

**Universität - Gesamthochschule Kassel**

Fachbereich 11 (Landwirtschaft, Internationale  
Agrarentwicklung und Ökologische Umweltsicherung)

- Fachgebiet Phytomedizin -

Untersuchungen zur Bedeutung phytotoxischer Sirodesmine  
und zur induzierten Seneszenz in Interaktionen  
von *Phoma lingam* mit *Brassica*-Arten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Universität - Gesamthochschule Kassel

vorgelegt von  
Hartwig Mennen  
aus Horum

Witzenhausen 1995

Referent: Prof. Dr. H.-H. Hoppe

Koreferent: Prof. Dr. S. Jutzi

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Juli 1995

Untersuchungen zur Bedeutung phytotoxischer Sirodesmine und zur induzierten Seneszenz in Interaktionen von *Phoma lingam* mit *Brassica*-Arten

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Toxine	1
1.2	<i>Phoma lingam</i> als Erreger der Wurzelhals- und Stängelfäule	4
1.3	Sirodesmin PL in Interaktionen von <i>P. lingam</i> mit <i>Brassica</i> -Arten	5
1.4	Zielsetzungen	5
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>6</b>
2.1	Präparative Isolierung von Sirodesmin PL durch Säulenchromatographie an Kieselgel	6
2.1.1	Flüssigkulturen zur Produktion von Sirodesminen	6
2.1.2	Extraktion und Vorreinigung der Sirodesmine	6
2.1.3	Präparative Säulenchromatographie (SC)	7
2.1.3.1	Vorbereitung einer Kieselgelsäule	7
2.1.3.2	Elution	8
2.1.3.3	Flash Chromatographie	8
2.1.3.4	Regenerieren einer gebrauchten Kieselgelsäule	9
2.2	Untersuchungen zur Wirkung von Behandlungen mit Sirodesmin PL auf nichtinokulierte Kotyledonen und auf Interaktionen mit <i>P. lingam</i>	9
2.2.1	Herstellung der Sporensuspensionen und Vorbereitung der Toxinlösungen	9
2.2.2	Pflanzenanzucht und Inokulation	9
2.2.3	Belichtungszeiten bei der Toxinwirkung auf Kotyledonen	10
2.3	Untersuchungen zur Wirkung einer Keimblattabtrennung auf Interaktionen mit <i>P. lingam</i>	11
2.3.1	Abtrennung von Kotyledonen und Inkubation	11
2.3.2	Untersuchung von infizierten Kotyledonen	11
2.4	Untersuchungen zur Toxinproduktion <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	15
2.4.1	<i>In vitro</i> Inkubation in Flüssigkulturen und auf Agar	15
2.4.2	Inkubation von infiziertem Pflanzengewebe	16
2.4.3	Extraktion von Sirodesminen	16
2.4.4	Qualitative und quantitative Bestimmung von Sirodesminen	18

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>19</b>
3.1	Präparative Isolierung von Sirodesmin PL	19
3.1.1	Kieselgel S (Korngröße 32 - 63 µm)	20
3.1.2.	Kieselgel 60 (Korngröße 15 - 40 µm) und Flash Chromatographie	21
3.1.3	Kieselgel 60 (Korngröße 63 - 200 µm)	23
3.2	Wirkung einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf nichtinokulierte Rapskotyledonen und auf Interaktionen mit <i>P. lingam</i>	25
3.2.1	Keimblattsymptome nach Inokulation mit <i>P. lingam</i>	25
3.2.2	Keimblattsymptome nach Behandlung mit Sirodesmin PL bei unterschiedlicher Belichtungsdauer und Inkubationstemperatur	28
3.2.3	Wirkung einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf inkompatible Interaktionen	33
3.2.4	Wirkung einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf eine kompatible Interaktion	39
3.3	Induzierte Seneszenz durch Abtrennung infizierter Kotyledonen und die Entwicklung von <i>P. lingam</i>	40
3.3.1	Wirkung einer Keimblattabtrennung auf die Entwicklung von <i>P. lingam</i>	41
3.3.2	Überdauerung von <i>P. lingam</i> auf intakten Kotyledonen und Entwicklung nach späteren Abtrennungsterminen	46
3.3.3	Wirkung von Kinetin auf die Seneszenz abgetrennter Kotyledonen und auf die Entwicklung von <i>P. lingam</i>	48
3.4	Toxinproduktion <i>in vitro</i> und in infiziertem Pflanzengewebe	50
3.4.1	Wirkung einer Belichtung auf die Sirodesmingehalte in Flüssigkulturen	51
3.4.2	Wirkung des Nährmediums auf das Myzelwachstum <i>in vitro</i>	51
3.4.3	Wirkung von Zinksalzen auf Myzelwachstum und Sirodesmingehalte <i>in vitro</i>	52
3.4.4	Abbau von Sirodesmin PL in toxinbehandelten Kotyledonen	55
3.4.5	Einfluss von Licht auf den Gehalt von Sirodesminen in infizierten Kotyledonen	56
3.4.6	Zeitlicher Verlauf der Sirodesminbildung in infizierten Kotyledonen	58
3.4.7	Sirodesmine in infizierten Hypokotylen und Sprosssteilen vom Freiland	62
3.4.8	Einfluss einer Belichtung auf die Läsionsentwicklung und den Gehalt von Sirodesminen in künstlich infizierten Hypokotylen	63

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1	Säulenchromatographie an Kieselgel zur präparativen Isolation von Sirodesmin PL	68
4.2	Mögliche Wirkung von Sirodesmin PL in Pflanzen	69
4.3	Induzierte Seneszenz und Einfluss auf die Resistenz gegenüber <i>P. lingam</i>	72
4.4	Einflussfaktoren auf die Toxinproduktion <i>in vitro</i> und in infiziertem Pflanzengewebe	73
4.5	Bedeutung von Sirodesmin PL in infizierten Pflanzen	75
4.6	Ausblick auf weitere Forschungsarbeiten	76
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>92</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Toxine

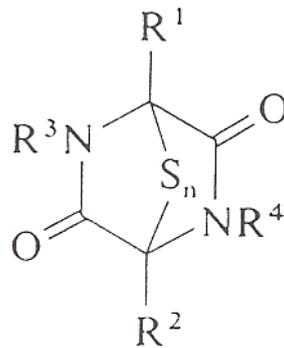
Die Interaktionen zwischen pathogenen Mikroorganismen und Pflanzen sind komplex und das gegenwärtige Wissen über dieses Zusammenspiel ist nur sehr lückenhaft. Es werden große Anstrengungen darauf verwendet, die Pathogenese auf molekularem Niveau besser zu verstehen. Auf der Ebene der Pflanze gilt das Interesse den Abwehrfaktoren, wie z.B. den PR-Proteinen (LINTHORST 1991, BOWLES 1990, BOL et al. 1990, DIXELIUS 1993), Proteinaseinhibitoren (RYAN 1990, PENG & BLACK 1976), induzierbaren Phytoalexinen (BAILEY 1981, DAHIYA & RIMMER 1989, GROSS 1993), präformierten niedermolekularen Abwehrstoffen (MITHEN et al. 1986, PETERKA 1990) und anderen mehr. Auf der Ebene des Pathogens spielen lytische Enzyme, Enzyme zur DNA-Manipulation des Wirtes, Wachstoffsstoffe, aber auch Toxine eine wichtige Rolle. Scheffer definierte Toxine als Produkte von Mikroorganismen, die offensichtliche Schäden an Pflanzen verursachen und mit hoher Wahrscheinlichkeit an Pflanzenkrankheiten beteiligt sind (SCHEFFER 1983).

Die chemischen Strukturen und Molekülmassen verschiedener Toxingruppen sind sehr unterschiedlich. So bildet *Corynebacterium insidiosum* in Luzerne Welketoxine als komplexe Glycopeptide mit Molekülmassen von  $5 \cdot 10^6$  Dalton (VAN ALFEN & TURNER 1975, STROBEL 1982) und *Alternaria alternata* die vergleichsweise einfach aufgebaute Tenuazonensäure mit einer Molekülmasse von nur 185 Dalton (STIERLE et al. 1989). Die Strukturformeln zahlreicher Toxine sind bis heute noch nicht genau bekannt. YODER unterscheidet die biologische Rolle von Toxinen als Pathogenitätsfaktoren, wenn ein Toxin notwendig ist, um eine Krankheit zu verursachen, und als Virulenzfaktoren, wenn ein Toxin das Ausmaß der Krankheit erweitert (YODER 1980).

Zu den Toxinen, die als Pathogenitätsfaktoren wirken, zählen generell die wirtsspezifischen Toxine (MITCHELL 1984). Sie schädigen nur Pflanzen, auf denen sich toxinproduzierende Erreger entwickeln können (SCHLÖSSER 1983). So wirkte ACT-Toxin Ib von *Alternaria alternata* in Konzentrationen von nur 10 ng/ml bei anfälligen Zitrus-Arten toxisch. Bei resistenten Zitrus-Arten dagegen waren sogar noch Dosierungen von 20 µg/ml ohne Wirkung (KOHMOTO & OTANI 1991). Angriffsziele der wirtsspezifischen Toxine sind häufig Plasmamembranen, Mitochondrien und Chloroplasten (PARK et al. 1987). So könnten in sensitiven Arten bestimmte Schlüsselenzyme und Rezeptormoleküle beeinflusst werden, die in resistenten Pflanzen nicht vorkommen (SCHEFFER & PRINGLE 1964, DALY & KNOCH 1982, YODER 1980). In unempfindlichen Pflanzen dagegen könnten die Toxine schneller und beständiger metabolisiert (SCHEFFER 1976, RUDOLPH 1976, WOOD 1989) oder vom Wirkort abgeschirmt werden (WATRUD et al. 1975). Nichtwirtsspezifische Toxine als Virulenzfaktoren (MITCHELL 1984) sind dagegen in mehreren Pflanzenarten wirksam. Die verschiedenen Wirkungsorte und -mechanismen sind dabei meistens nicht eindeutig bekannt. Man vermutet z.B. toxische Effekte durch den Angriff auf ubiquitär

vorkommende Enzyme (z.B. Fusicoccin auf die Plasmalemma ATPase, MARRÉ 1979, STROBEL 1982), die Wirkung als Radikalbildner (z.B. Cercosporin, DAUB & HANGARTER 1983), die Verstopfung des Xylems (z.B. Amylovorin, VAN ALFEN & ALLARD-TURNER 1979), die Erhöhung der Permeabilität von Biomembranen (z.B. Ophiobolin, BALLIO 1991) und durch chelatisierende Effekte auf Metallkationen (z.B. Lycomarasmin, ISAAC 1992).

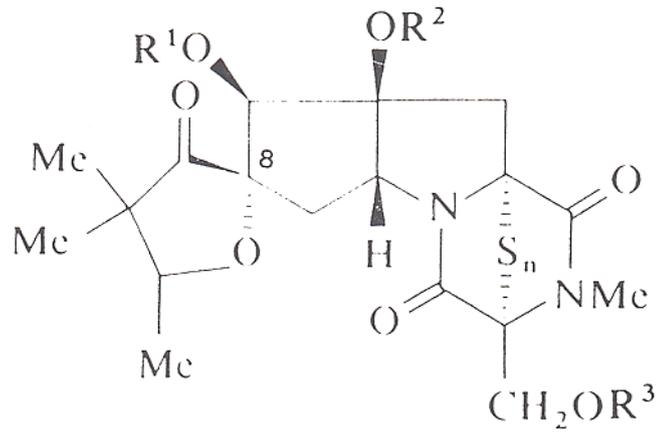
Toxine aus der Gruppe der Epipolythiopiperazine (SAMMES 1975), wie z.B. die Aranotine (NAGARAJAN et al. 1968a und b, NEUSS et al. 1968), die Chaetocine (HAUSER et al. 1970, 1972), die Gliotoxine (KIRBY & ROBINS 1980, SAKAI & WATANUKI 1987, RIDOUT & LUMSDEN 1993), die Hyalodendrine (STRUNZ et al. 1973, 1975), die Melinacidine (ARGOUDELIS 1972), die Sporidesmine (FRANCIS et al. 1972, SAFE & TAYLOR 1972), die Verticilline (MINATO et al. 1973) und die Sirodesmine (CURTIS et al. 1977) sind niedermolekulare, meist phytotoxische Verbindungen, die sich in ihrer Grundstruktur durch einen Dioxopiperazinring und eine Schwefelbrücke (Abb. 1) auszeichnen (KIRBY & ROBINS 1980).



**Abb. 1** Grundstruktur der Epipolythiodioxopiperazine

Für viele dieser Toxine wurde inzwischen eine antivirale, antibakterielle, antimykotische und phytotoxische Wirkung nachgewiesen (TAYLOR 1971, BOUDART 1989, POIRET et al. 1985, PEDRAS et al. 1987). Sirodesmine wurden erstmals 1974 (Patent OCTROOIRAAD NEDERLAND Nr. 7312627, 1974, British Patent Nr. 1 387 504, 1976) von Mitarbeitern der Firma Imperial Chemical Industries aus Flüssigkulturen von *Sirodesmium diversum* (Cooke) isoliert. Dabei wurden bis zu 15 verschiedene Sirodesminmoleküle festgestellt, die sich in der Zahl der Schwefelatome der Sulfidbrücke, an drei möglichen Stellen in der Zahl der Acetylgruppen oder H-Atomen und in der Epimerie am C 8 Atom (Abb.2) unterscheiden (CURTIS et al. 1977, BU'LOCK & CLOUGH 1992). Als dominierendes Toxin wurde in *Sirodesmium diversum* Sirodesmin A gefunden.

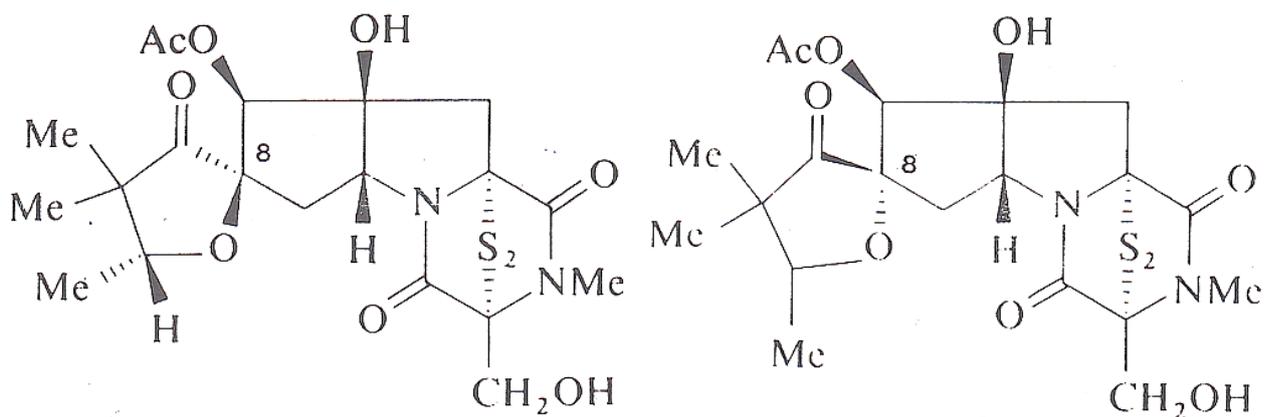
1977 wurden von einer französischen Arbeitsgruppe auch in Kulturfiltraten von *Phoma lingam* Sirodesmine isoliert und bestimmt (BOUSQUET et al. 1977, FÉRÉZOU et al. 1977).



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	n
Sirodesmin PL	CH <sub>3</sub> CO	H	H	2
Sirodesmin J	CH <sub>3</sub> CO	H	H	3
Sirodesmin K	CH <sub>3</sub> CO	H	H	4
Deacetylsirodesmin PL	H	H	H	2
Deacetylsirodesmin J	H	H	H	3
Deacetylsirodesmin K	H	H	H	4

**Abb. 2** Grundstruktur der Sirodesmine aus Kulturfiltraten von *P. lingam*

Das dominierende Toxin in den Flüssigkulturen von *P. lingam* war dabei Sirodesmin PL, welches auch unter der Bezeichnung Sirodesmin G in geringen Mengen von *Sirodesmium diversum* neben anderen Sirodesminen gebildet wurde. Sirodesmin PL besitzt eine Molekülmasse von 486 Dalton und zeichnet sich durch eine Disulfidbrücke im Dioxopiperazinring aus. In mehreren Forschungsberichten der letzten 15 Jahre wurde die unterschiedliche Epimerie von Sirodesmin A und Sirodesmin PL (Abb. 3) nicht beachtet und es traten Ungenauigkeiten in der Bezeichnung dieser und anderer Sirodesmine auf.



**Abb. 3** Epimerie von Sirodesmin A und Sirodesmin G (= Sirodesmin PL)

Die am C 8 Atom einheitlichen Sirodesmine A, B, und C (n = 2, 4, 3 ) werden mehrheitlich von *Sirodesmium diversum* (BU'LOCK & CLOUGH 1992) gebildet, die epimeren Formen Sirodesmin PL, J und K (n = 2, 3, 4 ) sind dagegen in *P. lingam* dominant (PEDRAS et al. 1990). Eine Toxinbildung wurde bisher jedoch fast nur unter *in vitro* Bedingungen beobachtet. Eine quantitative Bestimmung der Sirodesmine im infizierten Gewebe steht noch aus.

## 1.2 *Phoma lingam* als Erreger der Wurzelhals- und Stängelfäule an Raps

Der Pilz *Phoma lingam* (Teleomorph *Leptosphaeria maculans*) ist einer der wichtigsten Schaderreger beim Anbau vieler *Brassica*-Arten, insbesondere bei Winterraps. Von Raps konnten aggressive und nichtaggressive Formen des Pilzes isoliert werden (KOCH et al 1989, DEUKER-ISERMEYER et al. 1990, RIMMER & VAN DEN BERG 1992). Aggressive Isolate bilden dabei *in vitro* wirtsunspezifische, phytotoxische Sirodesmine, während sich die nichtaggressiven Isolate durch eine Pigmentbildung auszeichnen. Es wird vermutet, dass Sirodesmine als Virulenzfaktoren agieren (BADAWY & HOPPE 1989 b). So können aggressive Pathotypen alle Pflanzenteile besiedeln und auf diesen Krankheitssymptome hervorrufen. Die bedeutendsten Schäden verursacht der Pilz jedoch an Hypokotylen. Auf diesen Pflanzenteilen entwickeln sich braune Nekrosen, welche sich vergrößern und die Hypokotyle vermorschen lassen. Die betroffenen Pflanzen verlieren an Standfestigkeit und der Transport der Nährstoffe in den Leitungsbahnen wird bei starkem Befall unterbrochen. Solche Pflanzen sind dann zum vorzeitigen Absterben verurteilt. Der Pilz verbreitet sich über kurze Entfernungen durch Pyknosporenschleim im Spritzwasser (PETRIE 1978, WILLIAMS 1992) und über längere Distanzen (2 bis 5 km) durch Ascosporenflug (SCHRAMM & HOFFMANN 1991, HALL 1992). Über die Bedeutung von mechanisch erzeugten Eintrittspforten in die Pflanze durch Schädigungen (Insektenfraß, Miniergänge etc.) für die Pyknosporen liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (NEWMAN 1984, HÄNSEL 1991, BROSCHEWITZ et al. 1993). In kompatiblen Wirt – Parasit-Beziehungen entwickelt sich *P. lingam* zunächst im Pflanzengewebe, ohne Symptome hervorzurufen (HAMMOND et al. 1985). Nach einer Inkubationsdauer von mehr als zehn Tagen entstehen auf den befallenen Pflanzenorganen deutliche Symptome (HENDERSON 1918). Das betroffene Gewebe beginnt zu dehydrieren, einzusinken und abzusterben. Auf ihm entstehen häufig Pyknidien, die unter feuchten Inkubationsbedingungen Pyknosporenschleim absondern. Auf befallenen Hypokotylen werden die Symptome und Schädigungen meist erst im Frühjahr bei steigenden Temperaturen sichtbar (GLADDERS & MUSA 1980, GABRIELSON 1983, NATHANIELS & TAYLOR 1983).

Welche Mechanismen der Pilz während seiner biotrophen Lebensphase (HAMMOND et al. 1985, HAMMOND & LEWIS 1987) bei der latenten Entwicklung und während seines nekrotrophen Stadiums benutzt, ist bis heute nur ansatzweise bekannt. Man denkt an geringe Gehalte lytischer Enzyme im Bereich der Hyphenspitzen (DAHIYA 1988), die der Pilz beim Vordringen einsetzt. Die Pflanzenzellen werden selbst zunächst nicht angegriffen, das Wachstum erfolgt interzellulär (ABADIE & BOUDART 1982). Nach etwa zehntägiger Inkubation endet plötzlich die symptomlose Entwicklung von *P. lingam* in inokulierten Kotyledonen. Innerhalb weniger Stunden bilden sich fast gleichzeitig auf allen behandelten Kotyledonen ausgedehnte Läsionen. Zellwände, Plasmalemma und Tonoplasten verlieren ihre Integrität und Hyphen dringen in die kollabierten Pflanzenzellen ein (BOUDART 1981).

### **1.3 Sirodesmin PL in Interaktionen von *P. lingam* mit *Brassica*-Arten**

Es ist bisher nicht sicher geklärt worden, welche Kräfte des Pilzes die plötzliche Symptombildung auf Kotyledonen, Blättern und Hypokotylen in kompatiblen Interaktionen verursachen. Lytische Enzyme könnten dabei von Bedeutung sein. Aggressive Isolate bilden in Flüssigkulturen zellwanddegradierende Cellulasen, Polygalacturonasen,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucanasen (HANACZIWSKIJ & DRYSDALE 1984, DAHIYA 1988, HASSAN et al. 1991). Aus Läsionen infizierter Pflanzen konnte Polygalacturonase-, Arabinosidase- und Carboxymethylcellulase-Aktivität festgestellt werden (EASTON & ROSSALL 1985).

Appliziert man phytotoxische Sirodesmine auf verletzte Blätter verschiedener Pflanzen-Arten, entstehen innerhalb von 48 Stunden Chlorosen, die denen infizierter anfälliger *Brassica*-Arten sehr ähnlich sind (PEDRAS et al. 1987, SJÖDIN et al. 1988, eigene Beobachtungen). Sirodesmine werden aber nur von aggressiven *Phoma*-Isolaten gebildet. Daher ist die Vermutung naheliegend, dass diese Toxine für die Läsionsbildung mitverantwortlich sind. Allerdings liegen seit der Entdeckung von Sirodesminen aus Flüssigkulturen im Jahr 1977 bisher noch keine detaillierten Berichte über diese Toxine in infiziertem Pflanzengewebe vor. Außer einer einmaligen Isolation von Sirodesmin PL aus einem Hypokotyl von *B. napus* (BOUDART 1978) und ersten Versuchen in der Dissertation von BADAWY 1990, ist im Schrifttum lediglich über vergebliche Extraktionsversuche aus infiziertem Pflanzenmaterial (PEDRAS & TAYLOR 1993) berichtet worden.

### **1.4 Zielsetzungen**

In der vorliegenden Arbeit werden anfällige und resistente Interaktionen von *P. lingam* mit *Brassica*-Arten unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung phytotoxischer Sirodesmine untersucht.

Dabei sind folgende Problemstellungen von Relevanz:

- Entwicklung einer Methode zur Isolierung von Sirodesmin PL in größeren Mengen
- Einfluss einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf nichtinokulierte Rapskotyledonen
- Einfluss einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Symptomentwicklung inokulierter Rapskotyledonen
- Einfluss einer induzierten Seneszenz auf die Resistenzeigenschaften inokulierter Kotyledonen
- Einflussfaktoren der Toxinbildung
- Bildung von Sirodesmin PL in der infizierten Pflanze
- Korrelation der Toxingehalte in der Pflanze mit der Symptomentwicklung

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte das Verständnis über die Interaktionen von *P. lingam* mit *Brassica*-Arten vertieft werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Präparative Isolierung von Sirodesmin PL durch Säulenchromatographie an Kieselgel**

#### **2.1.1 Flüssigkulturen zur Produktion von Sirodesminen**

Aggressive *Phoma*-Isolate wurden auf V8-Agrar im Dunklen kultiviert. Erlenmeyerkolben mit 30 ml Czapek-Dox-Nährlösung wurden mit einem Myzelstück (Durchmesser 8 mm) beimpft. Die Nährlösung bestand aus folgenden Komponenten (g/l):

33,4 g Czapek-Dox-Pulver,

(bestehend aus: 2,0 g Natriumnitrat,  
0,5 g Kaliumchlorid,  
0,5 g Magnesiumglycerophosphat,  
0,001 g Eisen(II)-Sulfat,  
0,35 g Kaliumsulfat,  
30,0 g Saccharose,)

1,5 g Hefeextrakt,

2,0 g Calciumcarbonat und

1,0 l aqua. dest.

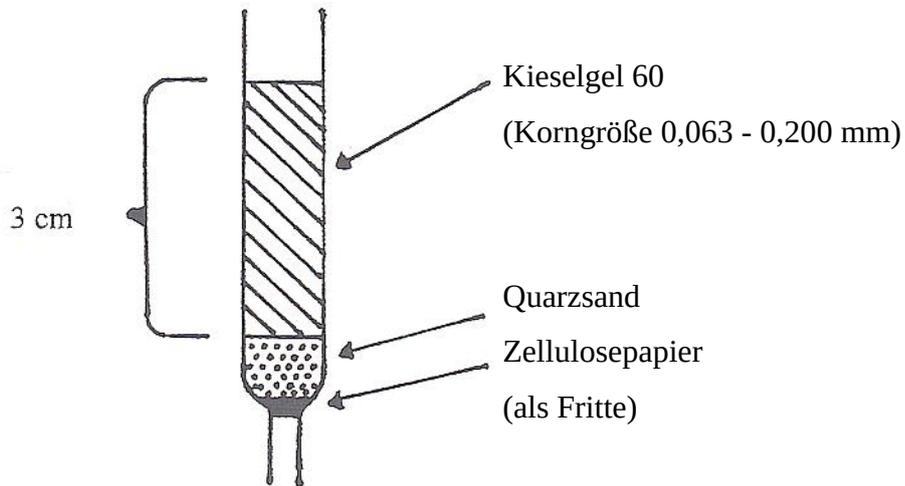
Die Flüssigkulturen wurden drei Wochen bei 20 °C im Dunklen als Standkultur inkubiert.

#### **2.1.2 Extraktion und Vorreinigung der Sirodesmine**

Während der Inkubationszeit bildeten die *Phoma*-Isolate eine dichte schwimmende Myzeldecke und schieden Sirodesmine in die Flüssigkulturen aus. Die Flüssigmedien wurden, durch Zellulosefilter vom Myzel getrennt, vereinigt (ca. 600 ml) und zweimal mit etwa 200 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Eine Vorreinigung der Toxine zur weiteren präparativen Isolierung erfolgte in zwei aufeinander folgenden Schritten:

##### **a) Vorchromatographie**

Der Rückstand in den Rundkolben wurde zunächst in Ethylacetat gelöst, in Spitzenröhrchen überführt und unter einem N<sub>2</sub> Gasstrom erneut bis zur Trockene eingengt. Der Inhalt wurde nacheinander in je 2 ml Petroleumbenzin und 2 ml Dichlormethan aufgenommen und auf eine Vorchromatographiesäule gegeben. Diese aus Pasteurpipetten gefertigten Kieselgelsäulen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abb. 4** Aus einer Pasteurpipette gefertigte Kieselgelsäule zur Vorchromatographie

Mit den Elutionsmitteln Petroleumbenzin und Dichlormethan waren die Sirodesmine im Kieselgel immobil und verblieben in der oberen Zone des Gelbettes, während apolarere Substanzen mit Dichlormethan eluiert und verworfen wurden. Mit 3 ml Ethylacetat wurden die Sirodesmine schließlich von der Vorchromatographiesäule eluiert und erneut bis zur Trockne eingengt.

#### b) Fällung der Toxine mit Petroleumbenzin

Der toxinhaltige Rückstand wurde in 2 ml Chloroform gelöst und anschließend durch Zugabe von 100 ml Petroleumbenzin bei Raumtemperatur ausgefällt, abzentrifugiert, an der Luft getrocknet und gewogen. Aus 1 l Kulturfiltrat ließen sich etwa 50 mg Sirodesmine in Form eines grauweißen Pulvers gewinnen, das bei -20 °C gelagert wurde.

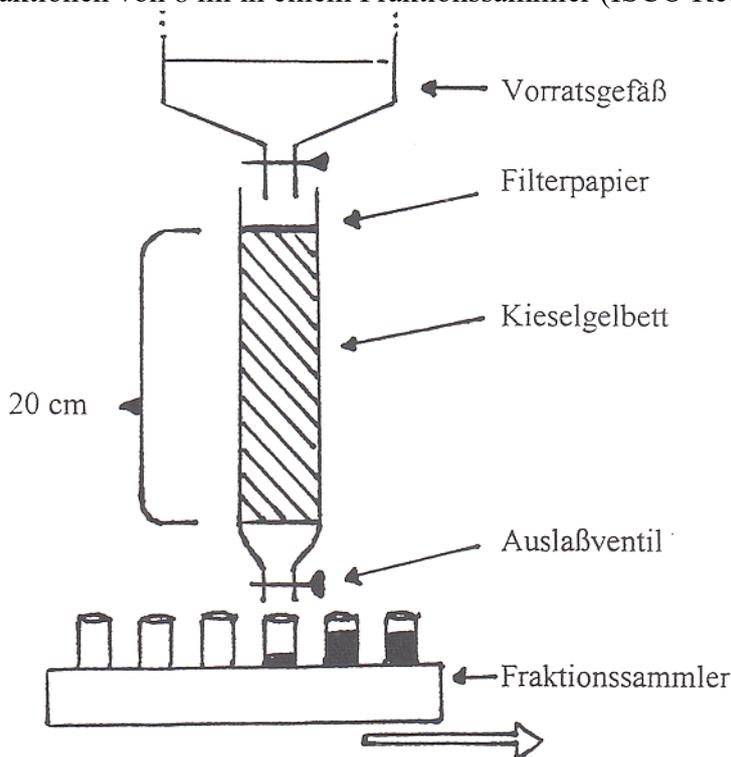
### 2.1.3 Präparative Säulenchromatographie (SC)

#### 2.1.3.1 Vorbereitung einer Kieselgelsäule

Bei der SC wurden drei verschiedene Kieselgele eingesetzt: Kieselgel S (Korngröße 32 - 63 µm, Riedel de Haen), Kieselgel 60 (Korngröße 15 - 40 µm, Merck) und Kieselgel 60 (Korngröße 63 - 200 µm, Merck). Die Kieselgele wurden mindestens 4 h bei 105 °C im Trockenschrank aktiviert, anschließend in Mengen von je 25 g in ca. 100 ml Elutionsmittel suspendiert, im Exsikkator entgast und in einem Fluss in eine Glassäule gefüllt (Länge der Säule: 20 cm; Innendurchmesser 1,8 cm; Höhe der Säulenfüllung ca. 17 cm). Am Boden der Säule befand sich eine Glassinterplatte. Die Säule blieb während des Befüllens geöffnet, so dass durch den Strom des Elutionsmittels das Absetzen des Kieselgels erleichtert wurde. Auf die Oberfläche des Gelbettes wurde ein Filterpapier aufgelegt, um ein Aufwirbeln des Kieselgels während des Auftrags zu vermeiden. Nach einem mindestens zwölfstündigen Absetzen des Gels konnte mit der Elution begonnen werden.

### 2.1.3.2 Elution

100 bzw. 200 mg Sirodesmingemische wurden in 2 ml Elutionsmittel gelöst und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Einsickern wurden zweimal 2 ml Elutionsmittel aufgetragen, um die Sirodesmine in das Gelbett eindringen zu lassen. Nach dem dritten Einsickern wurde ein Vorratsgefäß (500 ml) für die Elutionsmittel angeschlossen. Der Eluatfluss wurde mit dem Auslassventil auf eine Flussgeschwindigkeit von ca. 0,7 ml / min eingestellt. Das Eluat wurde in Fraktionen von 8 ml in einem Fraktionssammler (ISCO Retriever IV) aufgefangen.



**Abb. 5** Säulensystem zur präparativen Säulenchromatographie

Anteile der Fraktionen (0,4 ml) wurden eingengt und dünnschichtchromatographisch auf ihre Identität und Reinheit überprüft.

### 2.1.3.3 Flash Chromatographie

Unter dem Begriff Flash Chromatographie (STILL et al. 1978, PEDRAS et al. 1990) versteht man die Anwendung der Säulenchromatographie mit Gasen, die den Eluenten durch das Kieselgelbett treiben. Mit diesem Verfahren kann die Chromatographie wesentlich beschleunigt und auf einen Fraktionssammler verzichtet werden.

Dazu wurde die Chromatographiereinheit in einem Stativ drucksicher eingespannt. Nach dem Auftragen des Toxingemisches und dem Anschluss des gefüllten Vorratsgefäßes (vgl. 2.1.3.2) wurde das Gefäß mit N<sub>2</sub> (Stickstoffgas 4.6, Linde) unter Druck gesetzt. Es wurde ein Eluatfluss von 25 ml / min eingestellt, so dass die Fraktionen manuell aufgefangen werden konnten. Bei dieser Durchflussrate betrug der Druck für Kieselgel 60 (Korngröße 15 - 40 µm) 1,5 bar und für Kieselgel 60 (Korngröße 63 - 200 µm) 0,5 bar.

#### **2.1.3.4 Regenerieren einer gebrauchten Kieselgelsäule**

Eine bereits gebrauchte Kieselgelsäule konnte nach einem Regenerationsverfahren zur Chromatographie von Sirodesmin PL nochmals verwendet werden. Voraussetzung dazu war jedoch eine Vorreinigung des Sirodesmingemisches (vgl. 2.1.2). Zum Regenerieren und Äquilibrieren wurden nacheinander 100 ml Methanol, 100 ml Dichlormethan und 100 ml des Elutionsmittels durch die Säule gegeben. Ein Aktivieren der Säule war jedoch unter diesen Bedingungen nicht möglich. Daher musste mit einer Abnahme der Trennungsleistung gerechnet werden.

## **2.2 Untersuchungen zur Wirkung von Behandlungen mit Sirodesmin PL auf nicht-inokulierte Kotyledonen und in Interaktionen mit *P. lingam***

### **2.2.1 Herstellung der Sporensuspensionen und Vorbereitung der Toxinlösungen**

Für die Inokulationen auf Kotyledonen wurden Suspensionen von Pykno-sporen benötigt. Dazu wurden Isolate auf V8 Agar in Dunkelheit bei ca. 20 °C kultiviert. Nichtaggressive Isolate bildeten dabei meistens schon nach kurzer Inkubationsdauer (eine Woche) Pyknidien, während aggressive Isolate wie z.B. MIX 7 in der Regel erst durch eine UV Bestrahlung zur Pyknidienbildung angeregt werden konnten. Zur Sporenvermehrung wurden Pyknidien mit pinkfarbenem Sporenschleim als Agarplättchen (Durchmesser acht mm) ausgestanzt, in 2,5 ml steriles Aqua dest. überführt und darin geschüttelt. Die im Wasser suspendierten Sporen wurden auf zwei Petrischalen mit V8 Agar verteilt und zur Inkubation in ein UV-Kabinett bei 20 °C gestellt. Nach 14 Tagen entwickelten sich reife Pyknidien mit Sporenschleim. Aus den ausgestanzten Agarplättchen wurden wie zuvor Pykno-sporen ausgeschwemmt, in einer Thomakammer gezählt und anschließend durch Verdünnung der Sporensuspension auf eine Dichte von 10<sup>6</sup> Pykno-sporen/ml eingestellt.

Das in Pulverform gelagerte Sirodesmin PL wurde in Ethanol vorgelöst und zu den für die Inokulation verwendeten wässrigen Sporensuspensionen gegeben. Die Ethanolkonzentration in den Sporensuspensionen betrug 1,0 %. Die Versuche wurden mit 30, 100 und 300 µg Sirodesmin PL/ml Sporensuspension bzw. 0,15; 0,5 und 1,5 µg Toxin je Verletzungsstelle durchgeführt. Sporenfreie Toxinlösungen und toxinfreie Sporensuspensionen dienten jeweils als Kontrollen.

### **2.2.2 Pflanzenanzucht und Inokulation**

Samen von *B. napus* cv. Jet Neuf und Quinta, sowie *B. juncea* cv. Aurea wurden in Multitopfplatten ausgesät und entwickelten sich unter 400 W Glühlicht (RNP-T 400 W) bei 200 µE/m<sup>2</sup> \* sec für 8 Tage im Gewächshaus bei 20 °C.

Zur Inokulation wurden die Kotyledonen mit einer Impfnadel jeweils in der Mitte jeder Blatthälfte verletzt. Auf diese Einstichstellen wurden je 5 µl der Behandlungssuspension aufgetragen. Bei einer speziellen Versuchsserie wurden drei Tage nach der Erstinokulation weitere Toxinbehandlungen (mit erneut gesetzten Verletzungen) vorgenommen.

Die Pflanzen wurden anschließend für 18 Tage in Eisfink-Thermostaten bei 20 °C und bei 100 µE/

m<sup>2</sup> \* sec Licht und fast 100 % relativer Luftfeuchte inkubiert. Die sich entwickelnden Laubblätter mussten dabei regelmäßig entfernt werden, um die Kotyledonen länger lebensfähig zu halten.

### 2.2.3 Belichtungszeiten bei der Toxinwirkung auf Kotyledonen

Um den Einfluss der Belichtung auf die Wirkung des Toxins zu erfassen, wurden Kotyledonen der Sorte Jet Neuf mit 0,15, 0,5 und 1,5 µg Sirodesmin pro Verletzung behandelt und bei 15 °C bzw. 20 °C unterschiedlichen Belichtungszeiten ausgesetzt. Der vier Tage dauernde Versuch bestand aus nachfolgenden Varianten (h = 16 Stunden-Tag, d = ohne Belichtung):

- |                               |      |                               |      |
|-------------------------------|------|-------------------------------|------|
| a) vier Tage dunkel           | d4   | d) 2 Tage dunkel, 2 Tage hell | d2h2 |
| b) 1 Tag hell, 3 Tage dunkel  | h1d3 | e) 1 Tag dunkel, 3 Tage hell  | d1h3 |
| c) 2 Tage hell, 2 Tage dunkel | h2d2 | f) 4 Tage hell                | h4   |

Die Belichtungszeiten wurden unmittelbar nach der Toxinbehandlung variiert. Während der Inkubation wurde täglich die Läsionsausprägung bonitiert (Tab. 1).

**Tab. 1** Boniturnoten zur Läsionsausprägung auf Kotyledonen

Boniturnote	Beschreibung zur Ausprägung
0	keine Symptome
1	Gewebe sinkt nur unmittelbar am Verletzungsrand ein, keine Verfärbung
2	Gewebe sinkt stärker ein, keine Verfärbung
3	vorübergehende Verdunklung des eingesunkenen Gewebes
4	Aufhellung der entstandenen Läsion

Zusätzlich wurden täglich die Läsionsradien festgestellt, die sich aus nachfolgender Formel ergaben: (Läsionsdurchmesser minus Verletzungsdurchmesser) \* 0,5

## 2.3 Untersuchungen zur Wirkung einer Keimblattabtrennung auf Interaktionen mit *P. lingam*

Es wurden mehrfaktorielle Versuche mit verschiedenen Sorten, *Phoma*-Isolaten, Kinetin-behandlungen und Abtrennungsterminen der Kotyledonen angelegt. Dabei wurden vier verschiedene Merkmale für die Pilzentwicklung untersucht, die in den folgenden zwei Tabellen zusammengefasst sind:

**Tab. 2** Einflussfaktoren und Faktorstufen zu den Wirkungen von Keimblattabtrennungen auf die Entwicklung von *P. lingam*

Faktor	Stufen
Sorten	Aurea ( <i>B. juncea</i> ), Quinta ( <i>B. napus</i> )
Isolate	PHW 1261 (NA), IIa 1 (A1) und MIX 7 (A2)
Kinetinkonzentration	0 oder 100 ( $\mu\text{g/ml}$ )
Termin der Blattabtrennung	keine Abtrennung (Kontrolle) oder Abtrennung 3, 6, 9, 12, 15 oder 18 Tage nach der Inokulation

**Tab. 3** Übersicht zu den untersuchten Merkmalen

Makroskopisch:	Vermessen der Läsionsradien (mm)
Anfärben des Pilzgewebes und mikroskopische Untersuchung:	Vermessung der Hyphenlängen (mm) Einwachsen der Hyphen in die Petiole (+/-) Bonituren der Pyknidienentwicklung (Stadien: 0 - 4)

### 2.3.1 Abtrennung von Kotyledonen und Inkubation

Die Pflanzen wurden in Multitopfplatten (vgl. 2.2.2) angezogen. Sie entwickelten sich in Klimaschränken (Heräus Vötsch) bei 20 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 90 %. Die Belichtungsintensität betrug  $210 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{sec}$  im 16 Std.-Tag. Eine Inokulation mit *Phoma*-Isolaten wurde am siebten Tag nach der Saat an intakten Kotyledonen durchgeführt (vgl. 2.2.2). Die Kotyledonen wurden am Tag der Inokulation und 3, 6, 9, 12, 15 sowie 18 Tage danach abgetrennt und auf angefeuchtetem Filterpapier in Petrischalen inkubiert. Für den Phytohormonversuch war das Filterpapier mit 100 ( $\mu\text{g/ml}$ ) Kinetin getränkt worden. Als Kontrollen dienten infizierte Kotyledonen intakter Pflanzen.

### 2.3.2 Untersuchung von infizierten Kotyledonen

Als erstes Merkmal der Pilzentwicklung wurden auf den Kotyledonen die Radien der Läsionen gemessen. Anschließend wurden die Kotyledonen in Lactophenol für mikroskopische Untersuchungen entfärbt (modifiziert nach KEOGH et al. 1980).

Lactophenol setzte sich zusammen aus:

10 ml	Glyzerin,
10 g	Phenol,
10 ml	Ethanol,
10 ml	Aqua dest.
10 ml	Milchsäure.

