzu Optimierungsversuche zur Thaxtominproduktion in Schüttelkulturen sowie eine Fermentationskurve von Thaxtomin A im Flüssigmedium aufgenommen. Dies geschah vordergründig um die optimalen Zeitpunkte zur Fütterung von Iromycin A zu terminieren.

Nach einheitlicher Aufarbeitung des Kulturfiltrates unterschiedlicher Medien sowie dem gebildeten Mycel, zeigten die Medien YMG sowie Hafer die größten Ausbeuten an Thaxtomin A. Diese Ergebnisse deckten sich auch mit Untersuchungen von KING et al. (1989), welcher *S. scabies* erstmals in Hafermedium kultivierte und damit die zur Strukturaufklärung des Phytotoxins erreichte. Auch SHIOMI et al. (2006) konnte aus Hafermedium Thaxtomin A isolieren und ebenfalls dessen Biosynthesevorläufer detektieren. Untersuchungen zur Thaxtominproduktion von BEAUSÉJOUR et al. (1999) auf unterschiedlichen Medien ergaben, dass Thaxtomin A vornehmlich auf ‚natürlichen‘ Medien wie beispielsweise Hafer und YMG produziert wird. Der Grund für die mangelnde Biosyntheseleistung auf synthetischen Medien konnte hierbei nicht abschließend geklärt werden. Auch in eigenen Versuchen (Ergebnisse nicht dargestellt) konnte die Zugabe des Disaccharides Cellobiose, welches für die Expression der Biosynthese verantwortlich ist (JOSHI

et al., 2007) auch auf synthetischen Medien keine Produktion des Phytotoxins auslösen. Seither gilt das Hafermedium als Standardmedium für die Erforschung der Thaxtomin A Biosynthese sowie deren Regulation (vgl. Kapitel 3.5).

Bei der Optimierung der Thaxtomin A Produktion im Hafermedium für den Stamm *S. bottropensis* Dra 17 wurden Veränderungen unterschiedlicher Fermentationsparameter (Kolbenvolumen, Optimierung der Belüftung (Schikanen), Füllvolumen, Schüttelgeschwindigkeit) miteinander kombiniert. Hierbei zeigte sich, dass vor allem hohe Schüttelgeschwindigkeiten sowie die Verwendung von Kolben mit Schikanen die Thaxtomin A Produktion positiv beeinflussen. Dies lässt auf einen fördernden Einfluss von Luftsauerstoff auf die Biosynthese schließen. Da in der Biosynthese von Thaxtomin A zwei durch P₄₅₀-Oxygenasen vermittelte Oxidationen enthalten sind (HEALY et al., 2000, KERS et al., 2004), spricht diese Beobachtung für einen hohen Sauerstoffbedarf dieser Reaktionsschritte.

Neben der Produktion des Phytotoxins mussten zusätzlich praktische Gesichtspunkte für den weiteren Versuchsaufbau berücksichtigt werden. Aufgrund des geringen Füllvolumens bei 100 mL Kolben und dem begrenzten Platz an Schüttelplätzen bei 1000 mL Kolben, wurden für die folgende Fermentationskurve sowie den Fütterungsversuchen fortan 300 mL Schüttelkolben verwendet.

Die Untersuchung zur Optimierung der Fütterungszeitpunkte ergab eine Produktion von Thaxtomin A ab der 16. Stunde. Die Konzentration des Phytotoxins verlief bis zur 60. hpi stetig und stagnierte anschließend. Aus diesem Grund wurden für den folgenden Fütterungsversuch die Injektionszeitpunkte der NOS-Inhibitoren gleichmäßig auf diesen Zeitraum verteilt. Parallel zur Untersuchung der Thaxtomin A Produktion wurde der pH-Wert der Kulturen vor der Aufarbeitung überprüft. Hierbei zeigte sich ein für Streptomyceten typischer zeitlicher pH-Verlauf (SURUP, 2007).

Das Fütterungsexperiment mit NOS Inhibitoren erfolgte unter den identischen Bedingungen wie bei den vorangegangenen Untersuchungen. Zur Darstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden unterschiedliche Mengen Iromycin A (6 mg, 2 mg, 0,6 mg, 0,2 mg, 0,06 mg) in jeweils 2 mL Methanol gelöst und in sieben Etappen zwischen der 16. und 60. hpi mittels Einwegspritze zugefüttert. Methanol erwies sich hierbei als optimales

Lösungsmittel, da Iromycine hierbei eine gute Löslichkeit besaßen. Ferner diene das Methanol gleichzeitig als Desinfektionsmittel zur Sterilisation des Iromycins, wodurch große Verluste des Fütterungsdetergenz bei der Sterilfiltration ausblieben. Als Kontrollen wurden neben Methanol auch die literaturbekannten NOS-Inhibitoren NNA und NMMA (NUSZKOWSKI, 2001, SCHLEICHER, 2005) auf identische Weise zugefüttert.

Die analytische Auswertung der Kulturfiltrate, welche zuvor einheitlich aufgearbeitet wurden, ergab erwartungsgemäß eine starke Inhibition durch die beiden Positivkontrollen (NNA, NMA). Die Fütterungsvarianten mit stammeigenen Iromycin A konnten hingegen nur sehr geringe Effekte auf die Bildung des Phytotoxins Thaxtomin A ausüben. Gleichzeitig wurden in den Varianten mit Iromycin A als Fütterungsdetergenz große Mengen von dessen Abbauprodukt Iromycin B detektiert, welche mit zunehmender Fütterungsmenge an Iromycin A zunahm. Dieses lässt vermuten, dass Iromycin A ab einem gewissen Zeitpunkt des Fütterungsexperimentes rasch zu Iromycin B oxidiert wurde. In diesem Fall korrelieren die vorliegenden Ergebnisse mit Untersuchungen von SURUP, SCHLEICHER und OESS (2007), welche ebenfalls nur geringe Effekte bei der NOS-Inhibition von Iromycin B an Eierstöcken des Chinesischen Hamsters feststellten. Aufgrund des extrem schnellen Abbaus des zugesetzten Iromycin A kann man eine enzymatische Reaktion des Streptomyceten nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen von LORIA et al. (2008) geben darüber Aufschluss, dass die Biosynthese von Thaxtomin A sehr fein reguliert ist. Auf dieser Grundlage, dass Iromycin A bei *S. bottropensis* in die Regulation von Thaxtomin A einbezogen ist, kann man vermuten, dass die Biosynthesegene von Iromycin A während der Thaxtomin A Produktion inhibiert sind bzw. spezifische Enzyme dafür sorgen, dass lediglich das oxidative und inaktive Abbauprodukt Iromycin B gebildet wird. Im Falle dieses Fütterungsversuches könnte das zugefütterte Iromycin A direkt enzymatisch durch den Streptomyceten ‚detoxifiziert‘ worden sein. Diesen Sachverhalt unterstützt auch die Tatsache, dass in ‚Thaxtomin A potenten Medien‘ Iromycin A in sehr geringen Mengen produziert wurde, wobei größere Mengen des oxidativen Abbauprodukts Iromycin B in diesen Medien zu finden waren.

Um diese Tatsache zu untermauern, wurde der Versuch an einem phytopathogenen Streptomyceten wiederholt, welcher selber nicht in der Lage ist, Iromycine zu bilden und

somit auch nicht über einen entsprechenden Enzymapparat verfügt, welcher die Iromycin-Bildung inhibiert bzw. Iromycin A ‚detoxifiziert‘.

4.5.2 Fütterung von NOS-Inhibitoren bei *Streptomyces scabies* 1/3

Um den beschriebenen Fütterungsversuch zu wiederholen, wurde der Stamm *Streptomyces scabies* 1/3 ausgewählt. Vorversuche in unterschiedlichen Flüssigmedien (nicht dargestellt) zeigten, dass *S. scabies* 1/3 nicht in der Lage ist, Iromycine zu synthetisieren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass hierfür kein entsprechender Enzymapparat vorliegt.

Analog zu den Vorversuchen bei *S. bottropensis* Dra 17 wurden ebenfalls bei *S. scabies* 1/3 Vorversuche zur Medienoptimierung durchgeführt und eine Fermentationskurve aufgenommen:

Die Untersuchungen zur Medienoptimierung orientierten sich dabei an der Thaxtominproduktion des Streptomyceten in Medien mit unterschiedlichen Haferquellen. Untersuchungen von BEAUSÉJOUR et al. (1999) zeigten, dass Pflanzenteile für die Thaxtomininduktion wichtig sind. Als Haferquellen dienten hierbei Haferkörner, Haferkörner mit Spelze, zwei unterschiedliche Hafermehlpräparate sowie unterschiedliche Sorten an Haferkleie. Hinsichtlich der Fermentationsbedingungen gab es keine Unterschiede. Bei der dünnschichtchromatographischen Auswertung der Thaxtomin A Produktion konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten festgestellt werden. Eine Induktion der Thaxtominproduktion konnte daher nicht belegt werden. Aus praktischen Gesichtspunkten wurde für die weiteren Versuche das bereits vorgemahlene Hafermehl bzw. die geschrotete Haferkleie verwendet.

Die Aufnahme der Fermentationskurve an *Streptomyces scabies* 1/3 ergab ähnliche Ergebnisse wie bereits bei *S. bottropensis* Dra 17. Dies spricht hierbei für die hohe Simultanität des Thaxtomin Genclusters in unterschiedlichen phytopathogenen Streptomyceten sowie der damit verbundenen Möglichkeit des horizontalen Gentransfers, welcher durch KERS et al. (2005) beschrieben wurde. Auch bei *S. scabies* begann die Thaxtomin A Produktion im Hafermedium bei etwa 12 hpi und produzierte stetig bis 66 hpi. Auffällig war hierbei die intensive Produktion weiterer Thaxtomine nach der Stagnation der Hauptkomponente. Ähnliche Effekte wurden bisher noch nicht beschrieben.

Das Fütterungsexperiment an *Streptomyces scabies* 1/3 erfolgte unter den identischen Bedingungen wie zuvor bei *S. bottropensis*. Einzig die zusätzliche Variante Iromycin S, ein totalsynthetisch hergestelltes *tert*-Butylderivat des Iromycins, welches schwerer abbaubar ist, ergänzt den Versuch (SURUP, 2008). Ferner wurden die angesetzten drei Wiederholungen geteilt und jeweils zwei mit dem P₄₅₀ Oxidase-Inhibitor Ancymidol versetzt. Hierdurch sollte erreicht werden, dass der oxidative Abbau von Iromycin A zu Iromycin B verlangsamt oder ganz unterbrochen wird. Zwar geht damit die Gefahr einher, dass die Biosynthese von Thaxtomin A ebenfalls unterbrochen wird und sich dadurch Thaxtomin D und Thaxtomin B akkumulieren (SURUP, 2007). Dies liegt darin begründet, dass das Gen *txtC* eine cytochrome P₄₅₀-Monooxygenase kodiert und somit der letzte Biosyntheseschritt zu Thaxtomin A unterbrochen werden könnte (HEARLY et al., 2000).

Die Auswertung mittels HPLC und HPLC-MS ergab im Gegensatz zur vorangegangenen Fütterung eine deutliche Inhibition aller im Versuch eingesetzten Fütterungssubstanzen. Ferner ist bei den Iromycin A Varianten eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennbar. Im Gegensatz zu der Fütterung an *S. bottropensis* Dra 17 bewirkten bereits Zugaben von 1,33 mg Iromycin A pro Kolben ähnliche inhibitorische Effekte wie die literaturbekannten NOS-Inhibitoren NNA bzw. NMMA in gleicher Aufwandsmenge. Übertroffen wurden diese Ergebnisse durch die Zugabe des *tert*-Butylderivats Iromycin S. Hier konnte die Thaxtomin A Bildung fast komplett inhibiert werden. Die Zugabe des P₄₅₀ Oxidase-Inhibitors Ancymidol erzielte hingegen keinen einheitlichen Effekt. Zwar konnte der Inhibitor die Biosynthese von Thaxtomin A im beschriebenen Schritt nicht unterbinden, doch ist ferner kein eindeutiger Effekt beim Oxidationsschutz von Iromycin A erkennbar bzw. die Unterschiede von Varianten mit und ohne Ancymidol sind uneinheitlich. Ferner konnten bei LC-MS Untersuchungen im aufgearbeiteten Kulturfiltrat kein Thaxtomin D sowie kein Thaxtomin B detektiert werden

Ebenfalls nur geringe Mengen von den zugesetzten Fütterungsdetergenzien konnten im Kulturfiltrat nachgewiesen werden. Einzig in den Fütterungsvarianten mit hohem Iromycin A-Aufwand konnten geringe Mengen detektiert werden. Gleiches gilt für den Nachweis von Iromycin B und S. Neben den Untersuchungen zur Produktion von Thaxtominen und Iromycinen wurden im Vorfeld der chemischen Extraktion kleine Mengen

der einzelnen Kulturen verdünnt und auf die Anzahl der lebenden Zellen untersucht. Hierbei waren bei keiner Variante signifikante Unterschiede erkennbar. Es ist daher davon auszugehen, dass keines der Fütterungssubstanzen einen direkten Einfluss auf die Menge der gebildeten Bakterien in der Kultur hatte. Eine Beeinflussung der Anzahl an Organismen im Filtrat auf die Konzentration der einzelnen Sekundärmetaboliten ist daher ebenfalls auszuschließen.

