

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

Tabellenverzeichnis

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

Abbildungsverzeichnis

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

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