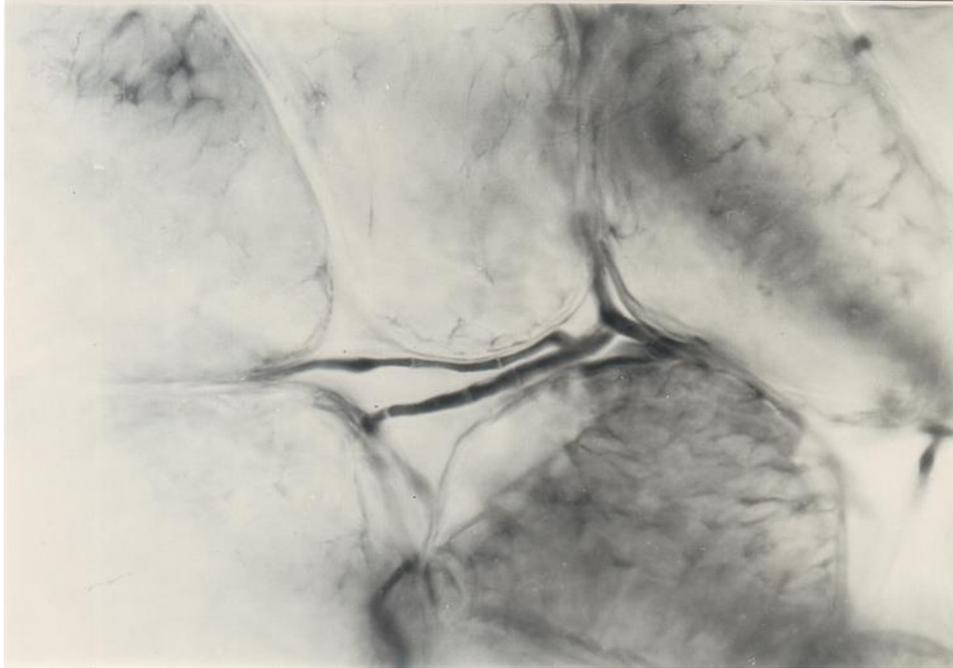
Nach zweiminütigem Sieden traten Farbstoffe aus dem Pflanzengewebe aus, die die Lösung grün-oliv färbten. Eine Wiederholung dieser Prozedur nach einer Stunde mit frischer Lösung bewirkte, dass die Kotyledonen fast frei von löslichen Farbstoffen waren und eine weiße bis gelbweiße Färbung angenommen hatten. Nach einem einminütigen Kochen in Lactophenol-Trypanblau Lösung (wie oben + 0,02 g Trypanblau) färbten sich die Kotyledonen und das Pilzgewebe. In Chloralhydrat (5g in 2 ml Aqua. dest.) differenzierte sich innerhalb von drei bis vier Stunden die Farbe in den Kotyledonen derart, so dass nur Gewebe von *P. lingam* die blaue Färbung behielt und in den Kotyledonen mikroskopisch sichtbar wurde.

Bei der mikroskopischen Messung der Hyphenlänge wurden die größten Entfernungen von Hyphenspitzen bis zum nächsten Rand der Inokulationsstelle festgehalten. Ein mögliches Eindringen von Pilzhyphen in den Blattstiel (Petiole) wurde als weiteres Merkmal notiert. Als vierter Parameter diente die Einteilung der Pyknidienentwicklung in fünf Stadien:

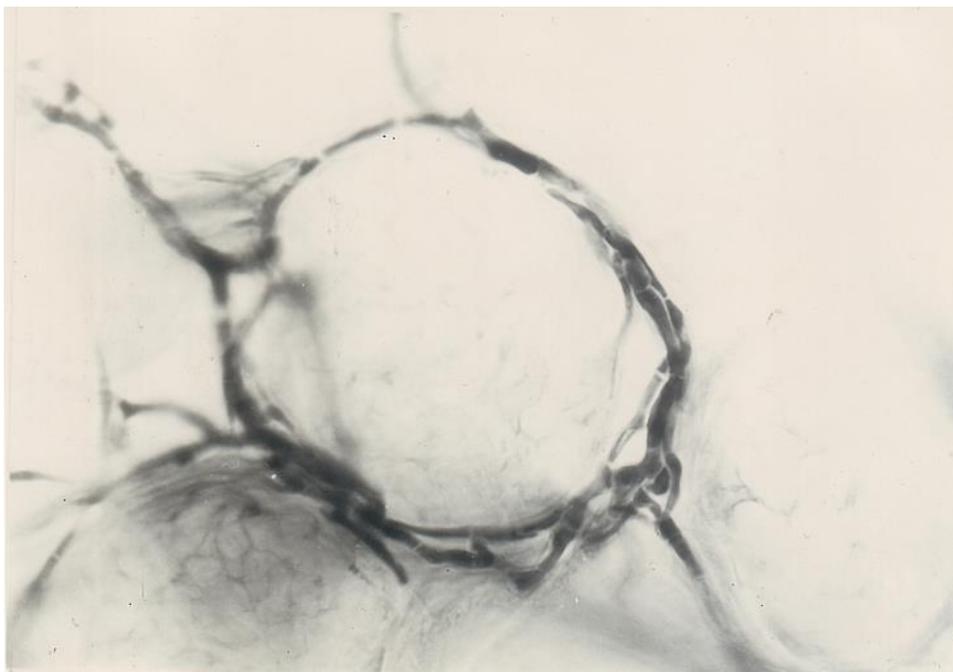
**Tab. 4** Boniturnoten zur Einteilung der Pyknidienentwicklung in fünf Stadien

Boniturnote	Stadien der Pyknidienbildung
0	vereinzelte Hyphen (Abb. 6)
1	sich verdickende Hyphen, erste Ansätze einer Myzelverdichtung (Abb. 7)
2	fortschreitende Myzelverdichtung (Abb. 8)
3	kleine, noch unreife Pyknidien (Abb. 9)
4	große, reife Pyknidien mit Sporenschleim (Abb. 10)

Die Stadien der Pyknidienentwicklung werden durch die folgenden Abbildungen illustriert:



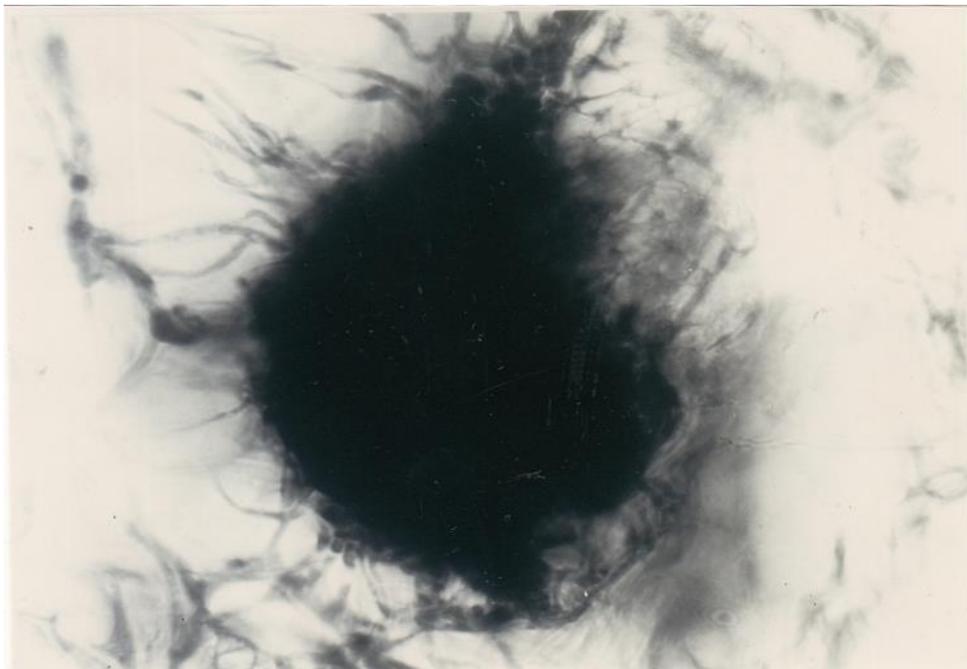
**Abb. 6** Vereinzelte Hyphen von *P. lingam* (Boniturnote 0)



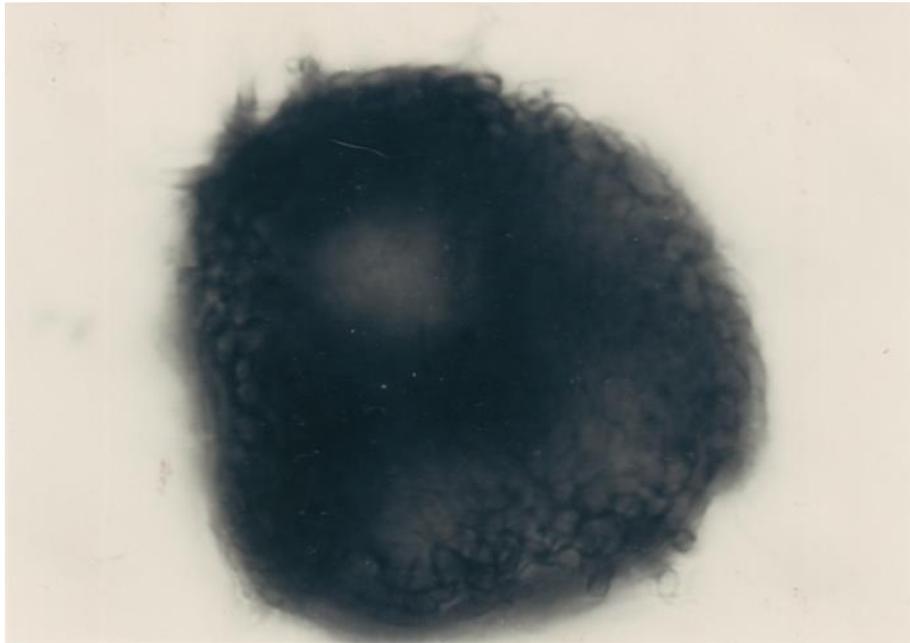
**Abb. 7** Sich verdickende Hyphen, erste Ansätze einer Myzelverdichtung (Boniturnote 1)



**Abb. 8** fortschreitende Myzelverdichtung (Boniturnote 2)



**Abb. 9** Kleine, noch unreife Pyknidien (Boniturnote 3)



**Abb. 10** Große, reife Pyknidien, die zur Sporenschleimabsonderung fähig sind (Boniturnote 4)

## 2.4 Untersuchungen zur Toxinproduktion *in vitro* und *in vivo*

### 2.4.1 *In vitro* Inkubation in Flüssigkulturen und auf Agar

Der Einfluss von Zinksalzen auf die Toxinproduktion des aggressiven *Phoma*-Isolates Ila 1 wurde in Czapek-Dox-Flüssigkulturen (vgl. 2.1.1) mit steigenden Gehalten von Zinkchlorid und Zinksulfat (0 - 2 mM  $Zn^{2+}$ ) untersucht. Dabei wurde die Inkubationsdauer und -temperatur in mehreren Versuchsserien variiert.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss einer Belichtung auf die Toxinproduktion bei diesem Isolat untersucht. Dazu wurde Ila 1 bei 20 °C für 14 Tage im Czapek-Dox-Medium im Thermostaten bei 200  $\mu E/m^2 \cdot sec$  oder in Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die toxinhaltigen Flüssigmedien abfiltriert. Zur Bestimmung der Trockenmasse wurde das Myzel 12 Stunden über Nacht bei 105 °C getrocknet und anschließend gewogen.

Als Nährmedien für Agarkulturen wurden V8-Gemüsesaft und Czapek-Dox mit steigenden Zinkchlorid- und Zinksulfatgehalten (0 - 10 mM  $Zn^{2+}$ ) verwendet. Als Merkmal für die Pilzentwicklung wurde in dreitägigen Abständen der Radius der sich entwickelnden kreisförmigen Myzelschicht gemessen.

### 2.4.2 Inkubation von infiziertem Pflanzengewebe

Für ein Screening an Kotyledonen wurden die Rapssorten Quinta und Jet Neuf (vergleiche 2.2.2) am 8. Tag nach der Saat mit Sporen aggressiver Isolate, die kurz zuvor aus Einsporlinien gewonnen wurden, infiziert. Diese waren:

T 12a D34	= A11 (A1)	T 12a A 3	= A22 (A2)
T 12a B11	= A12 (A1)	T 11j C25	= A51 (A5)
T 11j D18	= A21 (A2)	T 12j B 7	= A52 (A5)

Zur einfacheren Handhabung wurden die Isolate nach ihren Pathotypgruppen geordnet (siehe Klammer) und entsprechend umbenannt.

Für Zeitreihenversuche auf den Sorten Quinta und Jet Neuf wurden die Isolate Iia 1 (A1), MIX 7 und P 146 (A2) in verschiedenen Paarungen verwendet.

Die Pflanzen blieben bis zur ersten Symptomentwicklung im Gewächshaus und wurden ab dem 11. Tag nach der Inokulation zum Teil bei  $200 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  bei einer Photoperiode von 16 Stunden und fast 100 % rel. Luftfeuchte oder bei vollkommener Dunkelheit inkubiert.

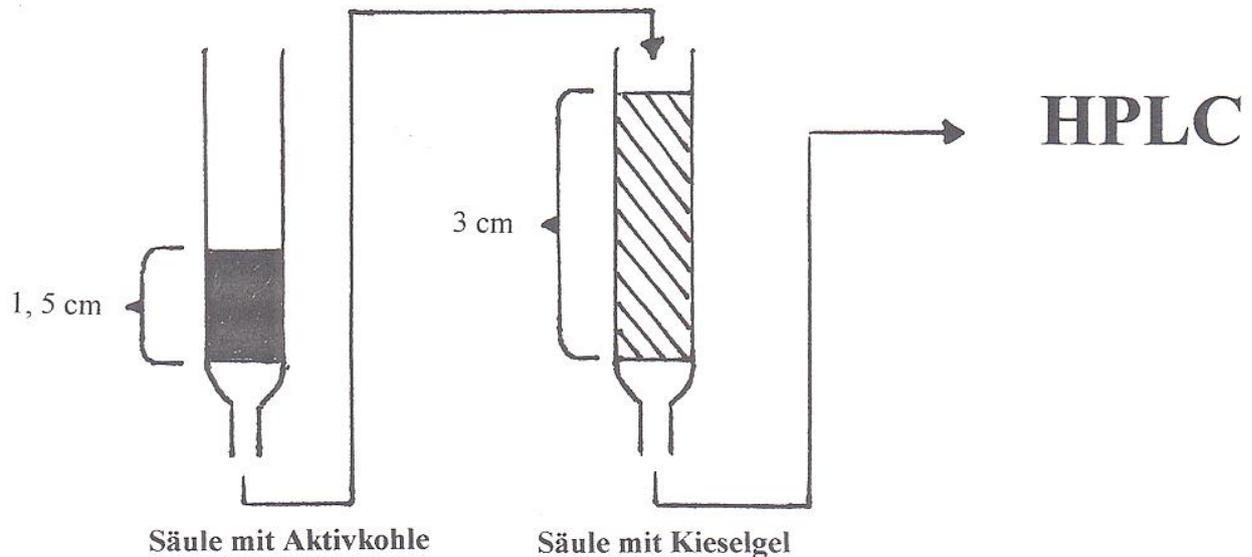
Für Experimente an Hypokotylen wurden die Rapssorten Cobra und Jet Neuf am achten Tag nach der Saat vereinzelt und bis zum Dreiblattstadium angezogen. Die Wurzelhäse wurden mit einer Injektionsnadel in einem Mindestabstand von 20 mm zweifach verletzt und mit ca. 5  $\mu\text{l}$  Sporensuspension des aggressiven Isolates Iia 1 inokuliert. Die Hälfte der infizierten Hypokotyle wurde mit Zellulosepapier abgedunkelt. Die entstehenden Läsionen wurden ab dem 15. Tag nach der Inokulation vermessen und bonitiert. Als Parameter dienten die vertikalen Läsionslängen, der Läsionsumfang in % und der Anteil der Läsion in % am gesamten Hypokotyl.

### 2.4.3 Extraktion von Sirodesminen

Für Extraktionen aus den Flüssigkulturen wurden die Flüssigmedien gefiltert und die Filtrate je zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Das Ethylacetat wurde mit den Sirodesminen unter einem  $\text{N}_2$ -Gasstrom bis zur Trockne eingeeengt (vgl. 2.1.2).

Zur Isolation aus den Agarnährmedien wurden Sirodesmine aus je 15 g Agar mit einem Ultra-Turrax Homogenisator in 30 ml Ethylacetat extrahiert. Das Homogenat wurde unter anschließender Zugabe von weiteren 20 ml Ethylacetat gefiltert und im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Nach einer Überführung mit 4 ml Ethylacetat wurden die Sirodesmine unter einem  $\text{N}_2$  Gasstrom erneut getrocknet.

Zur Extraktion von Sirodesminen aus Kotyledonen wurden ganze Kotyledonen mit einem Frischgewicht von 3 g mit Hilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert. Als Extraktionsmittel dienten 50 ml Ethylacetat und Ethanol (3/1, v/v), die nacheinander in kleineren Portionen verwendet und filtriert wurden. Die Flüssigkeiten wurden im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand enthielt neben möglichen Sirodesminen Blattpigmente und wurde daher an einer Aktivkohlesäule weiter aufgereinigt (Abb. 11).



**Abb. 11** Extraktions- und Vorchromatographieverfahren zur Analyse von Sirodesminen

Die Säule mit einem Innendurchmesser von 1,8 mm enthielt 2,5 g Aktivkohle und war mit ca. 25 ml Trichlormethan voreluert worden. Die Pflanzenextrakte wurden in 2 ml Trichlormethan aufgenommen und auf die Säule gegeben. Mit weiteren 25 ml dieses Elutionsmittels wurde in kleinen Mengen von 5 bzw. 10 ml nacheluiert. Das Eluat verließ die Säule fast pigmentfrei, es war jedoch noch mit lipophilen Substanzen und Partikeln der Aktivkohle verunreinigt. Zur weiteren Reinigung wurde eine aus einer Pasteurpipette (vgl. Abb. 4) hergestellte Säule verwendet. Das bis zur Trockne eingeeengte Eluat wurde nacheinander in je 2 ml Petroleumbenzin und 2 ml Dichlormethan aufgenommen und auf die Säule gegeben. Die lipophilen Substanzen wurden dabei durch die Säule gespült, während die polareren Sirodesmine von der stationären Phase festgehalten wurden. Abschließend wurden die Sirodesmine mit 6 ml Ethylacetat aus dem Kieselgel eluiert und gesondert aufgefangen. Das Eluat wurde danach bis zur Trockne eingeeengt.

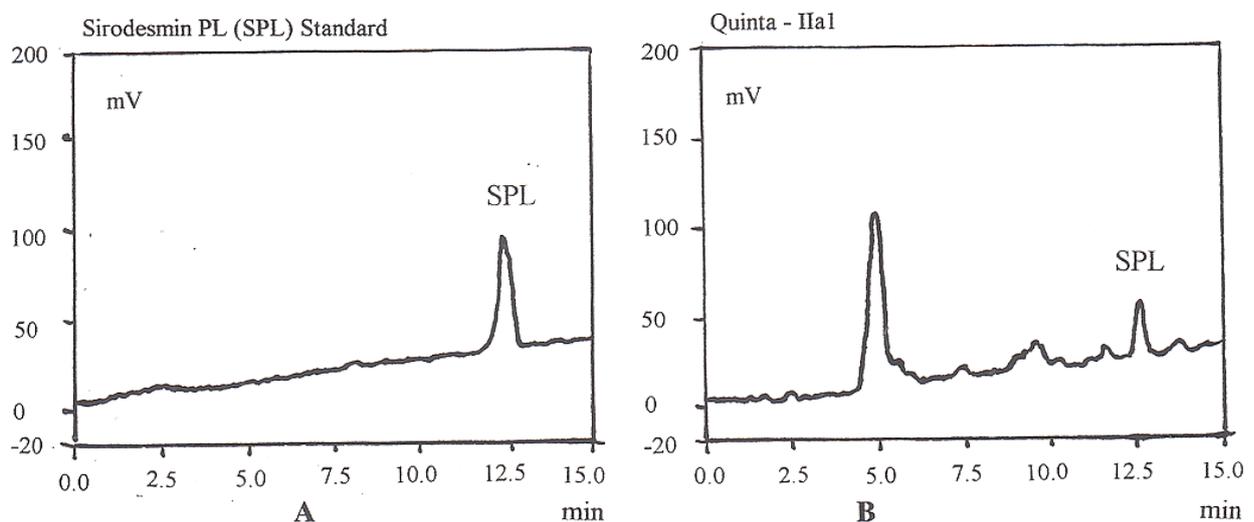
Bei den Extraktionen aus dem Hypokotyl wurden je 1,5 g Gewebe aufgearbeitet. Die Aufarbeitungsschritte des Materials entsprachen weitgehend denen der Keimblattextraktion, allerdings konnte wegen der geringeren Chlorophyllgehalte der Reinigungsschritt mit der Aktivkohle vereinfacht werden. Dazu wurde eine 2 ml Luerspritze als Säule verwendet und am Auslass mit extrafeiner Filterwatte abgedichtet. Die Aktivkohle wurde in einer Schichthöhe von 1,5 cm eingefüllt und mit Trichlormethan voreluert. Mit diesem Verfahren wurden auf sehr einfache Weise zahlreiche Säulen hergestellt und gleichzeitig betrieben. Bei der Elution konnten mit nur insgesamt 10 ml Trichlormethan, welches in Mengen von je 2 ml hinzugegeben wurde, erhebliche Einsparungen an Chemikalien erreicht werden.

An Kotyledonen der Rapssorte Jet Neuf wurde die Wiederfindungsrate (60 %) und der Abbau von Sirodesmin PL untersucht. Dazu wurden je 1,5 µg Sirodesmin PL auf die durch Nadelstiche verletzten Kotyledonen aufgetragen. Die Pflanzen wurden in Dunkelheit oder bei 200 µE / m<sup>2</sup> \* sec inkubiert. Jeweils zehn Kotyledonen mit insgesamt 60 µg aufgetragenem Sirodesmin PL wurden in Zeitreihenexperimenten aufgearbeitet und bezüglich der feststellbaren Toxinmenge analysiert.

#### 2.4.4 Qualitative und quantitative Bestimmung von Sirodesminen

Für die qualitative Überprüfung durch die Dünnschichtchromatographie wurden die gesammelten Toxine in Trichlormethan aufgenommen. Die Verdünnung der Sirodesmine orientierte sich an der zu erwartenden Menge, um eine einwandfreie DC zu gewährleisten. Die gelösten Toxine wurden in Mengen von ca. je 50 µl Trichlormethan auf Kieselgel-Dünnschichtplatten (Merck Kieselgel 60 F254, Schichtdicke 0,25 mm) aufgetragen. Nach der Chromatographie in Trichlormethan-Ethylacetat (1 : 1) wurden die Sirodesmine durch ein Tauchbad in 2 % Silbernitratlösung angefärbt (BADAWY & HOPPE 1989 b).

Für den quantitativen Nachweis wurden die durch die Vorchromatographie gewonnenen Rückstände in 100 µl Ethanol aufgenommen und davon 20 µl in die Säule einer HPLC Anlage (Kontron) gegeben. Die Kieselgelsäule bestand aus einem Umkehrphasen (reversed phase) Kieselgel (Kontron SPHERI 5 RP 18, 5 µ, 220 \* 4,6). Mit dem HPLC Pumpen-System (Kontron 322 System) ließ sich ein 20 Minuten dauernder Gradient mit den Elutionsmitteln Wasser und Methanol herstellen. Er betrug zu Beginn 50 % : 50 % und erreichte nach 15 Minuten ein Verhältnis von 20 % Wasser und 80 % Methanol. Die Säule wurde anschließend zur Reinigung jeweils fünf Minuten mit 100 % Methanol nachgespült. Die Peaks wurden mit dem UV Detektor (Kontron HPLC Detektor 432) bei einer Wellenlänge von 218 nm registriert und EDV-gerecht vom computergestützten HPLC Integration Pack erfasst. Mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichkurve ließen sich die integrierten Peakflächen in Gewichtsäquivalente umrechnen. Die Retentionszeiten wurden mit Sirodesminstandards wiederholt überprüft. Zusätzlich wurden die per HPLC gereinigten Toxine dünnschichtchromatographisch überprüft.

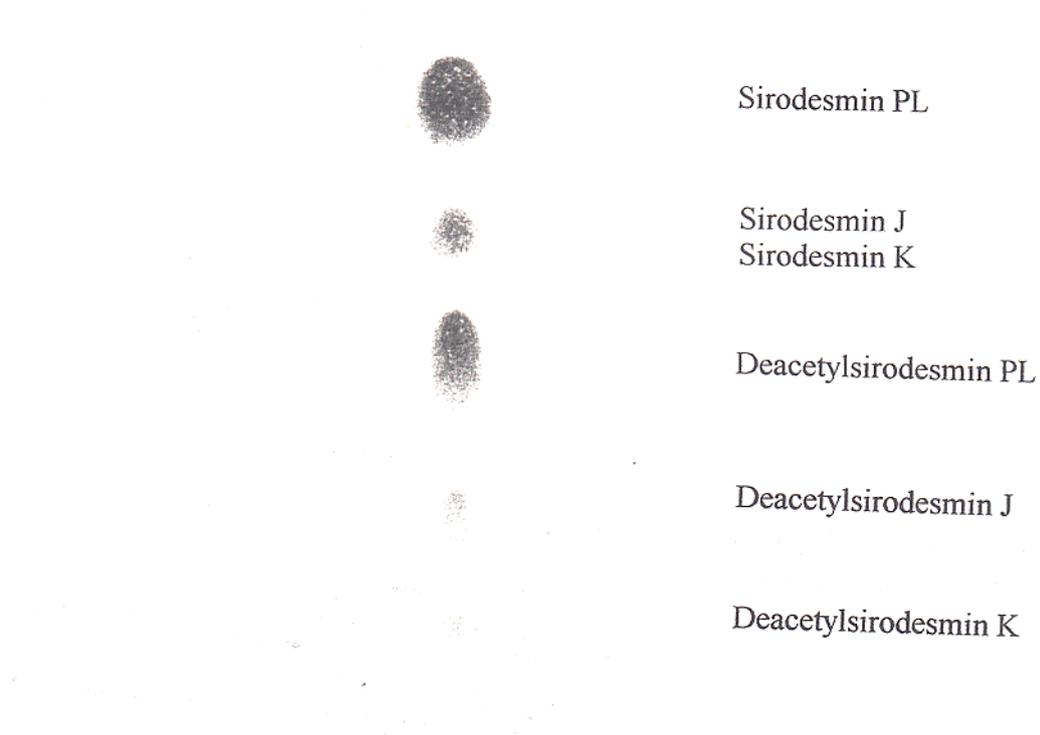


**Abb. 12** Nachweis von Sirodesmin PL durch HPLC. A: Testsubstanz, B: Sirodesmin PL aus Kotyledonen der mit dem Isolat IIa 1 inokulierten Sorte Quinta am 14. Tag nach der Inokulation. Die Pflanzen wurden vom 11 dpi an im Dunklen inkubiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Präparative Isolierung von Sirodesmin PL

Für das Forschungsvorhaben wurden für Toxinbehandlungen bei *Brassica*-Arten größere Mengen von Sirodesmin PL benötigt. Mit der Dünnschichtchromatographie (DC) steht eine zuverlässige analytische Methode zur Verfügung (BADAWY & HOPPE 1989 b), bei der bis zu 6 verschiedene Sirodesmine von *P. lingam* (Sirodesmin PL = Sirodesmin G, Sirodesmin J, Sirodesmin K, Deacetylsirodesmin PL, Deacetylsirodesmin J und Deacetylsirodesmin K), getrennt werden können (Abb. 13, siehe auch Abb. 2).



**Abb. 13** DC von Sirodesminen aus dem Kulturfiltrat eines aggressiven *Phoma*-Isolates an Kieselgel 60 F 254 mit Trichlormethan und Ethylacetat (1 : 1) als Laufmittel. Die Sirodesmine wurden durch eine Tauchbehandlung in wässriger Silbernitratlösung (2 %) angefärbt. Der oberste Fleck zeigt Sirodesmin PL, in weiterer Folge erscheinen mit zunehmender Polarität Sirodesmin J, Sirodesmin K, Deacetylsirodesmin PL, Deacetylsirodesmin J und Deacetylsirodesmin K.

Die Sirodesmine lassen sich vom Kieselgel der DC-Platte eluieren und können nach einer Passage durch eine Sephadex LH 20 Säule für weitere Versuche verwendet werden. Bei diesem Verfahren sind jedoch nur sehr geringe Toxinmengen zu gewinnen. Außerdem zeigte es sich in Vorversuchen, dass Sirodesmine auf der DC Platte unter Lichteinfluss degradieren können. Daher musste eine präparative Chromatographiemethode entwickelt werden, die diese beiden Nachteile ausschließt. Dies geschah auf der Basis der Säulenchromatographie (SC).

Anhaltspunkte für eine SC lieferten zwei Arbeiten, in denen über die Isolation von Sirodesmin PL an Kieselgel unter Verwendung der Laufmittel Dichlormethan (94,8 %) : Ethylacetat (4,74 %) : Methanol (0,46 %) (SJÖDIN et al. 1988) oder Dichlormethan (96 %) : Methanol (4 %) (PEDRAS et al. 1990) berichtet wurde. Danach wurden weitere Elutionsmittel auf ihre Trennungsleistung in Kombination mit drei verschiedenen Kieselgelen überprüft.

### **3.1.1 Kieselgel S (Korngröße 32 - 63 µm)**

**a** Dichlormethan (94,8 %) : Ethylacetat (4,74 %) : Methanol (0,46 %) nach SJÖDIN et al. 1988

**b** Dichlormethan (96 %) : Methanol (4 %), nach PEDRAS et al. 1990

Bei der Verwendung der mobilen Phasen der Versuche 1 und 2 traten die Sirodesmine kurz nach der Laufmittelfront aus der Säule aus. Sirodesmin PL war mit anderen, nicht identifizierbaren Substanzen vermischt. Daher mussten andere Elutionsgemische gefunden werden.

**c** Dichlormethan (100%)

Mit Dichlormethan waren die Toxine in der Säule weitgehend immobil. Um ihre Mobilität zu erhöhen, wurden in den folgenden Versuchen verschiedene Mischungen von Dichlormethan mit Ethylacetat untersucht.

**d** Dichlormethan (90%) - Ethylacetat (10%)

**e** Dichlormethan (80%) - Ethylacetat (20%)

**f** Dichlormethan (70%) - Ethylacetat (30%)

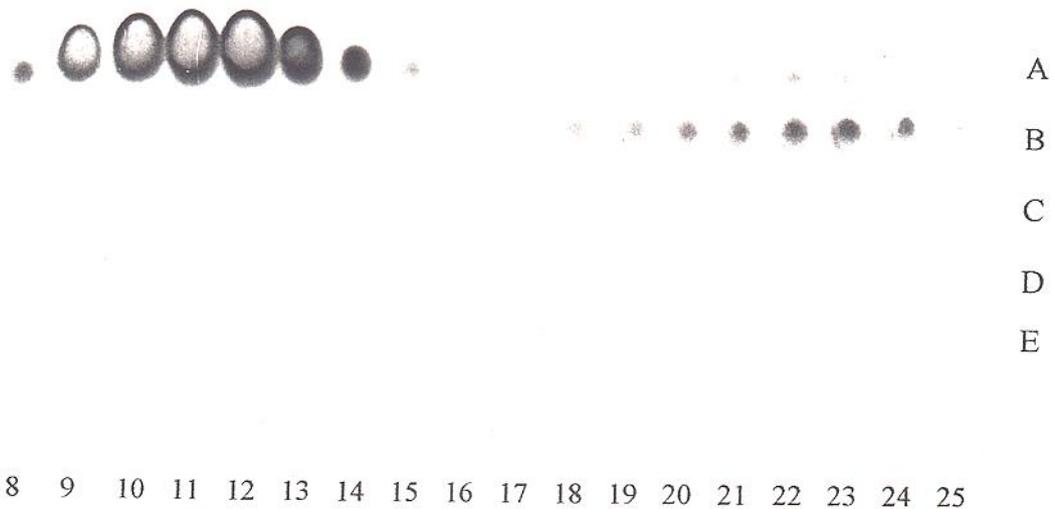
Mit steigenden Anteilen von Ethylacetat im Elutionsmittel erhöhte sich zwar die Mobilität der Sirodesmine im Kieselgel, die Trennung des Sirodesmin PL von den anderen Sirodesminen blieb jedoch unbefriedigend. Viele Fraktionen waren mit anderen Verbindungen verunreinigt. Daher wurde in den folgenden Versuchen Dichlormethan durch Trichlormethan ersetzt.

**g** Trichlormethan (90 %) - Ethylacetat (10%)

Diese beiden Lösungsmittel werden in der Dünnschichtchromatographie im Verhältnis 50% : 50% erfolgreich zur Trennung von Sirodesminen verwendet (KOCH et al. 1989). Nach GRITTER et al. (1987) lassen sich gemischte Laufmittel der DC nach einer Modifikation in der prozentualen Zusammensetzung auch für die SC einsetzen. Dabei soll bei der DC ein Verhältnis der Elutionsmittel gefunden werden, bei dem der Rf Wert der wichtigsten Verbindung etwa 0,3 beträgt. Für Sirodesmin PL wurde dabei ein Verhältnis von 90% : 10% ermittelt. In der SC trat das Sirodesmin PL allerdings bereits in den ersten Fraktionen auf und war meist mit apolareren Verbindungen verunreinigt. Aus diesem Grunde wurde im nächsten Versuch auf den Anteil von Ethylacetat im Eluenten verzichtet.

**h** Trichlormethan (100%)

Bei Verwendung von reinem Trichlormethan wurde eine zufriedenstellende präparative Isolierung von Sirodesmin PL erreicht. Das Toxin begann etwa mit der 8. Fraktion aus der Säule auszutreten. In den folgenden ca. 12 Fraktionen war es in fast reiner Form nachzuweisen. Danach traten die Sirodesmine J, K und Deacetylsirodesmin PL in einer Mischung aus. Fraktionen, die reines Sirodesmin PL enthielten, wurden vereinigt und auf 2 ml in Trichlormethan eingengt. Das Toxin wurde durch Zugabe von 100 ml Petroleumbenzin ausgefällt, bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und bei - 20° C aufbewahrt. In Abbildung 14 werden angefarbte Sirodesmine einer DC nach einer mit 100 % Trichlormethan erfolgten SC gezeigt.

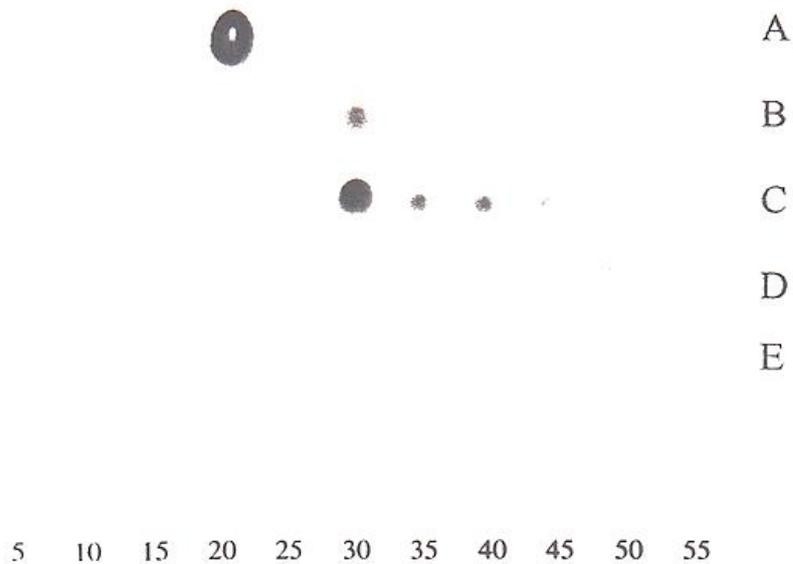


**Abb.14** DC von Siroidesminen nach einer präparativen SC an Kieselgel S mit Trichlormethan als Elutionsmittel. Von den 8 ml Fraktionen wurden 0,4 ml entnommen, bis zur Trockne eingengt, in 50 µl Trichlormethan gelöst und auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel 60 F 254, Merck) aufgetragen. Die DC-Trennung erfolgt mit Chloroform (50 %) : Ethylacetat (50%). Die Siroidesmine wurden durch eine Tauchbehandlung mit einer Silbernitratlösung (2 %) sichtbar gemacht. A: Siroidesmin PL, B: Siroidesmin J und K, C: Deacetylsiroidesmin PL, D: Deacetylsiroidesmin J, E: Deacetylsiroidesmin K.

### 3.1.2 Kieselgel 60 (Korngröße 15 - 40 µm) und Flash Chromatographie

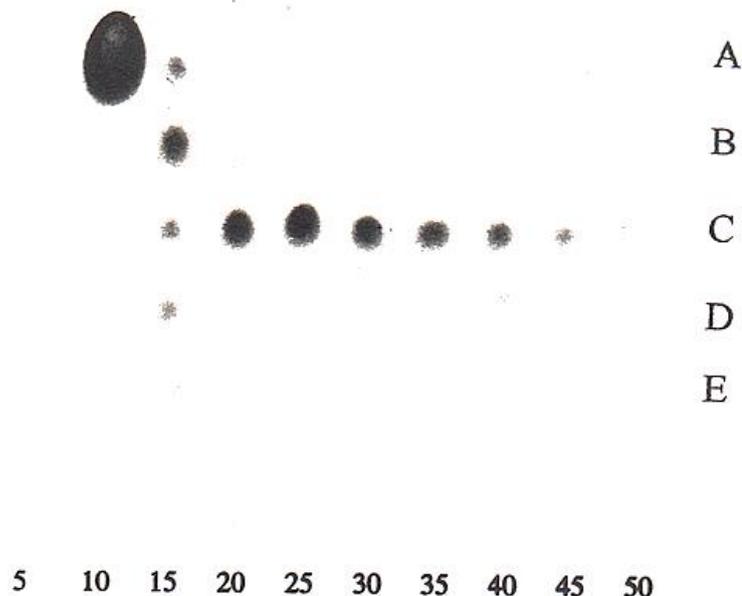
Die Porengröße des Kieselgels in der SC ist mit 60 Ångström mit der des Kieselgels auf den DC-Platten identisch. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde eine verbesserte Chromatographie der Siroidesmine erwartet. Das Kieselgel 60 mit der Korngröße 15 - 40 µm hat eine sehr feine Textur und damit eine relativ große Oberfläche. Eine gute Trennung der Siroidesmine wurde wegen der vergrößerten stationären Phase erwartet. Der Diffusionswiderstand in dem feinen Kieselgel ließ die Eluenten jedoch nur langsam passieren, so dass keine Regulierung an dem Auslassventil vorgenommen werden musste (Tropfgeschwindigkeit von 0,7 ml / min). In den folgenden Versuchen wurden die Trennungsleistungen einer unbenutzten und einer regenerierten Kieselgelsäule, sowie einer Flash Chromatographie getestet. Für diese Experimente wurde ein Elutionsgemisch gewählt, welches an den Versuch g von 3.1.1 angelehnt ist und die in der DC gewonnenen Erfahrungen bezüglich des Rf-Wertes auf die SC übertrug.

**a** 200 mg Siroidesmingemisch wurden in 90 % Trichlormethan und 10 % Ethylacetat in einer am Vortag hergestellten Säule chromatographiert. Die Qualität der Trennung war vergleichbar mit der zuvor beschriebenen Chromatographie unter 3.1.1 im Versuch h. In Abbildung 15 wird auf DC Platten das Ergebnis einer solchen SC gezeigt.



**Abb. 15** DC von Siroidesminen nach einer präparativen SC an Kieselgel 60 (Korngröße 15 - 40  $\mu\text{m}$ ) mit 90 % Trichlormethan und 10 % Ethylacetat als Elutionsmittel. (Für weitere Erklärungen siehe Legende zu Abb. 14).

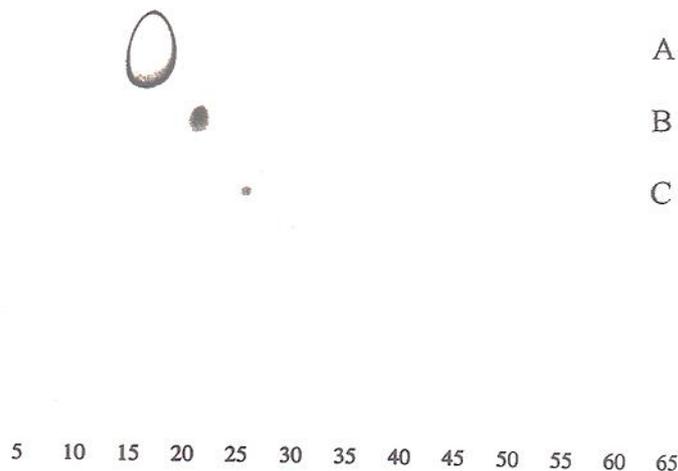
**b** 100 mg Siroidesmingemisch wurden mit dem gleichen Elutionsmittel wie im vorherigen Versuch in einer regenerierten Säule chromatographiert (vgl. 2.1.3.4). Die Trennungsleistung war für die Gewinnung von reinem Siroidesmin PL ausreichend, einige Fraktionen waren jedoch mit anderen Siroidesminen durchmischt. Ausschlaggebend für die Qualitätsminderung im Vergleich zu einer unbenutzten Säule dürfte die fehlende Aktivierung gewesen sein (siehe Abb. 16).



**Abb. 16** DC von Siroidesminen nach einer präparativen SC an regeneriertem Kieselgel 60 (Korngröße 15 - 40  $\mu\text{m}$ ) mit 90 % Trichlormethan und 10 % Ethylacetat als Elutionsmittel. (Für weitere Erklärungen siehe Legende zu Abb. 14).

**c** Die Flash Chromatographie wurde an einer am Vortag hergestellten Säule mit der gleichen

mobilen Phase wie in den beiden vorangegangenen Versuchen und mit 200 mg Sirodesmingemisch durchgeführt. Die Zahl der Fraktionen mit reinem Sirodesmin PL erhöhte sich und erbrachte damit eine Qualitätsverbesserung, die übrigen Sirodesmine waren jedoch durchmischt. Ein großer Vorteil der Flash Chromatographie bestand neben der Qualitätsverbesserung in der schnellen Durchführung (0,5 h) und im möglichen Verzicht auf den Fraktionssammler (siehe Abb. 17).



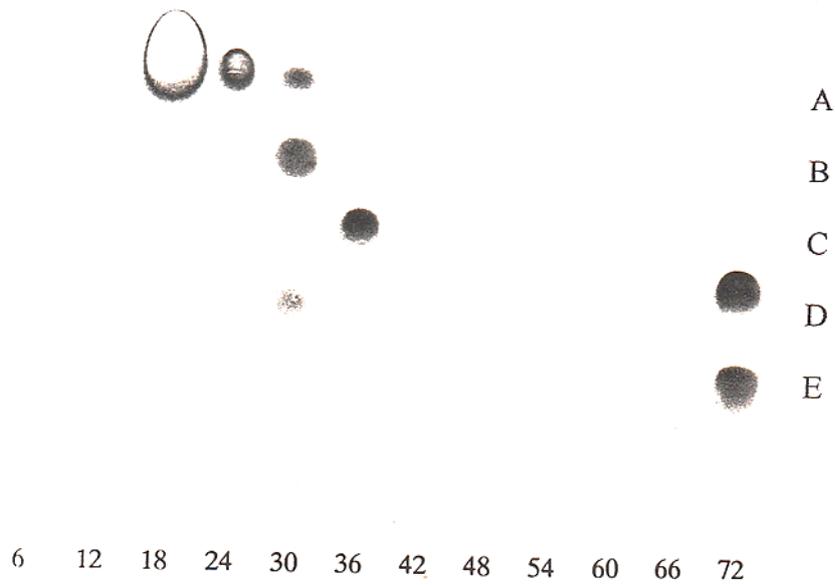
**Abb. 17** DC von Sirodesminen nach einer präparativen Flash Chromatographie an Kieselgel 60 (Korngröße 15 - 40  $\mu\text{m}$ ) mit 90 % Trichlormethan und 10 % Ethylacetat als Elutionsmittel (Für weitere Erklärungen siehe Legende zu Abb. 14).