Betrachtet man sich die Ergebnisse, stellt sich die Frage, warum Ancymidol nur einen geringen bzw. stark uneinheitlichen Einfluss auf den oxidativen Abbau des Iromycins und die damit verbundene Aktivität des NOS-Inhibitors hatte. Ferner wird die Frage aufgeworfen, warum Ancymidol als P₄₅₀ Oxidase-Inhibitor ebenfalls nicht in der Lage war den letzten Schritt der Thaxtomin A Biosynthese entscheidend zu hemmen. Untersuchungen von SURUP (2007) zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem oxidativen Abbau von Iromycin A zu Iromycin B und der eingesetzten Menge an Ancymidol. Die im Fütterungsversuch verwendete Menge an Ancymidol (22,5 mg/Kolben) entsprachen der Konzentration, bei welcher SURUP einen deutlichen Effekt auf das Oxidationsverhalten ermittelte. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist der Abbau des Ancymidols seitens des Streptomyceten bzw. eine Aufnahme des Iromycins seitens *S. scabies*. Letztes würde auch die nur geringen Mengen an Iromycin A, B und S in den Kulturfiltraten erklären.

Vergleicht man die Ergebnisse des Fütterungsversuches an *S. scabies* mit den Untersuchungen an *S. bottropensis* ist festzustellen, dass Iromycin A im Kulturfiltrat von *S. scabies* 1/3 eine weitaus höhere Aktivität aufweist. Dies wird an der deutlichen Hemmung der Thaxtominproduktion deutlich. Ob diese Tatsache auf einer langsameren Oxidation zu Iromycin B beruht, kann nicht abschließend geklärt werden. Jedoch ist auch davon auszugehen, dass der Abbau in der Flüssigkultur nicht auf rein chemische Vorgänge zurückzuführen ist, sondern in erster Linie auf einen aktiven enzymatischen Abbau seitens *S. bottropensis* Dra 17. Ferner stellt dies einen Anhaltspunkt dafür dar, dass Iromycin A bei *S. bottropensis* direkt an die Thaxtomin A Biosynthese gekoppelt ist (KERS, 2004). Zwar liefern die gewonnenen Ergebnisse noch keine Erkenntnisse über den zeitlichen Verlauf der Biosynthese beider Stoffe im natürlichen Habitat und der damit verbundenen Aufgabe von

Iromycinen in der Natur, doch könnte Iromycin A ein wichtiger Faktor bei der Thaxtomin Biosynthese von *S. bottropensis* Dra 17 sein.

Bei der Regulation des Phytotoxins stellt sich die Frage, warum bei der Biosynthese derart vielfältige Regulierungsfaktoren aufgebaut werden. Hierbei sind in erster Linie die direkte Hemmung auf transkriptionellem Weg über das Gen *txtR* zu nennen, aber auch die bis heute ungeklärte Funktion des *nec1*-Gens und dessen zugehörigen Proteins zu nennen (JOSHI et al., 2007, LORIA et al., 2008). Der Vorteil der Regulation über einen ‚aktiven Sekundärmetaboliten‘ gegenüber einer Regulation auf genetischer Ebene ist, dass der für die Biosynthese notwendige Enzymapparat bereits vollständig exprimiert vorliegen kann. Dennoch wird die Biosynthese von Thaxtomin A auf der ersten Stufe der Biosynthese unterdrückt. Erst nach Abbau von Iromycin A zu Iromycin B beginnt der vorhandene Biosyntheseapparat zu arbeiten. Ferner scheint die Regulation des ersten Schrittes der Biosynthese sinnvoll, da die nachfolgenden Vorläufermoleküle bereits eine schädigende Wirkung gegenüber der Wirtspflanze haben. Durch die Inhibierung der Biosynthese ist das Pathogen in der Lage, sich beispielsweise aus unanständig verletzten Zellen der Wirtspflanze (mechanische Schäden, etc.) zu ernähren ohne eine Immunabwehr der Pflanze zu induzieren. Eine aktive Penetration des Wirtsgewebes ist zu dieser Zeit, aufgrund des mangels an Thaxtomin A nicht möglich. Ist eine ausreichend starke Population aufgebaut, wird Iromycin A abgebaut und Thaxtomin A, aufgrund des bereits exprimierten Biosynthesegenclusters in großen Mengen produziert. Eine solche Sekundärmetabolit-Sekundärmetabolit-Hemmung ist allerdings bisher in der Literatur noch nicht bekannt. Eine weitere Möglichkeit der NOS-Aktivität der Iromycine, ist eine direkte Schädigung bzw. Suppression der pflanzlichen NOS, welche Bestandteil der pflanzlichen Abwehrreaktion ist (CHANDOK, 2003; HALLMANN et al., 2007, GUO et al, 2003).

4.5.3 Einfluss cellobiosehaltiger Medien auf die Produktion von Iromycinen und Thaxtominen

Die Idee zu Fütterungsexperimenten mit Cellobiose beruht auf Untersuchungen von JOSHI et al. (2007). Sie zeigen eine Regulierung der Thaxtominproduktion auf genetischer Ebene, verursacht durch die Anwesenheit von Cellobiose. Das hierbei beteiligte *txtR*-Gen fungiert

dabei als AraC/XylS Regulator, welcher stark durch abiotischen Umwelteinflüssen reguliert ist. Durch die gleichzeitige Funktion des *Txt*-Proteins, welches spezifisch an Cellobiose bindet sowie der Tatsache, dass Cellobiose zur Expression der Thaxtomin A Biosynthese-Gene benötigt wird, wurden die Auswirkungen auf *Streptomyces bottropensis* Dra 17 sowie *S. scabies* 1/3 näher beleuchtet. Vorversuche wurden hierbei zunächst zur Thermostabilität von Cellobiose unternommen. Zwar wird von JOSHI et al. (2007) Cellobiose ausschließlich steril filtriert in der Nährlösung eingesetzt, doch verwendeten andere Quellen Cellobiose auch im autoklavierten Zustand. Hierzu wurden unterschiedliche Ansätze eines YMG-Mediums mit verschiedenen Mengen an Cellobiose versetzt und mit *S. scabies* 1/3 inokuliert (vgl. Kapitel 3.5.3). Hierbei wurde kein Unterschied zwischen autoklavierter und steril filtrierter Cellobiose festgestellt. Zwar verfärbten sich Medien mit zugesetzter Cellobiose nach dem Autoklavieren leicht bräunlich, was für ein karamellisieren der Cellobiose spricht, doch konnte der Stamm offenbar dennoch die Cellobiose als solche ‚identifizieren‘. Unterschiede gab es hingegen bei den unterschiedlichen Cellobiosekonzentrationen im Medium. Hier decken sich die Untersuchungen mit Ergebnissen von JOSHI (2007), welcher ebenfalls ein Maximum der Thaxtomin A Produktion bei einer Cellobiose-Konzentration von 7 g/L in der Kultur beschreibt. Eine weitere Erhöhung der Thaxtomin A Konzentration bei höherer Cellobiose-Konzentration konnte nicht festgestellt werden.

Weiteren Untersuchungen an *S. bottropensis* Dra 17 wurden die Ergebnisse von *S. scabies* 1/3 zu Grunde gelegt und in verschiedenen Medien 7 g/L Cellobiose zugesetzt. Als Kontrolle dienten jeweils Medien ohne Cellobiose Zusatz. Die Thaxtomin A Produktion zeigte analog zu *S. scabies* eine deutliche Erhöhung sogar bei Medien, welche bereits ohne Cellobiose die Produktion von Thaxtomin A unterstützen. Auch die Produktion von Iromycin A und Iromycin B war bei nahezu allen Medien mit Cellobiose leicht erhöht. Vor dem Hintergrund der Erkenntnisse aus den vorangegangenen Fütterungsversuch lässt sich dieser Effekt nicht direkt erklären. Einzig eine zeitliche Verschiebung der Produktion der einzelnen Metaboliten steht diesem entgegen. Dem widerspricht jedoch ein potentieller enzymatischer Abbau von Iromycin A speziell im Hafermedium. Weitergehende Untersuchungen mit einer *txtR* Knock-out-Mutante könnten hierbei weitere Aufschlüsse über die Verzahnung der einzelnen Regulationsmechanismen der Thaxtomin A Biosynthese geben.

4.6 Untersuchungen zur Regulationsaktivität von Iromycinen *in planta*

Die Untersuchungen zur Regulation von Iromycinen *in planta* stellen die Fortführung der Untersuchungen an *Streptomyces bottropensis* Dra 17 in Flüssigkulturen dar. Hierbei gehen die Überlegungen auf Untersuchungen von BODE et al., (2002) zurück, wonach speziell Streptomyceten eine hohe biologische Diversität an Sekundärmetaboliten bei Veränderung der Kulturbedingungen aufweisen. Erste Schritte bei Experimenten sollten darüber Aufschluss geben, ob *Streptomyces bottropensis* Dra 17 auch auf dem natürlichen Wirt Kartoffeln in der Lage ist, Iromycine zu produzieren oder ob dies nur in dafür geeigneten Flüssigkulturen der Fall ist. Ferner sollten Untersuchungen zur zeitlichen Produktion der Sekundärmetaboliten Iromycin A, Iromycin B sowie Thaxtomin A Aufschluss darüber geben, welche Rolle Iromycin prinzipiell bei der Penetration des Wirtsgewebes spielt. Bei diesen Untersuchungen wurden daher neben der Quantifizierung der Sekundärmetaboliten auch die Produktion der pathogenen Biomasse mittels Real-Time PCR überprüft. Weitere Untersuchungen sollten dabei darüber Aufschluss geben, in wie weit sich die Produktion von Iromycinen auf die Phytopathogenität des Streptomyceten auswirkt. Hierzu wurden neben dem bereits erwähnten Iromycinproduzenten Dra 17 auch weitere *S. bottropensis* sp. sowie einige *S. scabies* sp. Stämme sowohl auf die Produktion ihrer Sekundärmetaboliten (Iromycine, Thaxtomine) sowie auf die Bildung bakterieller Biomasse *in planta* mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. Abschließend sollten Experimente an Radieschensamen, welche ebenfalls ein Wirt phytopathogener Streptomyceten sind, Aufschluss über den direkten Einfluss von Iromycinen und Thaxtominen auf die Keimung und damit auch über die Funktion der einzelnen Metaboliten geben. Um eventuelle enzymatische oder sonstige für Pathogenität relevante Einflussfaktoren des Streptomyceten auszuschließen, wurden diese Untersuchungen ausschließlich mit den Reinsubstanzen Iromycin A und Thaxtomin A durchgeführt. Quantifiziert wurden die Ergebnisse durch die Auswaage der gebildeten pflanzlichen Biomasse sowie durch spektralphotometrische Messung des Chlorophylls extrahierter Keimlinge. Eine abschließende Wiederholung des Versuches an *Arabidopsis thaliana* sollte die Ergebnisse untermauern (vgl. Kapitel 3.6).