Die größere Oberfläche des feineren Kieselgels band in diesem Elutionssystem die polareren Sirodesmine stärker an die stationäre Phase, so dass diese in der Säule festgehalten wurden.

### 3.1.3 Kieselgel 60 (Korngröße 63 - 200 $\mu\text{m}$ )

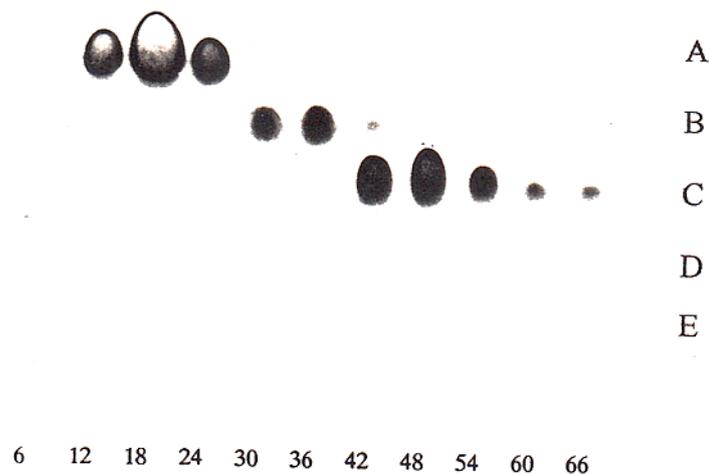
Das Kieselgel 60 mit der Korngröße 63 - 200  $\mu\text{m}$  ist deutlich gröber als das in 3.1.2 eingesetzte Kieselgel und besitzt eine kleinere Oberfläche. Aufgrund der gröberen Textur jedoch kann der Eluent schneller passieren, der mechanische Widerstand ist verringert. Für die Versuche wurden zwei verschiedene mobile Phasen verwendet, die für eine unterschiedliche Mobilität der Sirodesmine sorgten.

**a** Das Elutionsgemisch Trichlormethan (70 %) : Ethylacetat (30%) bewirkte eine vergleichsweise hohe Mobilität der Sirodesmine in der Säule und kann daher eluentensparend eingesetzt werden. Sirodesmin PL ließ sich mit dieser mobilen Phase hochgradig rein präparieren, die anderen Sirodesmine waren jedoch vermischt und ließen sich nicht rein isolieren (siehe Abb. 18).



**Abb. 18** DC von Sirodesminen nach einer präparativen SC an Kieselgel 60 (Korngröße 63 - 200  $\mu\text{m}$ ) mit 70 % Trichlormethan und 30 % Ethylacetat als Elutionsmittel. Ab der Fraktion 66 wurde mit reinem Ethylacetat eluiert (Für weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 14).

**b** Für den folgenden Versuch wurde ein Elutionsgemisch gewählt, welches dem im Versuch g von 3.1.1 entsprach. Dabei wurden die in der DC gewonnenen Erfahrungen bezüglich des Rf Wertes auf die SC übertragen. Trichlormethan und Ethylacetat im Verhältnis von 90% zu 10% als mobile Phase ermöglichten eine saubere Trennung von Sirodesmin PL und Deacetylsirodesmin PL. Die anderen Sirodesmine jedoch waren vermischt (siehe Abb. 19) .

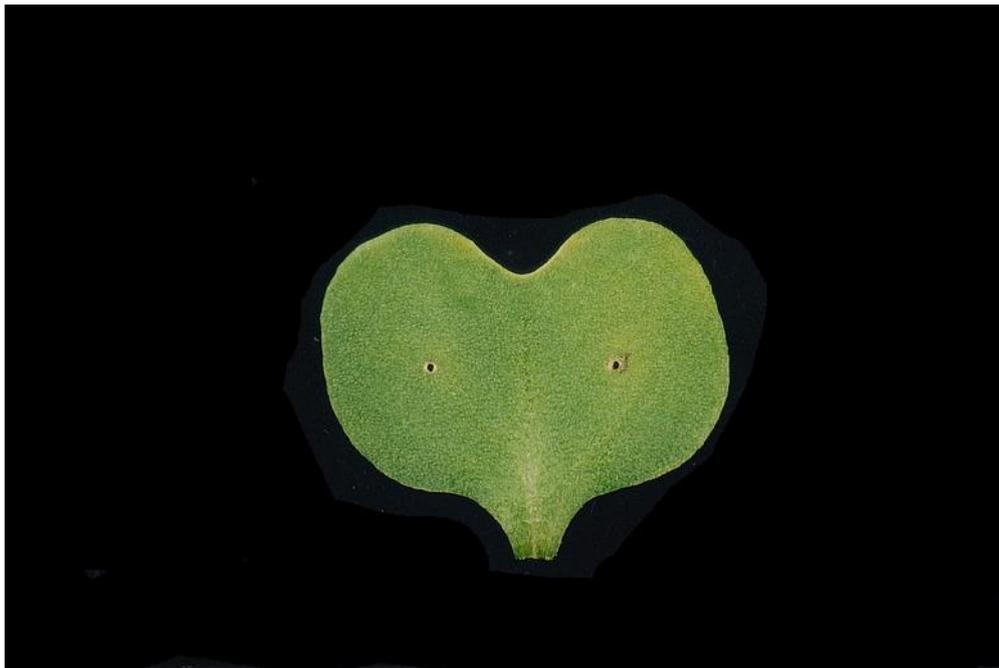


**Abb. 19** DC von Sirodesminen nach einer präparativen SC an Kieselgel 60 (Korngröße 63 - 200  $\mu\text{m}$ ) mit 90 % Trichlormethan und 10 % Ethylacetat als Elutionsmittel (Für weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 14).

### 3.2 Wirkung einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf nichtinokulierte Rapskotyledonen und auf Interaktionen mit *P. lingam*

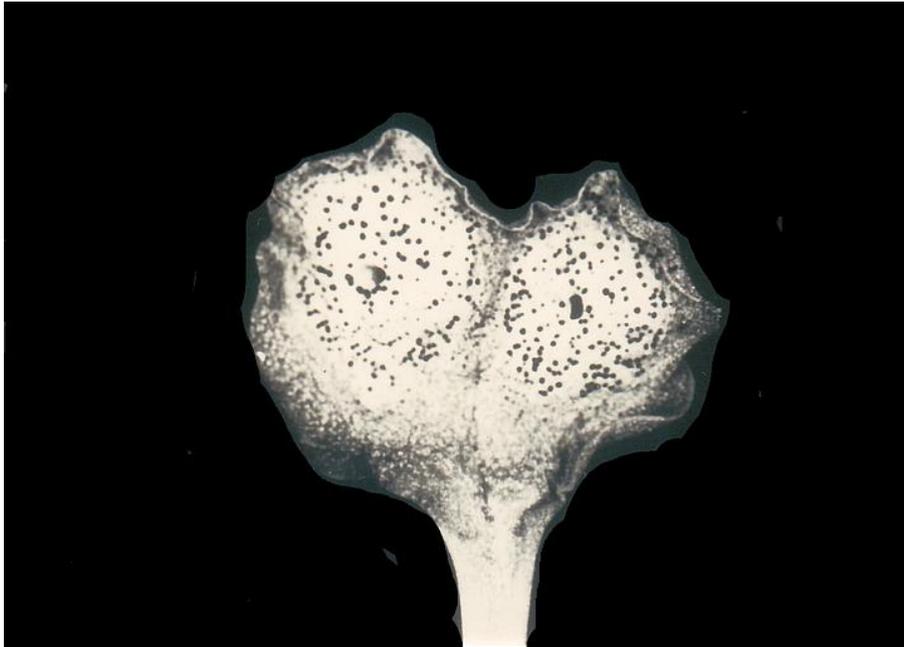
#### 3.2.1 Keimblattsymptome nach Inokulationen mit *P. lingam*

Inokulationsversuche mit *P. lingam* wurden schon häufig an Kotyledonen von *Brassica*-Arten durchgeführt (BRUNIN & LACOSTE 1970, THURLING & VENN 1977, DELWICHE 1980, CARGEEG & THURLING 1980, WITTERN & KRÜGER 1985, SJÖDIN & GLIMELIUS 1988). In Versuchsreihen von BADAWEY et al. 1991 und MENGISTU et al. 1989 wurden bei künstlichen Infektionen in verschiedenen Interaktionen auf den Kotyledonen unterschiedliche Reaktionen festgestellt, die eine Unterscheidung verschiedener Pathotypgruppen von *P. lingam* ermöglichten. Die nichtaggressiven Isolate (NA) verursachten in allen untersuchten *Brassica*-Arten wenige Tage nach der Inokulation an den Verletzungsstellen kleine, braune nekrotische Läsionen. Diese Nekrosen blieben auch nach längerer Inkubationszeit auf den unmittelbaren Wundbereich beschränkt. Identische Symptombilder zeigten sich auch in den Interaktionen aggressiver Isolate mit *B. juncea* cv. Aurea (Abb. 20).



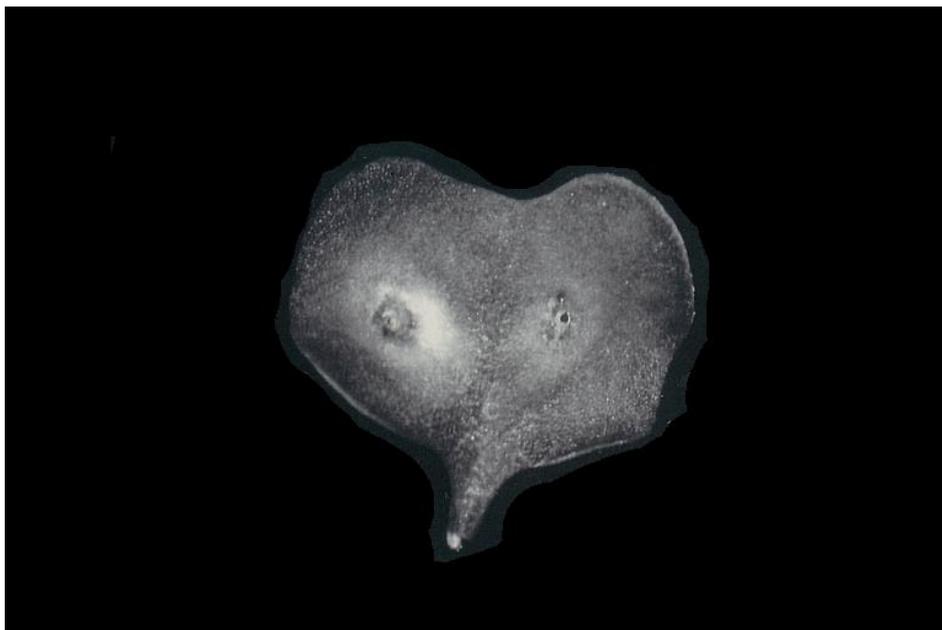
**Abb. 20** Punktförmige Nekrosen, verursacht durch ein nichtaggressives Isolat (PHW 1261) auf Quinta am 15. Tag nach der Inokulation (dpi). Das Keimblatt wurde durch Nadelstiche verletzt und mit einer Sporensuspension inokuliert.

Alle untersuchten Rapsorten reagierten auf A1 Isolate mit einer kompatiblen Reaktion, d.h. die Verletzungsstellen blieben etwa bis zum 9. Tag nach der Inokulation fast symptomfrei, bis sich dann rapide, fast schlagartig, etwa im Durchmesser von 10 bis 15 mm um die Inokulationsstelle das pflanzliche Gewebe aufhellte, einsank und abstarb. Dieser Prozess war häufig mit der Bildung von Pyknidien auf der Läsionsfläche verbunden (Abb. 21).



**Abb. 21** Läsionen mit Pyknidien, verursacht durch ein aggressives Isolat der Pathotypgruppe A1 (IIa 1) in einer kompatiblen Interaktion auf Quinta am 12 dpi. Das Keimblatt wurde mit Nadelstichen verletzt und mit einer Sporensuspension inokuliert.

Inokulationen mit aggressiven Isolaten der Pathotypgruppe A2 führten in inkompatiblen Interaktionen auf Quinta zunächst zu kleinen, unmittelbar am Wundrand auftretenden Nekrosen. Mit zunehmender Inokulationsdauer erweiterten sich diese Nekrosen und erreichten gelegentlich sogar die Größe von Läsionen kompatibler Beziehungen. Sie waren jedoch aufgrund ihrer braunen Farbe, der fehlenden Pyknidienbildung und der Dynamik ihrer Entstehung nicht mit den Läsionen kompatibler Interaktionen vergleichbar (Abb. 22).



**Abb. 22** Nekrosen, verursacht durch ein aggressives Isolat der Pathotypgruppe A2 (MIX 7) in einer inkompatiblen Interaktion auf Quinta am 15 dpi. Das Keimblatt wurde durch Nadelstiche verletzt und mit einer Sporensuspension inokuliert.

Ganz anders als in den zuvor beschriebenen inkompatiblen Interaktionen bei der Rapssorte Quinta verhielten sich A2 Isolate auf der Rapssorte Jet Neuf. Nach einer Phase der Symptomfreiheit zeigten sich ab dem 9. Tag nach der Inokulation auf den Kotyledonen Symptome wie in einer kompatiblen Interaktion mit A1 Isolaten. Diese gingen meist mit einer Pyknidienbildung einher.

Die Wirkung von in Flüssigkulturen produzierten Pilzausscheidungen wurde auf Rapskotyledonen schon 1982 von SACRISTAN untersucht. Die Autorin konnte einige Tage nach einer Applikation von Kulturfiltraten nekrotische Veränderungen auf dem behandelten Blattgewebe feststellen. DE MARCH et al. (1986) gelang der Nachweis, dass die Läsionsbildung auf Kotyledonen nur durch Kulturfiltrate aggressiver *Phoma*-Isolate induziert wird, während eine Behandlung mit den Kulturfiltraten nichtaggressiver Isolate auf den Blättern fast symptomlos blieb. KOCH et al. (1989) wiesen nach, dass nur aggressive Isolate Sirodesmine in Flüssigkulturen abscheiden. Schon mit der Entdeckung der Sirodesmine in Flüssigkulturen von *P. lingam* (BOUSQUET et al. 1977) wurde eine phytotoxische Wirkung dieser Verbindungen festgestellt. Als das häufigste produzierte Toxin wurde Sirodesmin PL ermittelt, welches auch die höchste Phytotoxizität aufweist (PEDRAS et al. 1987, BADAWEY & HOPPE 1989 a). Dabei zeigte sich, dass die Sirodesmine wirtsunspezifisch chlorotische Nekrosen erzeugen können. Die Untersuchungen wurden z.B. an Arten aus den Familien der Leguminosen, der Gramineen, der Solanaceen, der Cucurbitaceen und der Brassicaceen durchgeführt (PEDRAS et al. 1987, BADAWEY & HOPPE 1989 a).

Wenn es sich bei den Toxinabscheidungen in die Flüssigkulturen nicht um Artefakte handelt, könnten sie als wirtsunspezifische Toxine in kompatiblen Interaktionen an der Krankheitsentwicklung beteiligt sein (TURNER 1984). Die fehlende Aggressivität der NA-Isolate und die mangelnde Virulenz der A2 Isolate in inkompatiblen Interaktionen könnte auf einer fehlenden Sirodesminproduktion im Gewebe beruhen.

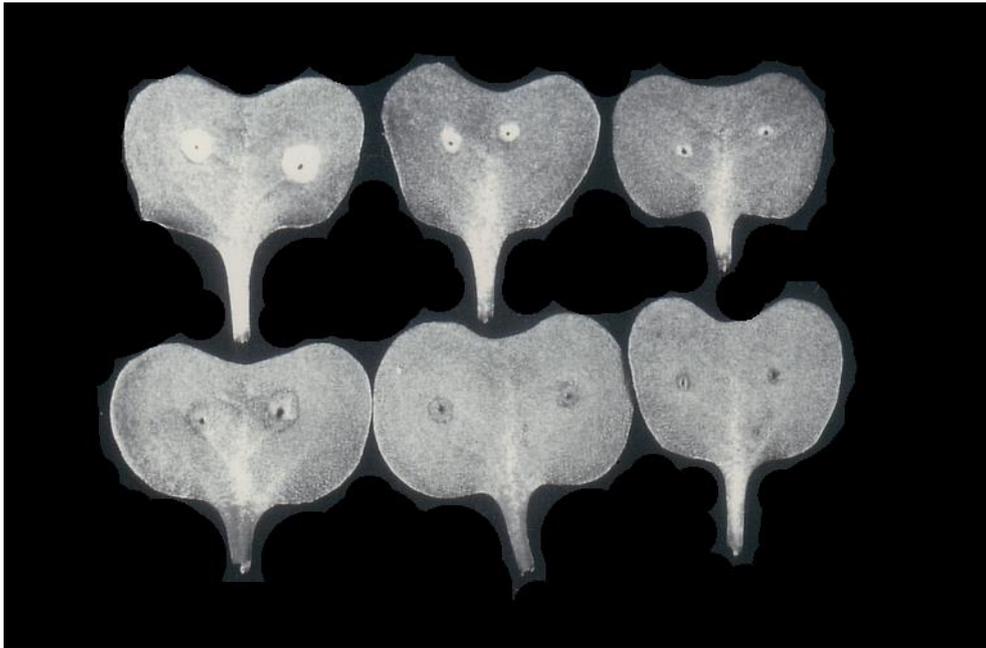
Mit einer Sirodesminbehandlung müsste es demnach möglich sein, das Pflanzengewebe gegenüber diesen Isolaten anfälliger zu machen und die spezifischen Resistenzen zu durchbrechen (RUDOLPH 1972). In der hier beschriebenen Versuchsserie wurde daher die Wirkung des durch SC isolierten Sirodesmin PL auf die in folgender Tabelle fettgedruckten Interaktionen überprüft.

**Tab. 5** Interaktionen zwischen Kotyledonen der Gattung *Brassica* und *P. lingam*, die für die Versuche ausgewählten Interaktionen sind fettgedruckt. (R = resistente Interaktion, A = anfällige Interaktion)

Isolate von <i>P. lingam</i> : Pathotypgruppen	PHW 1261	MIX 7	IIa 1
	NA	A2	A1
<i>Brassica napus</i> cv. Quinta	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>A</b>
" " " Jet Neuf	<b>R</b>	A	A
<i>Brassica juncea</i> cv. Aurea	R	R	<b>R</b>

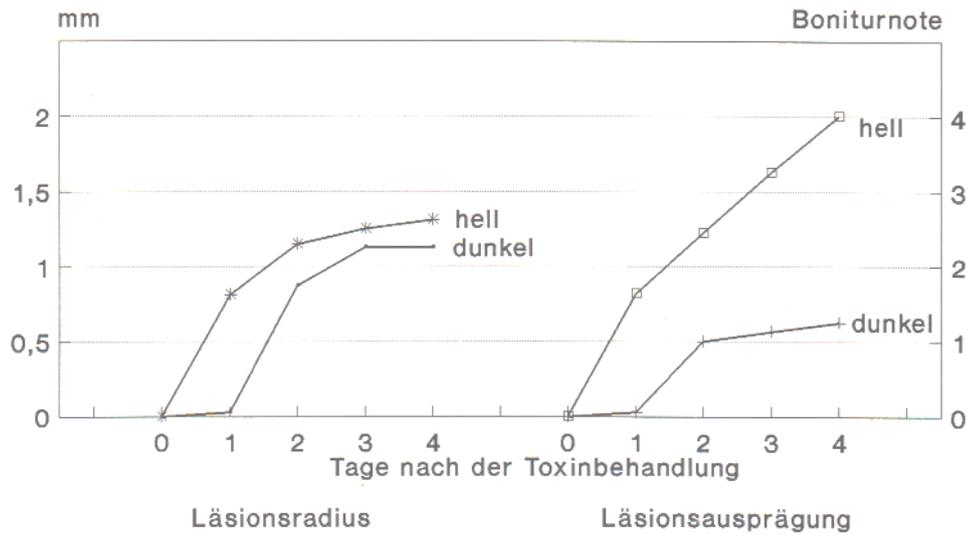
### 3.2.2 Keimblattsymptome nach Behandlung mit Sirodesmin PL bei unterschiedlicher Belichtungsdauer und Inkubationstemperatur

Sirodesmin PL verursachte Läsionen, die bereits ein bis zwei Tage nach der Behandlung sichtbar wurden (Belichtung bei  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2 * \text{sec}$ ). Bei einer Menge von  $0,15 \mu\text{g}$  Sirodesmin PL pro Verletzung waren nur am Wundrand leichte Veränderungen erkennbar. Bei  $0,5$  und  $1,5 \mu\text{g}$  Toxin sank das Pflanzengewebe in Abhängigkeit von der Konzentration in einem Durchmesser von ca. 2 oder ca. 3 mm zunächst ein und wurde grau-grün. Innerhalb von drei weiteren Tagen hellten sich die Läsionen auf und erschienen weiß-grau.



**Abb. 23** Toxinsymptome (von rechts nach links  $0,15$ ,  $0,5$  und  $1,5 \mu\text{g}$  Sirodesmin PL je Verletzung) auf Kotyledonen der Rapssorte Jet Neuf vier Tage nach der Toxinapplikation (oben im 16 Std.-Tag bei Licht inkubiert, unten in Dunkelheit inkubiert).

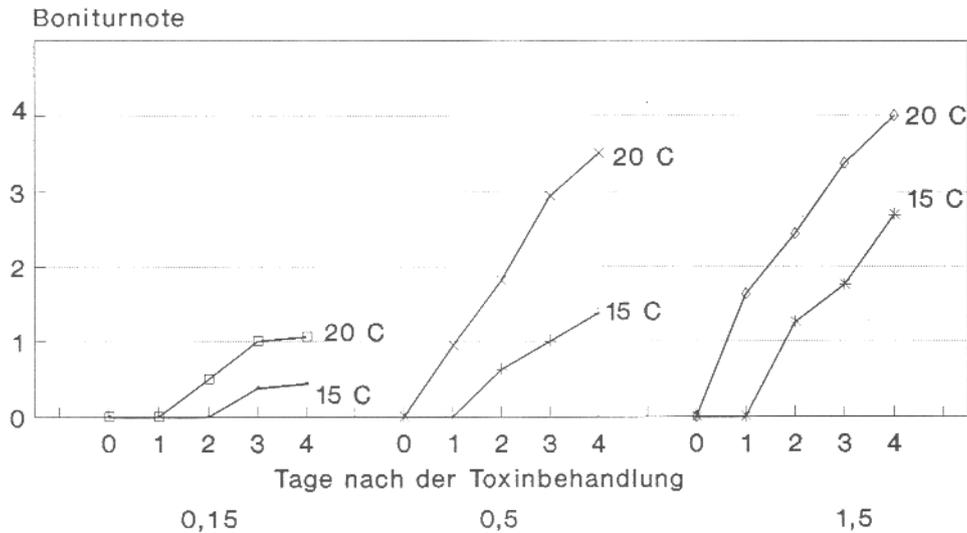
Weitere Veränderungen waren während der späteren Inkubationsphase nicht zu beobachten. Die chlorotischen Läsionen erweiterten sich während der viertägigen Inkubation nicht (siehe Abb. 23). In einer ersten Versuchsserie wurden die Effekte einer viertägigen Belichtung (16 Stunden Photoperiode) vom Beginn der Toxineinwirkung an mit einer ständigen Inkubation im Dunklen verglichen. Als Merkmale wurden der Läsionsradius gemessen und die Läsionsausprägung bonitiert.



**Abb. 24** Läsionsradien und Läsionsausprägungen (Boniturnoten siehe Tab. 1) auf toxinbehandelten Kotyledonen (1,5 µg Sirodesmin PL / Verletzung) der Sorte Jet Neuf bei 20 °C und Inkubation in Dunkelheit und bei Belichtung im 16 Std.-Tag. (Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen, Daten siehe A1).

Beim Merkmal Läsionsradius zeigten sich im Vergleich belichtet/unbelichtet nur kleine Unterschiede. Der Radius der Läsionen wurde (vgl. auch Abb. 30 a) entscheidend von der applizierten Toxinmenge beeinflusst. Dennoch waren in Abhängigkeit zur Belichtung visuell deutliche Unterschiede festzustellen, die mit der Bonitur des Merkmals Läsionsausprägung festgehalten werden konnten. So wurden in den dunklen Behandlungen Gewebereinbrüche unmittelbar an den Verletzungszonen bonitiert. Diese waren jedoch nicht chlorotisch. Unter Lichteinfluss erweiterte sich die Fläche der Gewebereinbrüche zwar nur geringfügig, aber es kam schon am dritten Tag nach der Inokulation zu einem Pigmentabbau und bis zum vierten Tag zur Bildung von weißgrauen Chlorosen (vgl. Abb. 23).

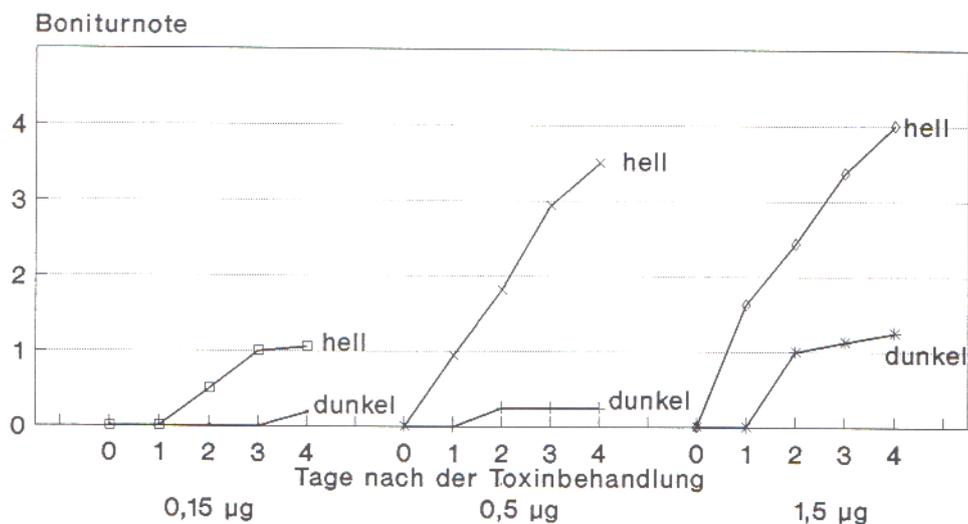
Mit der Bonitur der Läsionsausprägungen waren differenziertere Beobachtungen als beim Vermessen der Läsionsradien möglich. Der Prozess der toxinbedingten Läsionsausprägung in Abhängigkeit von der Belichtungszeit und der Temperatur wurde in mehreren Versuchsserien näher untersucht. Dazu wurde Sirodesmin PL in drei verschiedenen Dosierungen (0,15, 0,5 und 1,5 µg je Verletzungsstelle) auf Kotyledonen der Sorte Jet Neuf aufgetragen. Zunächst wurde die Wirkung der Temperatur auf die Läsionsausprägung überprüft (Abb. 25).



**Abb. 25** Einfluss der Temperatur auf die Läsionsausprägung (Boniturnoten siehe Tab. 1) toxinbehandelter Kotyledonen der Sorte Jet Neuf bei 15 und 20 °C im 16 Std.-Tag. (0,15, 0,5 und 1,5 µg Sirodesmin PL je Verletzungsstelle, Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen, Daten siehe A2).

Bei einer Temperatur von 20 °C wurde die Läsionsausprägung gegenüber 15 °C deutlich verstärkt. Dieser Effekt wurde in allen drei Behandlungsstufen deutlich. Während bei 20 °C und 0,15 µg Sirodesmin PL je Inokulationsstelle nach viertägiger Inkubation nur die Boniturnote 1 (Gewebeeinbruch, keine Nekrose) erreicht wurde, wurden bei 0,5 und 1,5 µg Sirodesmin PL am dritten Tag Chlorosen beobachtet, die sich bis zum vierten Tag weißgrau färben. Bei 15 °C dagegen waren diese Prozesse verzögert und abgeschwächt. Bei den folgenden Experimenten wurde bei 20 °C inkubiert, um die Läsionsausprägungen besser differenzieren zu können.

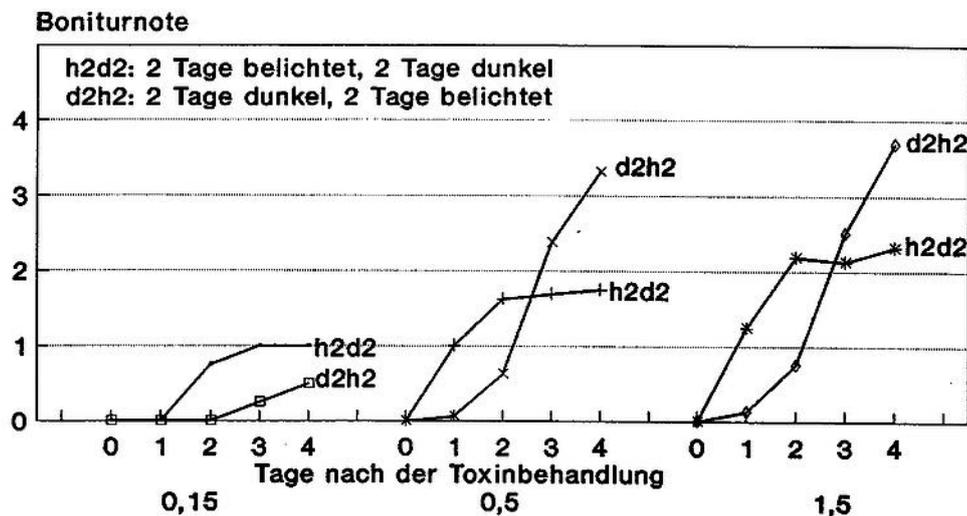
In der Abbildung 24 waren bereits Unterschiede zwischen in Dunkelheit oder unter Belichtung inkubierten Pflanzen dargestellt worden. Die Läsionsausprägungen wurden im nächsten Versuch nach der Behandlung mit den drei verschiedenen Toxindosierungen näher untersucht. Die Pflanzen wurden nach der Toxinbehandlung bei Belichtung oder in Dunkelheit inkubiert (Abb. 26).



**Abb. 26** Einfluss einer Belichtung auf die Läsionsausprägung (Boniturnoten siehe Tab. 1) toxinbehandelter Kotyledonen der Sorte Jet Neuf bei 20 °C im 16 Std.-Tag und einer Inkubation in Dunkelheit. (0,15, 0,5 und 1,5 µg Sirodesmin PL pro Verletzungsstelle, Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen, Daten siehe A3).

Der Effekt einer Belichtung auf die Läsionsausprägungen war wiederum sehr deutlich: Nach einer viertägigen Inkubation im Dunklen waren bei der niedrigsten Toxinstufe fast keine Symptome zu beobachten und bei der stärksten Dosierung sank nur das behandelte Gewebe um die Inokulationsstellen ein. Chlorotische Gewebeaufhellungen waren nicht zu beobachten. Deutlich unterschieden sich die Läsionen der unter Licht inkubierten Kotyledonen. Bei 0,15 µg Sirodesmin PL war das Gewebe um die Verletzung eingesunken, eine chlorotische Aufhellung war nicht erkennbar. Bei 0,5 und 1,5 µg Toxin je Blattwunde dagegen wurden die höchsten Boniturwerte der Symptomausprägung ermittelt. Es traten somit sehr ausgeprägte Chlorosen auf.

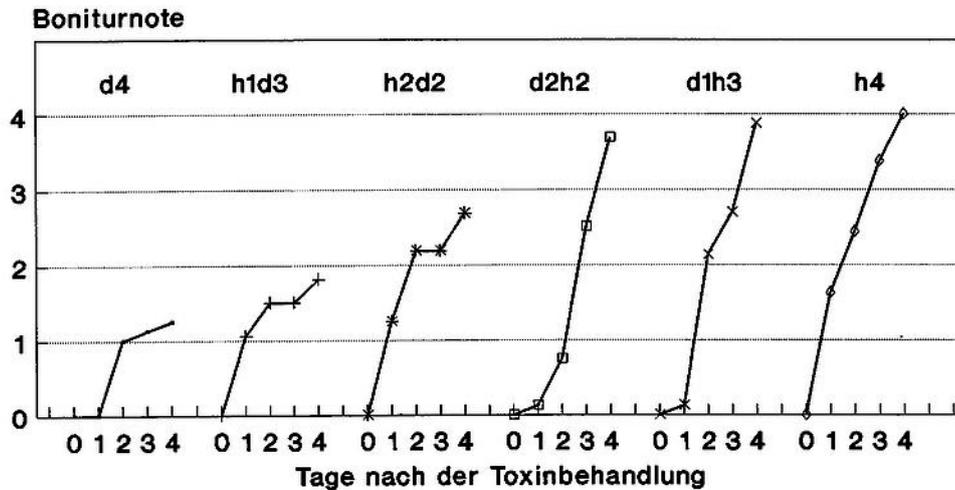
Die Dynamik der Läsionsausprägung wurde in einem weiteren Versuch mit verschiedenen Toxindosierungen und wechselnden Belichtungszeiten untersucht. Von sechs Behandlungsvarianten wurden in Abbildung 27 zwei ausgewählt, deren Gesamtbelichtungsdauer zwar gleich war, bei denen die Belichtung aber zu verschiedenen Terminen während der Inkubation nach der Toxinbehandlung stattfand.



**Abb. 27** Einfluss von zwei unterschiedlichen Belichtungsterminen (Erklärung siehe S. 10) auf die Läsionsausprägung (Boniturnoten siehe Tab. 1) toxinbehandelter Kotyledonen der Sorte Jet Neuf bei 20 °C. (0,15, 0,5 und 1,5 µg Sirodesmin PL pro Verletzungsstelle, Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen, Daten siehe A4).

Auch bei der Wahl der Belichtungstermine wurden deutliche Effekte bei der Läsionsausprägung deutlich. So förderte eine anfängliche Belichtung die Entstehung von Symptomen, die sich in der sich anschließenden Dunkelheit jedoch nicht weiterentwickeln. Bei den anfangs dunkel gehaltenen Kotyledonen waren Symptome zunächst nicht feststellbar bzw. sehr schwach ausgeprägt. Während der sich anschließenden Belichtungsphase wurde der Rückstand in der Symptomentwicklung im Vergleich zu der vorher beschriebenen Behandlung mehr als aufgeholt. Die Boniturwerte für die Symptomausprägung erreichten ein so hohes Niveau, welches dem der vier Tage belichteten Pflanzen gleichkam.

In der Abbildung 28 wurden alle sechs Varianten der Belichtungsstermine nach einer Applikation mit 1,5 µg Sirodesmin PL je Verletzungsstelle zusammengefasst.

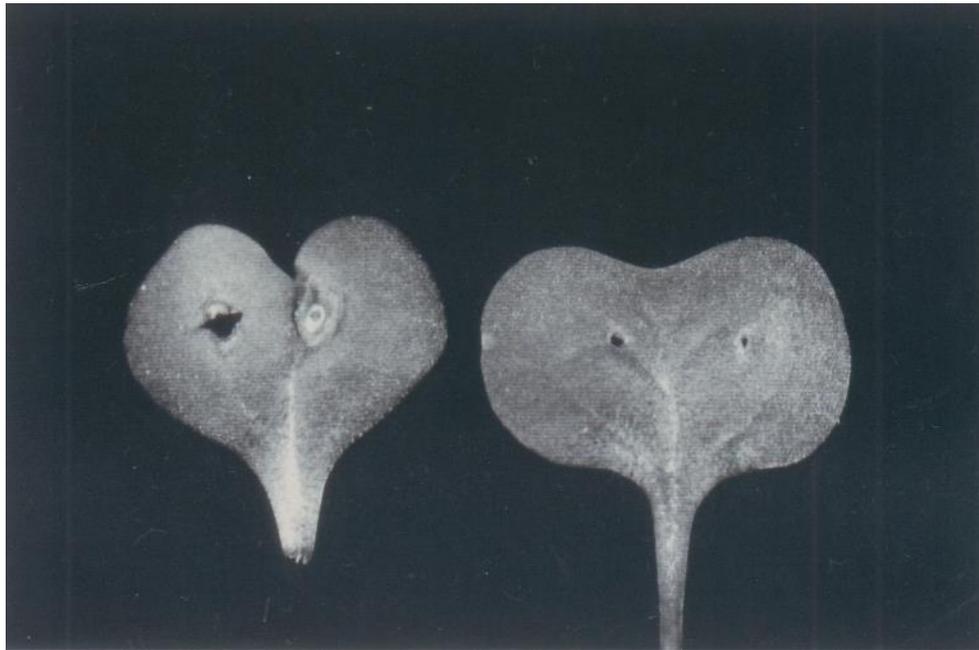


**Abb. 28** Übersicht zum Einfluss unterschiedlicher Belichtungsstermine (Erklärung siehe S. 10) auf die Läsionsausprägung (Boniturnoten siehe Tab. 1) toxinbehandelter Kotyledonen der Sorte Jet Neuf bei 20 °C. (1,5 µg Sirodesmin PL pro Verletzungsstelle, Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen, Daten siehe A5).

In dieser Zusammenfassung wird deutlich, wie mit zunehmender Dauer der Belichtung für die Symptomausprägung höhere Boniturnoten erreicht wurden. Eine Verdunklung zu Beginn der Inkubation ließ zunächst keine Symptome entstehen, die Wirksamkeit des Sirodesmin PL blieb jedoch erhalten und wurde nach einer später erfolgten Belichtung deutlich.

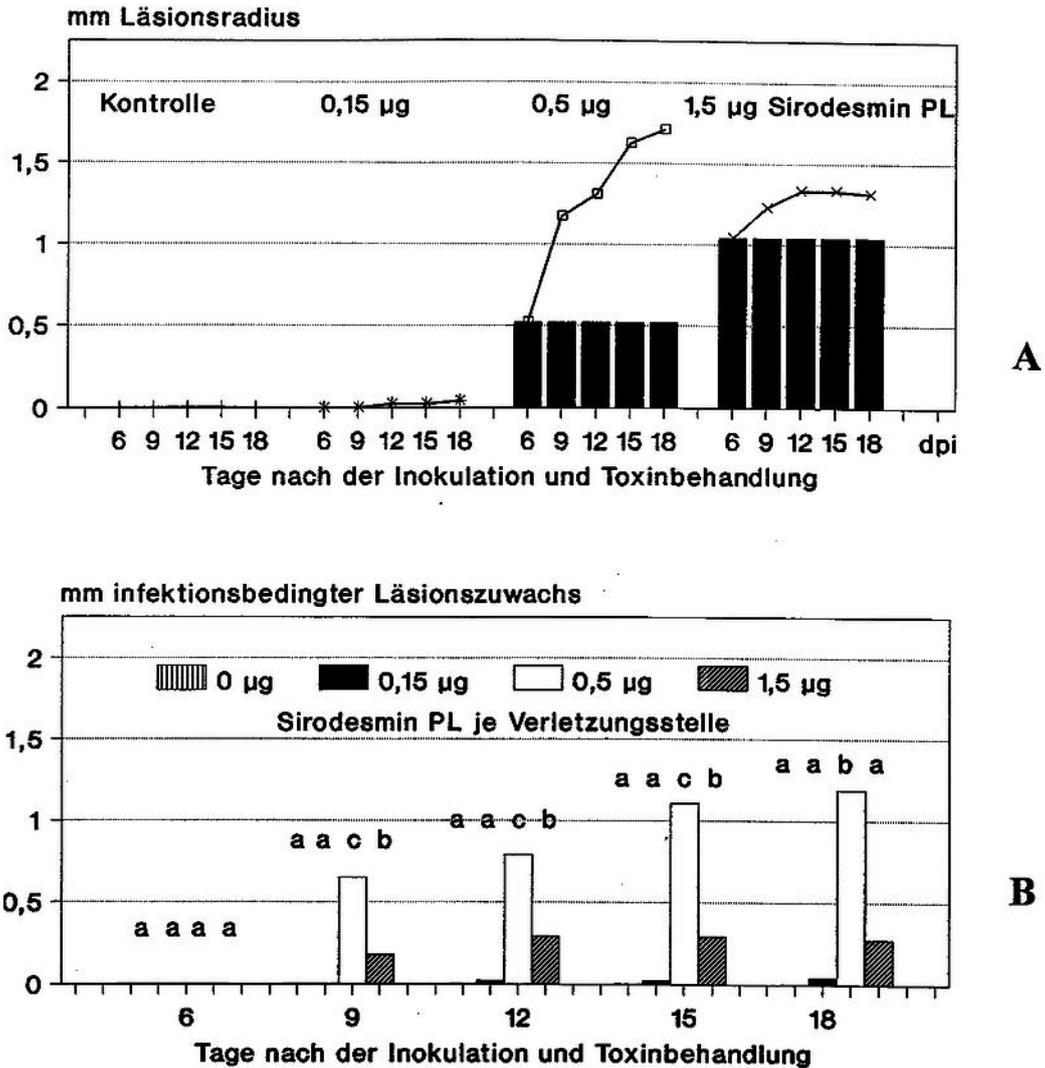
### 3.2.3 Wirkung einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf inkompatible Interaktionen

Schon in Vorversuchen zeigte es sich, dass bei niedriger relativer Luftfeuchte (unter 70%) eine läsionsfördernde Wirkung von Sirodesmin PL bei inkompatiblen Interaktionen nicht gegeben ist. Bei den vier untersuchten nichtkompatiblen Interaktionen wurden nur bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit (nahe 100%) läsionserweiternde Effekte beobachtet. Etwa ab dem sechsten Tag nach der Inokulation begannen die *Phoma*-Isolate über die Zone der toxininduzierten Läsion hinauszuwachsen. Diese Entwicklung wurde durch einen zunächst dünnen braunen nekrotischen Rand an der Toxinläsion eingeleitet, der sich während der weiteren Inkubationszeit vergrößerte (Abb. 29).



**Abb. 29** Effekt von Sirodesmin PL (0,5 µg / Inokulationsstelle) auf die Interaktion des nicht-aggressiven *Phoma*-Isolates PHW 1261 (NA) mit der Sorte Quinta am 18. Tag nach der Inokulation. Die Toxinbehandlung erfolgte gleichzeitig mit der Inokulation. Läsionen ohne Toxinbehandlung sind wesentlich kleiner (vgl. Abb. 20).

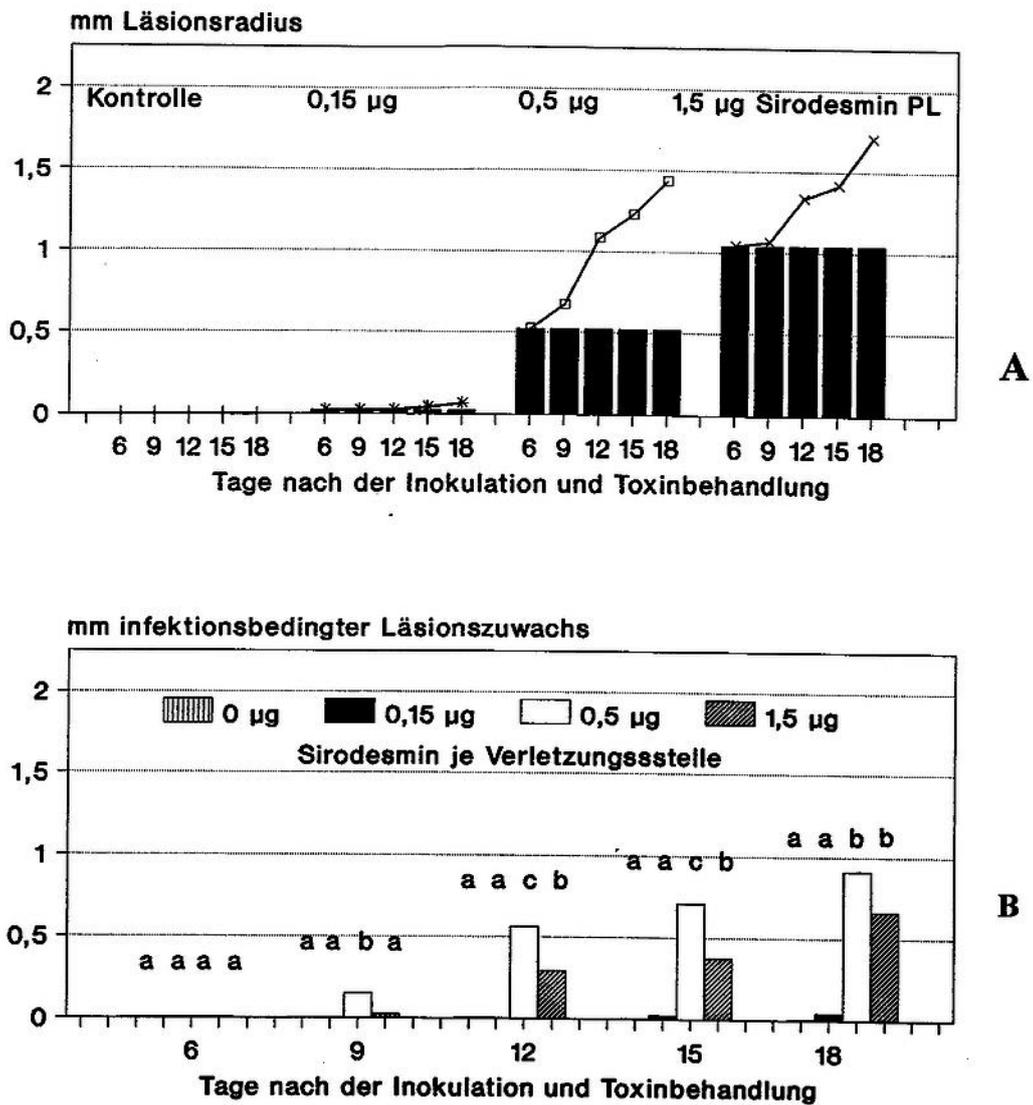
Auf den folgenden Abbildungen 30 - 33 werden auf den Kotyledonen die toxininduzierten und infektionsbedingten Läsionsradien gezeigt. Dabei wird jeweils im Abschnitt A der zeitliche Verlauf der Läsionsentwicklung verdeutlicht. Im Abschnitt B wird nach Subtraktion der Radien der Toxinläsionen die Abhängigkeit des infektionsbedingten Läsionswachstums von der Toxindosierung dargestellt. Die unterschiedlichen Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen ( $P = 0,95$  nach Tukey Test) an.



**Abb. 30** Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung in der inkompatiblen Interaktion der Sorte Quinta mit dem nichtaggressiven Isolat PHW 1261. Die Toxinbehandlung erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 32 Wiederholungen, Daten siehe A6).

**A:** Radien infektionsbedingter (Kurven) und toxininduzierter (Säulen) Läsionen der Interaktion der Sorte Quinta mit dem nichtaggressiven Isolat PHW 1261 nach Behandlung mit Sirodesmin PL.

**B:** Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf das infektionsbedingte Läsionswachstum nach Subtraktion der toxinbedingten Radien in Abhängigkeit von der Toxinkonzentration. Verschiedene Buchstaben am gleichen Messtag zeigen signifikante Unterschiede für die Stufen der Toxinbehandlung ( $P = 0,95$  nach Tukey) an.

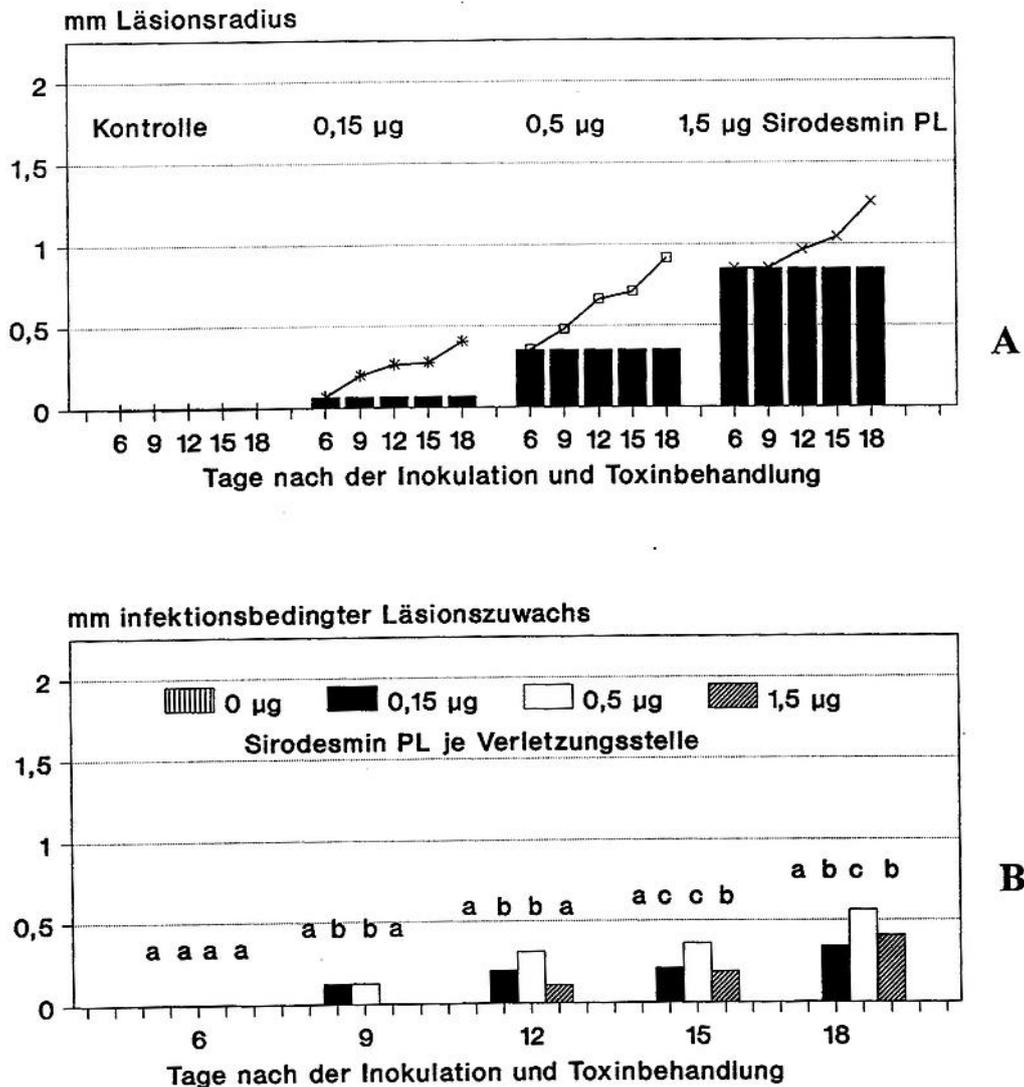


**Abb. 31** Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung in der inkompatiblen Interaktion der Sorte Jet Neuf mit dem nichtaggressiven Isolat PHW 1261. Die Toxinbehandlung erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 24 Wiederholungen, weitere Erklärungen siehe Abbildung 30, Daten siehe A7).

In den Abbildungen 30 und 31 sind die Wirkungen von Sirodesmin PL auf die durch das nichtaggressive Isolat PHW 1261 verursachten Läsionen an Kotyledonen der beiden Sorten Quinta und Jet Neuf dargestellt. In den toxfreien Kontrollinteraktionen blieben die Nekrosen auf den unmittelbaren Läsionsrand beschränkt, so dass kein Läsionsradius gemessen werden konnte. Bei beiden Sorten wirkte das Toxin in den drei untersuchten Dosierungsstufen läsionsvergrößernd. Bei 0,15 µg Sirodesmin PL je Verletzungsstelle auf Quinta und Jet Neuf war ein solcher Effekt nur tendenziell vorhanden und nicht immer reproduzierbar. Die Applikation von 0,5 µg Sirodesmin PL dagegen bewirkte in beiden Interaktionen hochsignifikante Vergrößerungen der

infektionsbedingten Läsionen. Bis zum 18. Tag nach der Inokulation wurden auf Kotyledonen der Sorten Quinta und Jet Neuf Vergrößerungen der Läsionsradien von 1,2 mm bzw. 0,9 mm erreicht. Bei der Verwendung von 1,5 µg schwächte sich die Wirkung des Toxins an beiden Sorten wieder ab. Beim Vergleich der Behandlungstufen (B) zeigte sich, dass eine Applikation von 0,5 µg Sirodesmin PL signifikant den größten Läsionszuwachs bewirkte.

In der folgenden Darstellung wird der Einfluss einer Toxinbehandlung auf die inkompatible Wirt-Parasit-Beziehung von *B. juncea* cv. Aurea mit dem aggressiven Isolat IIa 1 gezeigt.

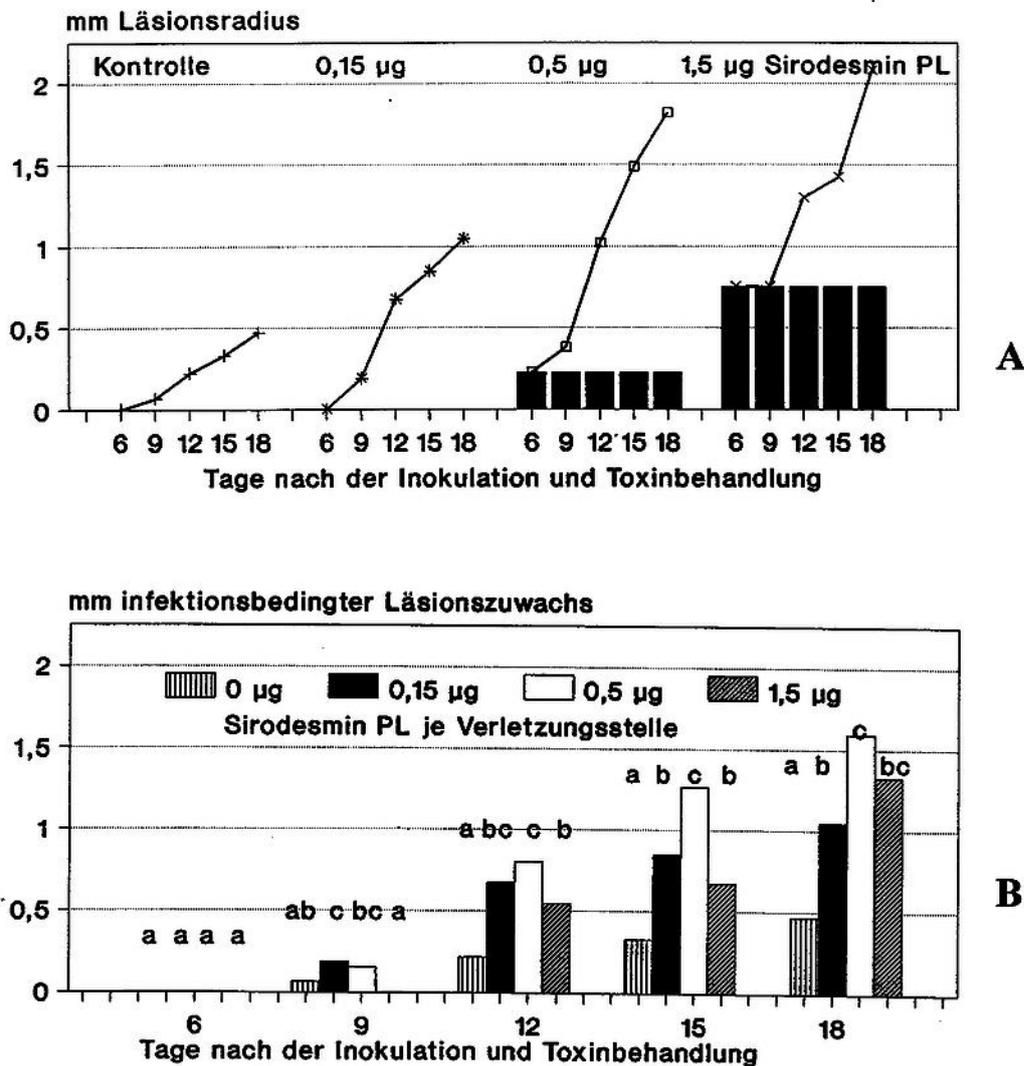


**Abb. 32** Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung in der inkompatiblen Interaktion von *B. juncea* cv. Aurea mit dem aggressiven Isolat IIa 1. Die Toxinbehandlung erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 32 Wiederholungen, weitere Erklärungen siehe Abbildung 30, Daten siehe A8).

In dieser Interaktion waren die durch Sirodesmin PL allein induzierten Läsionsradien deutlich kleiner als in den zuvor beschriebenen Interaktionen. Allerdings bewirkten schon 0,15 µg Sirodesmin PL je Verletzungsstelle beim Vergleich mit den toxinfreien Kontrollen im

Zusammenwirken mit dem Isolat Ila 1 deutliche Vergrößerungen der infektionsbedingten Läsionsradien. Durch eine Behandlung mit 0,5 µg Sirodesmin PL wurden die infektionsbedingten Läsionsvergrößerungen verstärkt. Sie erreichten bis zum 18. Tag nach der Inokulation ein durchschnittliches Maximum mit 0,56 mm. Bei der Zugabe von 1,5 µg Toxin war die pilzbedingte Läsionsentwicklung wie bei den zuvor gezeigten Interaktionen (Quinta, Jet Neuf - NA) schwächer ausgeprägt. Auf den inokulierten toxinfreien Kotyledonen der Kontrolle entwickelten sich keine sichtbaren Läsionen.

Aggressive Isolate der Pathotypgruppe A2 wie z.B. MIX 7 verursachten auf Quinta Nekrosen, die sich in ihrer Größe deutlich von denen der nichtaggressiven Isolate unterschieden. In der Abbildung 33 wird der Effekt einer Toxinbehandlung auf diese Interaktion gezeigt.



**Abb. 33** Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung bei der inkompatiblen Interaktion der Rapssorte Quinta mit dem aggressiven Isolat MIX 7. Die Toxinbehandlung erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 32 Wiederholungen, weitere Erklärungen siehe Abbildung 30, Daten siehe A9).

Schon bei den toxisfreien Kontrollbehandlungen der Interaktion Quinta - MIX 7 entstanden auf den Kotyledonen braune Nekrosen, die jedoch nicht mit den Läsionen von kompatiblen Wirt-Parasit-Beziehungen vergleichbar waren. Eine gleichzeitige Toxinapplikation mit 0,15 µg Sirodesmin PL / Inokulationsstelle förderte die Läsionsentwicklung und bewirkte bis zum 18. Tag nach der Inokulation infektionsbedingte Läsionsradien im Mittel von 1,05 mm. Noch deutlicher waren diese Effekte mit 0,5 µg Sirodesmin PL. So wurden Läsionsradien von durchschnittlich 1,59 mm gemessen. Eine noch höhere Toxindosierung (1,5 µg) verringerte wie in den vorherigen Untersuchungen den Zuwachs auf 1,33 mm. Die Toxinapplikationen bewirkten in allen drei Behandlungsstufen ab dem 12. Tag nach der Inokulation einen signifikanten Effekt im Vergleich zu den toxinunbehandelten Kontrollen.

In mehreren Versuchsserien wurden bei den vier zuvor beschriebenen inkompatiblen Interaktionen Toxinapplikationen mit 0,15 µg Sirodesmin PL je Verletzungsstelle am Tag der Inokulation und nochmals drei Tage später vorgenommen.

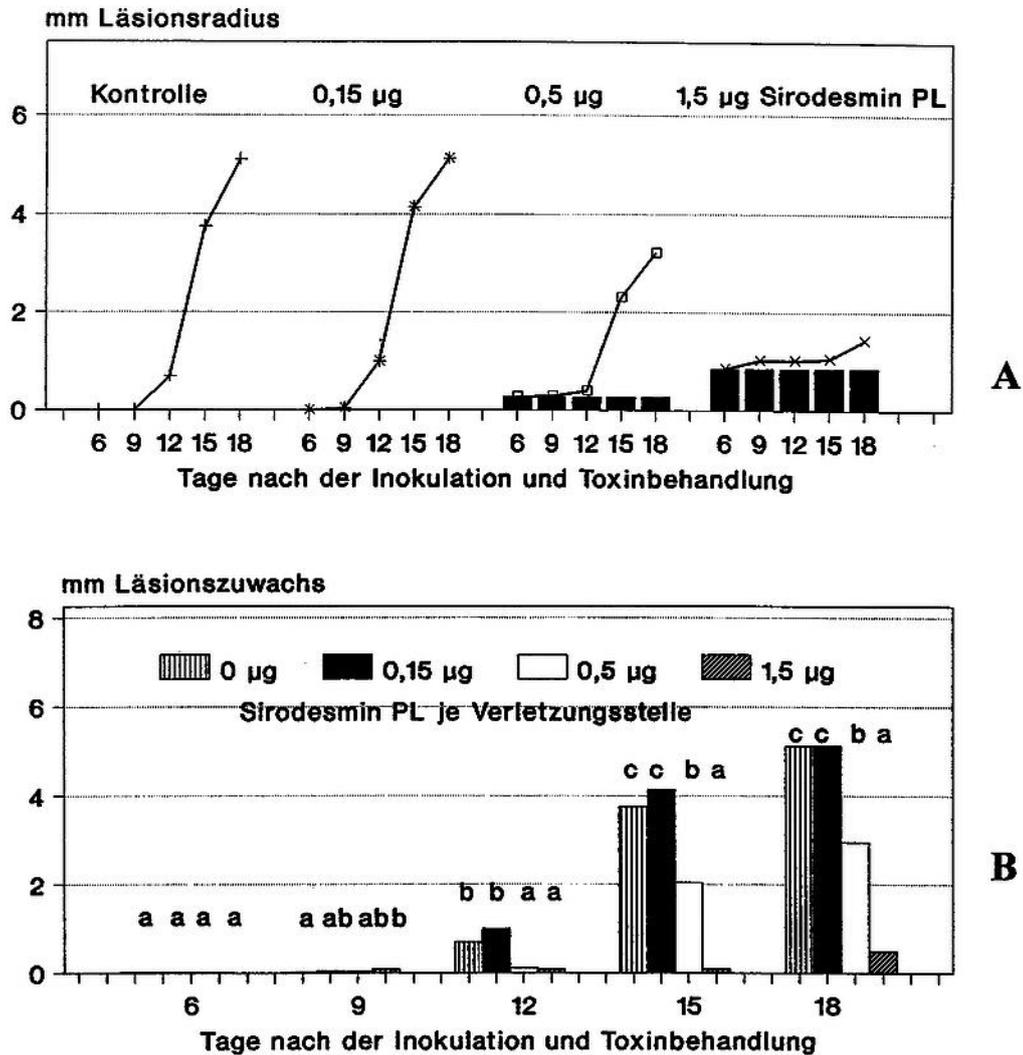
**Tab.6** Effekte von Behandlungen mit Sirodesmin PL auf die Entwicklung der infektionsbedingten Läsionsradien (mm) aggressiver und nichtaggressiver *Phoma*-Isolate in inkompatiblen Interaktionen. Die erste Behandlung mit 0,15 µg Sirodesmin PL je Verletzungsstelle erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums, die zweite wurde 3 Tage danach auf frisch gesetzten Verletzungen durchgeführt (Durchschnittswerte von 32 Wiederholungen, dpi = Tage nach der Inokulation, se = Standardfehler des Mittelwerts).

Interaktionspaar und Behandlungsart	6.	9.	12.	15	18. dpi	
	$\bar{x} \pm se$					
Quinta - PHW 1261	toxisfrei	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	einfach	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,04	0,04 ± 0,04	0,08 ± 0,05
	zweifach	0,04 ± 0,04	0,08 ± 0,05	0,21 ± 0,07	0,29 ± 0,08	0,25 ± 0,08
Jet Neuf - PHW 1261	toxisfrei	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	einfach	0,04 ± 0,04	0,04 ± 0,04	0,04 ± 0,04	0,08 ± 0,05	0,13 ± 0,06
	zweifach	0,08 ± 0,05	0,17 ± 0,08	0,33 ± 0,13	0,42 ± 0,13	0,42 ± 0,13
Aurea - Ila 1	toxisfrei	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	einfach	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,05	0,17 ± 0,06	0,25 ± 0,08
	zweifach	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,05	0,21 ± 0,07	0,46 ± 0,09
Quinta - MIX 7	toxisfrei	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,05	0,22 ± 0,14	0,33 ± 0,23	0,47 ± 0,26
	einfach	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,06	1,08 ± 0,23	3,00 ± 0,35	3,63 ± 0,42
	zweifach	0,00 ± 0,04	0,17 ± 0,06	0,92 ± 0,34	2,17 ± 0,16	2,63 ± 0,19

Die infektionsbedingten Läsionsradien erweiterten sich nach der zweiten Applikation von Sirodesmin PL nur geringfügig. In der Interaktion Quinta - MIX 7 schien eine zweite Toxinbehandlung die Läsionserweiterung im Vergleich zur einmaligen Behandlung sogar leicht zu hemmen. Die Unterschiede waren im Vergleich mit einer einmaligen Toxinbehandlung meistens nicht signifikant (P = 0,95 nach dem TUKEY Test).

### 3.2.4 Wirkung einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf eine kompatible Interaktion

Neben den vorgestellten vier inkompatiblen Interaktionen wurde auch die anfällige Interaktion Quinta - Ila 1 in die Versuche einbezogen.



**Abb. 34** Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung in der kompatiblen Interaktion der Rapssorte Quinta mit dem aggressiven Isolat Ila 1. Die Toxinbehandlung erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 32 Wiederholungen, weitere Erklärungen siehe Abbildung 30, Daten siehe A10).

Erwartungsgemäß entwickelten sich auf den toxinunbehandelten Inokulationsstellen dieser Interaktion ab dem 12 Tag ausgedehnte Läsionen, die bis zu 18 Tag einen durchschnittlichen Radius von 5,11 mm erreichten. 0,15 µg Sirodesmin PL je Verletzungsstelle hatten auf die Läsionsentwicklung keinen signifikanten Einfluss ( $r = 5,13$  mm). Dagegen wurde überraschenderweise die weitere Entwicklung der Läsionsradien durch eine höhere Dosierung von 0,5 µg Sirodesmin PL drastisch ( $r = 2,94$  mm) gehemmt. Eine Erhöhung der Toxinmenge auf 1,5 µg Sirodesmin PL hemmte die Läsionsentwicklung noch stärker ( $r = 0,5$  mm). Auf vielen Kotyledonen zeigten sich an den toxinbedingten Läsionen auch am 15. und 18. Tag nach der Inokulation keine sichtbare Pilzentwicklung, während auf anderen Kotyledonen toxininduzierte

Läsionsränder durch weitere, deutlich unterscheidbare Gewebereinbrüche und chlorotische Verfärbungen gekennzeichnet waren. Bei den Messungen ergaben sich daher sehr unterschiedliche Einzelresultate, die auch in hohen Standardabweichungen (Tab. 7) deutlich wurden.

**Tab. 7** Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung an nichtinokulierten Kotyledonen und in der kompatiblen Interaktion der Rapssorte Quinta mit dem aggressiven Isolat Ila 1 am 18. Tag nach der Inokulation. Die Toxinbehandlung erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 32 Wiederholungen, SD = Standardabweichung).

Behandlung	Läsionsradius	Behandlung	Läsionsradius
	$\bar{x} \pm SD$		$\bar{x} \pm SD$
0,15 µg Toxin	1,00 ± 0,00	Ila 1 ohne Toxin	11,22 ± 1,96
0,50 µg Toxin	1,53 ± 0,51	Ila 1 + 0,15 µg	11,25 ± 2,34
1,50 µg Toxin	2,88 ± 0,34	Ila 1 + 0,50 µg	7,40 ± 3,55
		Ila 1 + 1,50 µg	3,84 ± 1,44

### 3.3 Induzierte Seneszenz durch Abtrennung infizierter Kotyledonen und die Entwicklung von *P. lingam*

Die Resistenz einer Pflanze gegenüber Schaderregern wird von vielen Faktoren bestimmt. Hier sollen nur präformierte (Axenie) und induzierte (Apergie) Resistenzfaktoren berücksichtigt werden, die chemischer und morphologischer Natur sein können. In der Pflanzenzüchtung werden Resistenzprüfungen häufig an abgetrennten Pflanzenorganen durchgeführt (HANOUNIK 1986). Eine Abtrennung verursacht nicht den sofortigen Abbau von präformierten Faktoren, wie z.B. Dicke der Kutikula oder chemischer Abwehrstoffe (z.B. Glukosinolate, MONDE et al. 1991), so dass deren Wirksamkeit über einen begrenzten Zeitraum fortbestehen kann. Die Zufuhr von Nährstoffen, Phytohormonen und weiteren Verbindungen wird jedoch unterbrochen. So gelangen z.B. Cytokinine, welche u.a. Alterungsprozesse und Abbaureaktionen verlangsamen und überwiegend in den Wurzelzellen gebildet werden (DÖRFFLING 1982), nicht mehr in das isolierte Pflanzenorgan. Umgekehrt jedoch steigt die Aktivität der Abscisinsäure in abgetrennten Blättern (NOODÉN & LEOPOLD 1988) und die Seneszenz wird in diesen Blättern beschleunigt. Der Energiestoffwechsel müsste schon nach kurzer Zeit in sich zusammenbrechen, wenn nicht größere Mengen an energiereichen Kohlenhydraten gespeichert worden wären. Es ist vorstellbar, dass die Synthese von induzierbaren Resistenzfaktoren weitgehend gehemmt wird. So könnten Lignifizierungsprozesse, Kallosebildung, Synthese von PR-Proteinen und Phytoalexinbildung (BAILEY 1982) nach einer Blattabtrennung weitgehend gehemmt bzw. ausgeschaltet werden.

Mit einer Abtrennung infizierter Blätter sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

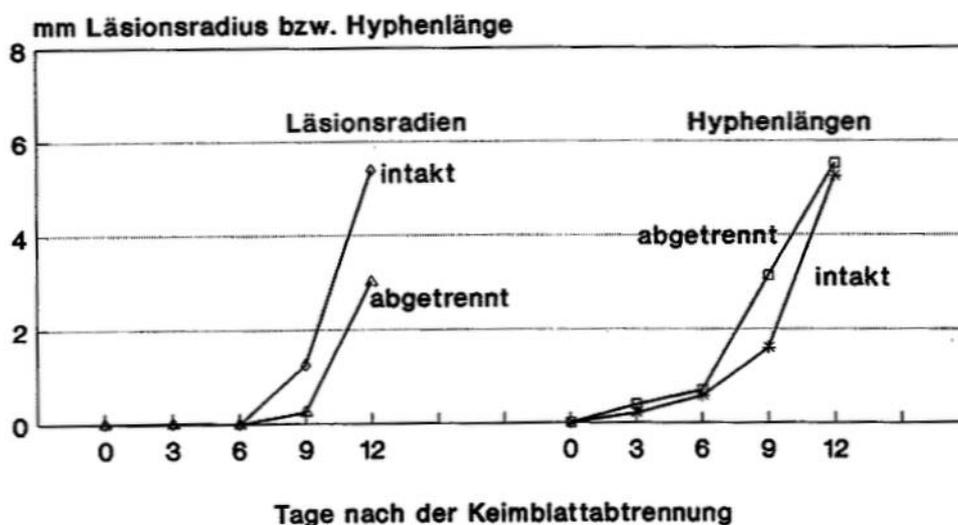
- 1 Wird die Resistenz in inkompatiblen Interaktionen nach einer Organabtrennung gebrochen ?
- 2 Kann *P. lingam* in inkompatiblen Interaktionen in intakten Kotyledonen für längere Zeit überdauern und sich nach einer Abtrennung weiterentwickeln?
- 3 Verzögert das Phytohormon Kinetin die Seneszenz der Kotyledonen und damit die Entwicklung von *P. lingam*?
- 4 Kann sich *P. lingam* auf abgetrennten Kotyledonen von *B. juncea* in der resistenten Sorte Aurea entwickeln?
- 5 Tragen präformierte oder induzierte Faktoren zur Resistenz gegenüber *P. lingam* bei?

### 3.3.1 Wirkung einer Keimblattabtrennung auf die Entwicklung von *P. lingam*

Im ersten Teil der Untersuchungen wurden vier Merkmale wie sichtbarer Läsionsradius, Hyphenlänge, Stadien der Pyknidienentwicklung und Hyphen im Blattstiel im Hinblick auf ihr Differenzierungsvermögen und ihre Aussagefähigkeit verglichen. Als Beispiele werden hier die Interaktionen von drei *Phoma*-Isolaten verschiedener Pathotypgruppen mit der Rapsorte Quinta vorgestellt.

#### Kompatible Interaktion Quinta - Ila 1 (A1)

Das aggressive Isolat Ila 1 entwickelte sich auf Quinta in einer kompatiblen Interaktion. Auf den intakten Kontrollblättern bewirkte der Pilz in der ersten Woche nach der Inokulation zunächst keine Symptome. Vom 9. bis zum 12. Tag nach der Inokulation bildeten sich Läsionen, die einen mittleren Radius von 5,4 mm erreichten. Das Hyphenwachstum konnte mikroskopisch schon am dritten Tag festgestellt werden; die durchschnittliche Hyphenlänge betrug am 12. Tag 5,3 mm (vgl. Abb. 35 und Tabelle 8).



**Abb. 35** Effekt einer Keimblattabtrennung auf die Entwicklung der Läsionsradien und auf die Hyphenlängen des aggressiven Isolates Ila 1 (A1) in der kompatiblen Interaktion mit Quinta (Durchschnittswerte von 12 Wiederholungen für Läsionsradien und von 6 Wiederholungen für Hyphenlängen Daten siehe A11).

Nach einer Abtrennung der Kotyledonen begannen sich die Werte dieser beiden Parameter unterschiedlich zu entwickeln. Im Vergleich zu den intakten Kotyledonen waren die visuell messbaren Läsionsradien deutlich kleiner, die durchschnittliche Hyphenlänge dagegen tendenziell war am 12. Tag nach der Abtrennung größer (Abb. 35 und Tab. 8).

An den intakten Kotyledonen entwickelten sich die Pyknidien bis zur Reife und erreichten bis zum 12. Tag die maximale Boniturnote. Ein Eindringen von Pilzhyphen in die Petiolen konnte dabei häufig beobachtet werden.

**Tab. 8** Entwicklung der Läsionsradien, der Hyphenlängen, der Stadien der Pyknidienbildung und Eindringen der Hyphen in die Petiolen nach einer Keimblattabtrennung in der kompatiblen Interaktion Quinta - Ila 1. Die Abtrennung erfolgte am Tag der Inokulation (Boniturschlüssel für Pyknidienentwicklung siehe Tab. 4, weitere Daten siehe A11, graphische Darstellung in Abb. 35).

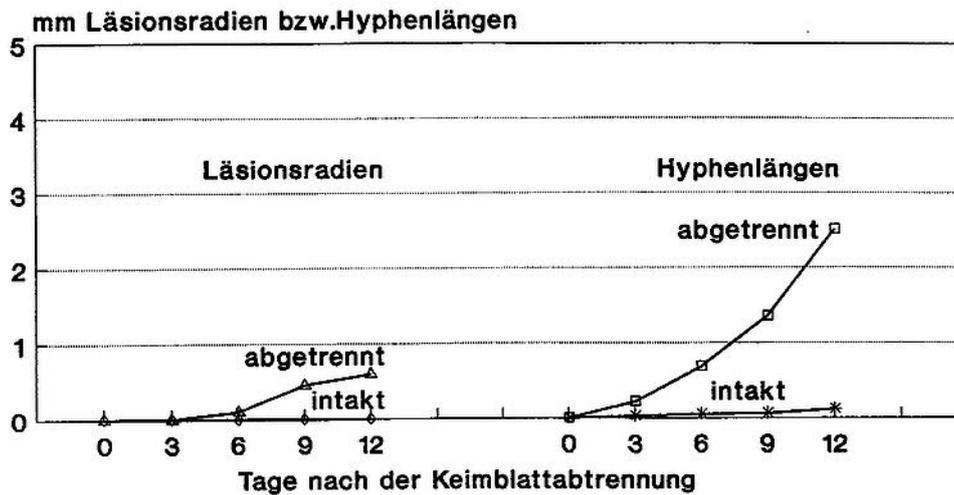
Tage nach der Inokulation	mm Läsionsradius		mm Hyphenlänge		Stadien der Pyknidienentwicklung		Eindringen von Hyphen in die Petiolen	
	intakt	abgetr.	intakt	abgetr.	intakt	abgetr.	intakt	abgetr.
0	0	0	0	0	0	0	-	-
3	0	0	0,201	0,382	0	0	-	-
6	0	0	0,569	0,700	0	0	-	-
9	1,25	0,25	1,583	3,110	3	4	-	+
12	5,37	3,00	5,250	5,500	4	4	+	+

Mit einer Abtrennung der Kotyledonen wurde auch die Entwicklung der beiden anderen Merkmale gefördert. Die Pyknidien erreichten schon am 9. Tag nach der Inokulation ihre Reife und sonderten Sporenschleim ab. Die Hyphen drangen bereits drei Tage eher als bei intakten Kontrollen in die Blattstiele ein (Tab. 8). Generell konnte eine leichte Förderung der Pilzentwicklung bei allen mikroskopisch untersuchten Merkmalen registriert werden.

### **Inkompatible Interaktion Quinta - PHW 1261 (NA)**

Auf intakten Kotyledonen in der Interaktion PHW 1261 - Quinta waren keine messbaren nekrotischen Läsionen sichtbar. Nur in unmittelbarer Nähe der Verletzungszone konnten Hyphenlängen von bis zu 0,12 mm am 12. Tag nach der Inokulation festgestellt werden (Abb. 36). Eine Pyknidienbildung war auf den Kotyledonen mikroskopisch nicht erkennbar. Ein Eindringen von Pilzhyphen in die Petiolen konnte nicht beobachtet werden (Tab. 9).

In den abgetrennten Kotyledonen dagegen konnte sich das nichtaggressive Isolat PHW 1261 deutlich besser entwickeln. So entstand ein mittlerer sichtbarer Läsionsradius von 0,6 mm und die mikroskopisch festgestellte Hyphenlänge betrug durchschnittlich 2,5 mm. Bis zum 12. Tag entstanden auf den Kotyledonen kleine Pyknidien (Boniturnote 3), aus denen jedoch noch kein Sporenschleim austrat. Die Pilzhyphen drangen nicht in die Petiolen ein.



**Abb. 36** Effekt einer Keimblattabtrennung auf die Entwicklung der Läsionsradien und auf die Hyphenlängen des nichtaggressiven Isolates PHW 1261 (NA) in der inkompatiblen Interaktion mit Quinta (Durchschnittswerte von 12 Wiederholungen für Läsionsradien und von 6 Wiederholungen für Hyphenlängen, Daten siehe A12).

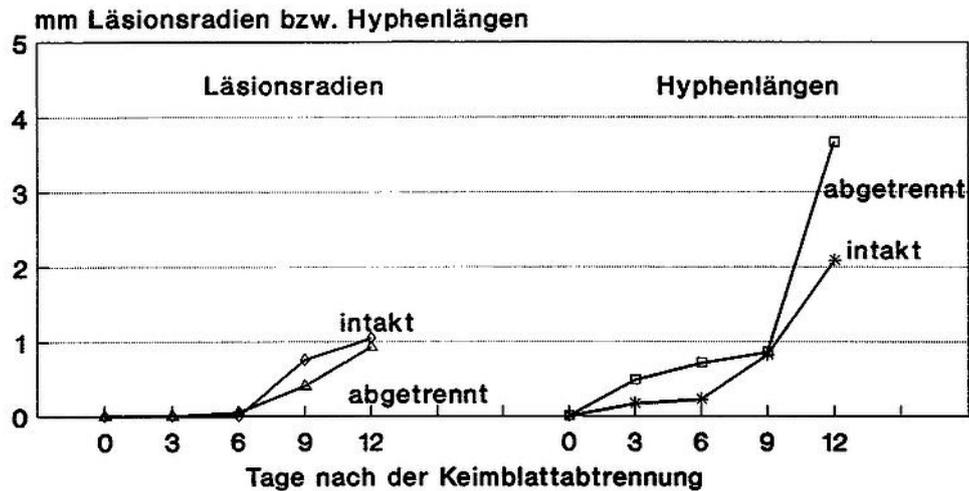
**Tab. 9** Entwicklung der Läsionsradien, der Hyphenlängen, der Stadien der Pyknidienbildung und des Eindringens der Hyphen in die Petiolen nach einer Keimblattabtrennung in der inkompatiblen Interaktion Quinta - PHW 1261. Die Abtrennung erfolgte am Tag der Inokulation. (Boniturschlüssel für Pyknidienentwicklung siehe Tab. 4, weitere Daten siehe A12, graphische Darstellung in Abb. 36).

Tage nach der Inokulation	mm Läsionsradius		mm Hyphenlänge		Stadien der Pyknidienentwicklung		Eindringen von Hyphen in die Petiolen	
	intakt	abgetr.	intakt	abgetr.	intakt	abgetr.	intakt	abgetr.
0	0	0	0	0	0	0	-	-
3	0	0	0,03	0,212	0	0	-	-
6	0	0,1	0,05	0,683	0	0	-	-
9	0	0,45	0,058	1,350	0	3	-	-
12	0	0,60	0,120	2,500	0	3	-	-

Aus der Differenz des Läsionsradius von 0,6 mm zur Hyphenlänge von 2,5 mm ergibt sich, dass die Hyphen weit in scheinbar unbesiedeltes Gewebe eingedrungen waren. Das nichtaggressive Isolat PHW 1261 konnte demnach in den abgetrennten Kotyledonen wachsen, ohne im besiedelten Gewebe Symptome zu verursachen.

### Inkompatible Interaktion Quinta - MIX 7 (A2)

Das aggressive Isolat MIX 7 konnte auf intakten Kotyledonen von Quinta seine Entwicklung nicht vollenden. So entstanden in dieser Interaktion braune nekrotische Läsionen, die am 12. Tag nach der Inokulation einen mittleren Radius von 1,04 mm erreichten. Bei den mikroskopischen Messungen der Hyphenlängen wurden mit 2,01 mm fast doppelt so hohe Werte (Abb. 37) erreicht. In den intakten Kotyledonen konnte die Pyknidienentwicklung nicht abgeschlossen werden. Ein Einwachsen von Pilzhypen in die Petiolen konnte nicht festgestellt werden.



**Abb. 37** Effekt einer Keimblattabtrennung auf die Entwicklung der Läsionsradien und auf die Hyphenlängen des aggressiven Isolates MIX 7 (A2) in der inkompatiblen Interaktion mit Quinta (Durchschnittswerte von 12 Wiederholungen für Läsionsradien und von 6 Wiederholungen für Hyphenlängen, Daten siehe A13).

**Tab. 10** Entwicklung der Läsionsradien, der Hyphenlängen, der Stadien der Pyknidienbildung und des Eindringens der Hyphen in die Petiolen nach einer Keimblattabtrennung in der inkompatiblen Interaktion Quinta - MIX 7. Die Abtrennung erfolgte am Tag der Inokulation. (Boniturschlüssel für Pyknidienentwicklung siehe Tab. 4, weitere Daten siehe A13, graphische Darstellung in Abb. 37).

Tage nach der Inokulation	mm Läsionsradius		mm Hyphenlänge		Stadien der Pyknidienentwicklung		Eindringen von Hyphen in die Petiolen	
	intakt	abgetr.	intakt	abgetr.	intakt	abgetr.	intakt	abgetr.
0	0	0	0	0	0	0	-	-
3	0	0	0,164	0,479	0	0	-	-
6	0	0,05	0,225	0,708	0	0	-	-
9	0,75	0,40	0,766	0,850	0	0	-	-
12	1,04	0,70	2,083	3,666	2	2	-	+

Abtrennungen der Kotyledonen bewirkten bei zwei der vier untersuchten Merkmale eine bessere Entwicklung für das Isolat MIX 7. Dies wurde zum Beispiel für den Parameter Hyphenlänge nach der Abtrennung deutlich. Im Gegensatz dazu jedoch war der sichtbare nekrotische Läsionsradius

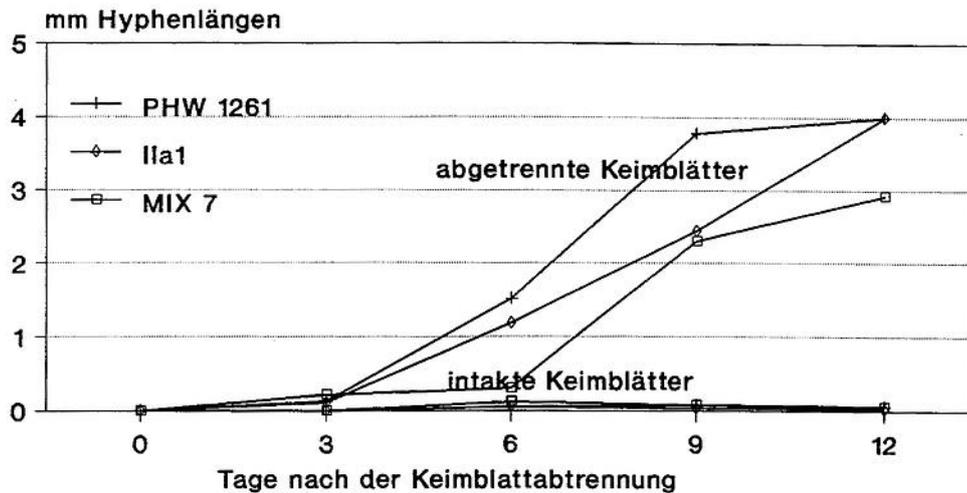
im Vergleich zu den intakten Kontrollblättern am 12. Tag nach der Inokulation um 0,3 mm kleiner. Wieder konnte damit eine zum Teil symptomlose Entwicklung in den abgetrennten Kotyledonen beobachtet werden. Die Keimblattabtrennung hatte auf die Pyknidienentwicklung in dieser Versuchsserie keinen Einfluss. Das Hyphenwachstum wurde aber so stark gefördert, dass gegen Ende der Inkubationszeit Pilzhyphen in die Petiole eingedrungen waren.