4.6.1 Inokulation von Kartoffeln, Extraktion von Sekundärmetaboliten und quantitative Bestimmung der bakteriellen Biomasse mittels Real-Time PCR

Bei Vorversuchen zur Inokulation wurden die Kartoffelscheiben zunächst nach einem Protokoll von (LORIA et al., 1995) inokuliert und auf unterschiedlichen ‚Medien‘ inkubiert. Die Bedingungen der Inkubation waren dabei jeweils identisch. Hierbei wurde deutlich, dass eine Inkubation der Kartoffelscheiben sowohl aus praktischen als auch aus mikrobiologischen Gesichtspunkten die besten Ergebnisse lieferte. Problematisch bei den Vorversuchen war hierbei, dass eine vollständige Sterilisation der Kartoffelscheiben nicht möglich war. Zwar konnten durch die Heißwasserbehandlung der kompletten Knolle sowie einem ethanolschen Tauchbad der Kartoffelscheiben ein großer Teil oberflächlich anhaftender Bakterien, Hefen und Pilze abgewaschen bzw. abgetötet werden, doch war die ‚Sterilisation‘ nur von kurzer Dauer. Speziell auf Medien, bei welchen die Kartoffelscheibe auf der Unterseite keinen Luftkontakt hatte, fingen diese sehr schnell an zu faulen. Ein typisch hefiger Geruch lies auf eine Kontamination schließen. Ähnliche Effekte ließen sich zwar auch bei einer Inkubation auf Glasperlen erkennen – dies aber meist erst nach sehr langen Inkubationszeiten. Versuche, die Kartoffelscheiben nach dem Vorbild der Samensterilisation nach SPLIVALLO (2009) zu inokulieren mussten verworfen werden, da das eingesetzte Wasserstoffhypochlorit das Anwachsen des Inokulums auf der Kartoffelscheibe entscheidend inhibierte.

Auch bei der eigentlichen Inkubation zeigten sich sehr große Unterschiede. Zwar erbrachte eine Inokulation als Tauchbad in eine Flüssigkultur die stärkste Bildung von Nekrosen, doch konnte keine ausreichende Spezifität der Ergebnisse aufgrund der nicht nachvollziehbaren Menge an Inokulum hergestellt werden. Auch die Wahl des Inokulationsmediums erbrachte große Unterschiede. Iromycin A haltiges Medium (Medium S nach Inokulation mit *S. bottropensis* Dra 17) konnte an Kartoffeln die stärkste Bildung von Nekrosen auslösen. Bei allen anderen getesteten Stämmen hingegen traten die größten Effekte bei Verwendung von YMG-Medium auf. Diese ersten Ergebnisse verstärken hierbei die Vermutung, dass Iromycin A auch einen direkten Einfluss auf das Infektionsvermögen von Streptomyceten aufweisen könnte (SURUP, 2007). Abschließend wurden im Rahmen der Inkubation bei mehreren

Temperaturen auf das Anwachsen der Streptomycceten auf Kartoffelscheiben untersucht. Hierbei gewährleistete erwartungsgemäß eine Anfangstemperatur von 28 °C den besten Anwuchseffekt. Eine anschließende Absenkung der Temperatur gewährleistete hingegen ein gleichmäßigste Wachstum. Eine Inokulation bei Raumtemperatur, ähnlich wie bei KERS et al. (2005) sowie LORIA et al. (1995), verursachte eine entscheidende Verlängerung der Entwicklung der Besiedlung des Wirtsgewebes (bis zu 8 Tage), welches mit einer verstärkten Kontaminationsgefahr einherging. Speziell gegen Ende einer 8-tägigen Inkubation brach die Konsistenz des Wirtsgewebes zunehmend zusammen, ohne dass auf der Unterseite nennenswerte Nekrosen zu finden waren. Speziell vor dem Hintergrund der anstehenden Analytik mittels Real-Time PCR bestand die Gefahr, dass der teilweise saprophytisch lebende Organismus (MAYFIELD et al., 1972) anfängt, sich selber zu zersetzen.

Die Extraktion der Sekundärmetaboliten aus Kartoffeln sowie die parallel dazu durchgeführte Isolierung der Gesamt-DNA erfolgten an gefriergetrockneten Kartoffelscheiben. Vorteil dieser Methode war, dass sowohl die chemische Extraktion sowie die DNA-Isolation am selben Ausgangsmaterial durchgeführt werden konnten und somit große Abweichungen b den Ergebnissen ausgeschlossen werden konnten. Ferner hatte die Gefrier Trocknung speziell bei der Extraktion der Sekundärmetaboliten den Vorteil, dass bei Verwendung von trockenem Ethylacetat kaum Stärke in die Probe gelangte, was aufwendige Extraktionen mit Chloroform überflüssig machte. Auch bei der Isolierung der Gesamt-DNA aus gefriergetrockneten Kartoffelscheiben konnte eine enzymatische Zersetzung der DNA im Gegensatz zur Verwendung von Frischproben ausgeschlossen werden. In beiden Fällen konnte die Handhabbarkeit der Untersuchungen mit gefriergetrockneten Proben entschieden verbessert werden. Bei der quantitativen Bestimmung der bakteriellen Biomasse mittels PCR konnte auf ein Protokoll von RINTALA & NEVALINEN (2006) zurückgegriffen werden. Zwar wurde bei den vorgeschlagenen Primern nicht speziell auf die pathogene Insel der Thaxtomin A Biosynthese zurück gegriffen, (LORIA et al., 2008) doch amplifizieren die Primer eine hochkonservierte Region des Gesamtgenoms, welche beinahe alle bekannten Streptomycceten abdeckt.

4.6.2 Fermentationskurve auf Kartoffelscheiben

Wie bereits in der Einleitung dieses Kapitels erwähnt, ist die Darstellung der zeitlichen Entwicklung von Sekundärmetaboliten und damit verbunden der bakteriellen Biomasse maßgeblich für die Charakterisierung der Aufgabe von Iromycinen bei der Penetration der Wirtspflanze.

Die zeitliche Produktion der Sekundärmetaboliten zeigt eine deutliche Trennung zwischen ‚Produktionsintervallen‘ von Iromycin A und Thaxtomin A auf Kartoffelscheiben. Das ‚Produktionsintervall‘ von Iromycin B hingegen verläuft synchron mit der Biosynthese von Thaxtomin A. Eine derartige Verschiebung von Iromycin A und Thaxtomin A konnte in eigenen Untersuchungen sowie in Untersuchungen von SURUP (2007) in keinem Flüssigmedium belegt werden. Ferner ist das extrem hohe Konzentration von Iromycin B, im Vergleich zu Iromycin A auffällig. Betrachtet man hierzu parallel die Entwicklung der bakteriellen Biomasse in den Kartoffelscheiben, so ist die Simultanität zur Produktion des NOS Inhibitors Iromycin A auffallend. Analog ist mit dem Beginn der Produktion des Phytotoxins also des Virulenzfaktors Thaxtomin A (LORIA et al., 2006) eine Verminderung der Biomasse des Phytopathogens *S. bottropensis* Dra 17 feststellbar (vgl. Kapitel 3.6.2).

Hierbei ist kritisch festzustellen, dass die Ergebnisse der Real-Time PCR eine sehr große Varianz der einzelnen Wiederholungen aufweist. Ob diese durch Abweichungen beim Wachstum des Streptomycceten *in planta* bzw. durch Differenzen bei der Isolierung der Gesamt-DNA zustande kam, lässt sich nicht mit absoluter Bestimmtheit feststellen. Eine Wiederholung im größeren Maßstab (mehr Wiederholungen) scheint daher angebracht.

Die zeitliche Trennung der Produktion der Sekundärmetaboliten Iromycin A und Thaxtomin A lässt auf die erwartete Inhibierung der Thaxtomin A Biosynthese, welche bereits in den Fütterungsversuchen nachgewiesen wurde, schließen. Ferner eröffnet die frühe Produktion des NOS-Inhibitors den Gedankengang, dass Iromycin einen Einfluss auf die pflanzliche Immunabwehr nimmt und somit eine Signalkaskade unterbindet (HELDT, 2003). Eine eingehendere Untersuchung der Auswirkungen von Iromycin A zu einem frühen Stadium der Penetration scheint daher angebracht. Hierbei könnte Iromycin A die NOS hemmen d.h. die Oxidation von Arginin verhindern und durch das enge Zusammenspiel der Signalsubstanzen die Bildung von Phytoalexinen bzw. die Bildung von reaktiven

Sauerstoffspezies unterbrechen und somit die pflanzliche Immunabwehr entscheidend schwächen. Einen Einfluss von Iromycin A ließe sich daher durch Untersuchungen jener erwähnten ‚Abwehrsubstanzen‘ bzw. durch Analyse der gebildeten Salicylsäure näher beleuchten (HELDT, 2003, GUO et al., 2003). Ferner könnten phytopathologische Untersuchungen mit Iromycin A-Knock-out Mutanten die Pathogenität näher beleuchten. Hierzu müsste jedoch das Iromycin Gencluster zunächst lokalisiert und ausgeschaltet werden.

Auch das starke Auftreten von Iromycin B parallel zur Thaxtomin A Produktion wirft mehrere Fragen auf. Zwar ist ein Teil des produzierten Iromycin B durch den Abbau von Iromycin A zu erklären, doch kann dies nicht die einzige Quelle darstellen. Daher kann darüber spekuliert werden, ob zu Beginn der Thaxtomin A Produktion, ein Enzym aktiviert wird, welches Iromycin A über eine P₄₅₀ Oxidase abbaut. Hierbei wird die weitere Produktion von Iromycin A keinesfalls gestoppt – neu gebildetes Iromycin A wird lediglich direkt nach der Biosynthese oxidiert und somit deaktiviert. Hiermit ließe sich einerseits die Produktion von Thaxtomin A, welches in Anwesenheit von Iromycin A nicht gebildet würde sowie andererseits der enorme Anstieg von Iromycin B erklären. In wieweit hierbei der gleichzeitige Rückgang der bakteriellen Biomasse zu erklären ist, kann anhand der gegebenen Daten nicht eindeutig belegt werden. Dem Rückgang der bakteriellen Biomasse zu Beginn der Thaxtomin A Produktion widerspricht ferner die Tatsache, dass das Phytotoxin als Hauptvirulentfaktor der Pathogenität von Streptomyceten gilt (KING et al., 1989, GOYER et al., 1998, KERS et al., 2005). Man sollte daher davon ausgehen, dass zu Beginn der Thaxtomin A Produktion und der damit einhergehenden Eröffnung neuer Ressourcen ein Anstieg der bakteriellen Biomasse zu erwarten ist. Dies belegt auch die Tatsache, dass parallel zum Beginn der Thaxtomin A Produktion erste deutliche Nekrosen auf der Oberfläche der Kartoffelscheiben erkennbar waren. Einzig der saprophytische Abbau von Streptomyceten in nekrotisierten Bereichen der Kartoffelscheibe könnte hierbei eine Erklärung darstellen. In wieweit hierbei ebenfalls inaktives Iromycin B aus den Zellen frei wird kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Dies unterstützt jedoch die Tatsache, dass zum Ende des beobachteten Fermentationszeitraumes (> 90 hpi) die inokulierten

Kartoffelscheiben ihre Zell-Integrität beinahe verloren haben und gleichzeitig keine bakterielle Biomasse mehr nachweisbar war.

4.6.3 Phytopathogenität verschiedener Streptomyceten

Um eine allgemeine Aussage zur Phytopathogenität verschiedener Thaxtomin A Produzenten treffen zu können, wurden diese auf Kartoffelscheiben angezogen und nach 72 Stunden auf Sekundärmetaboliten bzw. auf die bakterielle Biomasse untersucht.

Hierbei gab es große Unterschiede bei der Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A und der damit verbundenen potentiellen Virulenz (KING et al., 1989, GOYER et al., 1998, KERS et al., 2005). Die Phytotoxin Produktion der Stämme *S. bottropensis* DSMZ 40262 und 40800 lag hierbei zwischen 0 und 3 mg/kg Kartoffelmasse. Die eingesetzten *S. scabies* Stämme wiesen hierbei Thaxtomin A Gehalte zwischen 7 und 18 mg/kg auf, während *S. bottropensis* Dra 17 nach 72 Stunden einen Gehalt von etwa 5 mg/kg aufwies. Gleichzeitig wurden etwa 4 mg/kg Iromycin A und 15 mg/kg Iromycin B detektiert. Alle inokulierten Streptomyceten konnten hierbei leichte bis deutliche Nekrosen auf der Kartoffeloberfläche aufweisen. Neben der Untersuchung der gebildeten Sekundärmetaboliten wurde auch die gebildete Biomasse nach 72 hpi auf den inokulierten Kartoffelscheiben untersucht. Hierbei konnten ausschließlich bei den Stämmen *S. scabies* 1/3 sowie *S. bottropensis* Dra 17 eindeutige Nachweise der Biomasse erbracht werden. Eine direkte Dosis-Wirkungs-Beziehung bei reinen Thaxtomin A Produzenten nach LORIA et al., 2006 konnte daher bestätigt werden. Einzig der Stamm *S. bottropensis* Dra 17 konnte trotz geringer Thaxtomin A Produktion (5 mg/kg) die größten Mengen an bakterieller Biomasse auf dem Wirtsgewebe bilden. Aufgrund dieser Tatsache könnte man vermuten, dass Iromycin A einen direkten Einfluss auf die Pathogenität von Streptomyceten aufweist. Zwar ist es auch möglich, dass der Iromycinproduzent *S. bottropensis* Dra 17 eine andere Thaxtomin A Produktionsdynamik aufweist als Streptomyceten, welche nicht über die Fähigkeit verfügen, Iromycine zu produzieren. Daher waren zum Zeitpunkt der Probennahme bereits große Teile des gebildeten Phytotoxins Thaxtomin A abgebaut. Hierzu wären weitergehende Untersuchungen zur zeitlichen Bildung von Thaxtomin A auf Kartoffelscheiben notwendig.

Um die Fähigkeit der Iromycin Produktion seitens der bisher als reine Thaxtomin A Bilder bekannten Stämme zu untersuchen, wurden diese in speziell für die Iromycin A Biosynthese optimierten Flüssigmedien untersucht. Auch hier zeigten diese Stämme keinerlei Produktion des NOS-Inhibitors.

4.6.4 Einfluss von Iromycin A und Thaxtomin A auf die Keimung von Radieschen und Ackerschmalwand

Aufgrund der stark eingeschränkten Verfügbarkeit der Sekundärmetaboliten wurde ein Keimungstest von SPLIVALLO et al. (2009) am *Arabidopsis thaliana* zunächst stark miniaturisiert, wodurch eine 200-fache Einsparung an Sekundärmetaboliten realisiert werden konnte. Ferner konnte durch die Miniaturisierung ein Gradient der zu untersuchenden Substanzen im Agar vermieden werden. Nachteilig hierbei war, dass Einflüsse auf das sekundäre Längenwachstum sowie die Bildung von Seitenwurzeln und Wurzelhaaren nicht dokumentiert werden können. Dies liegt im sehr begrenzten Raum der einzelnen Vials der Mikrotiterplatte begründet. Einzig die Bildung der pflanzlichen Biomasse konnten in diesem Test direkt ausgewertet werden. Bei den Untersuchungen wurden neben einer Kontrolle (Methanol) die Sekundärmetaboliten Iromycin A und Thaxtomin A in unterschiedlichen Konzentrationen (50 nM bis 100 μ M) dem für die Pflanzenanzucht verwendeten MS Medium zugesetzt. Um eventuelle Synergieeffekte von Iromycin und Thaxtomin auf das Pflanzenwachstum zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mengen an Thaxtomin A (50 nM bis 100 μ M) mit einer gleichbleibenden Menge an Iromycin A (5 μ M) getestet. Hierbei zeigten sich bei der Biomassenbildung der Einzelmetaboliten nur geringe Effekte an Radieschen. Dies wird auch im Vergleich zu Ergebnissen von VALKONEN et al., (2006) deutlich, welcher an Kartoffeln weitaus stärkere inhibitorische Effekte durch Thaxtomin A nachweisen konnte. Die Kombinationsvariante von Iromycin A und unterschiedlichen Konzentrationen von Thaxtomin A zeigten indes eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung an Radieschenkeimlingen. Die gebildete pflanzliche Biomasse reduzierte sich um über 50 % (vgl. Kapitel 3.6.4).

Auffällig bei allen Iromycinvarianten war eine je nach Konzentration stark ausgeprägte Chlorose der primären Keimblätter. Untersuchungen des Chlorophyll A und B-Gehaltes

extrahierter Pflanzen zeigten kaum Effekte bei unterschiedlichen Thaxtomin A Konzentrationen. Iromycin konnte hingegen ab einer Konzentration von 1 μM die Bildung an Chlorophyll A um 40 % inhibieren. In der Kombinationsvariante beider Sekundärmetaboliten potenzierte sich dieser Effekt, wodurch ein Rückgang des Chlorophyllgehaltes von über 90 % eintrat. Auch die Zusammensetzung des Blattgrüns änderte sich bei Radieschen-Keimlingen entscheidend. Der Quotient zwischen Chlorophyll A und B, welcher bei den meisten Pflanzen zwischen 2,5 und 3,0 liegt, verschob sich beim Kombinationsansatz von Iromycin A und Thaxtomin A auf bis zu 1,0. Analoge Ergebnisse bei den Chlorophyllbestimmungen konnten an *Arabidopsis thaliana* erzielt werden. Aufgrund des extrem geringen Gewichtes der Keimlinge des Ackerschmalwandes, war eine massenspezifische Auswertung gefriergetrockneter Keimlinge nicht möglich. Überraschend bei *A. thaliana* war insbesondere der geringe Effekt von Thaxtomin A auf die gebildete Biomasse. Untersuchungen von DUVAL et al., (2005) zeigten starke Auswirkungen auf das Wachstum des Ackerschmalwandes in Zellkulturen. Ferner wurde die Thaxtomin A basierte Induktion eines programmierten Zelltodes beschrieben.

Der synergetische Effekt der Kombinationsvarianten aus Iromycin und Thaxtomin stellt ein weiteres Indiz dafür dar, dass Iromycin einen direkten Einfluss auf die Pathogenität von Streptomyceten aufweist. Besonders deutlich wird dies an der Bildung von Chlorosen an den primären Keimblättern. Obwohl Iromycin A bei Untersuchungen der BASF keinerlei herbiziden Charakter aufweisen konnte (SURUP, 2007), scheint Iromycin A auf Wirtspflanzen bzw. dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* eine direkte Wirkung ausüben zu können. Wodurch dieser Effekt zu begründen ist, kann nur spekulativ diskutiert werden. Einerseits ist hierbei der bereits detailliert dargestellte Effekt der Hemmung der pflanzlichen iNOS zu nennen (CRAWFORD, 2006). Andererseits ist Iromycin A auch als Inhibitor des Komplexes I der Atmungskette bekannt. Für die Hemmung der Photosynthese gibt es eine Vielzahl von Inhibitoren. Einige Herbizide nutzen hierbei Elektronentransportketten als Angriffspunkt (HOCK & ELSTNER, 1995). Hauptangriffspunkt der Elektronentransport-Inhibitoren stellt die Hemmung der Chloroplasten-F-ATPase dar. Hierbei ist der Mechanismus der Photophosphorylierung ähnlich einer oxidativen Phosphorylierung. Auch hier wird die ATP-Synthase durch einen elektrochemischen Gradienten von Protonen über die

Thylakoidmembran energetisch ‚aufgeladen‘ (BICKEL-SANDKÖTTER, 2002). Wesentlicher Unterschiede zur mitochondrialen ATP-Synthase besteht einzig darin, dass der photosynthetische Elektronentransport einzig durch Licht getrieben wird (HOCK & ELSTNER, 1995). Da die mitochondriale Atmungskette viele Gemeinsamkeiten mit der Elektronentransportkette der Photosynthese aufweist (HELDT, 2003), ließe sich ein Zusammenhang zwischen Iromycin A und den auftretenden Chlorosen erklären. Ferner könnte in weiteren Bioassays im Mikrotiterplattenmaßstab ein zeitlich versetzter Einsatz von NOS-Inhibitoren (Iromycin S, Iromycin A) und Thaxtomin A die ‚natürliche Produktionsdynamik‘ besser simulieren. Ferner bestünde auch die Möglichkeit, *Arabidopsis thaliana* zusammen mit *S. bottropensis* Dra 17 bzw. *S. scabies* 1/3 analog zu Untersuchungen von SPLIVALLO (2009) zu kultivieren um neben den rein chemischen Effekten einen Einfluss auf das Wachstum der Versuchspflanzen einerseits zu dokumentieren und andererseits eventuelle direkte Auswirkungen des Pathogens auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* zu bonitieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bakterielle sowie pflanzliche Sekundärmetaboliten sind ein außerordentlich großes Reservoir an Stoffen, welche gegen Erkrankungen bei Säugetieren aber auch zum Schutz von Pflanzen gegenüber Phytopathogenen genutzt werden können. Während die Suche nach praktisch nutzbaren Naturstoffen seit Jahrzehnten intensiv betrieben wird, ist die biologische Funktion bei der Mehrheit dieser Stoffe völlig unbekannt. In der Phytopathologie verbinden sich die beiden Forschungsrichtungen, da Sekundärmetaboliten zum einen als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren von Krankheitserregern wirken und Naturstoffe zum anderen als Leitsubstanzen für die Entwicklung von Pflanzenschutzmitteln dienen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Regulationsmechanismen zur Phytotoxizität pflanzenpathogener Streptomyceten sowie die Wirkung von Pflanzenextrakten auf die Entwicklung des Falschen Mehltaus der Rebe näher zu beleuchten.

5.1 Praktische Nutzung von Pflanzenextrakten am Beispiel von *Plasmopara viticola*

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Teedrogen auf deren Auswirkungen gegen einzelne Entwicklungsstadien des Falschen Mehltaus der Rebe (*Plasmopara viticola*) hin zu untersuchen. Hierbei wurden verschiedene Pflanzen mittels unterschiedlicher Lösungsmittel extrahiert. Hintergrund hierbei war die Abdeckung des gesamten

Polaritätsspektrums, um den größten Teil der pflanzlichen Metaboliten zu lösen. Anschließend wurden die in Wasser resuspendierten Extrakte einem Bioassay unterzogen, welcher im Rahmen der Magisterarbeit (KÖSSLER, 2006) entwickelt wurde. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse wurden teilweise mit jenen der Magisterarbeit abgeglichen und durch Real-Time PCR basierte Untersuchungen ergänzt.

Kernpunkt der Arbeit stellte der in Zusammenarbeit mit dem STAATLICHEN WEINBAUINSTITUT in Freiburg erarbeitete Bioassay zur Bestimmung der Eigenschaften der Prüfsubstanzen dar. Dieser orientierte sich vornehmlich an der asexuellen Entwicklung des Falschen Mehltaus der Rebe. Neben Rückschlüssen auf die Wirkungsweisen von Pflanzenextrakten wurde versucht, erste Ansatzpunkte für den Hintergrund dieser Wirkung anhand der Biologie von *Plasmopara viticola* zu beschreiben.

Untersuchungen zur Optimierung der Extrakterstellung zeigten, dass eine Extraktion mit 20 % Ethanol (40 °C, 180 rpm, 4 h) sowie einer weiteren Extraktion mit Aceton-Methanol (1:1) im Ultraschallbad für 20 Minuten die Ausbeute der Trockenmasse der Gesamtextrakte im Durchschnitt um etwa 40 % erhöhte. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Zusatzstoffe des vergällten Ethanols bei der Extrakterstellung sowie das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid bei der Substanzlösung keinen Einfluss auf die Entwicklung des Falschen Mehltaus der Rebe ausübten. Analog zur Magisterarbeit, wurde hierbei eine Applikationskonzentration von 3,0 % (TM) sowie ein rein protektiver Applikationszeitpunkt gewählt.

Analog zur visuellen und fluoreszenzmikroskopischen Bonitur wurde eine Real-Time PCR Methode etabliert, wodurch ein spezifischer Nachweis pilzlicher Biomasse im Rebblatt möglich ist. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Präparate festgestellt werden. Einzig der Extrakt aus Schlüsselblumen scheint keinen Einfluss auf das Wachstum des Pilzes im Blattinneren auszuüben. Weiterführende Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Inokulation könnten jedoch näheren Aufschluss zur Wirkungsweise der Extrakte im Interzellularraum geben.