Der Vergleich der Parameter zeigt, dass sich aus der Differenz der Läsionsradien und der gemessenen Hyphenlängen ein Wachstum des Pilzes außerhalb der Läsionsfläche ableiten lässt, welches makroskopisch nicht zu erfassen ist. Das Merkmal Läsionsradius war häufig auf abgetrennten Kotyledonen nicht so deutlich ausgeprägt wie auf intakten Blättern. Während die nekrotischen Läsionen auf intakten Kotyledonen meistens vom gesunden Gewebe scharf abgegrenzt erschienen, waren die meist chlorotischen Läsionen auf den abgetrennten Kotyledonen zum Teil nur schwer zu erkennen und daher unsicher zu bestimmen. Ferner konnte bei einer bloßen augenscheinlichen Messung in der Interaktion Quinta - PHW 1261 an intakten Kotyledonen oft nicht mit Sicherheit erkannt werden, ob die Inokulationen erfolgreich waren. So könnte eine alleinige Berücksichtigung dieses Merkmals über die wahre Pilzentwicklung hinwegtäuschen, da eine latente Entwicklung nicht erkennbar ist. Daher wurde bei der weiteren Auswertung auf den Parameter Läsionsradius verzichtet. Die mikroskopische Untersuchung des Merkmals "Hyphenlänge" dagegen ergab die genauesten und sichersten Messungen für alle untersuchten Interaktionen. Die Merkmale "Stadien der Pyknidienentwicklung" und "Eindringen von Hyphen in die Petiolen" vermittelten dabei zusätzliche Informationen.

### **Inkompatible Interaktionen von *B. juncea* cv. Aurea mit drei *Phoma*-Isolaten verschiedener Pathotypgruppen (NA, A1 und A2)**

Viele Sorten und Linien von *B. juncea* verhalten sich gegenüber den meisten Isolaten und Pathotypgruppen von *P. lingam* resistent (RIMMER & VAN DEN BERG 1992). Sollte diese Resistenz nur auf induzierbaren Faktoren beruhen, müsste es möglich sein, die Resistenz der Sorte Aurea durch eine Keimblattabtrennung zu brechen.

Dazu wurde die Sorte Aurea mit Isolaten der drei Pathotypgruppen NA (PHW 1261), A1 (IIa 1) und A2 (MIX 7) inokuliert. Die Kotyledonen wurden noch am selben Tag abgetrennt und in Petrischalen inkubiert. In dreitägigen Abständen wurden mikroskopisch die Hyphenlängen der *Phoma*-Isolate in intakten Kontrollblättern und den abgetrennten Kotyledonen untersucht (Abb. 38).



**Abb. 38** Wirkung einer Abtrennung infizierter Kotyledonen auf die Hyphenentwicklung von drei *Phoma*-Isolaten der Pathotypgruppen NA (PHW 1261), A1 (Ila 1) und A2 (MIX 7) auf *B. juncea* cv. Aurea. Die Abtrennung erfolgte am Tag der Inokulation (Durchschnittswerte von je 6 Wiederholungen, Daten siehe A14).

Auf den intakten Kotyledonen konnten mikroskopisch bei allen Interaktionen Pilzhyphen nur im unmittelbaren Wundbereich festgestellt werden. Ein weiteres Wachstum wurde jedoch bis zum 12. Tag nach der Inokulation völlig unterdrückt. Messbare braune Nekrosen und Ansätze zur Pyknidienbildung konnten auf den Kotyledonen nicht festgestellt werden. Nach der Keimblattabtrennung jedoch begannen alle untersuchten Isolate sich im Blattgewebe auszubreiten. Bis zum letzten Tag der Inkubation wurden in allen Interaktionen Hyphenlängen von durchschnittlich über 2 mm gemessen. Dabei konnten auch frühe Stadien der Pyknidienentwicklung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.2 Überdauerung von *P. lingam* auf intakten Kotyledonen und Entwicklung nach späteren Abtrennungsterminen

Inkompatible Interaktionen werden von *P. lingam* auf *Brassica*-Arten meist durch Abwehrreaktionen der Pflanzen verursacht. Es war bislang nicht klar, ob diese Reaktionen z.B. einen fungistatischen oder fungitoxischen Charakter haben. Sollten die Wirkungen fungitoxischer Natur sein, dürften bei einer späteren Keimblattabtrennung die Pilzsporen oder die ausgekeimten Hyphen nicht mehr entwicklungsfähig sein. In einer zusammenfassenden Darstellung (Tab. 11) wird der Effekt späterer Abtrennungstermine für die Entwicklung von *P. lingam* auf der Sorte Quinta vorgestellt.

**Tab. 11** Effekt späterer Termine der Keimblattabtrennung nach der Inokulation für die Entwicklung von *P. lingam* in drei Interaktionen. Die Abtrennungen erfolgten am 0., 3., 6., 9. und 12 Tag nach der Inokulation. Die Messtage orientieren sich an der Zeit nach der Abtrennung. (Abkürzungen: Hyph.  $\mu\text{m}$  = Hyphenlänge in  $\mu\text{m}$ , Pyk. = Boniturnote für die Pyknidienentwicklung (0-4), Pet. = Eindringen von Hyphen in die Petiole (+/-), Mittelwerte für Hyphenlängen von je 6 Wiederholungen).

Interaktionen		Quinta - PHW 1261			Quinta - Ila 1			Quinta - MIX 7		
Abtrennung am	Messung am	Hyph. $\mu\text{m} \pm \text{se}$	Pyk.	Pet.	Hyph. $\mu\text{m} \pm \text{se}$	Pyk.	Pet.	Hyph. $\mu\text{m} \pm \text{se}$	Pyk.	Pet.
Kontrolle	0. Tag	0	0	-	0	0	-	0	0	-
"	3	32 $\pm$ 6	0	-	201 $\pm$ 67	0	-	164 $\pm$ 27	0	-
"	6	50 $\pm$ 13	0	-	569 $\pm$ 157	0	-	225 $\pm$ 38	0	-
"	9	58 $\pm$ 15	0	-	1583 $\pm$ 331	3	+	766 $\pm$ 138	0	-
"	12	120 $\pm$ 46	0	-	5250 $\pm$ 544	4	+	2083 $\pm$ 190	2	-
3. Tag	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
"	3	211 $\pm$ 26	0	-	381 $\pm$ 48	0	-	479 $\pm$ 31	0	-
"	6	683 $\pm$ 130	0	-	700 $\pm$ 116	0	-	708 $\pm$ 138	0	-
"	9	1350 $\pm$ 173	3	-	3110 $\pm$ 419	4	+	850 $\pm$ 109	0	-
"	12	2500 $\pm$ 316	3	-	5500 $\pm$ 619	4	+	3666 $\pm$ 247	2	+
6. Tag	0	32 $\pm$ 6	0	-	201 $\pm$ 67	0	-	164 $\pm$ 27	0	-
"	3	171 $\pm$ 27	0	-	716 $\pm$ 95	0	-	310 $\pm$ 34	0	-
"	6	1100 $\pm$ 181	2	-	3741 $\pm$ 392	3	+	2495 $\pm$ 367	4	-
"	9	1708 $\pm$ 176	2	-	6416 $\pm$ 490	4	+	4166 $\pm$ 477	4	+
"	12	2200 $\pm$ 316	2	-	6000 $\pm$ 365	4	+	4500 $\pm$ 577	4	-
9. Tag	0	50 $\pm$ 13	0	-	569 $\pm$ 157	0	-	225 $\pm$ 38	0	-
"	3	367 $\pm$ 92	1	-	2416 $\pm$ 201	3	-	1550 $\pm$ 43	2	-
"	6	1308 $\pm$ 294	2	-	5433 $\pm$ 552	4	+	1950 $\pm$ 109	2	-
"	9	1766 $\pm$ 62	3	-	5600 $\pm$ 580	4	+	3383 $\pm$ 164	2	-
"	12	2200 $\pm$ 139	3	-	6566 $\pm$ 760	4	+	3866 $\pm$ 219	2	+
12. Tag	0	58 $\pm$ 15	0	-	1583 $\pm$ 331	3	-	766 $\pm$ 138	0	-
"	3	250 $\pm$ 26	0	-	6450 $\pm$ 412	4	+	1066 $\pm$ 102	1	-
"	6	425 $\pm$ 126	1	-	7200 $\pm$ 213	4	+	2016 $\pm$ 226	1	-
"	9	2933 $\pm$ 341	3	-	6333 $\pm$ 667	4	+	3566 $\pm$ 324	1	+
"	12	3216 $\pm$ 373	3	+	5983 $\pm$ 631	4	+	4656 $\pm$ 512	3	+

In den Kotyledonen intakter Pflanzen der Interaktionen Quinta - PHW 1261 (NA) und Quinta - MIX 7 (A2) war die Entwicklung von *P. lingam* bei allen untersuchten Merkmalen stark gehemmt. Durch eine Abtrennung der Kotyledonen wurde die Hemmung aufgehoben. Auch nach einer späten Abtrennung am 12. Tag nach der Inokulation setzte bei den Isolaten PHW 1261 und MIX 7 noch ein verstärktes Hyphenwachstum ein. Damit war häufig ein Eindringen der Hyphen in die Petiolen und eine Förderung der Pyknidienentwicklung verbunden.

Ebenso konnte bei *B. juncea* cv. Aurea die Resistenz intakter Kotyledonen in drei untersuchten Interaktionen auch nach späteren Abtrennungsterminen gebrochen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass *P. lingam* in inkompatiblen Interaktionen zu überdauern vermag. Die Hemmung in den intakten Kotyledonen ist daher nicht auf fungizide, sondern eher auf fungistatische Effekte zurückzuführen.

### 3.3.3 Wirkung von Kinetin auf die Seneszenz abgetrennter Kotyledonen und auf die Entwicklung von *P. lingam*

Phytohormone aus der Gruppe der Cytokinine werden vorwiegend im Wurzelgewebe gebildet und mit dem Saftstrom im Xylem in alle übrigen Pflanzenorgane transportiert (VAN STADEN & DAVEY 1979). Cytokinine stimulieren die Zellteilung, die RNA- und Proteinsynthese und wirken seneszenzverzögernd (MARSCHNER, 1986). Nach einer Abtrennung kann das Blatt nicht mehr mit diesen Phytohormonen versorgt werden und beginnt schon nach wenigen Tagen zu vergilben und zu altern. In der Natur sind auf abgefallenen und pilzbesiedelten Laubblättern oft grüne Inseln zu bemerken, die durch eine Cytokininsynthese der Pilze hervorgerufen werden (DÖRFFLING 1982, SCHLÖSSER 1983).

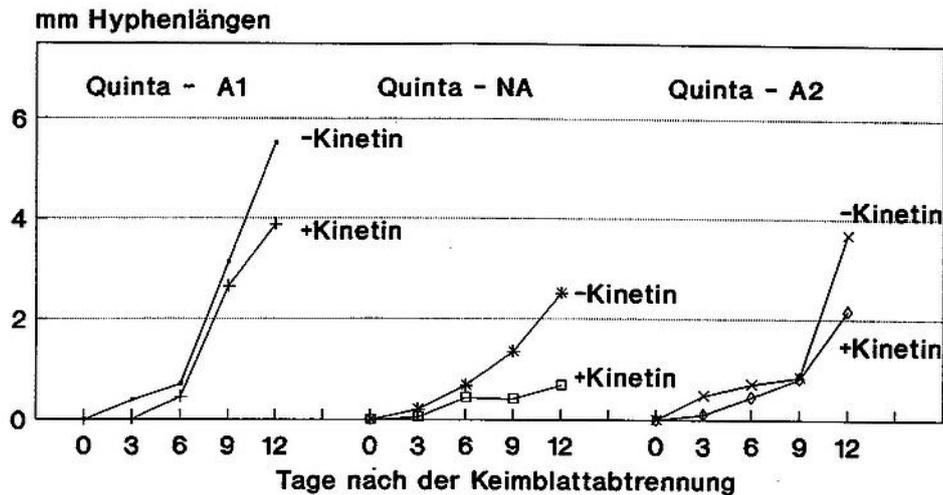
In den durchgeführten Untersuchungen sollte ein Cytokinin, Kinetin, die durch die Abtrennung bedingte Alterung verzögern. Dazu wurden abgetrennte Kotyledonen von *B. juncea* und *B. napus* in Petrischalen 12 Tage inkubiert. Die Hälfte der Schalen enthielt Filterpapier, das mit einer Kinetinlösung (100 µg/ml) angefeuchtet worden war. Eine Bonitur zum Grad der Vergilbung erfolgte jeweils in dreitägigen Abständen (Tab. 12).

**Tab. 12** Effekt von 100 µg/ml Kinetin auf die Alterung abgetrennter Kotyledonen von *B. napus* cv. Quinta und *B. juncea* cv. Aurea. (G = grünes Keimblatt, VG = schwache Vergilbung, V = vollständige Vergilbung)

Sorte	Phytohormonbehandlung	Tage nach der Keimblattabtrennung				
		0	3	6	9	12
Quinta	keine	G	G	VG	VG	V
"	+ 100 µg/ml Kinetin	G	G	G	G	G
Aurea	keine	G	G	VG	VG	V
"	+ 100 µg/ml Kinetin	G	G	G	G	G

In der Tabelle 12 wird eine deutliche Hemmwirkung durch Kinetin auf die Blattalterung der abgetrennten Kotyledonen deutlich. Eine Konzentration von 100 (µg/ml) im feuchten Filterpapier während der Inkubation verzögerte die Vergilbung und Mazerierung der Kotyledonen im Vergleich zur Kontrolle um 6 bis 9 Tage.

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss des Phytohormons Kinetin auf die Hyphenentwicklung in abgetrennten Kotyledonen der Sorten Quinta und Aurea untersucht. Dazu wurden frisch inokulierte Kotyledonen abgetrennt und entsprechend wie im vorherigen Versuch inkubiert. In der Abbildung 39 sind dazu drei Interaktionen dargestellt. Über einen Zeitraum von 12 Tagen nach der Inokulation wurden die Hyphenlängen unter dem Mikroskop gemessen.



**Abb. 39** Einfluss einer Kinetinbehandlung auf das Hyphenwachstum der *Phoma*-Isolate Ila 1 (A1), PHW 1261 (NA) und MIX 7 (A2) in abgetrennten Kotyledonen der Rapssorte Quinta. Die Kotyledonen wurden unmittelbar nach der Inokulation abgetrennt und mit einer Kinetinlösung (100 µg/ml) auf getränktem Filterpapier inkubiert. Eine Behandlung ohne Kinetin diente als Kontrolle (Durchschnittswerte von je 6 Wiederholungen, Daten siehe A15).

Das Hyphenwachstum der untersuchten *Phoma*-Isolate auf den abgetrennten Kotyledonen der Sorten Quinta und Aurea (Daten für Aurea nicht gezeigt) wurde durch Kinetin direkt oder indirekt reduziert. Sogar in der kompatiblen Beziehung von Ila 1 auf Quinta zeigte sich auf den kinetinbehandelten Kotyledonen tendenziell ein geringeres Hyphenlängenwachstum. In der Interaktion von PHW 1261 war in den kinetinbehandelten Kotyledonen das Wachstum der Hyphen auf ein Fünftel im Vergleich zur Kontrollbehandlung eingeschränkt. Ein reduziertes Hyphenwachstum durch Kinetin zeigt sich auch in etwas abgeschwächter Form für die Interaktion von MIX 7 mit Quinta. In der Tabelle 13 werden für die Interaktion Quinta - PHW 1261 zusätzlich die Merkmale "Stadien der Pyknidientwicklung" und "Eindringen von Hyphen in die Petiolen" unter dem Einfluss der Hormonbehandlung mit Kinetin dargestellt.

**Tab. 13** Einfluss einer Kinetinbehandlung (+ K) auf die Pyknidienentwicklung P (Boniturwerte vgl. Tab. 4) und auf das Eindringen von Hyphen in Petiolen (B) abgetrennter Kotyledonen der Sorte Quinta in Interaktion mit PHW 1261 (NA). Die Kotyledonen wurden unmittelbar und am 3., 6., und 9.Tag nach der Inokulation abgetrennt und in mit 100 µg/ml Kinetin (+ K) getränktem Filterpapier inkubiert. Eine Behandlung ohne Kinetin diente als Kontrolle (-K) (Durchschnittswerte von je 6 Wiederholungen).

Abtrenntermin ± Kinetin Merkmal	0 dpi				3 dpi				6				9 dpi				
	-K		+K		-K		+K		-K		+K		-K		+K		
	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	
Tage nach der Inokulation																	
0 dpi	0	-	0	-													
3 dpi	0	-	0	-	0	-	0	-									
6 dpi	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-					
9 dpi	3	-	0	-	2	-	0	-	1	-	0	-	0	-	0	-	
12 dpi	3	-	0	-	2	-	1	-	2	-	1	-	0	-	0	-	
15 dpi					2	-	1	-	3	-	1	-	1	-	0	-	
18 dpi									3	-	2	-	3	-	1	-	
21 dpi													3	+	3	+	

Auch bei dem Merkmal Pyknidienentwicklung wird in der Interaktion der Rapsorte Quinta mit PHW 1261 ein hemmender Effekt durch das Phytohormon deutlich. Die Unterschiede waren ebenso bei späteren Abtrennungsterminen festzustellen; sie schwächten sich mit zunehmenden Alter der Kotyledonen ab. Ein Einfluss auf ein verzögertes Eindringen in den Blattstiel wurde in diesem Versuch nicht deutlich.

### 3.4 Toxinproduktion *in vitro* und in infiziertem Pflanzengewebe

*P. lingam* scheidet in verschiedenen Flüssigkulturen Sirodesmine ab. Die produzierte Toxinmenge wird von den Eigenschaften der Isolate, der Mineralstoff- und Proteinzusammensetzung der Nährmedien und den Inkubationsbedingungen beeinflusst. So extrahierten PEDRAS et al. (1990) aus einem Minimalmedium nach Tinline 25 mg Sirodesmin PL je Liter. SJÖDIN et al. (1988) isolierten aus dem Fries Medium 15,4 mg/l, während FÉRÉZOU et al. (1977) aus einem modifiziertem Fries Medium 20 mg/l erhielten. BOUDART (1989) stellte eine positive Beziehung zwischen dem Schwefelgehalt der Nährmedien und der Sirodesminproduktion fest. So konnte er den Toxingehalt in Nährmedien, die sulfathaltige Mineralsalze enthielten, auf bis zu 80 mg/l steigern. In chloridhaltigen und sulfatarmen Nährlösungen dagegen betrug der Sirodesmin PL Gehalt nur 4,5 mg/l. Ein weiterer mineralischer Einflussfaktor auf die Toxinproduktion könnte das Element Zink sein, welches in Interaktionen mit Sirodesmin PL eine Entgiftungsfunktion zeigt (POIRET et al. 1985, ROUXEL et al. 1988, 1990). Auch eine Belichtung scheint *in vitro* und *in vivo* die Toxinproduktion zu beeinflussen (BOUDART 1977).

Bisher gelangen Nachweise von Sirodesminen aus infiziertem Pflanzengewebe nur vereinzelt. Die wenigen Ergebnisse lassen vermuten, dass Isolationen der Toxine nur sporadisch erfolgreich waren, häufig aber vergeblich vorgenommen wurden. BOUDART (1981) beschrieb in seiner

Dissertationsarbeit eine Extraktion von Sirodesmin PL aus infizierten Hypokotylen von Winterraps. BADAWEY (1991) berichtete über vereinzelte Extraktionen des Toxins aus Hypokotylen und aus infizierten Kotyledonen. PEDRAS et al. dagegen bemühen sich seit mehreren Jahren vergeblich um einen Toxinnachweis in infiziertem Pflanzengewebe (PEDRAS & SÉGUIN-SWARTZ 1992, PEDRAS & TAYLOR 1993).

Mit den folgenden Experimenten sollten die Faktoren, die die Bildung der Sirodesmine *in vitro* und im Pflanzengewebe beeinflussen, näher bestimmt werden. Abschließend wurde die Toxinproduktion im Hinblick auf die Läsionsentwicklung untersucht.

### 3.4.1 Wirkung einer Belichtung auf die Sirodesmingehalte in Flüssigkulturen

Kulturen von *P. lingam* werden zur Gewinnung von Sirodesminen meistens in Dunkelheit als Standkultur inkubiert. Um den Einfluss des Lichtes auf die Toxinproduktion des aggressiven Isolates Ila 1 festzustellen, wurden Czapek-Dox-Kulturen 14 Tage unter Belichtung ( $200 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ ) oder in Dunkelheit inkubiert.

**Tab. 14** Sirodesmingehalte und Trockengewichte (TGW) des Myzels belichteter und unbelichteter Flüssigkulturen (FK) des Isolates Ila 1 nach 14 tägiger Inkubation bei 20 °C (Durchschnittswerte von sechs Wiederholungen, verschiedene Buchstaben zeigen hochsignifikante Unterschiede nach dem Tukey Test,  $P = 0,99$ ).

	mg Sirodesmin PL / l FK	g TGW Myzel / l FK
	$\bar{x} \pm se$	$\bar{x} \pm se$
hell (Dauerbelichtung)	$10,88 \pm 0,44$ a	$3,94 \pm 0,23$ a
dunkel	$28,77 \pm 4,11$ b	$3,36 \pm 0,25$ a

In der belichteten Variante betragen die Gehalte des Sirodesmin PL nur etwa 38 % im Vergleich zur dunklen. Der Unterschied war hochsignifikant. Das Myzelwachstum wurde durch das Licht tendenziell gefördert. Eine Belichtung zeigte damit eine hemmende Wirkung auf die Toxinbildung, nicht aber auf die Myzelbildung.

### 3.4.2 Einfluss des Nährmediums auf das Myzelwachstum *in vitro*

In Czapek-Dox-Agar bilden aggressive *Phoma*-Isolate Sirodesmine, welche in V8-Gemüsesaft-Agar nicht entstehen (eigene Beobachtungen). HANACZIWSKYJ und DRYSDALE (1984) beobachteten, dass aggressive *Phoma*-Isolate auf einigen Agar-Nährmedien im Vergleich zu nichtaggressiven Formen ein geringeres Myzelwachstum zeigen. Diese Wachstumsverringering ist möglicherweise auf mykotoxisch wirkende Sirodesmingehalte im Agar zurückzuführen. In einem Experiment wurde das konzentrische Wachstum von vier *Phoma*-Isolatkolonien (PHW 1261 (NA), III b4 (NA), Ila 1 (A1) und MIX 7 (A2)) auf der Oberfläche der beiden Agar-Nährmedien gemessen. Die Ausdehnung des Myzels wurde bei den späten Messterminen durch den Durchmesser der Petrischalen (90 mm) begrenzt.

**Tab. 15** Entwicklung der Koloniedurchmesser (in mm) von vier *Phoma*-Isolaten auf V8-Gemüsesaft-Agar (V8) und Czapek-Dox-Agar (CD). Die Messungen erfolgten am 11., 14., 17. und 20. Tag nach der Inokulation (Durchschnittswerte von je fünf Wiederholungen).

Tag der Messung	PHW 1261		IIIb 4		IIa 1		MIX 7	
	V8	CD	V8	CD	V8	CD	V8	CD
	x ± se							
11	35 ± 0,4	30 ± 0,3	68 ± 0,1	55 ± 0,4	54 ± 0,4	32 ± 0,6	68 ± 1,5	29 ± 0,5
14	50 ± 0,5	40 ± 0,2	90 ± 0,0	70 ± 0,6	73 ± 0,6	33 ± 0,9	90 ± 0,0	34 ± 0,8
17	70 ± 0,8	51 ± 0,5	90 ± 0,0	88 ± 0,2	90 ± 0,0	36 ± 0,5	90 ± 0,0	36 ± 1,0
20	80 ± 0,5	72 ± 0,6	90 ± 0,0	90 ± 0,0	90 ± 0,0	37 ± 0,6	90 ± 0,0	38 ± 0,7

Die nichtaggressiven Isolate PHW 1261 und IIIb 4 entwickelten sich auf beiden Medien mit einem ungehemmten konzentrischen Wachstum. Die aggressiven Isolate IIa 1 (A1) und MIX 7 (A2) wuchsen in der ersten Woche auf beiden Medien zunächst mit fast gleicher Geschwindigkeit, bis dann ab dem 8. Tag nach der Inokulation auf dem Czapek-Dox-Agar eine Wachstumshemmung einsetzte. Um und unterhalb der Myzeldecke der beiden Isolate wurde eine schwarze Verfärbung im Agar beobachtet, die möglicherweise auf Ausscheidungen von Sirodesminen zurückzuführen ist. In späteren Versuchsserien konnten aus solchen Czapek-Dox-Agarmedien Sirodesmine isoliert werden.

### 3.4.3 Wirkung von Zinksalzen auf Myzelwachstum und Sirodesmingehalte *in vitro*

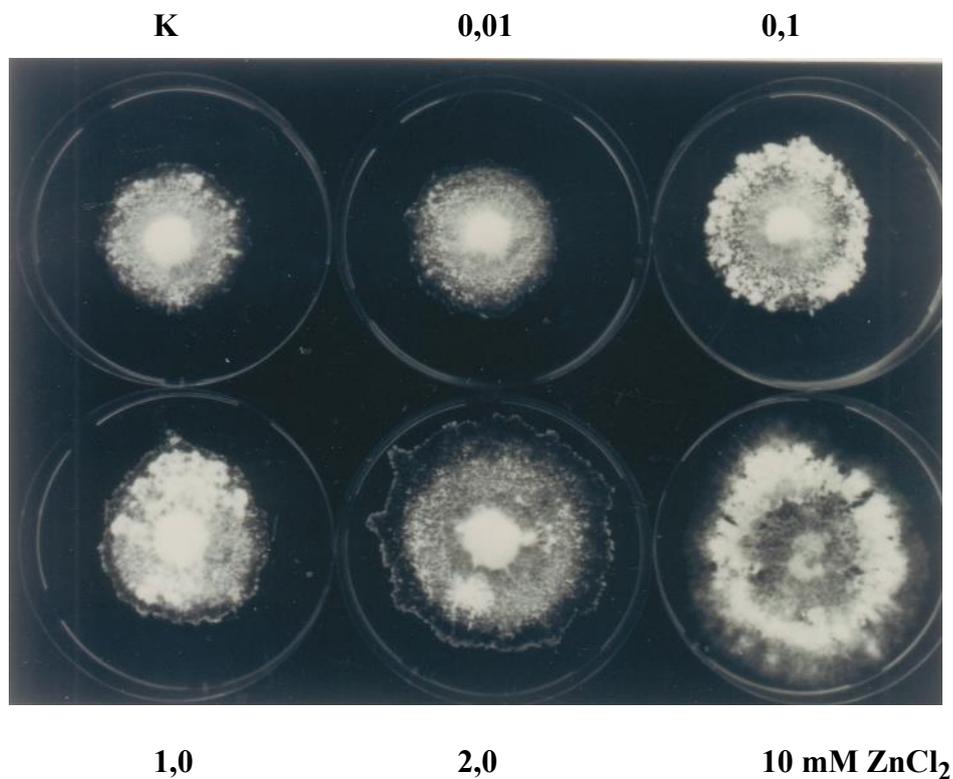
Zinksalze wirken auf die biotische Aktivität von Sirodesmin PL entgiftend (ROUXEL et al. 1990). Der Wirkungsmechanismus ist jedoch bislang noch unbekannt. Es könnte sein, dass das zweiwertige  $Zn^{2+}$  eine Reaktion mit dem Toxin an der Disulfidbrücke eingeht und dadurch das Toxin inaktiviert. Das aggressive *Phoma*-Isolat IIa 1 (A1) wurde im Dunkeln als Standkultur in Czapek-Dox-Flüssigkulturen mit steigenden Konzentrationen von Zinkchlorid inkubiert. Die Trockengewichte des Myzels und die Gehalte des Sirodesmin PL sind in der folgenden Tabelle auszugsweise dargestellt:

**Tab. 16** Einfluss von Zinkchlorid auf die Trockengewichte (TGW) des Myzels und den Gehalt von Sirodesmin PL je Liter Czapek-Dox-Flüssigkultur (FK) vom aggressiven *Phoma*-Isolat IIa 1 nach 10 tägiger Inkubationsdauer bei 18 °C (Durchschnittswerte von je fünf Wiederholungen).

	TGW Myzel g / l FK ± se	Sirodesmin PL mg / l FK ± se	Sirodesmin PL mg / g TGW Myzel
Kontrolle	4,07 ± 0,14	18,64 ± 2,04	4,58
0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>	4,30 ± 0,30	12,12 ± 3,52	2,82
1,0 mM ZnCl <sub>2</sub>	5,35 ± 0,14	7,35 ± 1,19	1,37

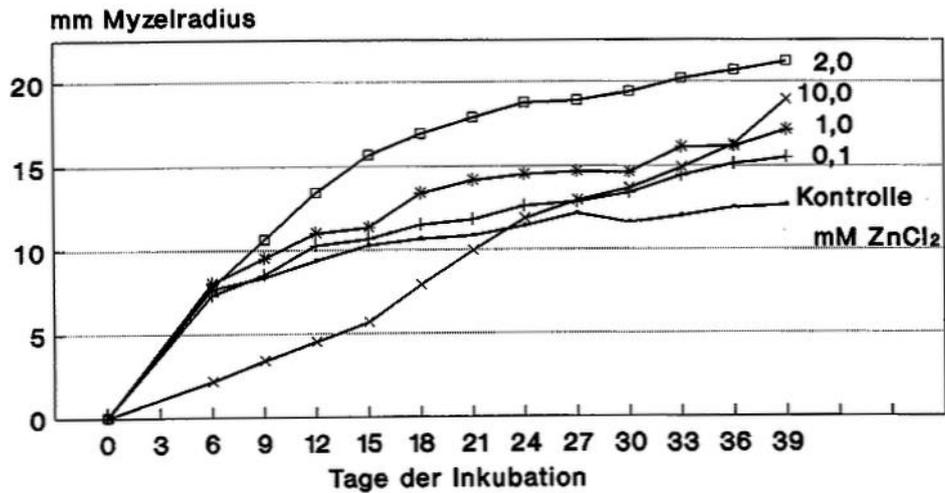
In der Tabelle 16 wird gezeigt, wie sich mit steigenden Zinkkonzentrationen die Trockengewichte des Myzels leicht erhöhten, während die Gehalte von Sirodesmin PL (und anderer Sirodesmine) deutlich abnahmen. Noch klarer werden diese Prozesse, wenn man einen Quotienten aus den Toxingehalten und dem Myzelgewicht bildet: Bei 1,0 mM  $ZnCl_2$  sank der Toxingehalt auf 30 % gegenüber der Kontrolle ab. Bei  $ZnCl_2$  Gehalten von über 2,0 mM war das Wachstum von *P. lingam* in den Flüssigkulturen aufgrund der toxischen Dosierung vollständig inhibiert.

Auch in Agarkulturen mit Czapek-Dox-Nährmedium wurde die Wirkung von  $ZnCl_2$  auf das Myzelwachstum und die Produktion von Sirodesmin PL untersucht. Dazu wurden ausgestanzte Myzelstücke auf Agar gesetzt, welche Dosierungen von 0 bis 10,0 mM  $ZnCl_2$  enthielten. Von den konzentrisch wachsenden Pilzkolonien wurden die Myzelradien in dreitägigen Abständen gemessen. In der Abbildung 40 wird der Einfluss von  $ZnCl_2$  auf die Myzelentwicklung in Petrischalen mit dem Isolat Ila 1 am 39. Tag nach der Inokulation gezeigt.



**Abb. 40** Entwicklung der Myzelradien des *Phoma*-Isolats Ila 1 bei steigenden Konzentrationen von Zinkchlorid auf Czapek-Dox-Agar am 39. Tag nach der Inokulation.

In den ersten sechs Tagen wuchs in allen Varianten bis 2 mM das Myzel mit fast gleicher Geschwindigkeit, während das Wachstum bei 10 mM aufgrund einer Zinktoxizität zunächst gehemmt war (Abb. 41). Bis zum 39. Tag nach der Inokulation differenzierte sich jedoch das Myzelwachstum in Abhängigkeit zur  $ZnCl_2$  Konzentration. Während in der Kontrolle ab dem 15. Tag die Entwicklung nahezu stagnierte, verbesserte sich das Myzelwachstum mit steigenden Zinkkonzentrationen. Sogar bei der höchsten Dosierungsstufe (10 mM  $ZnCl_2$ ), bei der anfangs die Pilzentwicklung gehemmt war, setzte ein Wachstum ein, welches sich mit zunehmender Inkubationsdauer verstärkte. Die geringere Empfindlichkeit gegenüber hohen Zinksalzkonzentrationen im Agar im Vergleich zu Flüssigkulturen könnte auf einen weniger engen Kontakt von Pilz und Nährmedium zurückgeführt werden.



**Abb. 41** Myzelradien des *Phoma*-Isolats IIa 1 auf Czapek-Dox-Agar mit 0, 0,1, 1, 2 und 10 mM Zinkchlorid (Mittelwerte von je sechs Wiederholungen, Daten siehe A16).

Die Toxingehalte in den verschiedenen Behandlungsstufen waren auch von der Dauer der Inkubation abhängig. So zeigten sich nach kurzer Inkubationszeit (9 Tage im Flüssigmedium, bzw. 15 Tage auf Agar bei 20 °C) die deutlichsten Unterschiede zwischen den Behandlungsstufen. Mit zunehmender Dauer schwächten sich diese besonders im Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 mM wieder ab. In der Tabelle 17 wurden die Myzelradien als Merkmal für die Pilzentwicklung und die Gehalte von Sirodesmin PL gemeinsam ausgewertet.

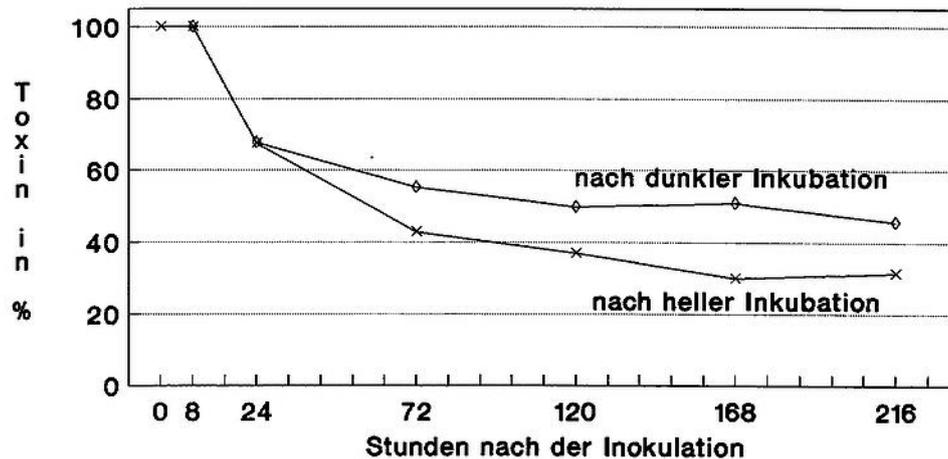
**Tab 17** Einfluss steigender ZnCl<sub>2</sub> Konzentrationen auf die Myzelradien und die Gehalte von Sirodesmin PL in Czapek-Dox-Agar mit 0,4 % Hefeextrakt durch das aggressive *Phoma*-Isolat IIa1 (Messungen am 15. Tag der Inkubation, Durchschnittswerte von je sechs Wiederholungen).

ZnCl <sub>2</sub> in mM	Myzelradius mm ± se	µg Sirodesmin PL (gepoolt von je 6 Agarplatten)
K	22,5 ± 0,44	86,24
0,1	22,0 ± 0,39	89,25
0,2	21,0 ± 0,85	32,04
0,5	22,0 ± 0,47	25,16
1,0	23,8 ± 0,21	17,20
2,0	26,7 ± 0,25	15,91

Bei 2,0 mM ZnCl<sub>2</sub> wurde auf Agar bis zum 15. Tag nach der Inokulation der größte Myzelradius gebildet, während umgekehrt dabei die Gehalte von Sirodesmin PL am niedrigsten waren. Im Agar wurden ab dem 9. Tag in der Kontrolle und bei niedrigen Zinkdosierungen bis 1,0 mM ZnCl<sub>2</sub> um und unterhalb der Myzeldecke dunkle Verfärbungen sichtbar. Möglicherweise sind die Verfärbungen auf Sirodesminausscheidungen zurückzuführen und tragen zur Hemmung des Myzelwachstums bei.

### 3.4.4 Abbau von Sirodesmin PL in toxinbehandelten Kotyledonen

Um bei späteren Extraktionen aus infiziertem Gewebe die Gehalte von Sirodesmin PL unter Berücksichtigung der Verluste während der Aufarbeitung bestimmen zu können, wurde zunächst die Wiederfindungsrate von Sirodesmin PL auf toxinbehandelten Kotyledonen ermittelt. Diese betrug bis zur Analyse in der HPLC etwa 60 %. Ausgehend davon wurde nun das Abbauverhalten von Sirodesmin PL bei hellen und unbelichteten Inkubationen untersucht (Abb. 42).

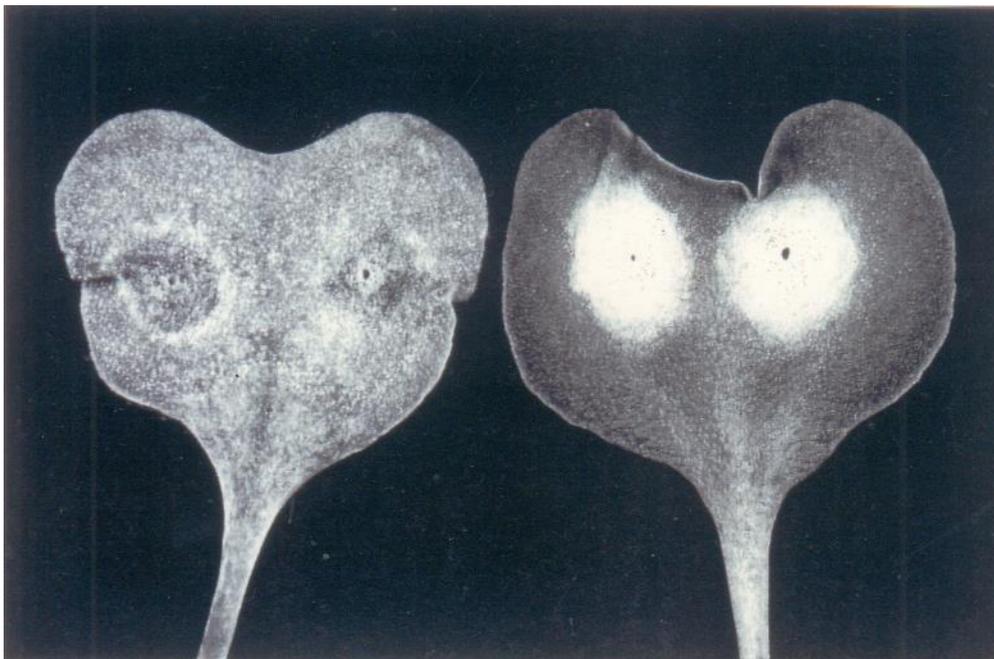


**Abb. 42** Abbauverhalten von Sirodesmin PL auf toxinbehandelten Kotyledonen der Sorte Jet Neuf in Abhängigkeit von der Zeit und der Belichtung

Die applizierten sirodesminhaltigen Tropfen trockneten auf den Kotyledonen innerhalb von acht Stunden langsam ein. Die nachgewiesene Toxinmenge war jedoch nach dieser Zeit gegenüber der unmittelbar nach Applikation erfolgten Analyse gleich. Nach einem Tag wurden in beiden Versuchsvarianten nur noch 68 % der aufgetragenen Toxinmenge wiedergefunden. Nach drei Tagen waren die Toxingehalte weiter abgesunken; sie betragen für die belichtete Inkubation 45 % und für die Inkubation in Dunkelheit 58%. Nach neun Tagen lagen die Werte bei 32 % bzw. 47 %. Die Abbaurate des Sirodesmin PL war relativ langsam und wurde durch die Belichtung nur geringfügig verstärkt.

### 3.4.5 Einfluss von Licht auf den Gehalt von Sirodesmin PL in infizierten Kotyledonen

In vielen Vorversuchen konnten zunächst nur mit seltenen Erfolgen aus infizierten Kotyledonen Sirodesmine extrahiert werden. Die Inkubations- und Extraktionsbedingungen wurden daher häufig variiert. Bei Experimenten mit schwacher Belichtung fiel auf, dass in der Spätphase der Inkubation auf den infizierten Kotyledonen keine chlorotischen Aufhellungen entstanden (Abb. 43). Die Pyknidienentwicklung und die Produktion von Sporenschleim wurden dagegen gefördert. In diesen Kotyledonen konnten höhere Gehalte von Sirodesmin PL festgestellt werden. Diese Beobachtungen ließen in Verbindung mit den in den *in vitro* Versuchen gewonnenen Ergebnissen (vgl. Tab. 14) die Vermutung entstehen, dass dem Faktor Licht eine wichtige Bedeutung bei der Unterdrückung der Sirodesminbildung zukommt.



**Abb. 43** Unterdrückung (links) der chlorotischen Aufhellung durch eine Inkubation in Dunkelheit ab dem 11. Tag nach der Inokulation auf der Rapssorte Jet Neuf. Die Pyknidienbildung und die Absonderung von Sporenschleim wurden in der Dunkelheit gefördert. Als Vergleich dazu ist rechts die gleiche Interaktion unter Belichtung bei 16 stündiger Photoperiode abgebildet (Abbildung vom 14. Tag nach der Inokulation).