Die im Rahmen dieser Arbeit entsandenen Optimierungen des Bioassays (KÖSSLER, 2006) ermöglichen ein Screening verschiedener Pflanzenextrakte gegen verschiedene Entwicklungsstadien des Falschen Mehltaus der Rebe (*Plasmopara viticola*). Hierbei wird

nicht nur die Gesamtwirkung eines Extraktes berücksichtigt sondern die einzelnen Entwicklungsschritte des oomyceten näher untersucht. Hierdurch könnte im Weiteren durch Kombination verschieden wirksamer Extrakte ein ‚Gesamtextrakt‘ designed werden, welches verschiedene Entwicklungsstadien abdeckt und die Gesamtwirkung entscheidend verbessern könnte.

5.2 Regulation der Biosynthese von Sekundärmetaboliten am Beispiel von *Streptomyces bottropensis*

Neben direkten Wirkungen von Sekundärmetaboliten auf pflanzliche Schaderreger spielen viele bioaktive Stoffe auch bei der Regulation komplexer Sachverhalte eine wichtige Rolle.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der aus *Streptomyces bottropensis* Dra 17 isolierten bioaktiven Stoffen Iromycin A und Thaxtomin A bei der Penetration von Kartoffeln näher zu untersuchen. Die Fähigkeit von *Streptomyceten* Wirtspflanzen befallen zu können, korreliert hierbei direkt mit den Produktionsvermögen des Phytotoxins Thaxtomin A. Bei der Biosynthese von Thaxtomin A wird Stickstoffmonoxid (NO) durch eine Stickstoffmonoxid-synthase (NOS) auf die Aminosäure Tryptophan übertragen und bewirkt eine direkte Nitrierung. Da Iromycine als bekannte NO Synthaseinhibitoren fungieren, wurde zunächst anhand von Fütterungsexperimenten der Einfluss von Iromycin A auf die Thaxtomin A Produktion überprüft. Bei HPLC sowie HPLC-MS Auswertungen ergab sich eine dosis-abhängige Verringerung der Thaxtomin A Produktion von 40 % bei *Streptomyces bottropensis*. Weitere Untersuchungen an *Streptomyces scabies* ergaben ebenfalls starke inhibitorische Effekte. Dadurch konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Iromycin A an *Streptomyces bottropensis* Dra 17 einen regulativen Charakter bezüglich der Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A aufweist. An weiteren Mikroorganismen ist eine Regulation der Biosynthese eines Sekundärmetaboliten durch einen anderen bisher sehr selten in der Literatur beschrieben.

Bei Fütterungsexperimenten mit dem Disaccharid Cellobiose sollte überprüft werden, ob neben den literaturbekannten Effekten auf die Thaxtomin A Produktion auch ein Einfluss auf die Iromycin Bildung festzustellen ist. Analog zu LORIA et al. (1994) konnte auch bei *Streptomyces bottropensis* ein starker Anstieg von Thaxtomin A nach Cellobiose-Fütterung

detektiert werden und der induzierende Effekt von Cellobiose auf die Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A bestätigt werden. Ferner konnte auch eine verstärkte Produktion der Iromycine A und B in hierzu optimierten Flüssigkulturen nachgewiesen werden. Die gewonnenen Erkenntnisse geben einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dass die Regulation der Biosynthesen von Thaxtomin A und Iromycin A miteinander korrelieren.

Untersuchungen zur Produktionsdynamik von Iromycinen und Thaxtomin A auf Kartoffelscheiben zeigen einen differenzierten Biosyntheseverlauf der einzelnen Metaboliten: So wird nach jetzigem Kenntnisstand zuerst ausschließlich Iromycin A *in planta* produziert. Erst nach enzymatischem Abbau zu Iromycin B beginnt das Pathogen mit einer starken Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A, welches dann auch umgehend Nekrosen auf der Kartoffelscheibe hervorruft. Diesbezüglich wurden neben der chemischen Analytik mittels HPLC und HPLC-MS auch Real-Time PCR gestützte Untersuchungen zur Quantifizierung des Wachstums von *Streptomyces bottropensis* durchgeführt. Neben dem bereits getätigten Beleg zur Regulation der Thaxtomin A Biosynthese im Streptomyceten durch Iromycin A, lassen die Ergebnisse der Fermentationskurve auf Kartoffeln ferner auf eine zusätzliche direkten Inhibition durch Iromycin A auf die pflanzliche iNOS schließen. Hierdurch wäre ein suppressive Effekt auf die pflanzliche Abwehr möglich, was es dem Streptomyceten erlaubt, durch die Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A das Wirtsgewebe ohne Widerstand zu besiedeln.

Nach dem Nachweis der inhibitorischen Effekte der Thaxtomin A Synthese durch Iromycin A in Flüssigmedien sowie auf Kartoffelscheiben, sollte ferner der Einfluss der Einzelmetaboliten auf die Keimung sowie das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* und *Raphanus sativus subsp. sativus* L. untersucht werden. Aufgrund der stark begrenzten Verfügbarkeit von Iromycin A wurde hierzu zunächst ein Keimungsassay im 96 Vial Zellkulturplattenmaßstab entwickelt. Hierbei zeigten sich bei Verwendung der Einzelmetaboliten nur geringe Effekte auf die Keimung der Samen sowie der Bildung von pflanzlicher Biomasse. Ein kombinierter Einsatz beider Substanzen (Iromycin A und Thaxtomin A) konnte die Biomassenproduktion der Keimlinge entscheidend hemmen. Dies unterstützt die Annahme, dass Iromycin A neben dem inhibitorischen Effekt auf die Thaxtomin A Produktion auch einen direkten Einfluss auf die Penetration des Wirtsgewebes

ausübten könnte. Ferner zeigten sich beim Einsatz von Iromycin A chlorotische Effekte bei den Keimlingen des Ackerschmalwandes sowie bei Radieschen. Messungen des Chlorophyll A-Gehaltes zeigten speziell bei den Kombinationsvarianten (Iromycin A und Thaxtomin A) einen Rückgang des gebildeten Chlorophyll A um bis zu 90 %. Hierbei ist ein inhibitorischer Effekt von Iromycin A auf die Chloroplasten F-ATPase eine mögliche Erklärung. Weitere Untersuchungen zu dieser Thematik sind daher geplant.

6 LITERATUR

ABDEL-FATTAH, G. M. & MOHAMEDIN, A. H. Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streptomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of brawn scales. *Biol. Fertil. Soils* **32**, 401–409 (2000).

AGRIOS, G. N., Ed.: *Plant Pathology*. Academic Press. San Diego, USA (2005)

AHRENS, K. Physiologische Untersuchungen an *Plasmopara viticola* unter besonderer Berücksichtigung der Infektionsbedingungen. *Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik* **70**, 93–157 (1929).

ALEXOPOULOS, C. J. *Einführung in die Mykologie*, Fischer, Stuttgart (1966).

AMES, B. N. Mycorrhiza development in onion in response to chitin-decomposing actinomycetes. *New Phytol.* **112**, 423–427 (1989).

ANKE, T. & STEGLICH W. Neue Wirkstoffe aus Basidiomyceten. *Forum Mikrobiologie* **2**, 21–25 (1988).

ATTARD, A.; GOURGUES, M.; GALIANA, E.; PANABIERES, F.; PONCHET, M.; KELLER, H. Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). *J. Plant Physiol.* **165**, 83–94 (2008).

BEAUSÉJOUR, J.; GOYER, C.; VACHON, J. & BEAULIEU, C. Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Can. J. Microbiol.* **45**, 764–768 (1999).

BECKER, H. *Bewertung des Einsatzes von kupferhaltigen Präparaten auf den Naturhaushalt unter besonderer Berücksichtigung des ökologischen Landbaus*. Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Berlin, 123–129 (2001).

BERDY, J. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? In: Debabov, V.; Dudnik, Y.; Danlienko V. (Eds.) *Proceedings of the 9th international symposium on the biology of actinomycetes*. All-Russia Scientific Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moskau, 13–34 (1995).

- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *J. Antibiot.* **58**, 1–26 (2005).
- BERDY, J. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.* **18**, 309–406 (1974).
- BERKELMANN-LÖHNERTZ, B. *Persönliche Mitteilung*. Fachhochschule Wiesbaden, Geisenheim (2003).
- BERNSTEIN, L.; BOSCH, P.; CANZIANI, O.; CHEN, Z.; CHRIST, R.; DAVIDSON, O.; HARE, H.; HUQ, S.; KAROLY, D.; KAROLY, H.; KATTSOV, V.; KUNDZEWICZ, Z.; LIU, J.; LOHMANN, U.; MANNING, M.; MATSUNO, T.; MENNE, B.; METZ, B.; MIRZA, M.; NICHOLLS, N.; NURSE, L.; PACHAURI, R.; PALUTIKOF, J.; PARRY, M.; QIN, D.; RAVINDRANATH, N.; REISINGER, A.; REN, J.; RIAHI, K.; ROSENZWEIG, C.; RUSTICUCCI, M.; SCHNEIDER, S.; SOKONA, Y.; SOLOMON, S.; STOTT, P.; STOUFFER, R.; SUGIYAMA, T.; SWART, R.; TIRPAK, D.; VOGEL, C.; YOHE, G. *Climate Change 2007: Synthesis Report* (2007); http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_synthesis_report.htm
- BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 208–215 (2005).
- BICKEL-SANDKÖTTER, S. *Nutzpflanzen und ihre Inhaltsstoffe*, 2. Auflage. Quelle & Meyer Verlag, Wiebelsheim (2002).
- BLAESER, P. Isolierung und Charakterisierung von Pflanzeninhaltsstoffen mit fungizider Wirkung. *Dissertation*, Friedrich-Wilhelm Universität, Bonn (1999).
- BLAESER, P.; STEINER, U.; DEHNE, H.-W. Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung. *Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL*, Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, **97** (2002).
- BODE, E. Kupfer als Pflanzenschutzmittel – Zielstellung und Ergebnisse seit dem 1. Kupfer-Fachgespräch. In: KÜHNE, S. & FRIEDRICH, B. Pflanzenschutz im Ökologischen Landbau - Probleme und Lösungsansätze - Siebtes Fachgespräch, *Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt Berlin-Dahlem* **118**, 4–5 (2003).
- BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* 619–627 (2002).

- BOUARAB, K.; MELTON, R.; PEART, J.; BAULCOMBE, D. & OSBOURN, A. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**, 889–892 (2002).
- BRANDFASS, C.; KARLOVSKY, P. Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. *BMC Microbiology* **6.4** (2006).
- BRENNER, J. P. Pesticidal compounds from higher plants. *Pestic. Sci.* **39**, 95–102 (1993).
- BROOK, P. J. Effect of light on sporulation of *Plasmopara viticola*. *N.Z. J. Bot.* **17**, 135–138 (1979).
- BUCHENAUER, H. Tendenzen in der Entwicklung neuer Wirkstoffe mit antifungalen Eigenschaften aus Naturstoffen. *Mitt. Biol. Bundesanst.* **321**, 487 (1996).
- BUKHALID, R. A. & LORIA, R. Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. *J. Bacteriol.* **179**, 7776–7783 (1997).
- BUKHALID, R. A.; TAKEUCHI, T.; LABEDA, D. & LORIA, R. Horizontal transfer of the plant virulence gene, *necl1*, and flanking sequences among genetically distinct streptomyces strains in the diastatochromogenes cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 738–744 (2002).
- CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)* **100**, 14555–14561 (2003).
- CHANDOK, M. R.; YTTERBERG, A. J.; VAN WIJK, K. J.; KLESSIG, D. F. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* **113**, 469–482 (2003).
- CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. *AAPS J.* **8**, E239–E253 (2006).
- CHUNG, I.; MIN, L. L.; MILLER, D. A.; CHUNG, I. M. Natural herbicide potential of *Alfalfa* residue on selected weed species. *Agron. J.* **87**, 920–925 (1995).
- CRAWFORD M. Mechanisms of nitric oxide synthesis in plants. *J. Exp. Bot.* **57**, 471–478 (2006).
- CUMMINS, C. S.; HARRIS, H. The chemical composition of the cell wall in some gram-positive

bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J. Gen. Microbiol.* **14**, 583–600 (1956).