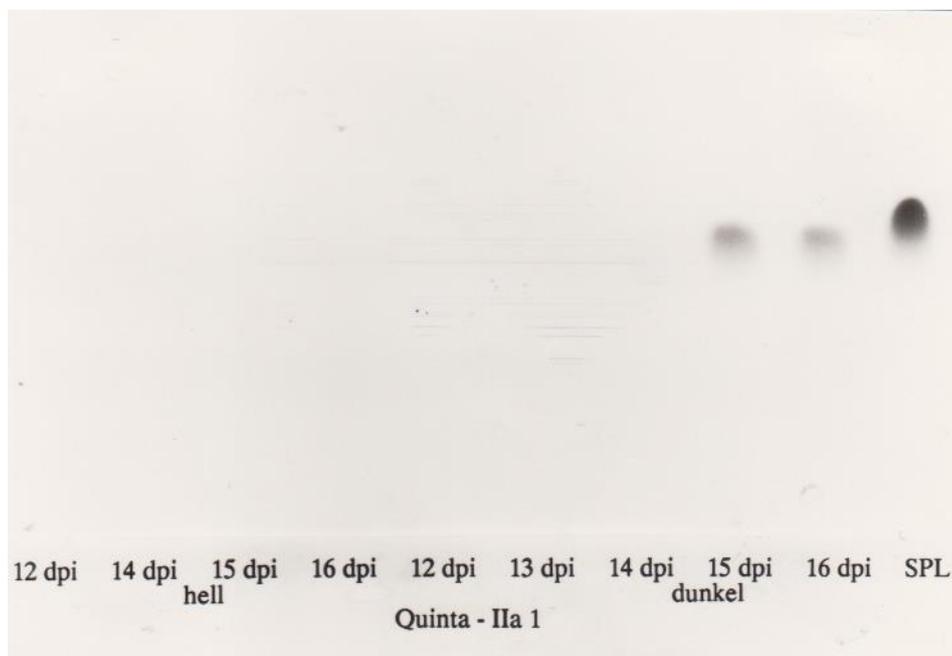
In einem ersten Versuch wurden die Kotyledonen der Sorten Quinta und Jet Neuf in jeweils kompatiblen Interaktionen mit Isolaten der Pathotypgruppen A1, A2 und A5 infiziert. Die Pflanzen wurden bis zum 11. Tag nach der Inokulation gemeinsam im Gewächshaus kultiviert. Danach wurden sie während der Phase der Läsionsbildung im 16 Std.-Tag bei  $100 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{sec}$  bzw. in Dunkelheit inkubiert. Am 16. Tag wurden aus den Kotyledonen Sirodesmine extrahiert und mit Hilfe der HPLC oder halbquantitativ durch DC analysiert. Dabei wurde nur Sirodesmin PL gefunden. Die mit der HPLC gewonnenen Daten wurden auf Frisch- (FGW) und Trockengewichtsbasis (TGW) berechnet und in Tabelle 18 dargestellt.



Licht. Noch deutlicher wurden die lichtbedingten Unterschiede, wenn die Sirodesmin PL-Gehalte auf die Trockengewichte des extrahierten Blattgewebes bezogen wurden. Hier reichte die Spannweite für die Toxingehalte der verdunkelten Behandlungsstufe von 530,0 µg bis 2 703,3 µg/g TGW. Im Durchschnitt lag dabei der Toxingehalt 118 mal höher als in der hell inkubierten Behandlungsstufe. In der Abbildung 44 wird deutlich, dass nur Sirodesmin PL als Epipolythiodioxopiperazin in den Interaktionen nachzuweisen war. Die Zugehörigkeit zu verschiedenen Pathotypgruppen spielte in den untersuchten Interaktionen keine entscheidende Rolle. Aus der Momentaufnahme vom 16. Tag nach der Inokulation wurde jedoch nicht deutlich, wann die Toxinbildung in der Pflanze einsetzte und ob nicht bereits maximale Konzentrationen überschritten worden waren.

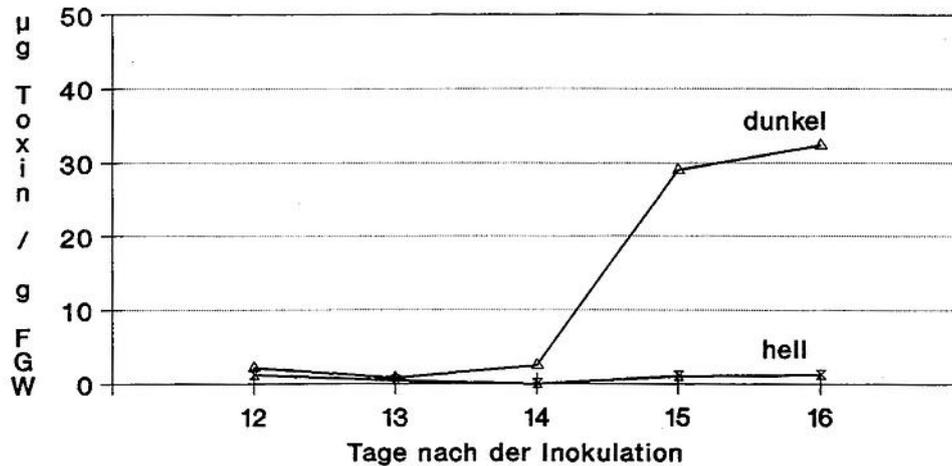
### 3.4.6 Zeitlicher Verlauf der Sirodesminbildung in infizierten Kotyledonen

In den folgenden Versuchen wurde der zeitliche Verlauf der Sirodesminbildung an ausgewählten kompatiblen Interaktionen untersucht. In Vorversuchen waren infizierte Pflanzen, die noch symptomlos waren, ab dem sechsten Tag nach der Inokulation auf Sirodesmingehalte untersucht worden. Unabhängig von Lichtintensität und -dauer sowie der Inkubationstemperatur waren während der nahezu symptomlosen biotrophen Entwicklungsphase bis zum Auftreten der ersten Läsionen keine Epipolythiodioxopiperazine dünnschichtchromatographisch festgestellt worden. Die infizierten Pflanzen wurden ab dem 11. Tag nach der Inokulation bei Belichtung (8 oder 16 Std.-Tag) oder in Dunkelheit inkubiert. Ab dem 12. Tag wurden täglich bzw. zweimal täglich je 3 g Frischgewicht Kotyledonen geerntet und bis zur Sirodesminanalyse aufgearbeitet. Als erste Interaktionspartner zur Produktion von Sirodesmin PL werden die Rapssorte Quinta und das Isolat Ila 1 dargestellt (Abb. 45 und Abb. 46).



**Abb. 45** Sirodesmin PL in infizierten Kotyledonen der kompatiblen Interaktion Quinta - Ila 1 . Die Kotyledonen wurden ab dem 11. Tag nach der Inokulation in Dunkelheit oder im 8 Std.-Tag ( $140 \mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{sec}$ ) bei einer relativen Luftfeuchte von fast 100 % und bei 15 °C inkubiert. (SPL = Sirodesmin als Vergleichssubstanz)

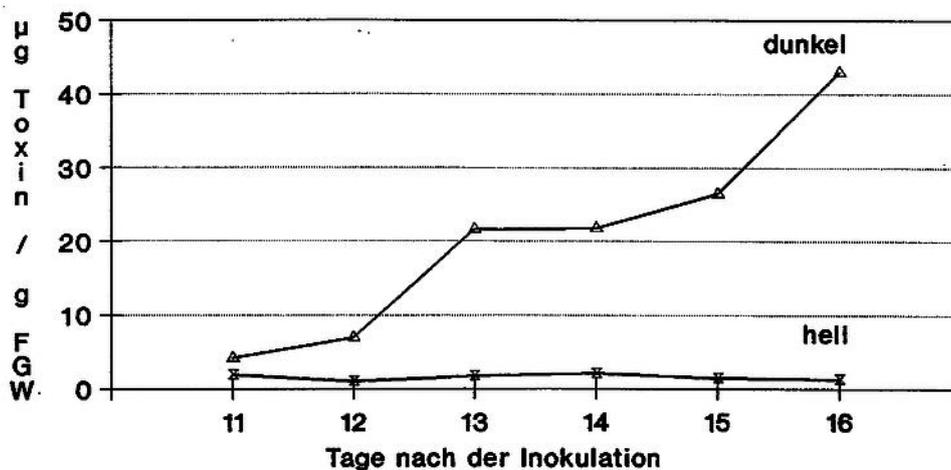
Unter dem Einfluss einer Belichtung wurde die Akkumulation von Sirodesminen in den Kotyledonen unterdrückt. In den ab dem elften Tag nach der Infektion dunkel inkubierten Kotyledonen waren dagegen mit zunehmender Dauer steigende Gehalte von Sirodesmin PL festzustellen. Weitere Epipolythiodioxopiperazine waren neben dem Sirodesmin PL nicht sicher nachzuweisen. Die Gehalte von Sirodesmin PL werden im zeitlichen Verlauf in der Abbildung 46 graphisch dargestellt.



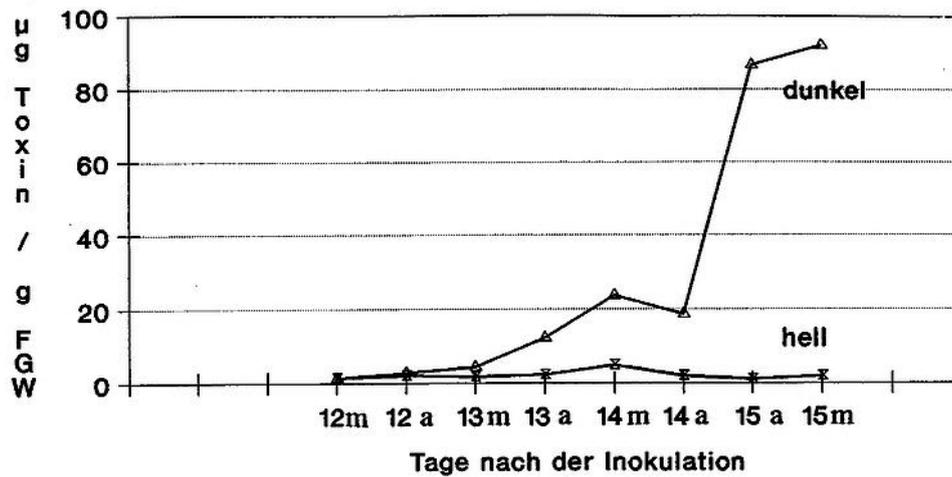
**Abb. 46** Einfluss einer Belichtung auf die Gehalte von Sirodesmin PL in infizierten Kotyledonen der kompatiblen Interaktion der Sorte Quinta mit dem *Phoma*-Isolat Ila 1. Die Kotyledonen wurden ab dem 11. Tag nach der Inokulation dunkel oder im 8 Std.-Tag ( $140 \mu\text{E} / \text{m}^2 * \text{sec}$ ) bei einer relativen Luftfeuchte von fast 100 % bei  $15^\circ\text{C}$  inkubiert.

Eine stetige Zunahme des Toxins während der Inkubation in Dunkelheit ist in der Grafik deutlich zu erkennen. Während einer Inkubation im 8 Std.-Tag wurde dagegen die Akkumulation von Sirodesmin PL unterdrückt.

Weitere kompatible Interaktionen, wie Jet Neuf - Ila und Jet Neuf - P 146 wurden untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 47 und 48 dargestellt.



**Abb. 47** Einfluss einer Belichtung auf die Gehalte von Sirodesmin PL in infizierten Kotyledonen der kompatiblen Interaktion der Rapssorte Jet Neuf mit dem *Phoma*-Isolat Ila 1. Die Kotyledonen wurden ab dem 11. Tag nach der Inokulation dunkel oder im 8 Std.-Tag ( $140 \mu\text{E} / \text{m}^2 * \text{sec}$ ) bei einer relativen Luftfeuchte von fast 100 % bei  $15^\circ\text{C}$  inkubiert.



**Abb. 48** Einfluss einer Belichtung auf die Gehalte von Sirodesmin PL in infizierten Kotyledonen der kompatiblen Interaktion von Jet Neuf mit dem *Phoma*-Isolat P 146. Die Kotyledonen wurden ab dem 11. Tag nach der Inokulation dunkel oder im 16 Std.-Tag ( $280 \mu\text{E} / \text{m}^2 * \text{sec}$ ) bei einer relativen Luftfeuchte von fast 100 % bei 20 °C inkubiert. Die Toxinbestimmungen wurden täglich morgens (m) und abends (a) durchgeführt.

Diese drei und weitere kompatible Interaktionen wurden mehrfach bei verschiedenen Inkubationstemperaturen, Belichtungsintensitäten und Belichtungszeiten untersucht und zeigten ähnliche Ergebnisse: Unter Lichteinfluss wurde eine Akkumulation des Sirodesmin PL gehemmt und das Toxin konnte nur in Spuren bzw. nicht nachgewiesen werden. In der Tabelle 19 wurden die bei 15 °C und bei  $140 \mu\text{E} / \text{m}^2 * \text{sec}$  im 8 Std.-Tag inkubierten Interaktionen (vgl. Abb. 46 und 47) zusammengestellt.

**Tab. 19** Einfluss einer Belichtung auf die Gehalte von Sirodesmin PL ( $\mu\text{g}$  Toxin pro g FGW) in infizierten Kotyledonen verschiedener kompatibler Interaktionen. Die Kotyledonen wurden ab dem 11. Tag nach der Inokulation dunkel oder im 8 Std.-Tag bei  $140 \mu\text{E} / \text{m}^2 * \text{sec}$  und einer relativen Luftfeuchte von fast 100 % bei 15 °C inkubiert. Die Extraktionen erfolgten fortlaufend am 12., 13., 14., 15. und 16. Tag nach der Inokulation.

Extraktion am Inkubation	12. Tag		13. Tag		14. Tag		15. Tag		16. Tag	
	hell	dunkel								
Jet Neuf - IIa 1	1,03	6,93	1,67	21,63	2,05	21,78	1,43	26,50	1,25	42,95
Jet Neuf - P 146	1,38	2,83	2,32	6,70	6,10	16,32	8,70	27,78	13,81	74,23
Quinta - IIa 1	1,18	2,10	0,43	0,70	-,--	2,53	1,02	29,00	1,20	32,33

Die genannten Interaktionen wurden mehrfach untersucht und zeigten ähnliche Ergebnisse, wie sie in der Tabelle 19 dargestellt wurden.

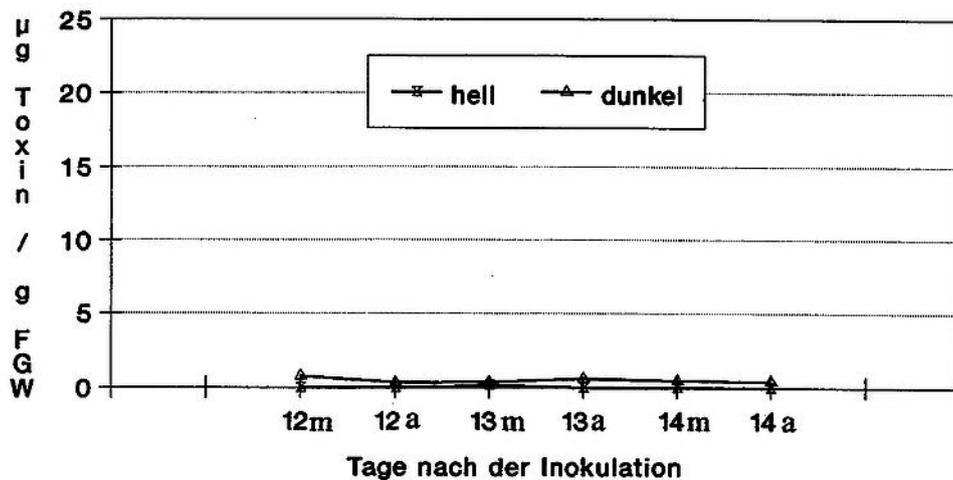
In der Tabelle 20 wurden die bei 20 °C und bei 280  $\mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{sec}$  im 16 Std.-Tag inkubierten Interaktionen (vgl. Abb. 48 für Jet Neuf - P 146) zusammengestellt. Die Extraktionen erfolgten zweimal täglich je morgens und abends.

**Tab. 20** Einfluss einer Belichtung auf die Gehalte von Sirodesmin PL ( $\mu\text{g}$  Toxin pro g FGW) in infizierten Kotyledonen verschiedener kompatibler Interaktionen. Die Kotyledonen wurden ab dem 11. Tag nach der Inokulation dunkel (d) oder im 16 Std.-Tag (h) bei 280  $\mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{sec}$  und einer relativen Luftfeuchte von fast 100 % bei 20 °C inkubiert. Die Extraktionen erfolgten zwei Mal täglich am 12., 13. und 14. Tag nach der Inokulation (dpi).

Extraktion am Inkubation	12. morgens		12. abends		13. morgens		13. abends		14. morgens		14. dpi abends	
	h	d	h	d	h	d	h	d	h	d	h	d
Jet Neuf - IIa 1	0,83	1,18	0,78	1,27	0,83	1,90	0	2,12	0,48	11,12	0,83	6,50
Jet Neuf - P 146	1,37	1,30	2,03	2,78	1,62	4,28	2,27	12,13	4,78	23,72	1,92	18,50
Quinta - IIa 1	0,77	1,13	0,53	4,30	1,55	2,15	2,87	3,00	0,95	6,63	0,23	11,42

Das Isolat P 146 zeichnete sich schon unter *in vitro* Bedingungen durch ein besonderes üppiges Pyknidienbildungsvermögen aus und schied hohe Toxingehalte in die Flüssigkulturen ab. Auch *in vivo* produzierte es in Jet Neuf meistens die höchsten Toxingehalte. Bei einer geringeren Lichtintensität (140  $\mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{sec}$ ) im 8 Std.-Tag wurden in dieser Interaktion deutlich höhere Sirodesmingehalte nachgewiesen als in anderen Interaktionen. Diese Mengen betrug jedoch nur etwa 19 % im Vergleich zur dunkel inkubierten Behandlung am 16. Tag nach der Inokulation (Tab. 19).

Die inkompatiblen Interaktionen Quinta - MIX 7 (A2) und Quinta - P 146 (A2) wurden wiederholt auf die Bildung von Sirodesmin PL untersucht. Dabei konnten keine oder nur so geringe Toxingehalte festgestellt werden, die an der Nachweisgrenze lagen. Auch nach einer verlängerten Inkubationsdauer konnten weder bei Licht noch bei Dunkelheit Sirodesmine nachgewiesen werden. Als Beispiel ist in der folgenden Abbildung die inkompatible Wirt-Parasit-Beziehung Quinta - P 146 (A2) dargestellt.



**Abb. 49** Einfluss einer Belichtung auf die Gehalte von Sirodesmin PL in infizierten Kotyledonen der inkompatiblen Interaktion von Quinta mit dem *Phoma*-Isolat P 146. Die Kotyledonen wurden ab dem 11. Tag nach der Inokulation dunkel oder im 16 Std.-Tag (280  $\mu\text{E} / \text{m}^2 \cdot \text{sec}$ ) bei einer relativen Luftfeuchte von fast 100 % bei 20 °C inkubiert. Die Toxinbestimmungen wurden täglich morgens (m) und abends (a) durchgeführt.

In der Interaktion Quinta - P 146 entwickelten sich schon wenige Tage nach der Inokulation nekrotische Läsionen. Diese erreichten bis zum 16. Tag eine Flächenausdehnung, die mit den Läsionen der kompatiblen Interaktionen am 12. oder 13. Tag vergleichbar war. Die Nekrosen waren jedoch deutlich dunkler und vom gesunden Gewebe scharf abgegrenzt. Eine Pyknidienbildung konnte auch am 21. Tag nach der Inokulation nicht beobachtet werden. Das aggressive Isolat P 146 erwies sich bisher *in vitro* und in kompatiblen Interaktionen als ein guter Sirodesminbildner. In einer inkompatiblen Beziehung wurden jedoch keine nachweisbaren Toxine gebildet.

### 3.4.7 Sirodesmin PL in infizierten Hypokotylen und Sprosssteilen vom Freiland

Die wichtigsten Schadwirkungen werden von *P. lingam* an den Hypokotylen von empfindlichen *Brassica*-Arten verursacht. Die Schädigungen der Kotyledonen und der Laubblätter durch *phomabedingte* Nekrosen und dem damit verursachten Verlust an Assimilationsfläche sind eher als unbedeutend einzustufen. In den folgenden Experimenten sollte daher den Hypokotylen von Rapssorten Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Im Juni 1993 wurden im Freiland stark geschädigte *phomainfizierte* Hypokotyle und Rapsstängel der Rapssorten Cobra und Jet Neuf gesammelt. Cobra wurde 1993 vom Bundessortenamt bei der Anfälligkeit für *Phoma* mit der Note 7 als relativ empfindlich eingestuft. Die Sorte Jet Neuf, die 1993 beim Bundessortenamt nicht mehr eingetragen war, wurde 1987 in der beschreibenden Sortenliste mit der Note 2 als relativ resistent beschrieben. Während der Aufarbeitung des infizierten Materials wurde streng darauf geachtet, dass bei beiden Rapssorten gleich schwer geschädigte Pflanzenteile für die Extraktion verwendet wurden. Dennoch zeigten sich in den Analyseergebnissen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten im Gehalt von Sirodesmin PL.

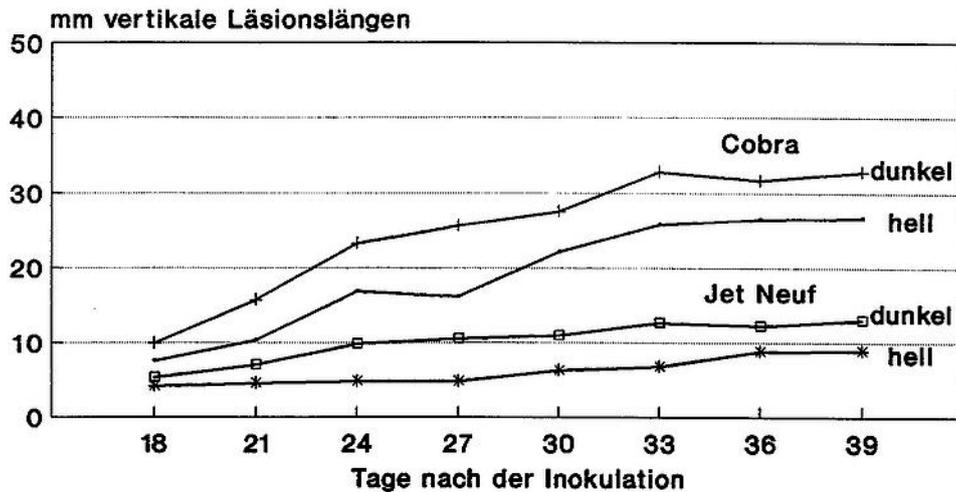
**Tab. 21** Sirodesmin PL ( $\mu\text{g} / \text{g}$  FGW) aus infizierten Hypokotyl- und Sprossläsionen vom Freiland (Juni 93). Die Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede nach dem Tukey Test ( $P = 0,95$ ) die Durchschnittswerte für sieben (Hypokotyl) bzw. drei (Spross) Wiederholungen an.

Ort der Läsion	Sorte	$\mu\text{g} / \text{g}$ FGW $\pm$ se
Hypokotyl	Cobra	30,28 $\pm$ 2,88 a
	Jet Neuf	8,50 $\pm$ 0,79 b
Spross	Cobra	2,54 $\pm$ 0,08 a
	Jet Neuf	1,72 $\pm$ 0,13 b

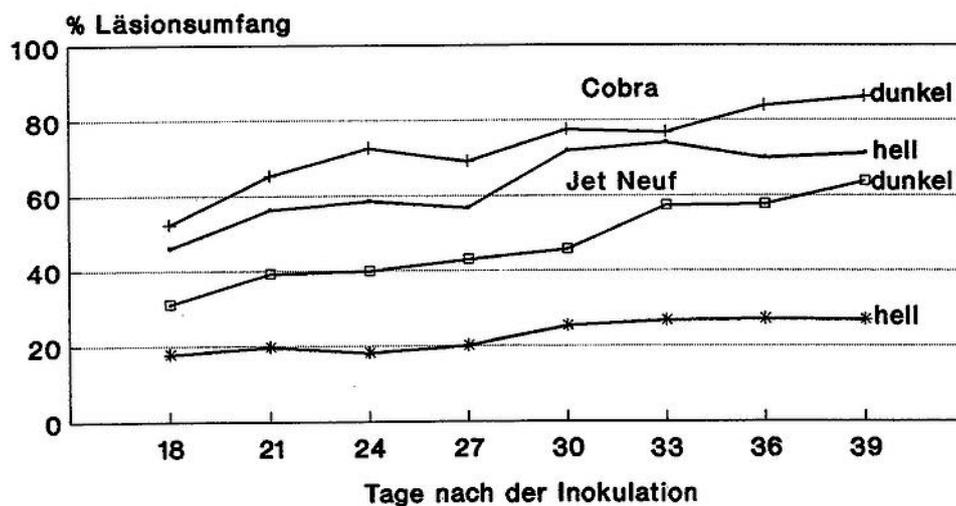
Die Gehalte von Sirodesmin PL waren in den Läsionen der infizierten Hypokotyle von Cobra mehr als dreimal so hoch wie in der resistenteren Sorte Jet Neuf. Ein signifikanter Unterschied war, wenn auch auf niedrigerem Niveau, in den Stängelläsionen der beiden untersuchten Sorten festzustellen. Hier waren die Gehalte von Sirodesmin PL in der Sorte Cobra um das 1,5 fache höher als in Jet Neuf. Mit diesen Ergebnissen konnte erstmals Sirodesmin PL in infiziertem Pflanzenmaterial vom Freiland festgestellt werden. Ferner zeigte sich eine Korrelation von den Gehalten an Sirodesmin PL zur unterschiedlichen Anfälligkeit der beiden Sorten.

### 3.4.8 Einfluss einer Belichtung auf die Läsionsentwicklung und den Gehalt von Sirodesmin PL in künstlich infizierten Hypokotylen

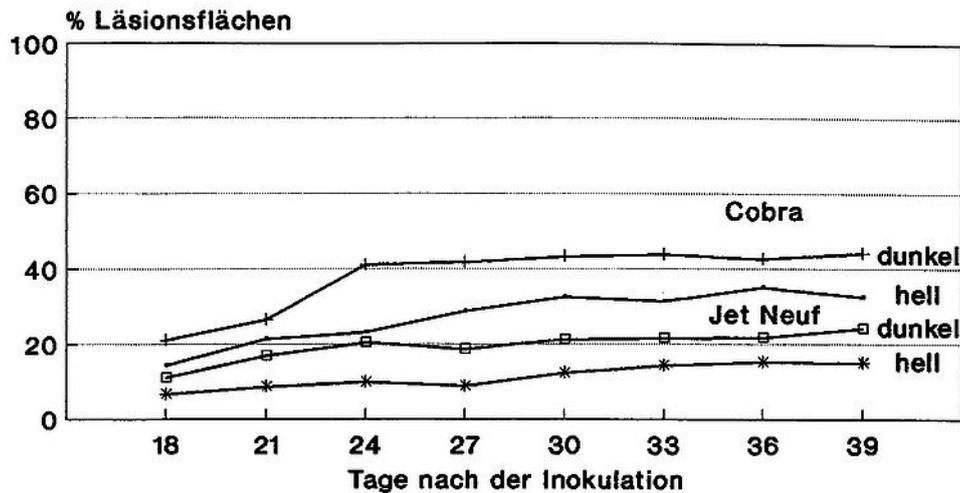
Die Rapssorten Cobra und Jet Neuf wurden bezüglich der Läsionsentwicklung und der Sirodesmingehalte am bzw. im Hypokotyl untersucht. Sie wurden dazu im Dreiblattstadium am Hypokotyl mit dem Isolat Ila 1 künstlich infiziert und dort zum Teil abgedunkelt. Während der Inkubationszeit wurden regelmäßig Messungen und Bonituren an den entstehenden Läsionen der Hypokotyle durchgeführt. Die Abbildungen 50 bis 52 zeigen die Entwicklung der drei untersuchten Parameter "vertikale Läsionslänge", "Läsionsumfang" und "Läsionsfläche am Hypokotyl" unter dem Einfluss von Beschattungen vom 18. bis zum 39. Tag nach der Inokulation.



**Abb. 50** Entwicklung der vertikalen Läsionslängen (mm) auf Hypokotylen der Sorten Cobra und Jet Neuf in der Interaktion mit dem Isolat Ila 1. Die Hypokotyle wurden bei Belichtung im 16 Std.-Tag und bei Beschattung inkubiert. Die Messungen wurden vom 18. bis zum 39. Tag nach der Inokulation durchgeführt (Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen, Daten siehe A17).



**Abb. 51** Entwicklung der Läsionsumfänge (%) auf Hypokotylen der Sorten Cobra und Jet Neuf in der Interaktion mit dem Isolat Ila 1. Die Hypokotyle wurden bei Belichtung im 16 Std.-Tag und bei Beschattung inkubiert. Die Bonituren wurden vom 18. bis zum 39. Tag nach der Inokulation durchgeführt (Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen, Daten siehe A18).



**Abb. 52** Entwicklung der Läsionsflächen (%) auf Hypokotylen der Sorten Cobra und Jet Neuf in der Interaktion mit dem Isolat Iia 1. Die Hypokotyle wurden bei Belichtung im 16 Std.-Tag oder bei Beschattung inkubiert. Die Bonituren wurden vom 18. bis zum 39. Tag nach der Inokulation durchgeführt (Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen, Daten siehe A19).

In den kompatiblen Interaktionen des *Phoma*-Isolats Iia 1 mit den Sorten Cobra und Jet Neuf zeigten sich bei der Läsionsentwicklung deutliche Sortenunterschiede. Auch die unterschiedliche Belichtung der Hypokotyle bewirkte signifikante Differenzen. Diese Differenzen waren bei allen untersuchten Merkmalen (Abbildungen 50 - 52) deutlich ausgeprägt.

So entwickelten sich an unbeschatteten Hypokotylen der Sorte Jet Neuf nur kleine Nekrosen, deren Länge, Umfang und Fläche begrenzt blieb. Das Wachstum und die Entwicklung dieser Rapssorte wurde vom Pilz während der Beobachtungszeit nicht beeinträchtigt. Das beschattete Hypokotyl von Jet Neuf erwies sich dagegen als empfindlicher. So konnten bei den drei untersuchten Parametern "vertikale Läsionslänge", "Läsionsumfang" und "Läsionsfläche am Hypokotyl" zu fast allen Mess- und Boniturterminen signifikant höhere Werte ermittelt werden. Aber auch die Pyknidienentwicklung an den beschatteten Organen wurde begünstigt (Tab. 22). Bei einigen Pflanzen wurden die beschatteten Hypokotyle vollständig abgeschnürt (Läsionsumfang = 100 %) und die Zerstörung der Leitungsbahnen führte zum Absterben dieser Pflanzen.

**Tab. 22** Anteil von Hypokotylen mit Pyknidien (in %) der Rapssorten Jet Neuf und Cobra in der Interaktion mit dem *Phoma*-Isolat Ila 1. Die Hypokotyle wurden nach der Inokulation bei Belichtung im 16 Std.-Tag oder bei Beschattung inkubiert (je 16 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation	Kontrollen hell und dunkel	Jet Neuf hell	Jet Neuf dunkel	Cobra hell	Cobra dunkel
18	0	8,33	12,50	8,33	16,60
21	0	0	15,00	10,00	15,00
24	0	12,50	31,25	81,25	87,50
27	0	10,00	50,00	50,00	83,33
30	0	22,22	55,55	66,66	100,00
33	0	33,33	55,55	88,88	100,00
36	0	40,00	75,00	80,00	100,00
39	0	50,00	75,00	100,00	100,00

Die Rapssorte Cobra erwies sich in den Versuchen gegenüber dem *Phoma*-Isolat Ila 1 generell als empfindlicher. So waren bei den unbeschatteten Hypokotylen von Cobra in allen Merkmalen signifikante Unterschiede (Tukey Test,  $P = 0,95$ ) gegenüber der gleich behandelten Sorte Jet Neuf festzustellen. Eine Abdunklung der Hypokotyle bewirkte eine erhöhte Anfälligkeit, welche für alle untersuchten Merkmale festgestellt werden konnte. Ebenso wurde die Pyknidienbildung positiv beeinflusst (Tab. 22). Vereinzelt begannen schon ab dem 18. Tag nach der Inokulation Pflanzen mit abgedunkelten Hypokotylen abzusterben. Am 36. und 39. Tag waren die meisten Pflanzen dieser Behandlungsstufe so stark geschädigt, dass sie nur noch wenige Tage überlebt hätten.

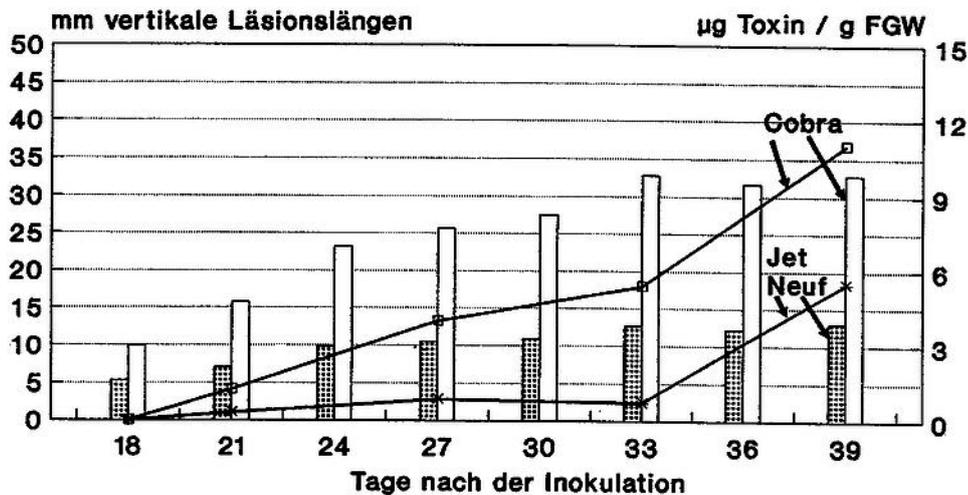
Die Messungen und Bonituren der Läsionsentwicklung wurden von Analysen auf den Gehalt von Sirodesmin PL begleitet. Dazu wurden 18, 21, 24, 27, 33 und 39 Tage nach der Inokulation in je vierfacher Wiederholung pro Behandlungsstufe 1,5 g Läsionsgewebe der Hypokotyle aufgearbeitet und die Sirodesmin PL Gehalte in der HPLC gemessen. Nichtinfizierte Hypokotyle von Cobra und Jet Neuf wurden als Kontrollen geführt (Tab.23).

**Tab. 23** Sirodesmin PL ( $\mu\text{g} / \text{g}$  FGW) nach Inokulation mit dem Isolat Ila 1 in Hypokotylen der Sorten Cobra und Jet Neuf. Die Hypokotyle wurden nach der Inokulation bei Belichtung im 16 Std.-Tag oder bei Beschattung inkubiert (Durchschnittswerte von je 4 Wiederholungen).

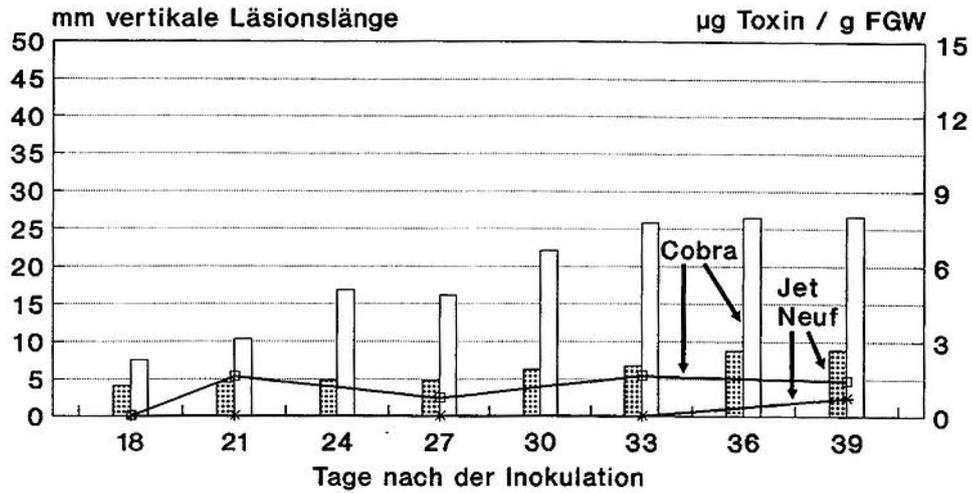
Tage nach der Inokulation	Kontrollen hell und dunkel $\bar{x} \pm \text{se}$	Jet Neuf hell $\bar{x} \pm \text{se}$	Jet Neuf dunkel $\bar{x} \pm \text{se}$	Cobra hell $\bar{x} \pm \text{se}$	Cobra dunkel $\bar{x} \pm \text{se}$
18	0	0	0	0	0
21	0	0	$0,32 \pm 0,32$	$1,58 \pm 1,56$	$1,22 \pm 1,19$
27	n.d.	0	$0,84 \pm 0,84$	$0,71 \pm 0,71$	$3,97 \pm 1,09$
33	0	0	$0,72 \pm 0,72$	$1,62 \pm 0,78$	$5,38 \pm 1,73$
39	0	$0,72 \pm 0,30$	$5,48 \pm 2,49$	$1,42 \pm 0,18$	$11,00 \pm 3,70$

In den Kontrollen der beiden Sorten wurde dünnschichtchromatographisch und nach HPLC Analysen kein Sirodesmin PL festgestellt. Damit wurde sichergestellt, dass Sirodesmine nur nach einer Infektion mit *P. lingam* im Hypokotylgewebe auftreten. In den infizierten belichteten Hypokotylen der Sorte Jet Neuf wurden nur am 39. Tag nach der Inokulation niedrige Gehalte von Sirodesmin PL festgestellt. In den beschatteten Hypokotylen dieser Sorte dagegen wurde bereits am 21. Tag geringe Mengen von Sirodesmin PL gefunden. Diese blieben jedoch auf einem niedrigen Niveau und erreichten am 39. Tag mit 5,48 µg / g FGW Hypokotylgewebe ihr Maximum. In den unbeschatteten Hypokotylen der Sorte Cobra wurden ab dem 21. Tag nach der Inokulation niedrige Sirodesmin PL Gehalte gefunden. Die Gehalte stiegen während der gesamten Inkubationszeit jedoch nicht weiter an. In den beschatteten Hypokotylen von Cobra wurden im Vergleich zu allen anderen Behandlungen die höchsten Toxingehalte gefunden. Die Toxingehalte stiegen während der Inkubation an und erreichten am 39. Tag nach der Inokulation mit 11,0 µg Sirodesmin PL / g FGW Hypokotylgewebe die höchsten Werte.

Wie schon bei den Inokulationsversuchen an den Kotyledonen waren höhere Toxingehalte im Pflanzengewebe erst zu einem sehr späten Termin im abgedunkelten Pflanzengewebe festzustellen, nachdem sich bereits größere Läsionen entwickelt hatten. Diese Beobachtungen wurden in weiteren Versuchen bestätigt (Abb. 53 und 54).



**Abb. 53** Läsionsentwicklung und Bildung von Sirodesmin PL durch das aggressive *Phoma*-Isolat IIa 1 in den kompatiblen Interaktionen mit den Rapssorten Jet Neuf und Cobra auf beschatteten Hypokotylen. Gemessen wurden die vertikalen Läsionslängen (mm) und die Bildung von Sirodesmin PL (µg / g FGW) vom 18. bis zum 39. Tag nach der Inokulation (Durchschnittswerte für die Läsionslängen von 16 Wiederholungen, für die Sirodesmin PL Bildung von 4 Wiederholungen, Daten siehe A20).



**Abb. 54** Läsionsentwicklung und Bildung von Sirodesmin PL durch das aggressive *Phoma*-Isolat IIa 1 in den kompatiblen Interaktionen mit den Rapssorten Jet Neuf und Cobra auf unbeschatteten Hypokotylen. Die Hypokotyle waren dem Tageslicht und der Zusatzbeleuchtung im Gewächshaus ausgesetzt. Gemessen wurden die vertikalen Läsionslängen (mm) und die Bildung von Sirodesmin PL ( $\mu\text{g} / \text{g FGW}$ ) vom 18. bis zum 39. Tag nach der Inokulation (Durchschnittswerte für die Läsionslängen von 16 Wiederholungen, für die Sirodesmin PL Bildung von 4 Wiederholungen, Daten siehe A21).

Auf den verdunkelten Hypokotylen ging die Läsionsentwicklung der Toxinakkumulation zeitlich weit voraus. Erst gegen Ende der Inkubationszeit stiegen die Gehalte von Sirodesmin PL auf höhere Werte an. In den unbeschatteten Hypokotylen konnten trotz einer gleichmäßigen Läsionsentwicklung, die allerdings deutlich langsamer als in den beschatteten Pflanzen verlief, keine kontinuierlichen Anreicherungen von Sirodesmin PL festgestellt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Säulenchromatographie an Kieselgel zur präparativen Isolation von Sirodesmin PL

Phytotoxische Sirodesmine lassen sich dünn-schichtchromatographisch sehr gut voneinander trennen (BADAWY & HOPPE 1989 b). Leider sind bei diesem Verfahren nur sehr geringe Toxinmengen zu gewinnen, die außerdem auf der DC Platte unter Lichteinfluss degradieren können. Daher musste eine präparative Chromatographiemethode entwickelt werden, die diese beiden Nachteile ausschließt.

Die Säulenchromatographie (SC) mit Kieselgelen beruht auf unterschiedlich starken Bindungskräften (Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und VAN DER WAALSche Kräfte) zwischen den zu trennenden Molekülen und einem mehr oder weniger polaren Trägermaterial (Adsorbens). Die Moleküle sind, nachdem sie im gelösten Zustand in die Trägerschicht eingedrungen sind, zu einem bestimmten Teil reversibel an das Adsorbens (Adsorptionschromatographie) gebunden (SCHOPFER 1986). Je nach der Polarität der Elutionsmittel und dem Grad der Hydrophilie des Trägermaterials lässt sich die Adsorption von Sirodesminen am Kieselgel beeinflussen. Beim Kieselgel S empfiehlt sich zur Chromatographie von Sirodesmin PL als Elutionsmittel 100 % Trichlormethan, bei den beiden unterschiedlich fein gekörnten Kieselgelen 60 (15 - 40 µm und 63 - 200 µm Korngröße) sind als Elutionsgemisch 90 % Trichlormethan und 10 % Ethylacetat optimal. Für eine präparative Isolierung von 100 mg Sirodesmin PL in aktiviertem Kieselgel genügte 250 ml der oben genannten Elutionsmittel.

Bei den gewöhnlichen nichtaktivierten Adsorbentien ist die Oberfläche mit Wasser belegt. Das heißt, die Adsorptionsstellen werden von sehr polaren und über Wasserstoffbrücken gebundenen Wassermolekülen eingenommen (GRITTER et al. 1987). Um eine optimale Chromatographie des Sirodesmin PL zu erreichen, mussten die Kieselgele durch Erhitzen bei ca. 105 °C aktiviert werden. Die Breite der Bandenbildung konnte dadurch verringert werden, während dabei die Aktivitätsstufe des Kieselgels standardisiert wurde.