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* **62**, 5–16 (2009).

DROBNICA, L.; STURDIK, E.; MINARIK E.; RAGALA, P. Einfluss von Rebschutzmitteln auf Weinhefen. *Die Weinwissenschaft* **35**, 404–413 (1980).

DUVAL, I.; BROCHU, V.; SIMARD, M.; BEAULIEU, C.; BEAUDOIN, N. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta* **222**, 820–831 (2005).

EHRHARDT, H. & JAKOB, L. Beiträge zur Bestimmung von Gärabläufen in Traubenmost unter der Einwirkung von Fungiziden. *Weinberg und Keller* **14**, 435–458

EVANS D. A. & LAWSON K. R. Crop protection chemicals – research and development perspectives and opportunities. *Pestic Outlook* **3**, 10–17 (1992).

FARLOW, W. G. American grape mildew in Europe. *Botanic Gazette* **7**, 30–31 (1882).

FEVRE, M. Glucanases, glucan synthesis and wall growth in *Scrapollegnia monoica*. *Fungal Walls and Hyphal Walls Growth*, Cambridge University Press, Cambridge (1979).

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science* **325**, 1089–1093 (2009).

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* **106**, 3468–3496 (2006).

FUGMANN, B.; LIEB, F.; MOSCHLER, H.; NAUMANN, K.; WACHENDORF, U. Natürliche Pflanzenschutzwirkstoffe. Teil I: Eine Alternative zu synthetischen Pflanzenschutzmitteln? *Chemie in unserer Zeit* **6**, 317–330 (1991).

GAMS, W.; HOEKSTRA E. S.; APTROOT, A. *Course of Mycology*. CBS, Baarn (1998).

GÄRTEL, W. Belastung der Weinbergböden durch Kupfer. *Berichte der Landwirtschaft, Sonderheft* **198**, 123–132 (1985).

GEHMANN, K. Untersuchungen zur Epidemiologie und Bekämpfung des Falschen Mehltaus der Weinrebe, verursacht durch *Plasmopara viticola*. *Dissertation*, Universität Stuttgart Hohenheim (1987).

GISI, U.; SIEROTZKI, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur. J. Plant Pathol.* 157–167 (2008).

GOBBIN, D.; JERMINI, M.; LOSKILL, B.; PERTOT, I. M. R.; GESSLER, C. Relevance of *Plasmopara viticola* secondary inoculum. *Plant Pathol.* **54**, 522–534 (2005).

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 189–216 (1983).

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BREITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducer of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* **8**, 629–643 (1996).

GOYER C., VACHON J., BEAULIEU, C. Phytogeticity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology* **88**, 442–445 (1998).

GUNDERSON, J. H.; ELWOOD, H.; INGOLD, A.; KINDLE, K.; SOGRIN; M. L.. Phylogenic relationships between chlorophytes, chrysophytes and oomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)* **84**, 5823–5827 (1987).

GUO, F.-Q.; OKAMOTO, M.; CRAWFORD, N. M. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**, 100–103 (2003).

GURIP-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* **27**, 1–93 (2006).

HAAS E.; AMPLATZ B. Gezielte Peronosporabekämpfung mit Hilfe eines modernen Prognoseverfahrens. *Obstbau und Weinbau* **3**, 78–80 (1989)

Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; v. Tiedemann, A. *Phytomedizin – Grundwissen Bachelor*. Ulmer Verlag, Stuttgart (2007).

HAMPP, R.; SCHAEFFER, C. Mycorrhiza – carbohydrate and energy metabolism. In: Varma, A.;

Hock, B. (Eds.) Mycorrhiza – structure, function, molecular biology and biotechnology. Springer, Berlin 273–303 (1998).

HEALY, F. G.; BUKHALID, R. A.; LORIA, R. Characterization of an insertion sequence element associated with genetically diverse plant pathogenic *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* **181**, 1562 (1999).

HEALY, F. G.; WACH, M.; KRASNOFF, S. B.; GIBSON, D.M.; LORIA, R. The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **38**, 794–804 (2000).

HEIBERTSHAUSEN, D.S. Befallsreduzierung von *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt. ex de Bary) Berl. & de Toni im ökologischen Weinbau auf der Basis von Maßnahmen zur Kupferminimierung und Verfahren der Induzierten Resistenz. *Dissertation*, Universität Gießen (2009).

HELDT, H. W. *Pflanzenbiochemie*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin (2003).

HENKEL, T.; BRUNNE, R. M.; MÜLLER, H.; REICHEL, F. Statistische Untersuchungen zur Strukturkomplementarität von Naturstoffen und synthetischen Substanzen. *Angew. Chem.* **111**, 688–691 (1999).

HERGER, G. Die Wirkung von Auszügen aus dem Staudenknöterich *Reynoutria sachalinensis* gegen Pilzkrankheiten, insbesondere Echte Mehltäupilze. *Dissertation*, Universität Darmstadt (1991).

HILLEBRAND, W.; LORENZ, D.; LOUIS, F. *Rebschutz Taschenbuch*, 11. Auflage, Fachverlag Fraund, Mainz, S. 19 ff. (1998).

HILTUNEN, L. H.; LAAKSO, I.; CHOBOT, K. V.; HAKAKA, WECKMAN, A.; VALKONEN, J. T. Influence of thaxtomins in different combinations and concentrations on growth of micropropagated potato shoot cultures. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3372–3379 (2006).

HOCK, B.; ELSTNER, E. F. *Schadwirkungen auf Pflanzen*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1995).

HOFMANN, U. Extraktion von Salicyl- und Butulinsäure. *Diplomarbeit*, Universität Jena (2005).

HOFMANN, U.; KÖPFNER, P.; WERNER, A. *Ökologischer Weinbau*, 1. Auflage, Stuttgart (1995).

HOOD M. E.; SHEW, H. D. Advances in imagine the cell biology of plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 443–459 (1996).

HURTER, J.; MAYER, K.; ZÜRRER, H. Gärhemmungen durch Fungizidrückstände, *Zeitschrift für Obst- und Weinbau* **102**, 592–597 (1966).

HÜTTER, R. Zur Systematik der Aktinomyceten. *Arch. Mikrobiol.* **43**, 365–391 (1962).

ISLAM, T.; ITO, T.; SAKASAI, M.; TAHARA, S. Zoosporical activity of polyflavoid tannin identified in *lannea coromandelica* stem bark against phytopathogenic oomycete *Aphanomyces cochlioides*. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6697–6703 (2002).

ISLAM, T.; TAHARA, S. Chemotaxis of fungal zoospores, with special reference to *Aphanomyces cochlioides*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1933–1948 (2001).

JAGLAN, M. S.; KHOKHAR, K. S.; MALIK, M. S.; TAYA, J. S. Standardization of method for extraction of bioactive components from different plants for insecticidal property. *Indian Journal of Agricultural Research* **31**, 167–173 (1997).

JESPER, A. B. K.; WAARD, M. A. Natural products in plant protection. *Neth. J. Pl. Path.* **99**, 109–117 (1993).

JEYARAJAN, R.; DORAISWAMI, R.; BHASKARAN, R.; JAYARAJ, S. Effect of neem and other plant products in the management of plant disease in india. *Proc. 3rd. Int. Neem Conf.*, Nairobi, 635–644 (1986).

JOSHI, M. V.; BIGNELL, D. R. D.; JOHNSON, E. G.; SPARKS, J. P.; GIBSON D. M.; LORIA, R. The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. *Mol. Microbiol.* **66**, 633–642 (2007).

JUTSUM, A. R. Commercial application of biological control: status and prospects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **318**, 357–373 (1988).

KAMOUN, S.; HUITEMA, E.; VLEESHOUWERS V. G. A. A. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci.* **4**, 196–201 (1999).

KÄMPFER, P.; KROPPESTEDT, R. M.; DOTT, W. J. *Gen. Microbiol.* (1991)

KASSEMAYER, H. H. Erarbeitung von wissenschaftlichen Ansätzen zur biologischen Kontrolle

der Rebenperonospora und für Strategien zu deren Regulierung im öko-logischen Weinbau. Scientific approach to the biological control of grapevine downy mildew. *Bericht, Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau, Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)*, Bonn. (2003).

KAST, W. K. *Untersuchungen zu Alternativen für den Einsatz kupferhaltiger Mittel gegen Rebenperonospora im ökologischen Weinbau*, LVWO Weinsberg, (2003):
www.infodienst-mlr.bwl.de/-1a/lvwo/Veroeff/alternativenkupfer.htm

KAST, W. K.; STARK-URNAU, M. Neues zur Biologie der Peronospora: Lebensdauer der Peronosporasporangien. *Rebe und Wein* 5, 210–212 (2000).

KAST, W. K.; STARK-URNAU, M. Survival of sporangia from *Plasmopara viticola*, the downy mildew of grapevine. *Vitis* 38, 185–186 (1999).

KAUER, R. *Persönliche Mitteilung*, Fachhochschule Wiesbaden, Geisenheim (2003).

KAUER, R.; FADER, B.; WOLFF, M. Aktuelle Situation der Bekämpfung von *Plasmopara viticola* in der Praxis des ökologischen Weinbaus in Deutschland. *Fachgespräch Berlin-Dahlem: „Bedeutung von Kupfer für den Pflanzenschutz, insbesondere für den Ökologischen Landbau – Reduktions- und Ersatzstrategien“* 142, 21–26 (2008).

KEIL, S. Epidemiologische Aspekte der Falschen Mehltauinfektion durch *Plasmopara viticola* an *Vitis*. *Dissertation*, Universität Hohenheim (2007).

KEIL, S. *Persönliche Mitteilung* (2009).

KERS, J. A.; CAMERON K. D.; JOSHI, M. V.; BUKHALID, R. A.; MORELLO, J. E.; WACH, M. J.; GIBSON, D. M.; LORIA, R. A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol.* 55, 1025–1033 (2005).

KERS, J. A.; WACH, M. J.; KRASNOFF, S. B.; WIDOM, J.; CAMERON, K. D.; BUKHALID, R. A.; GIBSON, D. M.; CRANE, B. R.; LORIA R. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature* 429, 79–82 (2004).

KIEFER, B.; RIEMANN, M.; BÜCHE, C.; KASSEMAYER, H.-H.; NICK, P. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta* 215, 387–393 (2002).

- KING, R. R.; LAWRENCE, C. H. Characterization of new thaxtomin A analogues generated *in vitro* by *Streptomyces scabies*. *J. Agric. Food Chem* **44**, 1108–1110 (1996).
- KING, R. R.; LAWRENCE, C. H.; CALHOUN, L. A. Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, the causal organism of potato common scab. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 834–837 (1992).
- KING, R. R.; LAWRENCE, C. H.; CLARK, M. C.; CALHOUN, L. A. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 849 (1989).
- KING, R. R.; LAWRENCE, C. H.; EMBLETON, J.; CALHOUN, L. A. More chemistry of the thaxtomin phytotoxins. *Phytochemistry* **64**, 1091–1096 (2003).
- KING, R.; LAWRENCE, C.; CALHOUN, L. Unusual production of 5-Nitroanthranilic acid by *Streptomyces scabies*. *Phytochemistry* **49**, 1265–1267 (1998).
- KLINGAUF, F.; HERGER, G. Die Wirkung von Pflanzenextrakten auf den Echten Mehltau an Wintergerste, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Mededel. Fac. Landbouwwetenschap., Rijksuniv. Gent.* **50** (2b), 270–274 (1985).
- KLOPPENSTEDT, M., DSMZ, Bericht zur Taxonomische Einordnung des Streptomyceten: *Streptomyces* sp. Dra 17.
- KORTEKAMP, A. Growth, occurrence and development of septa in *Plasmopara viticola* and other members of the *Peronosporaceae* using light and epifluorescence-microscopy. *Mycol. Res.* **109**, 640–648 (2005).
- KÖSSLER, P. Kupferersatzstoffe in der Peronosporabekämpfung – unter besonderer Berücksichtigung pflanzlicher Extrakte. *Diplomarbeit*, Fachhochschule Wiesbaden, Geisenheim. (2004).
- KÖSSLER, P. Wirkung von Pflanzenextrakten und pflanzlichen Inhaltsstoffen auf die Entwicklung des Falschen Mehltaus der Rebe (*Plasmopara viticola*). *Magisterarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen (2006)
- KOWALEWSKI, A. Die resistenzinduzierenden Inhaltsstoffe von *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai: Vorkommen, Charakterisierung und Wirkungsmechanismus. *Dissertation*, Universität Darmstadt (1992).

KRSEK, M.; MORRIS, N.; EGAN, S.; WELLINGTON, E. M. H. Actinomycetes. In: LEDERBERG, J. (Ed.) *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego, 28–41 (2000).

KÜHNE, S. *Zusammenfassung Fachgespräch Berlin-Dahlem: „Bedeutung von Kupfer für den Pflanzenschutz, insbesondere für den Ökologischen Landbau – Reduktions- und Ersatzstrategien“* **142**, 4–5 (2008).

LAFON, R.; BUILT, J. Downy mildew of the vine. In: SPENCER, D. M. (Ed.) *The Downy mildews*. Academic press, London. (1981).

LAKSHMANAN, P.; MOHAN, S.; JEYARAJAY, R. Antifungal properties of some plant extracts against *Thanatephorus*, the causal agent of collar rot disease of *Phaseolus aureus*. *Madras Agricultural Journal* **77**, 1–4 (1990).

LATTEN, J., Biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze mit Hilfe von Pflanzenextrakten. *Dissertation*, Justus-Liebig-Universität, Gießen (1994).

LAUZIER, A.; GOYER C.; RUEST L.; BRZEZINSKI, R.; CRAWFORD, D. L.; BEAULIEU C. Effect of amino acids on thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces scabies*. *Can. J. Microbiol.* **48**, 359–364 (2002).

LAWEWNCE, C. H.; CLARK, M. C.; KING, R. R. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytochemistry* **80**, 606–608 (1990).

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Biology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **21**, 71–100 (1967).

LORIA, R.; BIGNELL, D. R. D.; MOLL, S.; HUGUET-TAPIA, J. C.; JOSHI, M. V.; JOHNSON, E. G.; SEIPKE, R. F.; GIBSON, D. M. Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**, 3–10 (2008).

LORIA, R.; BUKHALID, R. A.; CREATH, R. A.; LEINER, R. H.; OLIVIER, M.; STEFFENS, J. C. Differential production of thaxtomins by phytopathogenic *Streptomyces* species in vitro. *Phytopathology* **85**, 537–541 (1995).

LORIA, R.; BUKHALID, R. A.; FRY, B. A.; KING, R. R. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant. Dis.* **81**, 836–846 (1997).

LORIA, R.; COOMBS, J.; YOSHIDA, M.; KERS, J.; BUKHALID, R. A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **62**, 65–72 (2003).

LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of phytogeticity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, 469–487 (2006).

LOSKILL, B. J. Untersuchungen zur Biologie und Epidemiologie von *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) BERL. & DE TONI auf der Basis serologischer und genetischer Studien. *Dissertation*, Georg-August-Universität, Göttingen (2003).

LOSKILL, B.; GOBBIN, D.; BERKELMANN-LÖHNERTZ, B. Bodenbürtige *Peronospora*-Infektionen. *Der Deutsche Weinbau* **7**, 26–29 (2005).

MARTIN, H. *Die wissenschaftlichen Grundlagen des Pflanzenschutzes*. Verlag Chemie, Weinheim (1967).

MATTINA, M. J. I.; BERGER, W. A. I.; DENSON, C. L. Microwave-assisted extraction of taxanes from taxus biomass. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4691–4696 (1997).

MAYFIELD, C. I.; WILLIAMS, S. T.; RUDDICK, S. M.; HATFIELD, H. L. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biol. Biochem.* **4**, 79–91 (1972).

MENON, S. Smelly success for sorghum's savoire. *New Scientist* 1950, **22** (1994).

METRAUX, J. P.; AHL, P.; STAUB, T. H.; SPEICH, J.; STEINMANN, A.; RAYLS, J.; WARD, E. Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloro-isonicotinic acid and pathogens. In: HENNECKE H.; VERMA, D. P. S. *Advances in Molecular genetics of plant microbe interactions*, Vol. 1. Kluwer Academic (Netherlands) 432–439 (1991).

MEYER, J. R.; LINDERMANN, R. G. Selective influence of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biol. Biochem.* **18**, 191–196 (1986).

MILLARDET, A.; GAYON, D. Recherches nouvelles sur l'action que les preparations cuiveuses exercent sur la *Peronospora*. *Journale d'agriculture praticien* **51** (1887)

MOHAMED, S.; SAKA, S.; EL-SHARKAWY, S. H.; ALI, A. M.; MUID, S. Antimycotic screening of

58 malaysian plants against plant pathogens. *Pestic. Sci.* **47**, 259–264 (1996).

MOHR, H. D. (Ed) *Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe*. E. Ulmer, Stuttgart (2005).

MOHR, H. D.; PORTZ, C.; HOLZ, B.; NOGA, G.; KAST, W. K.; HENNING, M. Minimierung des Kupfereinsatzes im ökologischen Weinbau unter besonderer Berücksichtigung der Blattbeläge und ihrer Wirkung gegen den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) – Teil 1: 2002 bis 2003. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **59**, 49–58 (2007).

MUGNIER, J.; MOSSE, B. Spore germination and viability of vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **88**, 411–413 (1987).

MÜLLER, K. *Rebschädlinge und ihre neuzeitliche Bekämpfung*. Staatliches Weinbauinstitut Freiburg (1918).

MÜLLER, K.; SLEUMER, H. Biologische Untersuchungen über die Peronosporakrankheit des Weinstocks mit besonderer Berücksichtigung ihrer Bekämpfung nach Inkubationsmethode. *Z. Wiss. Landwirtsch.* **79**, 509–576 (1934).

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461–516 (2007)

OERKE, E.; DEHME, H.; SCHÖNBECK, F.; WEBER, A. *Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and cash crops*. Elsevier Science, Amsterdam (1994).

NUSZKOWSKI, A.; GRÄBNER, R.; MARSCHE, G.; UNBEHAUN, A.; MALLE, E.; HELLER, R. Hypochlorite-modified low density lipoprotein inhibits nitric oxide synthesis in endothelial cells via an intracellular dislocalization of endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **276**, 14212–14221 (2001).

PARENTI, F.; CORONELLI, C. Members of the genus *Actinoplanes* and their antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**, 389–411 (1979).

PILLMOOR, J. B.; WRIGHT, K.; TERRY, A. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pesticide Science* **39**, 2, 131-140 (1993).

PINTO, C. M. F.; MAFFIA, L. A.; CASALI, D. W. V.; CARDOSO, A. A. *In vitro* effect of plant leaf extracts on mycelial growth and sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*. *J. Phytopathol.*

146, 421–425 (1998).

PLIMMER, J. R. Regulatory problems associated with natural products and biopesticides. *Pestic. Sci.* **39**, 103–108 (1993).

RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N.; KROPPESTEDT, R. M., STRACKEBRAND, E. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of Nocardiopsaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 1088–1092 (1996).

REIMERS, F.; SMOLKA, E. S.; WERRES, S.; PLANK-SCHUMANN, K.; WAGNER, G. Effect of ajoene, a compound derived from *Allium sativum*, on phytopathogenic and epiphytic microorganisms. *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz.* **100**, 623–633 (1993).

RINTALA, H. & NEVALAINEN, A. Quantitative measurement of streptomycetes using real-time PCR. *J. Environ. Monit.* **8**, 745 (2006).

ROVESTI, L. S.; MARCO, D. I.; PANCALIDI, D. Effect of neem kernel extract on some phytopathogenic fungi under greenhouse conditions. *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz.* **99**, 293–296 (1992).

RUESS, W.; MÜLLER, K.; KNAUF-BREITNER, G.; STAUB, T. Plant activator CGA 245704: An innovative approach for disease control in cereals and tobacco. *Proc. Bright. Crop Prot. Conf.* 53–60 (1996).

RUMBOLZ, J.; WIRTZ, S.; KASSEMAYER, H. H.; GUGGENHEIM, R.; SCHÄFER, E.; BÜCHE, C. Sporulation of *Plasmopara viticola*: differentiation and light regulation. *Plant Biol.* **4**, 413–422 (2002).

SANGLIER, J. J.; HAAG, H.; HUCK, T. A., FEHR, T. Review of actinomycetes compounds 1990–1995. *Expert. Opin. Invest. Drugs* **5**, 207–223 (1996).

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**, 1488–1493 (1999).

SCHEELE, B.; BOSS, N. *Roche Lexikon Medizin*, 4. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München (1999).

SCHNEIBL, W.-R.; FRY, B.; KOCHVENKO, A.; SCHINDELASCH, D.; ZIMMERLI, L.; SOMERVILLE, S.;

- LORIA, R.; SOMERVILLE, C. R. An arabidopsis mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *The Plant Cell Online* 133 (2003).
- SCHERER, E.; GISI, U. Characterization of genotype and mating type in European isolates of *Plasmopara viticola*. *J. Phytopathol.* **154**, 489–495 (2006).
- SCHINNER, F.; SONNLEITNER, R. *Bodenökologie*, Band 1, Springer Verlag, Berlin (1996).
- SCHLEICHER, M.; BRUNDIN, F.; GROSS, S.; MÜLLER-ESTERL, W.; OESS, S. Cell cycle-regulated inactivation of endothelial NO synthase through NOSIP-dependent targeting to the cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8251–8258 (2005).
- SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. Molecular systematics of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 143–187 (1983).
- SCHMIDT, O.; HENGELER, S. *Biologischer Pflanzenschutz im Garten*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart (1984).
- SCHOLL, W.; ENKELMANN, R. Zum Kupfergehalt von Weinbergsböden. *Landwirtsch. Forschung* **37**, 286–297 (1984).
- SCHRAMM, G.; STEGLICH, W.; ANKE, T.; OBERWINKLER, F. Antibiotika aus Basidiomyceten, III. Strobilurin A und B, antifungische Stoffwechselprodukte aus *Strobilurus tenacellus*. *Chem. Ber.* **111**, 2779–2784 (1978).
- SCHREY S. D.; SALO, V.; RAUDASKOSKI, M.; HAMPP, R.; NEHLS, U.; TARKKA, M. T. Interaction with mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* sp. ACh 505 modifies organisation of actin cytoskeleton in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria* (fly agaric). *Curr. Genet.* **52**, 77–85 (2007).
- SCHÜEPP, H.; SIEGFRIED W. Auftreten, Bedeutung und Bekämpfung der Pilzkrankheiten im Rebbau der deutschsprachigen Schweiz. *Gesunde Pflanzen* **40**, 286–293 (1988).
- SHIOMI, H.; UI, K.; SUZUKI, H.; HATANO, MORIMOTO, H.; YAMAGUCHI, Y.; MASUMA, R.; SUNAZUKA, T.; SHIMAMURA, H.; SAKAMOTO, K.; KITA, K.; MIYOSHI, H.; TOMODA, H.; OMURA, S. Verticipyrene, a new NADH-fumarate reductase inhibitor, produced by *Verticillium* sp. FKI-1083. *J. Antibiot.* **59**, 785–790 (2006).

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. I. The international streptomyces project. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **17**, 315–322 (1967).

SHU, Y.-Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* **61**, 1053–1071 (1998).

SINGH U. P.; PANDEY, V. N.; WAGNER, K. G.; SINGH, K. P. Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*). *Can. J. Bot.* **68**, 1354–1356 (1990).

SINGH, U. P.; CHAUHAN, V. B. Effect of ajoene, a compound derived from garlic (*Allium sativum*), on *Phytophthora drechsleri* F. Sp. Cajani. *Mycologia* **84**, 105–108 (1992).

SINGLETON, P.; SAINSBURY, D. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 3rd edn. John Wiley & Sons Ltd., Chichester (2001).

SMITH, S. E.; READ, D. J. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edn. Academic, Cambridge, (1997).

SPLIVALLO, R.; FISCHER, U.; GÖBEL, C.; FEUSSNER, I.; KARLOVSKY, P. Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol.* **150**, 2018–2029 (2009).

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchical classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 479–491 (1997).