Auch regenerierte Säulen wurden wiederverwendet. Jedoch war dabei die Ausbeute an reinem Sirodesmin PL geringer. Das Kieselgel in diesen Säulen konnte nicht aktiviert werden und die nachfolgenden, polarerer Verbindungen waren stets durchmischt.

Bei der Schwerkraftchromatographie an feinem Kieselgel 60 (Korngröße 15 - 40 µm) betrug die Dauer der Isolation von Sirodesmin PL ca. 12 Stunden. Mit dem Einsatz der Flash Chromatographie (STILL et al. 1978, PRICE et al. 1987, PETERKA & FENWICK 1988 und PEDRAS et al. 1990) konnte die Dauer einer Chromatographie auf eine halbe Stunde reduziert werden. Auf einen Fraktionssammler konnte verzichtet werden und die Fraktionen wurden manuell aufgefangen. Die Trennungsleistung war bezüglich des Sirodesmin PL sehr gut. Die Flash Chromatographie ist eine einfache und überzeugende Methode zur Isolierung dieses Toxins an feineren Kieselgelen.

Unbefriedigend blieb jedoch bei allen Versuchen die Isolation der Sirodesmine J und K, Deacetylsirodesmin PL, J und K. Deacetylsirodesmin PL konnte nur in einem Ausnahmefall (vgl. Abb. 19) in reiner Form isoliert werden. Diese und andere Sirodesmine lösten sich in reinem

Chloroform oder Ethylacetat in den gemischten Fraktionen nicht so gut wie Sirodesmin PL. Nach FÉRÉZOU et al. (1977) löst sich Deacetylsirodesmin PL sehr gut in Pyridin. Schon ein Anteil von 1 Promille in Chloroform oder Ethylacetat bewirkten bei diesen Sirodesminen eine Löslichkeit von 100 %. Die Verwendung von 1 Promille Pyridin im Elutionsgemisch (90 % Trichlormethan, ca. 10 % Ethylacetat) an Kieselgel 60 (Korngröße 15 - 40 µm) verbesserte jedoch nicht die Trennleistung der SC (Ergebnisse nicht gezeigt).

Nach MOTL & NOVOTNY (1979) sind die Porenstruktur, die Größe und Form der Kieselgelpartikel die Basisfaktoren für die Eigenschaften eines Chromatographiesystems. Auf den Partikeln einfacher Kieselgele existieren kleine Oberflächenporen und tiefere Poren in das Partikelinnere. Die relativ langsame Diffusion in und aus diesen Poren verursacht breite Zonen der zu adsorbierenden Substanz. Dieser unerwünschte Effekt wird durch die unregelmäßige Form und Größe der Partikel verstärkt.

Seit einigen Jahren gibt es neue Adsorbentien für die Schwerkraftchromatographie, die diese Nachteile ausschließen. Die Partikel bestehen aus einem nichtporösen Nucleus (ca. 30 µm, meistens aus Glas) und sind mit einer porösen Lage des Adsorbenten (Kieselgel oder Aluminium) bedeckt. Die Chromatographieeigenschaften konnten mit diesen neuen Trägermaterialien deutlich verbessert werden, jedoch auf Kosten der Kapazität (MOTL & NOVOTNY 1979).

Bei der HPLC (Hochdruck - Flüssigkeitschromatographie) wird mit sehr kleinen sphärischen Partikeln (5- 10 µm) als Adsorbentien gearbeitet. Diese sehr homogenen Partikel sind porös und ermöglichen exzellente Chromatographieergebnisse. Allerdings kann nur unter hohem Druck (bis zu 400 bar) mit einem relativ teuren präparativen System gearbeitet werden.

Die SC in einer Glassäule an Kieselgel 60 (63 - 200 µm Korngröße) und Kieselgel S (32 - 63 µm Korngröße) ist das technisch einfachste und billigste Verfahren mit einer hohen Kapazität zur Gewinnung von reinem Sirodesmin PL. Bei noch feineren Kieselgelen empfiehlt sich die Anwendung in Verbindung mit der Flash Chromatographie. Jedoch werden dabei keine wesentlichen Verbesserungen der Trennungseigenschaften erreicht.

#### **4.2 Mögliche Wirkung von Sirodesmin PL in Pflanzen**

Ein Einfluss der Umgebungsfaktoren auf die Wirkung des wirtsunspezifischen Sirodesmin PL konnte festgestellt werden. Eine Temperaturerhöhung unterhalb des physiologischen Optimums beschleunigt die Stoffwechselfvorgänge in der Pflanze. In den Experimenten wurde damit auch Geschwindigkeit der Symptomentwicklung erhöht. Darüber hinaus wurde auch die Symptomausprägung verstärkt.

Interessant war der Effekt des Lichtes auf die Symptomausprägung. Während bei einer dunklen Inkubation die Chlorotisierung unterdrückt wurde, kam bei einer Photoperiode von 16 Stunden bei 140 µE / m<sup>2</sup> \* sec die Entwicklung der Chlorosen durch das Toxin bei 0,5 und 1,5 µg je Verletzungsstelle mit einer vollständigen Chlorotisierung zum Abschluss. Diese Beobachtungen lassen einen Zusammenhang der Toxinwirkung mit lichtabhängigen Enzymen vermuten. Wenn diese Enzyme unter Lichteinfluss durch ein Toxin in ihrer Aktivität gehemmt werden, kann es zu

einer Anreicherung der für sie notwendigen Substrate oder Mangel der Produkte kommen, die für den weiteren pflanzlichen Stoffwechsel schädlich wirken.

Ein solches Enzym ist die Superoxiddismutase (SOD), welche toxische Sauerstoffradikale ( $O_2^-$ ) zu Wasserstoffsuperoxid metabolisiert (BRIDGES & SALIN 1981). Die drei bekannten Typen der SOD werden nach ihren Metall-Cofaktoren klassifiziert: die kupfer-/zinkhaltige Form (Cu/Zn SOD), die manganhaltige (MnSOD) und die eisenhaltige (FeSOD) Form. Die Cu/Zn SOD unterscheidet sich strukturell von den beiden einander ähnlichen MnSOD und FeSOD. Die Cu/Zn SOD ist in höheren Pflanzen mit Ausnahme einiger Seerosenarten (BRIDGES & SALIN 1981) und eukaryotischer Algen verbreitet (BOWLER et al. 1992). Eine besonders wichtige Funktion nimmt die SOD bei der Photosynthese ein. Im Photosystem I werden als Beiprodukte  $O_2^-$  Radikale produziert und müssen von der SOD entgiftet werden (ELSTNER 1979, MARSCHNER 1986).

Toxine und Xenobiotika könnten auf verschiedene Art und Weise auf die Regulation der Konzentration der Sauerstoffradikale einwirken. Einige Herbizide, wie z.B. Paraquat, Diquat und andere Dipyridylumverbindungen verändern den Elektronentransport im Photosystem I und verstärken die Synthese von  $O_2^-$ . Dabei wird Paraquat zunächst vom Photosystem I reduziert (MÜLLER 1986, BOWLER et al. 1992). Bei der sich anschließenden Reoxidation wird jeweils ein Elektron auf Sauerstoffmoleküle ( $O_2$ ) übertragen. Die Konzentration der toxischen Sauerstoffradikale kann dann um mehr als das 20 fache steigen (KUNERT & DODGE 1989). In paraquatsensitiven Pflanzen können diese erhöhten Konzentrationen durch die SOD nicht mehr ausreichend metabolisiert werden und die Sauerstoffradikale beginnen Membranlipide und andere Zellbestandteile anzugreifen (YOUNGMAN & ELSTNER 1988). In der Dunkelheit dagegen wird die Wirkung dieser Herbizide stark verlangsamt und verringert (FEDTKE 1982). Auch Luftverunreinigungen wie z.B. Ozon und  $SO_2$  bewirken eine erhöhte  $O_2^-$  Konzentration im Pflanzengewebe und führen zu massiven Schäden (ELSTNER 1989)

Eine Hemmung der Cu/Zn SOD durch Luftverunreinigungen, Xenobiotika und Toxine ist möglich. So könnte auch Sirodesmin PL die Cu/Zn SOD hemmen (ROUXEL et al. 1990). Bei Licht käme es zu einer erhöhten Konzentration zerstörerischer Sauerstoffradikale, die für die Läsionsentwicklung und den Chlorophyllabbau verantwortlich sind.

Sirodesmin PL wurde nach einer längeren Inkubation in Dunkelheit nur sehr langsam metabolisiert, während die Symptomentwicklung schwach ausgeprägt war. Bei einer sich später anschließenden Belichtungsphase zeigte das Toxin eine fast unveränderte Effektivität im Vergleich von zu Beginn an hell inkubierten Behandlungen.

Eine läsionserweiternde Wirkung durch Sirodesmin PL konnte bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit (nahe 100 %) nur in den inkompatiblen Interaktionen festgestellt werden. Die Wirkung trat sowohl in inkompatiblen Interaktionen mit Toxinproduzenten (A2-Isolate) als auch mit Isolaten auf, die keine Sirodesmine bilden (NA-Isolate). Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit der toxininduzierten und infektionsbedingten Läsionsgrößen von der Toxindosierung. Während die toxininduzierten Läsionsradien mit steigenden Konzentrationen von Sirodesmin PL korreliert waren, wurden die größten infektionsbedingten Läsionszuwachsrate nach Applikation von 0,5  $\mu$ g Sirodesmin PL pro Verletzungsstelle erreicht. Dieser Läsionszuwachs war nekrotisch und scheint aus einer

"Hypersensitivitätsreaktion" (HR) hervorgegangen zu sein. Die HR ist das Ergebnis einer Erkennung durch die Wirtspflanze und eine Konsequenz der Inkompatibilität zwischen Wirt und Pathogen (ISAAC 1992). Die braunen Nekrosen waren daher nicht vergleichbar mit den graugrünen, sporulierenden Läsionen, die für anfällige Interaktionen, z.B. für die Interaktion der Sorte Quinta mit dem Isolat Ila 1 (vgl. Abb. 22) charakteristisch sind.

Eine mögliche Erklärung für die läsionsfördernde Toxinwirkung wäre, dass das abgestorbene Gewebe der Sirodesminläsion dem Pilz *P. lingam* als Nährstoffquelle diene und die Fähigkeit zur weiteren Ausbreitung im Pflanzengewebe begünstige. Ein Überleben und eine Weiterentwicklung der Isolate war nur bei hoher Luftfeuchtigkeit möglich, da das geschädigte Pflanzengewebe leicht austrocknen konnte und dann dem Pilz keine optimalen Lebensbedingungen mehr geboten wurden. Überraschend war die Wirkung von Sirodesmin PL bei der kompatiblen Interaktion Quinta - Ila 1. Ohne eine Toxinbehandlung fand bis zum ca. 9 Tag nach der Inokulation eine symptomlose Entwicklung statt, bevor der Pilz um die Verletzungszone eine Läsionsbildung auf den Kotyledonen verursachte. Eine niedrige Dosierung von 0,15 µg Sirodesmin PL je Verletzungsstelle bewirkte im Vergleich zur toxinfreien Kontrolle keine Veränderungen. Dosierungen von 0,5 µg und 1,5 µg Toxin je Verletzungsstelle dagegen unterdrückten die normale Entwicklung von Ila 1 in Quinta. Auf vielen Kotyledonen dieser Behandlungen entstanden nur sehr schmale nekrotischen Zonen am Rand der toxininduzierten Läsion. Durch das Toxin induzierte Abwehrreaktionen durch Quinta oder für Ila 1 negative Toxineffekte waren nicht auszuschließen. Ob durch eine Toxinbehandlung Abwehrreaktionen an *Brassica*-Arten induziert werden, wird am Beispiel der Phytoalexinbildung in der Dissertation von S. POUTOT (1995) untersucht.

Eine direkte Toxinwirkung auf keimende Sporen wurde auf Wasseragar untersucht. Im Vergleich zu den Isolaten PHW 1261 und MIX 7 wurde die Sporenkeimung von Ila 1 durch höhere Toxinkonzentration im Agar (100 µg und 300 µg Sirodesmin PL / ml Wasseragar, Daten nicht gezeigt) gehemmt. Bei einem Versuch auf Kotyledonen der Sorte Quinta wurde Sirodesmin PL drei Tage nach der Inokulation mit Ila 1 appliziert. Obwohl die Sporen bereits in den Blättern gekeimt sein mussten, wirkte das Toxin auf die infektionsbedingte Läsionsentwicklung hemmend. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aggressivität der A1- und A2-Isolate in kompatiblen Interaktionen nicht allein mit der Produktion von Sirodesminen erklärt werden kann. Die wirtsunspezifischen Toxine können lediglich das Ausmaß der Symptome mitbeeinflussen, sie allein garantieren jedoch nicht den normalen Entwicklungszyklus von *P. lingam* in der Pflanze.

### 4.3 Induzierte Seneszenz und Einfluss auf die Resistenz gegenüber *P. lingam*

Häufig werden Abtrennungen von Pflanzenorganen in der Pflanzenzüchtung und in der Phytomedizin vorgenommen, um Resistenzmechanismen gegenüber Schaderregern zu studieren (HARTLEB et al. 1990, BADAWY et al. 1992). Das abgetrennte Pflanzenmaterial lässt sich leichter unter *ceteris paribus* Bedingungen inkubieren und in größeren Mengen auf kleinem Raum bearbeiten. Vielfach bleiben dabei die Resistenzen gegenüber definierten Schaderregern bestehen. So bestanden z.B. gute Korrelation von intakten Pflanzenorganen gegenüber abgetrennten bei *Phytophthora infestans* an Kartoffeln, *Ascochyta spp.* an Erbsen, *Phytophthora megasperma f. sp. glycina* an der Sojabohne, *Helminthosporium sigmoideum* auf Reis (DHINGRA & SINCLAIR 1985) und *Drechslera teres* an Gerste (KRÄMER 1988). Welche Faktoren für eine zunächst weiterbestehende Resistenz maßgebend sind, ist in nur wenigen Fällen bekannt. Bei anderen Interaktionen wurden jedoch nach einer Abtrennung die Abwehrreaktionen abgeschwächt und die Resistenz durchbrochen. So verschwanden z.B. nach einer Abtrennung von Weizenblättern zwei Proteinbande, die an intakten Blättern eine Resistenz gegen bestimmte Rassen von *P. graminis* bewirken. Mit einer Kinetinapplikation konnten jedoch Resistenz- und Proteinverlust vermieden werden (HOFFMANN et al. 1976).

Ob induzierbare Resistenzfaktoren, wie Phytoalexine, PR Proteine oder strukturelle Veränderungen negativ durch Organabtrennungen beeinflusst werden, ist nicht genau bekannt. Mit der Abtrennung wird unter anderem die Zufuhr von Cytokininen unterbrochen und Alterungsprozesse können schneller einsetzen. Die Seneszenz wird durch eine verstärkte Bildung von Abscisinsäure z.B. in den Chloroplasten (DÖRFFLING 1982) gefördert. Auch Ethylen kann ohne die antagonistischen Effekte der Cytokinine besser wirksam werden. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass nach längerer Zeit der Abtrennung durch die Änderungen im Hormonhaushalt induzierbare Resistenzfaktoren nicht mehr synthetisiert werden. Von den Abbauprozessen dürften auch präformierte Resistenzfaktoren chemischer und morphologischer Natur betroffen sein. Dies gilt insbesondere für Arten der Gattung *Brassica*, deren wasserreiches Blattgewebe sich während der Seneszenz schnell zersetzt.

In *B. napus* und *B. juncea* wandelten sich nach einer Organabtrennung inkompatible Reaktionen in kompatible Interaktionen um. Schon drei Tage nach einer Keimblattabtrennung zeigte sich auf diesen Blättern eine verstärkte Pilzentwicklung, bevor die Zeichen einer Blattalterung deutlicher wurden. Resistenzen, die zuvor an intakten Blättern bestanden, brachen mit zunehmender Seneszenz mehr und mehr zusammen. Eine Inkubation in Kinetin dagegen verzögerte den Prozess der Blattalterung und damit auch den der Pilzentwicklung.

Sporen nichtaggressiver Isolate oder aggressiver Isolate können in inkompatiblen Interaktionen intakter Pflanzen über einen längeren Zeitraum überdauern. Trotz möglicher Abwehrreaktionen, z.B. einer HR Reaktion, bleibt *P. lingam* auf den befallenen Pflanzen lebensfähig und wird durch fungistatische Eigenschaften der Pflanzen gehemmt. Die weitere Entwicklung dieser Isolate setzt erst ein, wenn das Pflanzengewebe durch interne Faktoren (Alterung) oder externe Faktoren (z.B. induzierte Seneszenz durch Abtrennung) geschwächt wird. Der Pilz durchdringt dann das geschwächte Gewebe und gelangt zur Pyknidienbildung. So wird verständlich, dass auch für

nichtaggressive *Phoma*-Isolate ökologische Nischen bzw. Lebensräume auf *B. napus* bestehen und von Winterraps im Freiland nichtaggressive Isolate isoliert werden konnten (MC GEE & PETRIE 1978, DE MARCH et al 1986, KOCH & HOPPE 1988).

Das *in vitro* beobachtete schnellere Wachstum der NA Isolate auf Czapek-Dox-Agar lässt die Deutung zu, dass eine Toxinproduktion auf absterbenden Pflanzen nicht notwendig ist und im Wettbewerb mit anderen Parasiten von Nachteil sein könnte (KNOCHE & DUVICK 1987).

#### **4.4 Einflussfaktoren auf die Toxinproduktion *in vitro* und in infiziertem Pflanzengewebe**

Während der Inkubation von *P. lingam* *in vitro* wurden mehrere Faktoren variiert, um Hinweise auf eine mögliche Bildung von Sirodesmin PL in der Pflanze zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass eine Belichtung während der Inkubation die Bildung von Sirodesminen (Tab. 14) unterdrückte. Die Zusammensetzung der Nährmedien war dabei ebenso von Bedeutung. Während in V8-Nährmedien nur sporadisch geringe Sirodesminmengen gebildet wurden, waren stets dünn-schichtchromatographisch nachweisbare Gehalte in Czapek-Dox und Fries Medien feststellbar. Die Bildung von Sirodesmin PL wird mit zunehmenden SO<sub>4</sub> Konzentrationen im Nährmedium gefördert (BOUDART 1989). Schwefel ist eine wichtige Komponente im Dioxopiperazinring von Sirodesminen und könnte daher im Kulturmedium ein begrenzender Faktor sein (TAYLOR 1971). Zinksalze hemmen die Symptomausprägung *phomainfizierter* Pflanzen (POIRET et al. 1985, ROUXEL et al. 1988, 1990). Eigene Versuche *in vitro* zeigten, dass die Bildung des Sirodesmin PL durch Zinksalze kurzzeitig gehemmt wird. Es ist möglich, dass Zn<sup>2+</sup> einen Komplex mit der Sulfidbrücke des Dioxopiperazinrings bildet und damit die Eigenschaften des Sirodesmin PL ändert.

Bei der Frage nach der Relevanz von phytotoxischen Verbindungen in Wirt - Parasit Beziehungen ist es von entscheidender Bedeutung, ob diese Toxine während der Pathogenese auch im infizierten Pflanzengewebe nachweisbar sind (TURNER 1984). Bisher war es nur wenigen Arbeitsgruppen gelungen, solche Verbindungen aus dem Pflanzengewebe zu isolieren. So wiesen BUCHWALDT & JENSEN (1991) wirtsspezifische Toxine wie Destruxin B und Homodestruxin B in der Interaktion von *Alternaria brassicae* in mehreren *Brassica*-Arten nach; OHKAWA & TORIKATA gelang 1967 die Extraktion des AK Toxins von *Alternaria kikuchiana* in infizierten japanischen Birnen. Isolationen von wirtsunspezifischen Toxinen aus dem Pflanzengewebe gelangen NISHIYAMA et al. (1977) und GNANAMANICKAM et al. (1982) mit Coronatin von verschiedenen Pathovaren des Bakteriums *Pseudomonas syringae* bei Welschem Weidelgras bzw. Sojabohnen; MITCHELL & BIELESKI (1977) isolierten Phaseolotoxin von *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bohnen. Ein weiteres wirtsunspezifisches Toxin, das aus infizierten Aprikosen und Pfirsichen isoliert wurde, ist Fusicoccin vom Pilz *Fusicoccum amygdali* (TURNER & GRANITI 1969).

Über Isolationen von Polythiodioxopiperazinen aus infiziertem Pflanzengewebe lagen außer den Hinweisen von BOUDART (1977) und BADAWY (1991) über vereinzelte Extraktionen bisher noch keine detaillierteren Untersuchungen vor.

Die Schwierigkeiten, Sirodesmine aus infiziertem Pflanzengewebe zu gewinnen, wurden auch in

den eigenen Untersuchungen deutlich: So stellte sich neben der Frage der optimalen Aufreinigungstechnik das Problem möglicher Degradationen während der Inkubation und der Aufarbeitung. Auch war es nicht sicher, ob diese Toxine überhaupt während der Inkubationszeit im Pflanzengewebe gebildet werden oder ihre Bildung nur in bestimmten Kulturmedien *in vitro* möglich ist.

Erstmals konnte aus Läsionen von infizierten Pflanzenorganen vom Freiland Sirodesmin PL isoliert werden. Bei Laubblättern im Rosettenstadium gelang der Nachweis von Sirodesmin PL in den Wintermonaten 1991/1992. Während bei einigen Extraktionen dünn-schichtchromatographisch geringe Toxingehalte festgestellt werden konnten, war bei anderen Extraktionen kein Sirodesmin PL nachweisbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Welche Einflussfaktoren für das nur sporadisch nachweisbare Sirodesmin PL verantwortlich waren, blieb zunächst unbekannt. Im Juni 1993 wurden stark infizierte Hypokotyle und Sprosssteile der beiden Rapssorten Cobra und Jet Neuf vom Freiland untersucht. Die Pflanzenteile stammten aus einem dichten Bestand und hatten daher nur eine geringe Belichtung erhalten. In mehreren Untersuchungen konnte aus den Hypokotylen Sirodesmin PL isoliert werden. Andere Sirodesmine waren nicht nachweisbar. Es wurde daraufhin die Hypothese aufgestellt, dass eine Anreicherung von Sirodesmin PL im infizierten Gewebe nur bei geringem Lichteinfluss möglich ist.

Diese Hypothese konnte unter kontrollierten Laborbedingungen an inokulierten Pflanzenorganen bei kompatiblen Interaktionen bestätigt werden. In Kotyledonen, welche in Dunkelheit inkubiert wurden, reicherte sich Sirodesmin PL in Konzentrationen von bis zu 159 µg Sirodesmin PL /g Frischgewicht Pflanzengewebe an. Auf diesen Pflanzenorganen war auch die Pyknidiengröße und die Absonderung von Sporenschleim besonders ausgeprägt. In den bei Belichtung inkubierten Kotyledonen dagegen wurden aus den ausgeprägten Läsionen keine oder nur sehr geringe Gehalte von Sirodesmin PL ermittelt.

Auffällig an den dunkel inkubierten Kotyledonen war, dass das Chlorophyll im Vergleich zur belichteten Behandlung nicht abgebaut wurde und die grüne Farbe erhalten blieb. Eine Mazeration des Gewebes durch den Pilz war zu erkennen.

Entsprechende Ergebnisse zeigten sich auf toxinbehandelten, nichtinfizierten Kotyledonen: Auf hell inkubierten Blättern wurde das Chlorophyll in der Läsionszone schnell abgebaut, während es in dunkel inkubierten Läsionen erhalten blieb. Eine nachfolgende Belichtung jedoch förderte auch auf diesen Blättern einen schnellen Abbau des Chlorophylls. Analog zur Wirkung des Cercosporins konnte eine photosensitivierende Wirkung des Sirodesmins auf das Pflanzengewebe beobachtet werden.

Bei Versuchen an inokulierten Hypokotylen, welche belichtet oder abgedunkelt inkubiert wurden, konnte wie bei den Kotyledonen ein negativer Einfluss des Lichtes auf den Gehalt von Sirodesmin PL festgestellt werden. Interessant war die Beobachtung, dass beim Vergleich der anfälligeren Sorte Cobra mit der weniger empfindlichen Sorte Jet Neuf in Cobra signifikant höhere Toxingehalte gemessen werden konnten.

Die Untersuchungen zeigten, dass dem Licht eine zentrale Bedeutung bei der Toxinanreicherung zukommt. Diese Beobachtungen könnten die vergeblichen Versuche der Arbeitsgruppe um

PEDRAS (PEDRAS & SÉGUIN-SWARTZ 1992, PEDRAS & TAYLOR 1993) erklären, die versuchten, Sirodesmine im infiziertem Pflanzengewebe festzustellen.

Einige Toxine, wie z.B. das photosensitivierende Cercosporin (DAUB 1982, DAUB & HANGARTER 1983) und das Tabtoxin- $\beta$ -lactam (DURBIN 1991) zeigen besonders unter Lichteinfluss eine toxische Wirkung auf Pflanzen. Cercosporin wird bei Belichtung auf ein höheres Energieniveau gehoben und produziert dabei Sauerstoffradikale. BALIS & PAYNE zeigten 1981, dass Cercosporin in wässrigen Medien bei Lichteinfluss schnell degradiert wird. Eine solche Degradation könnte z.B. auch bei Sirodesmin PL auf hell inkubierten Blättern stattgefunden haben. Um dieses zu untersuchen, wurde Sirodesmin PL auf Kotyledonen aufgetragen und bei Licht bzw. in Dunkelheit inkubiert. Nach neun Inkubationstagen war in beiden Varianten noch Sirodesmin PL nachweisbar. Es wurde deutlich, dass unter Lichteinfluss das Toxin nur unwesentlich stärker degradiert wird. Der Unterschied für den Toxinabbau bei der Inkubation unter Licht oder in Dunkelheit betrug nur etwa 10 %. Es darf also angenommen werden, dass unterschiedliche Toxingehalte im Pflanzengewebe auf eine unterschiedliche Syntheserate zurückzuführen sind. Unterstützung findet diese Annahme durch entsprechende Ergebnisse bei hell bzw. dunkel inkubierten Flüssigkulturen von *Phoma*-Isolaten *in vitro*.

#### **4.5 Bedeutung von Sirodesmin PL in infizierten Pflanzen**

Aggressive *Phoma*-Isolate wachsen bei kompatiblen Interaktionen in der Frühphase symptomlos im Pflanzengewebe. Sie sind nur nach einer Anfärbung mikroskopisch erkennbar. Sollte Sirodesmin PL die Abwehrreaktionen der Pflanzen in dieser Phase unterdrücken und für das biotrophe Wachstum ein Schutzmechanismus darstellen, könnte es in geringen Konzentrationen nachweisbar sein. Diese Konzentrationen müssten jedoch so niedrig sein, dass morphologische Veränderungen des Pflanzengewebes nicht hervorgerufen werden. Eine Isolation des Toxins in dieser Phase blieb jedoch in allen untersuchten Interaktionen erfolglos. Etwa 10 Tage nach einer Infektion beendeten die aggressiven Isolate ihre symptomlose Entwicklungsphase und begannen auf den Kotyledonen ausgedehnte Läsionen zu entwickeln. Die Läsionsbildung könnte auf eine verstärkte Toxinbildung zurückgeführt werden. Es konnten jedoch in der Phase der Läsionsentwicklung in hell und dunkel inkubierten Interaktionen (10. - 12. Tag auf Kotyledonen, 15. - 30. Tag auf Wurzelhälsen, die im Dreiblattstadium infiziert wurden) keine oder nur sehr geringe Gehalte von Sirodesmin PL ermittelt werden.

Trotz der geringen Gehalte von Sirodesmin PL ist eine Beteiligung an der Läsionsbildung während dieser Entwicklungsphase nicht auszuschließen. In Flüssigkulturen mit Mesophyllprotoplasten von *B. napus* wirkten schon 1  $\mu$ M Sirodesmin PL zu 100 % toxisch (SJÖDIN et al. 1988) und Mikrosporen von *B. napus* cv. Westar zeigten eine LD 50 bei 0,84  $\mu$ M Sirodesmin PL (PEDRAS & SÉGUIN-SWARTZ 1992). Diese Konzentrationen bewegen sich in einem Bereich unterhalb der Nachweisgrenze bei Isolationen aus pflanzlichem Gewebe. Bei einer Beteiligung des Toxins an der Läsionsbildung könnte es sein, dass dieses nur sehr lokal, d.h. in sehr kleinen Zonen (z.B. im Bereich der Hyphenspitzen, oder in den Anlagen der Pyknidien) gebildet wird. Bei der

Aufarbeitung könnte durch toxisches Pflanzengewebe eine Verdünnung erfolgen, so dass die Konzentrationen von Sirodesmin PL unter die Nachweisgrenze verringern wurden.

Die Toxizität der Epidithiodioxopiperazine könnte auf die reaktive Disulfidbrücke im Molekül zurückgeführt (SAMMES 1975, BOUDART 1989) werden. Dabei wird eine Wirkung der Epidithiodioxopiperazine auf zinkhaltige Enzyme in verschiedenen Organismen vermutet (TOWERS 1978, SMITH et al. 1977, BOUDART 1989). Die Cu/Zn SOD detoxifiziert  $O_2^-$  Radikale, die als hauptsächlich als Nebenprodukt vom Photosystem I in den Chloroplasten gebildet werden (BOWLER et al. 1994). Eine Reaktion der Disulfidbrücke des Sirodesmin PL mit  $Zn^{2+}$  der Cu/Zn SOD könnte das Enzym inaktivieren. Unter Lichteinfluss würden die  $O_2^-$  Konzentrationen ohne die dismutierende Wirkung der SOD auf ein toxisches Niveau steigen. Auch Radikalfänger, wie  $\alpha$ -Tocopherol können die lichtabhängige Bleichung nicht mehr verhindern. Neben einer hemmenden Wirkung auf die Aktivität der Cu/Zn SOD ist auch ein Einfluss auf die DNA abhängige RNA-Polymerase (TAYLOR 1971, ROUXEL et al. 1988), die Alkoholdehydrogenase und auf die Kohlensäureanhydratase wahrscheinlich. Ein Zusatz von Sirodesminen in einer Nährlösung hemmte das Wurzellängenwachstum verschiedener Pflanzen, ohne dass an diesen Pflanzenorganen Nekrotisierungen deutlich wurden (eigene Beobachtungen, BADAWEY & HOPPE 1989, SJÖDIN & GLIMELIUS 1989). Es ist wahrscheinlich, dass für die Reduktion des Wurzelwachstums ein anderer Wirkungsmechanismus als bei der Nekrotisierung an Sprosssteilen aktiv ist. Eine Hemmung der DNA abhängigen RNA-Polymerase bei der Transkription würde den Stoffwechsel und damit die Wachstumsprozesse der betroffenen Pflanzenorgane beeinträchtigen.

Die erst spät im Verlauf der Pathogenese einsetzende Anreicherung des Toxins im Läsionsgewebe lässt eine weitere Interpretation zur Bedeutung von Sirodesmin PL zu. Das Toxin besitzt antivirale, antibakterielle und antimykotische Eigenschaften (CURTIS et al 1977, BOUDART 1989 und POIRET et al. 1985) und könnte schützend für die Sporenlager (Pyknidien und Pseudothecien) von *P. lingam* bzw. *L. maculans* wirken. Die so geschützten Pyknidien und Pseudothecien wären gegen ihre Parasiten weitgehend abgesichert und die Pyknosporen und Ascosporen können dabei für längere Zeit infektiös bleiben.

#### **4.6 Ausblick auf weitere Forschungsarbeiten**

Der Einfluss des Lichtes auf die Konzentration von Sirodesmin PL in der infizierten Pflanze und auf dessen Phytotoxizität wurde leider erst relativ spät während der experimentellen Phase dieser Dissertation festgestellt, so dass die Effekte aus zeitlichen Gründen nicht mehr genauer untersucht werden konnten. Die Bedeutung einer Belichtung für die Toxinwirkung sollte in zukünftigen Experimenten erforscht werden. Zur Bestimmung einer möglichen Hemmung der Cu/Zn SOD Aktivität durch Sirodesmin PL könnte nach einer Methode von PAOLETTI & MOCALI (1990) ein relativ einfacher Versuch im Photometer durchgeführt werden.

*Nuphar luteum* und *Nymphaea odorata* gehören zu den Pflanzen, die keine Cu/Zn SOD Aktivität besitzen (BRIDGES & SALIN 1981). Falls die Cu/Zn SOD das Zielenzym für Sirodesmin PL ist, dürften nach Toxinapplikationen auf Blättern dieser Pflanzen keine Chlorosen und Nekrosen

entstehen.

Weiter sollte eine mögliche Wirkung von Sirodesmin PL sollte auch bei anderen zinkhaltigen Enzymen untersucht werden. Untersuchungsmethoden bestehen bereits für die DNA abhängige RNA-Polymerase (JOHNSON et al 1969), die Alkoholdehydrogenase (BERGMEYER 1962) und für die Kohlensäureanhydratase (LINDSKOG et al. 1971).

Auch andere Prozesse der Photosynthese könnten durch Sirodesmin PL betroffen sein. Fast ein Drittel der im Pflanzenschutz eingesetzten herbiziden Wirkstoffe beeinträchtigen die Photosynthese (MÜLLER 1986). Dazu gehören zum Beispiel die Phenylharnstoffe, die s-Triazine, Diazine, Biscarbamate, Amide und die Dipyridyliumsalze. Sie und möglicherweise auch Sirodesmin PL könnten in folgenden Bereichen der Photosynthese wirken: Hill-Reaktion, Elektronentransport zwischen dem Photosystem II und Photosystem I, zyklischer Elektronentransport, Photophosphorylierung und Elektronenakzeptoren.

Für weitere Untersuchungen zur Bedeutung dieses Toxins könnten durch UV Bestrahlung und andere Methoden Mutanten von *P. lingam* hergestellt werden, die kein Sirodesmin PL bilden. Die vitalsten Mutanten sollten auf Kotyledonen und jungen Wurzelhälsen von Rapspflanzen inokuliert werden. Die Relevanz des Toxins dürfte bei einer unterdrückten Läsionsentwicklung an diesen Organen deutlich werden.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung phytotoxischer Sirodesmine in Interaktionen von *Phoma lingam* mit *Brassica napus* und *Brassica juncea* zu untersuchen. Ein weiteres Interesse galt dem Einfluss einer induzierten Seneszenz auf die Resistenzeigenschaften.

Zur Isolierung von Sirodesmin PL wurde ein Säulenchromatographieverfahren auf Kieselgelbasis entwickelt. Mit dieser Methode konnten bis zu 100 µg Sirodesmin PL in reiner Form pro Arbeitsgang chromatographiert werden.

Sirodesmin PL wurde in verschiedenen Dosierungen auf nichtinokulierte Rapskotyledonen aufgetragen. Die Inkubationen erfolgten bei unterschiedlichen Temperaturen und Belichtungsterminen. Die Größe der Läsionen war abhängig von der Toxindosierung. Die Läsionsausprägung jedoch wurde durch eine zunehmende Belichtungsdauer und höhere Temperaturen gefördert.

Bei inkompatiblen Interaktionen zwischen *P. lingam* und *Brassica*-Arten förderte Sirodesmin PL in verschiedenen Dosierungen das Wachstum der Läsionen. Bei 0,5 µg Sirodesmin PL je Verletzungsstelle wurde der größte pilzbedingte Läsionszuwachs erzielt. Diese Läsionen blieben jedoch nekrotisch. Auch nach längerer Inkubationsdauer entstanden auf ihnen keine Pyknidien und sie waren nicht mit den Läsionen einer kompatiblen Interaktion vergleichbar. Bei kompatiblen Interaktionen zwischen *P. lingam* und *B. napus* cv. Quinta wirkten steigende Dosierungen von Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung dagegen hemmend.

Kotyledonen von *B. napus* und *B. juncea* wurden mit verschiedenen *Phoma*-Isolaten inokuliert. Durch die Abtrennung der inokulierten Kotyledonen wurde eine Seneszenz induziert. Dabei wurde jede Resistenz, die zuvor in inkompatiblen Interaktionen bestanden hatte, aufgehoben. Die einsetzende Pilzentwicklung auch der nichtaggressiven Isolate bei späten Abtrennungsterminen nach der Inokulation zeigte, dass die Hemmung von *P. lingam* in inkompatiblen Interaktionen nicht fungitoxischer, sondern fungistatischer Natur sein muss. Eine Verzögerung der Seneszenz durch das Phytohormon Kinetin verlangsamte bei inkompatiblen Interaktionen in den abgetrennten Pflanzenorganen die Pilzentwicklung.

Die Bildung von Sirodesminen durch aggressive Isolate wurde in Kulturmedien von verschiedenen Umgebungsfaktoren beeinflusst. Eine Sirodesminanreicherung wurde durch Belichtung und Zinksalze negativ, durch Sulfate im Nährmedium dagegen positiv beeinflusst.

Verschiedene Interaktionen zwischen *P. lingam* und verschiedenen Rapssorten wurden auf der Basis inokulierter Kotyledonen untersucht. In kompatiblen Interaktionen konnten während der symptomlosen Phase bis zum Auftreten der ersten Läsionen keine Sirodesmine festgestellt werden. Wurden die Kotyledonen nach dem Beginn der Läsionsentwicklung in Dunkelheit inkubiert, reicherten sich in ihnen mit fortwährender Inkubationsdauer steigende Gehalte von Sirodesmin PL an. Eine Anreicherung von Sirodesmin PL konnte unter diesen Bedingungen bei allen untersuchten kompatiblen Interaktionen festgestellt werden. Bei einer fortgesetzten Inkubation unter Licht dagegen wurden in den Keimblättern keine oder nur geringe Mengen von Sirodesmin PL ermittelt. Bei inkompatiblen Interaktionen wurden generell keine Sirodesmine gefunden.

Sprosssteile und Hypokotyle *phomainfizzierter* Rapspflanzen vom Freiland wurden auf Toxine untersucht. Dabei konnte aus den Läsionen Sirodesmin PL isoliert werden. Andere Sirodesmine konnten nicht nachgewiesen werden. Interessant war die Beobachtung, dass der Toxingehalt in den Hypokotylen um den Faktor 10 höher lag als im unteren Stängelbereich. Die als anfällig eingestufte Sorte Cobra wies deutlich höhere Gehalte an Sirodesmin PL auf als die weniger empfindliche Sorte Jet Neuf.

In Gewächshausversuchen wurden die Hypokotyle der beiden Sorten mit *P. lingam* inokuliert. Dabei wurde durch eine Abdunklung der Hypokotyle die Anreicherung von Sirodesmin PL gefördert. In den belichtet inkubierten Hypokotylen wurden dagegen keine oder nur geringe Gehalte von Sirodesmin PL festgestellt. Die anfälligere Sorte Cobra wies in den mehrfach durchgeführten Untersuchungen deutlich höhere Sirodesmingehalte als Jet Neuf auf. Im zeitlichen Verlauf wurden für Sirodesmin PL im befallenen Gewebe erst bei einer späten Phase der Läsionsentwicklung höhere Konzentrationen ermittelt.