STACKEBRANDT, E.; WOESE, C. R. Towards a phylogeny of actinomycetes and related organisms. *Curr. Microbiol.* **5**, 131–136 (1981).

STAUB, T.; GOY, A.; KESSMANN, H. Chemically induced disease resistance in plants. In: LYR, H.; POLTER, C. (Eds.) *Proc. 10th Int. Symp. On systemic fungicides and antifungal compounds*, Reinhardtsbrunn, 239–249 (1992).

STILLE, B. Das Keimverhalten der Sporangien von *Phytophthora infestans* in Abhängigkeit von Temperatur- und Hydraturbedingungen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **72**, 193–200 (1964).

SUKENAGA, Y.; YAMAZAKI, T.; AOYAMA, T.; TAKAYASU, Y.; HARADA, T. *Japan Pat.*, 98 237 044, CA, 129, 244203s (1998).

SURUP, F. Metagenom-Technologie zur Wirkstoffsuche sowie Untersuchungen der Iromycine aus *Streptomyces* sp., *Dissertation*, Georg-August-Universität, Göttingen (2007).

SURUP, F.; WAGNER, O.; v. FRIELING, J.; SCHLEICHER, M.; OESS, S.; MÜLLER, P.; GROND, S. The iromycins, a new family of pyridone metabolites from *Streptomyces* sp. *J. Org. Chem.* **72**, 5085–5090 (2007).

TEGG, R.S. Plant cell growth and ion flux responses to the streptomycete phytotoxin thaxtomin A: Calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. *Plant Cell Physiol.* **46**, 638–648 (2005).

THE UNIPROT CONSORTIUM THE UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE (UNIPROT). *Nucleic Acids Res.* **35**, D193–D197 (2007).

TILCHER, R. Untersuchungen zur Biologischen Bekämpfung des Falschen Mehltaus der Weinrebe *Plasmopara viticola* (BERK. & CURT. EX DE BARY) BERL. & DE TONI durch bakterielle Antagonisten. *Dissertation*, Georg-August Universität, Göttingen (1995).

TILCHER, R.; BRENDDEL, G. Biologische Bekämpfung pilzlicher Schaderreger unter besonderer Berücksichtigung des Pilzparasitismus. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch* **42**, 179–190 (1991).

TOKALA R. K.; STRAP, J. L.; JUNG, C. M.; CRAWFORD, D. L.; SALOVE, M. H.; DEOBALD, L. A.; BAILEY, J. F.; MORRA M. J. Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *S. lydicus* WYEC108 and the pea plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1695–2161 (2002).

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 782–787 (1990).

TYLKA, G. L.; HUSSEY, R. S.; RONCADORI, R. W. Axenic germination of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effects of selected *Streptomyces* species. *Phytopathology* **81**, 754–759 (1991).

UNGER, S. Untersuchungen zur Wirt-Parasit-Wechselwirkung zwischen dem Erreger des Falschen Mehltaus (*Plasmopara viticola*) und verschiedenen Vitaceen. *Diplomarbeit*, Albert-Ludwig Universität, Freiburg (2001).

VALSESIA, G.; GOBBIN, D.; PATOCCHI, A.; VERCCHIONE, A.; PERTOT, I.; GESSLER, C. Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* **95**, 672–678 (2005).

VAN DER HAAR, A. W. Untersuchungen in der Familie der *Araliaceae*, speziell über die

Glukoside und Oxydasen aus den Blättern von *Polyscias nodosa* und *Hedera helix*. *Dissertation*, Universität Bern (1913).

WAGNER, O. Sekundärstoffbildende Actinomyceten aus der Umgebung Göttingens: Isolierung, Strukturaufklärung und Biosynthese ausgewählter Metabolite. *Dissertation*, Georg-August-Universität, Göttingen (2000).

WANG, Z.-Q.; LAWSON, R. J.; BUDDHA, M. R.; WEI, C.-C.; CRANE, B. R.; MUNRO, A. W.; STUEHR, D. J. Bacterial flavodoxins support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **282**, 2196–2202 (2007).

WARNECKE, F.; SOMMARUGA, R.; SEKAR, R.; HOFER, J.; PERNTHALER, J. Abundances, Identity, and Growth State of Actinobacteria in Mountain Lakes of Different UV Transparency. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 9, 5551-5559 (2005)

WICHTEL, M.; FROHNE, D.; HÖLTZEL, C.; NAGELL, A. Teedrogen und Phytopharmaka, *Wissenschaftlicher Verlag, Heidelberg*, 4. Auflage, (2002).

WONG, F. P.; BURR, H. N.; WILCOX, W. F. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* **50**, 427–432 (2001).

WYSS, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhiza. *Plant Soil* **147**, 159–162 (1992).

ZEIDLER, D.; ZÄHRINGER, U.; GERBER, I.; DUBERY, I.; HARTUNG, T.; BORS, W.; HUTZLER, P.; DURNER, J. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)* **101**, 15811–15816 (2004).

ZILLIG, H. Die Peronospora der Reben, *BBA, Land- und Forstwirtschaft, Flugblatt 41*

ZORNBACH, W. Lückenindikationen – Ein unlösbares Problem? *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt* **301**, 42 (1994).

7 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Zuname: Philip Bastian Kössler
 Geburtsdatum/-Ort: 03.07.1977, Freiburg im Breisgau
 Staatsangehörigkeit: deutsch

WERDEGANG

Seit 06/2010 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** an der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN, DNPW¹, Abteilung Molekulare Pflanzenpathologie und Mykotoxinforschung
 01/2010 – 05/2010 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) – Institut für Pflanzenschutz- IPS 3d

STUDIUM

4/2006-01/2010 **Dissertation** an der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN, DNPW¹, Abteilung Molekulare Pflanzenpathologie und Mykotoxinforschung Thematik: „Regulation der Biosynthese von Sekundärmetaboliten und praktische Nutzung von Pflanzenextrakten am Beispiel von *Streptomyces bottropensis* und *Plasmopara viticola*“, PROF. DR. PETR KARLOVSKY, PROF. DR. ELKE PAWELZIK
 24/04/2006 Abschluss als **Magister Sc.agr.** (Note: gut)
 10/2005-04/2006 **Magisterarbeit** an der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN, DNPW¹, Abteilung Allgemeiner Pflanzenschutz und Pflanzenpathologie: Thematik: „Wirkung verschiedener Pflanzenextrakte auf die Entwicklung des Falschen Mehltaus der Rebe“, PROF. DR. ANDREAS VON TIEDEMANN, DR. BIRGER KOOPMANN
 04/2004-04/2006 Studium an der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN, Aufbaustudiengang: **Phytomedizin**
 21/01/2004 Abschluss als **Diplom-Ingenieur** (FH) (Note: gut)
 07/2003-01/2004 **Diplomarbeit** an der FACHHOCHSCHULE WIESBADEN-GEISENHEIM: Thematik: „Kupferersatzstoffe in der Peronosporabekämpfung (*Plasmopara viticola*) – unter besonderer Berücksichtigung pflanzlicher Extrakte“, PROF. DR. RANDOLF KAUER, DR. WALTER K. KAST (LVWO WEINSBERG)
 10/1999-1/2004 Studium an der FACHHOCHSCHULE WIESBADEN-GEISENHEIM, Studiengang Weinbau und Getränketechnologie, Studienrichtung **Weinbau und Oenologie**

¹ DNPW: Department für Nutzpflanzenwissenschaften

SCHULBILDUNG

06/2008 **Allgemeine Hochschulreife** am HOHENSTAUFEN-GYMNASIUM, Bad Wimpfen

FREMDSPRACHEN

- sehr gute Kenntnisse in Englisch (fließend in Wort und Schrift)
- Kenntnisse in Französisch

ZUSÄTZLICHE QUALIFIKATIONEN

- EDV-Kenntnisse · sehr gute Kenntnisse in MS-Office (ständig in Anwendung)
 · 2007 bis 2009: Systemadministrator der Abteilung PROF. DR. S. GROND
- Ausbildereignung · Ausbilderbefähigung (IHK) im Rahmen des Studiums an der FACHHOCHSCHULE
 WIESBADEN-GEISENHEIM
- Analytik · sehr gute Kenntnisse in chromatographischen Trennmethode:n:
 HPLC, MPLC, SC sowie Massenspektrometrie (EI, ESI, LC-MS, HR-MS)
 · sehr gute Kenntnisse in mikrobiologischen und molekulargenetischen
 Arbeitsmethoden (Nucleinsäureanalytik, PCR, Real-Time PCR)

STUDIENBEGLEITENDE PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN

- seit 02/2007 Betreuung des Praktikums „Biomolekulare Chemie für Chemiker“ sowie des
 Praktikums „Chemie für Mediziner“, Institut für Organische und Biomolekulare
 Chemie, PROF. DR. CLAUDIA STEINEM
- 05/2006-07/2006 Betreuung des Praktikums „Bodenphysik“, DNPW, Abteilung Agrarpädologie,
 DR. CHRISTIAN AHL, DR. KLAUS BECKER (*i.R.*)
- 03/2003-04/2006 wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Bodenwissenschaften, DR. CHRISTIAN AHL,
 PROF. DR. EM. BRUNK MEYER

AUSGEWÄHLTE POSTER UND VORTRÄGE

- 09/2010 57. Deutsche Pflanzenschutztagung
Vortrag: „Einfluss von Sekundärmetaboliten auf die Thaxtomin A Biosynthese“
- 07/2008 Tübinger Gespräche zur Biologie und Chemie von Mikroorganismen, Blaubeuren,
Vortrag: „Regulationsaktivität und Biosynthese von Iromycinen“
- 06/2008 Microbial Genome Research in the Age of Ultrafast Sequencing Technologies,
 Frankfurt,
Poster: “Biosynthesis and Regulation Activity of the new Iromycin from *Streptomyces*
 sp. Dra 17“

Göttingen, 18. November 2010

8 DANKSAGUNG

Ich möchte dieses Danksagung nutzen, Herrn PROF. DR. PETR KARLOVSKY für die Übernahme der Betreuung, sowie der steten Förderung und Unterstützung zu danken. Frau PROF. DR. ELKE PAWELZIK danke ich für die Übernahme der Korreferenz bei der vorliegenden Arbeit. Frau PROF. DR. STEPHANIE GROND danke ich für die Begleitung meiner Arbeiten am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie. Herrn PROF. DR. AXEL ZEECK danke ich für die Bereitstellung des Actinobakteriums *Streptomyces bottropensis* Dra 17, ohne den die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau PATRICIA BARTOSCHEK, Frau RUTH PILOT, Frau HEIKE ROLLWAGE, Herrn LUKAS SCHMITZ, Frau VERENA BRANDENBURG, Herrn HANS-JÖRG LANGER, Herrn HANS-PETER KROLL, Herrn EUGEN HODYL, Frau Dr. SABINE NUTZ, Frau DR. MELANIE QUITSCHAU, Frau DR. NADINE CZEMPINSKI, Herrn DR. DANIEL VOLLMAR, Herrn DR. ATHANASSIOS MAVRIDIS, Herrn DR. BIRGER KOOPMANN, sowie Herrn PROF. DR. ANDREAS VON TIEDEMANN danke ich für die rege Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Ratschläge und die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Frau KATHARINA DÖLL, Frau DR. SABINE NUTZ, Herrn LARS TORBEN PETERSEN, HERRN DR. DANIEL VOLLMAR sowie Herrn DR. MARKO GENTZSCH danke ich für die inhaltliche und orthographische Korrektur dieser Arbeit.

Mein größter Dank geht an Herrn DR. MARKO GENTZSCH für die geduldige und ausdauernde Unterstützung beim Einstieg in meine Arbeiten am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie sowie „HERRN PROF. DR. DR. HC. EM. SKITTLES“, Herren DR. DANIEL VOLLMAR und natürlich meinen Eltern (!), die mir stets den nötigen Rückhalt während der Zeit dieser Arbeit geboten haben.

9 ERKLÄRUNGEN

1. Hiermit erkläre ich, daß diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits anderen Prüfungsbehörden vorgelegen hat.

Weiter erkläre ich, daß ich mich an keiner anderen Hochschule um einen Doktorgrad beworben habe.

Göttingen, den 16.12.2009

Philip Kössler

2. Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß diese Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Göttingen, den 16.12.2009

Philip Kössler