## 6 Literatur

- ABADIE, M. & BOUDART, G. (1982). Études cytologique et ultrastructurale de la nécrose des crucifères due à *Leptosphaeria maculans*, forme conidienne *Phoma lingam*. Étude chez un hôte sensible.  
Annales des Sciences Naturelles, Botanique 13, 53 - 72
- ARGOUDELIS, A.D. (1972). Melinacidins II, III and IV, new "3,6-epidithiadiketopiperazine antibiotics."  
The Journal of Antibiotics 25, 171 - 178
- BADAWY, H.M.A. & HOPPE, H.-H. (1989 a). Nonspecific phytotoxic effects of sirodesmins on host and nonhost plants of *Leptosphaeria maculans*.  
Journal of Phytopathology 127, 137 - 145
- BADAWY, H.M.A. & HOPPE, H.-H. (1989 b). Production of phytotoxic sirodesmins by aggressive strains of *Leptosphaeria maculans* differing in interactions with oil seed rape genotypes.  
Journal of Phytopathology 127, S. 146 - 157
- BADAWY, H.M.A. (1990). Studies on pathotype differentiation and phytotoxins of *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces et De Not., the causal agent of stem canker disease of oilseed rape (*Brassica napus* L.).  
Dissertation Universität - Gesamthochschule Kassel
- BADAWY, H.M.A., HOPPE, H.-H. & Koch, E. (1991) Differential reactions between the genus *Brassica* and aggressive single spore isolates of *Leptosphaeria maculans*.  
Journal of Phytopathology 131, 109 - 119
- BADAWY, H.M.A., KAKAU, J. & HOPPE, H.-H. (1992). Temperature and ageing of host tissue affect the interactions between different oilseed rape cultivars and pathotype groups of *Leptosphaeria maculans*.  
Journal of Phytopathology 134, 255 - 263
- BAILEY, J.A. (1982). Mechanisms of phytoalexin accumulation. In: Phytoalexins, eds. J.A. Bailey and J. W. Mansfield,  
Blackie Glasgow and London, 289 - 318
- BALIS, C. & PAYNE, M.B. (1981). Triglycerides and cercosporin from *Cercospora beticola*: fungal growth and cercosporin production.  
Phytopathology 61, 1477 - 1484
- BALLIO, A. (1991). Non-host-selective fungal phytotoxins: Biochemical aspects of their mode of action.  
Experientia 47, 783 - 790
- BERGMAYER, H.U. (1962). Alkoholdehydrogenase In: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, S. 290
- BOL, J.F., LINTHORST, H.J.M. & CORNELISSEN, B.J.C. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection.  
Annual Review of Phytopathology 28, 113 - 138

- BOUDART, G. (1978). Phytotoxine et necrose des hypokotyles de cruciferes infectées par *Leptosphaeria maculans* (Ces. et De Not.) et sa forme imparfaite *Phoma lingam*. *Phytopathologische Zeitschrift* 92, 76 - 82
- BOUDART, G. (1981). Modalités de l'attaque parasitaire des crucifères par *Leptosphaeria maculans* (Des.) Ces. et De Not. (f.c. *Phoma lingam*) agent de la nécrose du collet. Déterminants moléculaire du pouvoir pathogène. Thèse de Docteurs es-Sciences Naturelles. L'Université des Sciences et Techniques, Lille, France
- BOUDART, G. (1989). Antibacterial activity of sirodesmin PL phytotoxin: Application to the selection of phytotoxin-deficient mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1555 - 1559
- BOUSQUET, J. F., FÉRÉZOU, J. P., DEVYS, M. & BARBIER, M. (1977). Sur une toxine produite par le champignon *Phoma lingam* Tode, parasite du Colza; isolement et propriétés. *Comptes Rendus de l'Academie des Seances (Paris)* t. 284, Série D, 927 - 928
- BOWLER, C., VAN MONTAGU, M. & INZÉ, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 83 - 116
- BOWLER, C., VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M. & INZÉ, D. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13 (3), 199 - 218
- BOWLES, D.J. (1990). Defense related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59, 873 - 907
- BRIDGES, S.M & SALIN, M.L. (1981). Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiology* 68, 275 - 278
- BROSCHEWITZ, B., STEINBACH, P. & GOLTERMANN, S. (1993). Einfluss stengelbewohnender Schaderreger auf den Befall von Winterraps mit *Phoma lingam* und *Botrytis cinerea*. *Gesunde Pflanzen* 45, 106 - 110
- BRUNIN, B. & LACOSTE, L. (1970). Recherches sur la maladie du colza due a *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. II. - Pouvoir pathogène des ascospores. *Annales Phytopathologie* 2, 477 - 488
- BUCHWALDT, L. & JENSEN J.S. (1991). HPLC purification of destruxins produced by *Alternaria brassicae* in culture and in leaves of *Brassica napus*. Assignment of the <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra by 1D- and 2D techniques. *Phytochemistry* 30, 2311 - 2316
- BUCHWALDT, L. & GREEN, H. (1992). Phytotoxicity of destruxin B and its possible role in the pathogenesis of *Alternaria brassicae*. *Plant Pathology* 41, 55 - 63
- BU'LOCK, J.D. & CLOUGH, L.E. (1992). Sirodesmin biosynthesis. *Australian Journal of Chemistry* 45, 39 - 45

- CARGEEG, L.A. & THURLING, N. (1980). Contribution of host-pathogen interactions to the expression of the blackleg disease of spring rape (*Brassica napus* L.) caused by *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.  
Euphytica 29, 465 - 476
- CURTIS, P. J., GREATBANKS, D., HESP, B., CAMERON, F. A. & FREER, A. A. (1977). Sirodesmins A, B, C, and G, antiviral epipolythiopiperazine-2,5-diones of fungal origin: X-ray analysis of sirodesmin A diacetate.  
Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I, 180 - 189
- DAHIYA, J.S. (1988). Cellulolytic activity of *Leptosphaeria maculans* *in vitro* and *in vivo*.  
Indian Journal of Microbiology 28, 286 - 290
- DAHIYA, J.S. & RIMMER, S.R. (1989). Phytoalexin accumulation in plant tissues of *Brassica* spp. in response of abiotic elicitors and infection with *Leptosphaeria maculans*.  
Botanical Bulletin of Academia Sinica 30, 107 - 115
- DALY, J.M. & KNOCHE, H.W. (1982). The chemistry and biology of pathotoxins exhibiting host-selectivity. Advances in Plant Pathology Vol. 1, eds. D.S. Ingram & P.H. Williams, London: Academic press, S. 83 - 138
- DAUB, M. E. (1982). Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species.  
Phytopathology 72, 370 - 374
- DAUB, M.E. & HANGARTER, R.P. (1983). Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin.  
Plant Physiology 73, 855 - 857
- DELWICHE, P.A. & WILLIAMS, P.H. (1979). Screening for resistance to blackleg of crucifers in the seedling stage.  
Cruciferae Newsletter 4, S. 24
- DE MARCH, G., SÉGUIN-SWARTZ, G. & PETRIE, G.A. (1986). Virulence and culture filtrate phytotoxicity in *Leptosphaeria maculans*: Perspectives for *in vitro* selection.  
Canadian Journal of Plant Pathology 8, 422 - 428
- DEUKER-ISERMAYER, B., BADAWEY, H.M.A. & HOPPE, H.-H. (1990). *Phoma*: Sanfte und aggressive Formen schädigen den Raps.  
Pflanzenschutzpraxis 3, 40 - 43
- DIXELIUS, C. (1993). Pathogenesis-related proteins in *Brassica*. In: B.Fritig and M. Legrand (eds.) Mechanisms of Plant Defense Responses.  
Kluwer Academic Publishers, S. 361
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR J.B. (1985). Basic plant pathology methods. IX. Inoculation of detached plant parts.  
CRC Press Boca Raton, Florida, S. 161 -163
- DÖRFFLING, K. (1982). Das Hormonsystem der Pflanzen.  
Thieme Verlag Stuttgart, New York, S.79
- DURBIN, R. D. (1991). Bacterial phytotoxins: mechanisms of action.  
Experientia 47, 776- 783

EASTON, C. J. & ROSSALL, S. (1985). The production of certain cell wall-degrading enzymes by *Leptosphaeria maculans* in culture and in stem canker lesions of oilseed rape. *Physiological Plant Pathology* 26, 185 - 197

ELSTNER, E. F. (1979). Oxygen activation and superoxide dismutase in chloroplasts. In: *Photosynthesis II*, Eds. M. Gibbs and E. Latzko, *Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol 6*, 410 - 415

ELSTNER, E. F. (1988). Schadstoffe, die über die Luft zugeführt werden. In: *Schadwirkungen auf Pflanzen: Lehrbuch der Pflanzentoxikologie*. Eds. B. HOCK & E. Elstner, 2. Auflage, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 69 - 95

FEDTKE, C. (1982). *Biochemistry and Physiology of Herbicide Action*. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 202 Seiten

FÉRÉZOU, J. P., RICHE, C., QUESNEAU-THIERRY, A., PASCARD-BILLY, C., BARBIER, J. F. & BOUDART, G. (1977). Structures de deux toxines isolées des cultures du champignon *Phoma lingam* Tode: la sirodesmine PL et la deacetylsirodesmine PL. *Nouveau Journal de Chimie*, Vol. 1, N° 4, 327 - 334

FRANCIS, E. RAHMAN, R., SAFE, S. & TAYLOR, A. (1972). Sporidesmins. Part XII. Isolation and structure of sporidesmin G, a naturally-occurring 3,6-epitetrathiopiperazine-2,5-dione. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I*, 470 - 472

GABRIELSON, R. L. (1983). Blackleg disease of crucifers caused by *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) and its control. *Seed Science and Technology* 11, 749 - 780

GLADDERS, P. & MUSA, T. M. (1980). Observations on the epidemiology of *Leptosphaeria maculans* stem canker in winter oilseed rape. *Plant Pathology* 29, 28 - 37

GNANAMANICKAM, S. S., STARRATT, A. N. & WARD, E.W.B. (1982). Coronatine production *in vitro* and *in vivo* and its relation to symptom development in bacterial blight of soybean. *Canadian Journal of Botany* 60, 645 - 650

GRITTER, R. J., BOBBITT, J. M. & SCHWARTING, A. E. (1987). *Einführung in die Chromatographie*. Heidelberger Taschenbücher, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo

GROSS, D. (1987). *Chemische Abwehrstoffe der Pflanze*. *Biologische Rundschau* 25, 225 - 237

GROSS, D. (1993). Phytoalexins of the *Brassicaceae*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 100, 433 - 442

GUGEL, R.K. & PETRIE, G.A. (1992). History, occurrence, impact, and control of blackleg of rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14, 36 - 45

HALL, R. (1992). Epidemiology of blackleg of oilseed rape.  
Canadian Journal of Plant Pathology 14, 46 - 55

HÄNSEL, M. (1991). Korrelationen im Auftreten des Rapserrdflahs (*Psylliodes crysocephala*) und pilzliche Schaderreger am Beispiel *Phoma lingam* anhand der Ergebnisse der Schaderregerüberwachung auf dem Gebiet der ehemaligen DDR.  
Sitzung des Arbeitskreises " Integrierter Pflanzenschutz - Projektgruppe Raps" vom 18. - 19.02.91 in Braunschweig

HAMMOND, K. E., LEWIS, B. G. & MUSA, T. M. (1985). A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*.  
Plant Pathology 34, 557 - 565

HAMMOND, K. E. & LEWIS, B. G. (1986). Ultrastructural studies of the limitation of lesions caused by *Leptosphaeria maculans* in stems of *Brassica napus* var. *oleifera*.  
Physiological and Molecular Plant Pathology 28, 251 - 265

HAMMOND, K.E. & LEWIS, B.G. (1987). The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*.  
Plant Pathology 36, 135 - 147

HANACZIWSKI, P. & DRYSDALE, R. B. (1984). Cultural and biochemical characterization of isolates of *Leptosphaeria maculans* varying in pathogenicity.  
Aspects of Applied Biology 6, 387 - 397

HANOUNIK, S.B. (1986). Screening techniques for disease resistance in faba beans.  
International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), 59 Seiten

HARTLEB, H., MEYER U. & LEHMANN, C. O. (1990). Das Resistenzverhalten von Saatgersten gegenüber verschiedenen Isolatzen von *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem.  
Archiv Phytopathologie und Pflanzenschutz 26, 257 - 263

HASSAN, A.K., SCHULZ, C., SACRISTAN, M.D. & WÖSTEMEYER, J. (1991). Biochemical and molecular tools for the differentiation of aggressive and non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen, *Phoma lingam*.  
Journal of Phytopathology 131, 120 - 136

HAUSER, D., LOOSLI, H. R. & NIKLAUS, P. (1972). Isolierung von 11<sub>1</sub>, 11<sub>2</sub> - Dihydroxychaetocin aus *Verticillium tenereum*.  
Helvetica Chimica Acta 55, 2182 - 2187

HAUSER, D., WEBER, H. P. & SIGG, H. O. (1970). Isolierung und Strukturaufklärung von Chaetocin.  
Helvetica Chimica Acta 53, 1061 - 1073

HENDERSON, M.P. (1918). The black-leg disease of sabbage caused by *Phoma lingam* (TODE) Desmaz.  
Phytopathology 8, 379 - 431

HOFFMANN, G., NIENHAUS, F., SCHÖNBECK, F., WELTZIEN, H.C. & WILBERT, H. (1976). Lehrbuch der Phytomedizin, 1. Auflage, Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg, S. 300

ISAAC, S. (1992). Fungal - Plant Interactions, Chapman and Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 418 Seiten

JOHNSON, J.C., SHANOFF, M., BASS, S.T., BOEZI, J.A. & HANSON, R.G. (1968). An enzymic method for determination of inorganic pyrophosphatase and its use for RNA polymerase.  
Analytical Biochemistry 26, 137 - 145

KEOGH, R.C., DEVERALL, B.J. & MCLEOD, S. (1980). Comparison of histological and physiological responses to *Phakospora pachyrhizi*.  
Transactions of the British Mycological Society 74, 329 - 333

KIRBY, G.W. & ROBINS, D.J (1980). The biosynthesis of gliotoxin and related epipolythio-dioxopiperazines. In: The Biosynthesis of Mycotoxins - A Study in Secondary Metabolism, Eds. by P.S. Steyn.  
Academic Press, S. 301 - 326

KLECZKOWSKI, L.A. (1994). Inhibitors of photosynthetic enzymes /carriers and metabolism.  
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 45, 339 - 367

KNOCHE, H.W. & DUVICK, J.P. (1987). The role of fungal toxins in plant disease. In: Fungal infection of plants, ed. by G.F. Pegg & P.G. Ayres  
British Mycological Society Symposium Series 13, 158 - 192

KOCH, E. & HOPPE, H.-H. (1988) Zur Verbreitung aggressiver und nichtaggressiver Stämme von *Phoma lingam* in der Bundesrepublik Deutschland  
Raps 6, 74 - 77

KOCH, E., BADAWY, H.M.A. & HOPPE, H.-H. (1989). Differences between aggressive and non-aggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production.  
Journal of Phytopathology 124, 52 - 62

KOHMOTO, K. & OTANI, H. (1991). Host recognition by toxigenic plant pathogens  
Experientia 47, 755 - 764

KRÄMER, R., OPEL, M. & SIEBERT, A. (1988) Reaktion abgetrennter Gerstenblätter auf ein teilgereinigtes Toxinpräparat von *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem.  
Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz 25, 277 - 283

KUNERT, K. J. & DODGE, A. D. (1989). Herbicide induced damage and antioxidative systems. In: Target sites of herbicide action, eds. P. Böger & G. Sandmann  
CRC Press Boca Raton, S. 46 - 63

LINDSKOOG, S., HENDERSON, L.E., KANNAN, K.K., LILJAS, A., NYMANN, P.O. & STRANDBERG, B. (1971). Carbonic anhydrase In: The Enzymes, Editor: P.D Boyer,  
Academic Press, New York, 587 - 665

LINTHORST, H.J.M. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants.  
Critical Reviews in Plant Sciences 10, 123 - 150

MARSCHNER, H. (1986) Mineral Nutrition of higher plants.  
Academic Press London S. 138

- MARRÉ, E. (1979). Fusicoccin - a tool in plant physiology.  
Annual Review of Plant Physiology 30, 273 - 288
- MC GEE, D. C. & PETRIE, G. A. (1978). Variability of *Leptosphaeria maculans* in relation to blackleg of oilseed rape.  
Phytopathology 68, 625 - 630
- MENGISTU, A., RIMMER, S. R., KOCH, E. & WILLIAMS, P. H. (1989). Pathogenicity grouping of *Leptosphaeria maculans* isolates based on three cultivars of *Brassica napus*.  
Crucifer Genetics Workshop IV, Davis, California  
Phytopathology 79, S. 1207
- MINATO, H., MATSUMOTO, M. & KATAYAMA, T. (1973). Studies on the metabolites of *Verticillium sp.* Structures of Verticillins A, B, and C.  
Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I, 1819 - 1825.
- MITCHELL, R.E. & BIELESKI, R.L. (1977). Involvement of phaseolotoxin in halo blight of beans. Transport and conversion to functional toxin.  
Plant Physiology 60, 723 - 729
- MITCHELL, R. E. (1984). The relevance of non-host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens.  
Annual Review of Plantpathology 22, 215 - 245
- MITHEN, R.F. & MAGRATH, R. (1992). Glucosinolates and resistance to *Leptosphaeria maculans* in wild and cultivated *Brassica* species.  
Plant Breeding 108, 60 - 68
- MONDE, K., TAKASUGI, M., LEWIS, J.A. & FENWICK, G.R. (1991). Time-course studies of phytoalexins and glucosinolates in UV-irradiated turnip tissue.  
Zeitschrift für Naturforschung 46 c, 189 - 193
- MOTL, O. & NOVOTNY, L (1979). Adsorption column chromatography. In: Laboratory handbook of chromatographic and allied methods.  
John Wiley & Sons Sussex, 150 - 217
- MÜLLER, F. (1986) Phytopharmakologie: Verhalten und Wirkungsweise von Pflanzenschutzmitteln  
Ulmer Verlag Stuttgart, 228 Seiten
- NAGARAJAN, R., HUCKSTEP, L. L. LIVELY, D. H., DELONG, D. C., MARSH, M. M. & NEUSS, N. (1968 a). Aranotin and related metabolites from *Arachniotus aureus*.  
I. Determination of structure.  
Journal of the American Chemical Society 90, 2980 - 2982
- NAGARAJAN, R., NEUSS, N. & MARSH, M. M. (1968 b). Aranotin and related metabolites.  
III. Configuration and conformation of acetylaranotin.  
Journal of the American Chemical Society 90, 6518 - 6519
- NATHANIELS, N. Q. R. & TAYLOR, G. S. (1983). Latent infection of winter oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*.  
Plant Pathology 32, 23 - 31

- NEUSS, N., NAGARAJAN, R., MOLLOY, B. B. and HUCKSTEO, L. L. (1968). Aranotin and related metabolites. II. Isolation, characterization and structure of two new metabolites. *Tetrahedron Letters* 42, 4467 - 4471
- NEWMAN, P.L. (1984). The effects of insect larval damage upon the incidence of canker in winter oilseed rape. *Proceedings of the 1984 British Crop Protection Conference - Pests and Diseases*, S. 815 - 821
- NISHIYAMA, K., SAKAI, R., EZUKA, A., ICHIHARA, A., SHIRAISHI, K. & SAKAMURA, S. (1977). Detection of coronatine in halo blight lesions of Italian ryegrass. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 43, 219 - 220
- OHKAWA, M. & TORIKATA, H. (1967). Studies on resistance of Japanese pears to black spot disease fungus. VII. The isolation of host-specific toxin from the natural lesions, and the chemicals which decrease in toxicity of that toxin. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Sciences* 36, 263 -268  
[in Japanese, English Summary]
- NOODEN, L.D. & LEOPOLD, A. C. (1988). *Senescence and ageing in plants*. Academic Press, 526 Seiten
- PAOLETTI, F & MOCALI, A. (1990). Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods in Enzymology* 186, 209 - 220
- PARK, P., OHNO, T., NISHIMURA, S., KOHMOTO, K. & OTANI, H. (1987). Leakage of sodium ions from plasma membrane modifications, associated with permeability change, in host cells treated with a host-specific toxin from a Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Canadian Journal of Botany* 65, 330 - 339
- PEDRAS, M.S.C., SÉGUIN-SWARTZ, G., PETRIE, G.A. & ABRAMS, S. R. (1987). Toxins of *Leptosphaeria maculans*: production, isolation, derivatisation and phytotoxicity. In: *Abstracts of the Crucifer Genetics Cooperative Workshop IV*. 12-14 October, Madison, Wisconsin, U.S.A.
- PEDRAS, M. S. C., SÉGUIN-SWARTZ, G. & ABRAMS, S. R. (1990). Minor phytotoxins from the blackleg fungus *Phoma lingam*. *Phytochemistry* 29, 777 - 782
- PEDRAS, M. S. & SÉGUIN-SWARTZ, G. (1990). Rapid high-performance liquid chromatographic analysis of phytotoxins from *Phoma lingam*. *Journal of Chromatography* 519, 383 - 386
- PEDRAS, M. S. C. & SÉGUIN-SWARTZ, G. (1992). The blackleg fungus: Beyond phytotoxins and phytoalexins. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14, 67 - 75
- PEDRAS, M. S. C. & TAYLOR, J. L. (1993). A novel chemical signal from the "blackleg" fungus: Beyond phytotoxins and phytoalexins. *Journal of Organic Chemistry* 58, 4778 - 4780

- PENG, J.H. & BLACK, L.L. (1976). Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by *Phytophthora infestans*.  
Phytopathology 66, 958 - 963
- PETERKA, S. (1990) Grundlagen der Resistenz von *Brassica* spp. gegenüber *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not.  
Dissertation, Universität Giessen
- PETERKA, S. & FENWICK, G. R. (1988). The use of flash-chromatography for the isolation and purification of glucosinolates.  
Fat Science Technology 90, 61 - 64
- PETRIE, G.A. (1978). Occurrence of a highly virulent strain of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) on rape in Saskatchewan (1975 - 1977).  
Canadian Plant Disease Survey 58, 21 -25
- POIRET, B., KOLLMANN, A. & BOUSQUET, J. F. (1985). Activités antifongiques de la sirodesmine PL et de deux analogues naturels isolés de *Phoma lingam* (Tode) Desm.  
Action antagoniste du zinc.  
Agronomie 5, 533 - 538
- POUTOT, SILVIA (1995)  
Dissertation, Universität Göttingen (in Vorbereitung)
- PRICE, K. R., CURL, C. L. & FENWICK, G. R. (1987). Flash-chromatography - a simple technique of potential value for the food chemist.  
Food Chemistry 25, 145 - 157
- RIDOUT C.J. & LUMSDEN R.D. (1993). Polypeptides associated with gliotoxin production in the biocontrol fungus *Gliocladium virens*.  
Phytopathology 83, 1040 - 1045
- RIMMER, S.R. & VAN DEN BERG, C.G.J. (1992). Resistance of oilseed *Brassica* spp. to blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*.  
Canadian Journal of Plant Pathology 14, 56 - 66
- ROUXEL, T., CHUPEAU, Y., FRITZ, R., KOLLMANN, A. & BOUSQUET, J. F. (1988). Biological effects of sirodesmin PL, a phytotoxin produced by *Leptosphaeria maculans*.  
Plant Science 57, 45 - 53
- ROUXEL, T., KOLLMANN, A. & BOUSQUET, J. F. (1990). Zinc suppresses sirodesmin toxicity and protects *Brassica napus* plants against the blackleg disease caused by *Leptosphaeria maculans*.  
Plant Science 68, 77 - 86
- RUDOLPH, K. (1976). Non-specific toxins. In: Physiological Plant Pathology (Ed. by R. Heitefuss and P.H. Williams),  
Springer-Verlag, Berlin, 270 - 315
- RYAN, C.A. (1990). Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens.  
Annual Review of Phytopathology 28, 425 - 449

- SACRISTAN, M.D. (1982). Resistance responses to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*.  
Theoretical and Applied Genetics 54, 129 - 132
- SAFE, S. and TAYLOR, A. (1972). Sporidesmins Part XIII. Ovine III-thrift in Nova Scotia. Part III. The characterization of chetomin, a toxic metabolite of *Chaetomium cochliodes* and *Chaetomium globosum*.  
Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I, 472 - 479
- SAKAI, M. & WATANUKI, M. (1987). Inhibitory effect of gliotoxin on platelet aggregation, importance of disulfide structure.  
Agricultural and Biological Chemistry 51, 2167 - 2170
- SAMMES, P. G. (1975). Naturally occurring 2,5-dioxopiperazines and related compounds.  
Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe 32, 51 - 107
- SCHEFFER, R.P. & PRINGLE, R.B. (1964). Uptake of *Helminthosporium victoriae* toxin by oat tissue.  
Phytopathology 54, 832 - 835
- SCHEFFER, R. P. (1976). Host specific toxins in relation to pathogenesis and disease resistance. In: Physiological Plant Pathology (Ed. by R. Heitefuss and P.H. Williams), Springer-Verlag, Berlin, S. 247 - 269
- SCHEFFER, R. P. (1983). Toxins as chemical determinants of plant disease. In: Toxins and Plant Pathogenesis, eds. J. M. Daly & B. J. Deverall, Academic Press, Sydney, 1 - 40
- SCHLÖSSER, E. (1983). Allgemeine Phytopathologie.  
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 280 Seiten
- SCHOPFER, P. (1986). Experimentelle Pflanzenphysiologie.  
Band 1: Einführung in die Methoden.  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 178 Seiten
- SCHRAMM, H. & HOFFMANN, G. M. (1991). Biologische Grundlagen zur integrierten Bekämpfung von *Phoma lingam* (Teleomorph: *Leptosphaeria maculans* (Desmaz.) Ces & De Not.), dem Erreger der Wurzelhals- und Stängelfäule an Winterraps.  
Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 98, 581 - 596
- SJÖDIN, C., NYHAMMAR, T. & GLIMELIUS, K. (1988). Effect of toxic metabolites produced by *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. on protoplasts, cells, and plants of hosts and non-hosts of the pathogen.  
Physiological and Molecular Plant Pathology 32, 301 - 312
- SJÖDIN, C. & GLIMELIUS, K. (1989). Differences in response to the toxin sirodesmin PL produced by *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. on protoplasts, cell aggregates and intact plants of resistant and susceptible *Brassica* accessions.  
Theoretical Applied Genetics 77, 76 - 80
- SMITH, B.L., EMBLING, P.P., TOWERS, N.R., WRIGHT, D.E. & PAYNE, E. (1977) The protective effect of zinc sulfate in experimental poisoning of sheep.  
New Zealand Veterinary Journal 25, 124 - 127

STIERLE, A. C. and CARDELLINA, J. H. (1989). Phytotoxins from *Alternaria alternata*, a pathogen of spotted knapweed.  
Journal of Natural Products 52, 42 - 47

STILL, C. W., KAHN, M. & MITRA, A. (1978). Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution.  
Journal of Organic Chemistry 43, 2932 - 2925

STROBEL, G. A. (1982). Phytotoxins.  
Annual Review of Biochemistry 51, 309 - 333

STRUNZ, G. M., KAKUSHIMA, M, STILLWELL, M. A. & HEISSNER, C. J. (1973). Hyalodendrin: a new fungitoxic epidithiopiperazine produced by a *Hyalodendron* species.  
Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I, 2600 - 2602

STRUNZ, G. M., KAKUSHIMA, M & STILLWELL, M. A. (1975). An epitetradioxo-piperazine with 3S,6S configuration from *Hyalodendron* species.  
Canadian Journal of Chemistry 53, 295 - 297

TAYLOR, A. (1971). The toxicology of sporidesmins and other epipolythoadioxopiperazines. In: "Microbial Toxins", eds. S. Kadis, A. Ciegler and S.J. Ajl, Vol. VII, chapter 10, Academic Press New York, 337 - 376

THURLING, N. & VENN, L. A. (1977). Variation in the responses of rapeseed (*Brassica napus* and *B. campestris*) cultivars to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) infection.  
Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 17, 445 - 451

TOWERS, N.R. (1978). Effect of zinc on the toxicity of the mycotoxin sporidesmin to the rat.  
Life Science 20, 413 -418

TURNER, N.X. & GRANITI, A. (1969). Fusicoccin, : a fungal toxin that opens stomata.  
Nature 223, 1070 - 1071

TURNER, J.G. (1984). Role of toxins in plant disease.  
In: Plant diseases: infection, damage and loss, eds. by R.K.S. Wood & G.J. Jellis  
Blackwell Scientific Publications, Oxford, 3 - 12

VAN ALFEN, N.K. & TURNER, N.C. (1975). Changes in alfalfa stem conductance induced by *Corynebacterium insidiosum* toxin.  
Plant Physiology 55, 559 - 561

VAN ALFEN, N.K. & ALLARD-TURNER, V. (1979). Susceptibility of plants to vascular disruption by macromolecules.  
Plant Physiology 63, 1072 - 1075

VANNIASINGHAM, V.M. & GILLIGAN, C.A. (1989). Effects of host, pathogen and environmental factors on latent period and production of pycnidia of *Leptosphaeria maculans* on oilseed rape leaves in controlled environments.  
Mycological Research 93, 167 - 174

VAN STADEN, J. & DAVEY, J. E. (1979). The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins.  
Plant, Cell and Environment 2, 93 -106

WATRUD, L.S., BALDWIN, J.K., MILLER, R.J. & KOEPPE, D.E. (1975). Induction of a sensitive response to *Helminthosporium maydis* race T toxin in resistant mitochondria of corn (*Zea mays* L.) by removal of the outer mitochondrial membrane. *Plant Physiology* 56, 216 - 221

WILLIAMS, P.H. (1992). Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14, 30 - 35

WITTERN, I. & KRÜGER, W. (1985). Sporenkeimung von *Phoma lingam* (Tode ex. Fr.) Desm. und Resistenzprüfung bei Raps im Gewächshaus. *Phytopathologische Zeitschrift* 113, 113 - 124

WOOD, R. K. S. (1989). Toxins and disease resistance. In: *Phytotoxins and Plant Pathogenesis*, eds. A. Graniti et al. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 267 - 273

YODER, O. C. (1980). Toxins in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 18, 103 - 129

YOUNGMAN, R.J & ELSTNER, E.F. (1988). Herbizide In: *Schadwirkungen auf Pflanzen: Lehrbuch der Pflanzentoxikologie*. Eds. B. HOCK & E. Elstner, 2. Auflage, BI Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich, 132 - 141

7 **Anhang**

**A1** Tabelle zur Abbildung 24

Läsionsradien (mm) und Läsionsausprägungen (Boniturnoten siehe Tab. 1) auf toxinbehandelten Kotyledonen (1,5 µg Sirodesmin PL / Verletzung) der Sorte Jet Neuf bei 20 °C und bei unterschiedlicher Belichtung (hell: 16 Std.-Tag, Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen).

Tage nach der Toxinbehandlung	Läsionsradius		Läsionsausprägung	
	dunkel $\bar{x} \pm se$	hell $\bar{x} \pm se$	dunkel $\bar{x} \pm se$	hell $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0
1	0,03 ± 0,03	0,81 ± 0,15	0,06 ± 0,06	1,63 ± 0,15
2	0,86 ± 0,06	1,16 ± 0,08	1,00 ± 0,00	2,44 ± 0,16
3	1,13 ± 0,06	1,25 ± 0,06	1,13 ± 0,09	3,25 ± 0,17
4	1,13 ± 0,06	1,31 ± 0,06	1,25 ± 0,11	4,00 ± 0,00

**A2** Tabelle zur Abbildung 25

Einfluss der Temperatur auf die Läsionsausprägung (Boniturnoten siehe Tab. 1) toxinbehandelter Keimblätter der Sorte Jet Neuf bei 15 und 20 °C im 16 Std.-Tag (0,15, 0,5 und 1,5 µg Sirodesmin PL je Verletzungsstelle, Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen).

Tage nach der Toxinbehandlung	0,15 µg		0,5 µg		1,5 µg Sirodesmin PL	
	15 °C $\bar{x} \pm se$	20 °C $\bar{x} \pm se$	15 °C $\bar{x} \pm se$	20 °C $x \pm se$	15 °C $\bar{x} \pm se$	20 °C $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0,94 ± 0,19	0	1,63 ± 0,15
2	0	0,50 ± 0,13	0,63 ± 0,13	1,81 ± 0,14	1,25 ± 0,11	2,44 ± 0,16
3	0,38 ± 0,13	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,94 ± 0,19	1,75 ± 0,14	3,25 ± 0,17
4	0,44 ± 0,13	1,06 ± 0,06	1,38 ± 0,13	3,50 ± 0,13	2,69 ± 0,12	4,00 ± 0,00

**A3** Tabelle zur Abbildung 26

Einfluss der Belichtung auf die Läsionsausprägung (Boniturnoten siehe Tab. 1) toxinbehandelter Keimblätter der Sorte Jet Neuf bei 20 °C im 16 Std.-Tag und einer Inkubation in Dunkelheit (0,15, 0,5 und 1,5 µg Sirodesmin PL pro Verletzungsstelle, Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen).

Tage nach der Toxinbehandlung	0,15 µg		0,5 µg		1,5 µg Sirodesmin PL	
	dunkel $\bar{x} \pm se$	hell $\bar{x} \pm se$	dunkel $\bar{x} \pm se$	hell $\bar{x} \pm se$	dunkel $\bar{x} \pm se$	hell $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0,94 ± 0,19	0	1,63 ± 0,15
2	0	0,50 ± 0,13	0,25 ± 0,11	1,81 ± 0,14	1,00 ± 0,00	2,44 ± 0,16
3	0	1,00 ± 0,00	0,25 ± 0,11	2,94 ± 0,19	1,13 ± 0,09	3,25 ± 0,17
4	0,19 ± 0,10	1,06 ± 0,06	0,25 ± 0,11	3,50 ± 0,13	1,25 ± 0,11	4,00 ± 0,00

**A4** Tabelle zur Abbildung 27

Einfluss von zwei unterschiedlichen Belichtungsterminen (Erklärung siehe S.10) auf die Läsionsausprägung (Boniturnoten siehe Tab. 1) toxinbehandelter Keimblätter der Sorte Jet Neuf bei 20 °C (0,15, 0,5 und 1,5 µg Sirodesmin PL pro Verletzungsstelle, Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen).

Tage nach der Toxinbehandlung	0,15 µg		0,5 µg		1,5 µg Sirodesmin PL	
	h2d2	d2h	h2d2	d2h2	h2d2	d2h2
	$\bar{x} \pm se$	$\bar{x} \pm se$				
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	1,00 ± 0,13	0,06 ± 0,06	1,25 ± 0,11	0,13 ± 0,09
2	0,75 ± 0,17	0	1,63 ± 0,13	0,38 ± 0,13	2,19 ± 0,14	0,75 ± 0,11
3	1,00 ± 0,18	0,25 ± 0,11	1,68 ± 0,12	2,38 ± 0,18	2,19 ± 0,10	2,50 ± 0,13
4	1,00 ± 0,18	0,50 ± 0,13	1,75 ± 0,11	3,31 ± 0,20	2,68 ± 0,12	3,69 ± 0,12

**A5** Tabelle zur Abbildung 28

Übersicht zum Einfluss unterschiedlicher Belichtungstermine (Erklärung siehe S.10) auf die Läsionsausprägung (Boniturnoten siehe Tab. 1) toxinbehandelter Keimblätter der Sorte Jet Neuf bei 20 °C (1,5 µg Sirodesmin PL pro Verletzungsstelle, Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen).

Tage nach der Toxinbehandlung	1,5 µg Sirodesmin PL					
	d4	h1d3	h2d2	d2h2	d1h3	h4
	$\bar{x} \pm se$	$\bar{x} \pm se$	$\bar{x} \pm se$	$\bar{x} \pm se$	$\bar{x} \pm se$	$\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0	0	0
1	0,06 ± 0,06	1,06 ± 0,14	1,25 ± 0,11	0,13 ± 0,09	0,13 ± 0,09	1,63 ± 0,15
2	1,00 ± 0,00	1,44 ± 0,13	2,19 ± 0,14	0,75 ± 0,11	2,00 ± 0,13	2,44 ± 0,16
3	1,13 ± 0,09	1,50 ± 0,13	2,19 ± 0,10	2,50 ± 0,13	2,63 ± 0,13	3,25 ± 0,17
4	1,25 ± 0,11	1,81 ± 0,10	2,68 ± 0,12	3,69 ± 0,12	3,88 ± 0,09	4,00 ± 0,00

**A6** Tabelle zur Abbildung 30

Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung in der inkompatiblen Interaktion der Sorte Quinta mit dem nichtaggressiven Isolat PHW 1261. Die Toxinapplikation erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 32 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation und der Toxinbehandlung	infektionsbedingtes Läsionswachstum (mm Läsionsradius)			
	Kontrolle	0,15 µg	0,5 µg	1,5 µg
	$\bar{x} \pm se$	$\bar{x} \pm se$	$\bar{x} \pm se$	$\bar{x} \pm se$
6	0	0	0	0
9	0	0	0,65 ± 0,07	0,19 ± 0,07
12	0	0,02 ± 0,02	0,79 ± 0,08	0,29 ± 0,12
15	0	0,02 ± 0,02	1,10 ± 0,10	0,29 ± 0,12
18	0	0,04 ± 0,03	1,19 ± 0,16	0,27 ± 0,12

**A7** Tabelle zur Abbildung 31

Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung in der inkompatiblen Interaktion der Sorte Jet Neuf mit dem nichtaggressiven Isolat PHW 1261. Die Toxinapplikation erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 24 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation und der Toxinbehandlung	infektionsbedingtes Läsionswachstum (mm Läsionsradius)			
	Kontrolle $\bar{x} \pm se$	0,15 µg $\bar{x} \pm se$	0,5 µg $\bar{x} \pm se$	1,5 µg $\bar{x} \pm se$
6	0	0	0	0
9	0	0	0,15 ± 0,06	0,02 ± 0,03
12	0	0	0,56 ± 0,11	0,29 ± 0,08
15	0	0,02 ± 0,02	0,71 ± 0,13	0,38 ± 0,08
18	0	0,04 ± 0,03	0,91 ± 0,15	0,67 ± 0,14

**A8** Tabelle zur Abbildung 32

Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung in der inkompatiblen Interaktion von *B. juncea* cv. Aurea mit dem aggressiven Isolat Ila 1. Die Toxinapplikation erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 32 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation und der Toxinbehandlung	infektionsbedingtes Läsionswachstum (mm Läsionsradius)			
	Kontrolle $\bar{x} \pm se$	0,15 µg $\bar{x} \pm se$	0,5 µg $\bar{x} \pm se$	1,5 µg $\bar{x} \pm se$
6	0	0	0	0
9	0	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,05	0
12	0	0,20 ± 0,06	0,31 ± 0,06	0,11 ± 0,05
15	0	0,21 ± 0,06	0,36 ± 0,05	0,18 ± 0,05
18	0	0,34 ± 0,07	0,56 ± 0,06	0,41 ± 0,05

**A9** Tabelle zur Abbildung 33

Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung in der inkompatiblen Interaktion der Sorte Quinta mit dem aggressiven Isolat MIX 7. Die Toxinapplikation erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 32 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation und der Toxinbehandlung	infektionsbedingtes Läsionswachstum (mm Läsionsradius)			
	Kontrolle $\bar{x} \pm se$	0,15 µg $\bar{x} \pm se$	0,5 µg $\bar{x} \pm se$	1,5 µg $\bar{x} \pm se$
6	0	0	0	0
9	0,06 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,16 ± 0,05	0
12	0,22 ± 0,04	0,67 ± 0,06	0,80 ± 0,09	0,55 ± 0,07
15	0,33 ± 0,05	0,84 ± 0,07	1,27 ± 0,10	0,67 ± 0,05
18	0,47 ± 0,06	1,05 ± 0,06	1,59 ± 0,16	1,33 ± 0,10

**A10** Tabelle zur Abbildung 34

Effekt einer Behandlung mit Sirodesmin PL auf die Läsionsentwicklung in der kompatiblen Interaktion der Sorte Quinta mit dem aggressiven Isolat Ila 1. Die Toxinapplikation erfolgte gleichzeitig mit der Applikation des Inokulums (Durchschnittswerte von 32 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation und der Toxinbehandlung	infektionsbedingtes Läsionswachstum (mm Läsionsradius)			
	Kontrolle $\bar{x} \pm se$	0,15 µg $\bar{x} \pm se$	0,5 µg $\bar{x} \pm se$	1,5 µg $\bar{x} \pm se$
6	0	0	0	0
9	0	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,04
12	0,69 ± 0,14	0,99 ± 0,15	0,11 ± 0,04	0,08 ± 0,04
15	3,75 ± 0,15	4,14 ± 0,22	2,03 ± 0,30	0,09 ± 0,05
18	5,11 ± 0,17	5,13 ± 0,21	2,94 ± 0,29	0,49 ± 0,13

**A11** Tabelle zur Abbildung 35

Effekt einer Keimblattabtrennung auf die Entwicklung der Läsionsradien und auf die Hyphenlängen des aggressiven Isolates Ila 1 (A1) in der kompatiblen Interaktion mit Quinta (Durchschnittswerte von 12 Wiederholungen für Läsionsradien und von 6 Wiederholungen für Hyphenlängen).

Tage nach der Inokulation	Läsionsradien in mm		Hyphenlängen in mm	
	intakt $\bar{x} \pm se$	abgetrennt $\bar{x} \pm se$	intakt $\bar{x} \pm se$	abgetrennt $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0
3	0	0	0,20 ± 0,06	0,38 ± 0,05
6	0	0	0,57 ± 0,11	0,70 ± 0,12
9	1,25 ± 0,25	0,25 ± 0,16	1,58 ± 0,33	3,11 ± 0,62
12	5,38 ± 0,21	3,00 ± 0,62	5,25 ± 0,54	5,50 ± 0,62

**A12** Tabelle zur Abbildung 36

Effekt einer Keimblattabtrennung auf die Entwicklung der Läsionsradien und auf die Hyphenlängen des nichtaggressiven Isolates PHW 1261 (NA) in der inkompatiblen Interaktion mit Quinta (Durchschnittswerte von 12 Wiederholungen für Läsionsradien und von 6 Wiederholungen für Hyphenlängen).

Tage nach der Inokulation	mm Läsionsradien		mm Hyphenlängen	
	intakt $\bar{x} \pm se$	abgetrennt $\bar{x} \pm se$	intakt $\bar{x} \pm se$	abgetrennt $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0
3	0	0	0,03 ± 0,01	0,21 ± 0,03
6	0	0,10 ± 0,07	0,05 ± 0,01	0,68 ± 0,13
9	0	0,44 ± 0,15	0,06 ± 0,02	1,35 ± 0,17
12	0	0,58 ± 0,08	0,12 ± 0,05	2,50 ± 0,32

**A13** Tabelle zur Abbildung 37

Effekt einer Keimblattabtrennung auf die Entwicklung der Läsionsradien und auf die Hyphenlängen des aggressiven Isolates MIX 7 (A2) in der inkompatiblen Interaktion mit Quinta (Durchschnittswerte von 12 Wiederholungen für Läsionsradien und von 6 Wiederholungen für Hyphenlängen).

Tage nach der Inokulation	mm Läsionsradien		mm Hyphenlängen	
	intakt $\bar{x} \pm se$	abgetrennt $\bar{x} \pm se$	intakt $\bar{x} \pm se$	abgetrennt $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0
3	0	0	0,16 ± 0,03	0,48 ± 0,03
6	0	0,05 ± 0,02	0,24 ± 0,04	0,56 ± 0,16
9	0,75 ± 0,25	0,38 ± 0,21	0,82 ± 0,17	0,85 ± 0,11
12	1,04 ± 0,13	0,92 ± 0,15	2,08 ± 0,19	3,67 ± 0,25

**A14** Tabelle zur Abbildung 38

Effekt einer Abtrennung infizierter Keimblätter auf die Hyphenentwicklung (mm) von drei *Phoma*-isolaten der Pathotypgruppen NA (PHW 1261) A1 (IIa 1) und A2 (MIX 7) auf *B. juncea* cv. Aurea. Die Abtrennung erfolgte am Tag der Inokulation (Durchschnittswerte von je 6 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation	intakte Keimblätter			abgetrennte Keimblätter		
	PHW 1261 $\bar{x} \pm se$	IIa 1 $\bar{x} \pm se$	MIX 7 $\bar{x} \pm se$	PHW 1261 $\bar{x} \pm se$	IIa 1 $\bar{x} \pm se$	MIX 7 $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0,13 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,21 ± 0,04
6	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,03	1,51 ± 0,31	1,18 ± 0,15	0,35 ± 0,03
9	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,05	3,78 ± 0,30	2,44 ± 0,46	2,30 ± 0,27
12	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,04	4,00 ± 0,47	4,00 ± 0,37	2,92 ± 0,35

**A15** Tabelle zur Abbildung 39

Effekt einer Kinetinbehandlung auf das Hyphenwachstum (mm) der *Phoma*-Isolate IIa 1 (A1), PHW 1261(NA), MIX 7 (A2) in abgetrennten Kotyledonen der Rapssorte Quinta. Die Keimblätter wurden unmittelbar nach der Inkubation abgetrennt und in mit 100 µg / ml Kinetin getränktem Filterpapier inkubiert. Eine Behandlung ohne Kinetin diente als Kontrolle. Die Abtrennung erfolgte am Tag der Inokulation (Durchschnittswerte von je 6 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation	100 µg / ml Kinetin			ohne Kinetin		
	PHW 1261 $\bar{x} \pm se$	IIa 1 $\bar{x} \pm se$	MIX 7 $\bar{x} \pm se$	PHW 1261 $\bar{x} \pm se$	IIa 1 $\bar{x} \pm se$	MIX 7 $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0	0	0
3	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,38 ± 0,05	0,48 ± 0,03
6	0,43 ± 0,05	0,45 ± 0,07	0,45 ± 0,08	0,68 ± 0,13	0,70 ± 0,12	0,56 ± 0,16
9	0,41 ± 0,08	2,63 ± 0,24	0,82 ± 0,05	1,35 ± 0,17	3,11 ± 0,62	0,85 ± 0,11
12	0,68 ± 0,14	3,87 ± 0,32	2,15 ± 0,17	2,50 ± 0,32	5,50 ± 0,62	3,67 ± 0,25

**A16** Tabelle zur Abbildung 41

Myzelradien des Isolates Ila 1 auf Czapek-Dox-Agar mit 0, 0,1, 1, 2 und 10 mM Zinkchlorid (Mittelwerte von je sechs Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation	mm Myzelradius				
	Kontrolle $\bar{x} \pm se$	0,1 mM $\bar{x} \pm se$	1,0 mM $\bar{x} \pm se$	2,0mM $\bar{x} \pm se$	10,0 mM ZnCl <sub>2</sub> $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0	0
6	07,7 ± 0,48	07,3 ± 0,48	08,0 ± 0,39	07,8 ± 0,36	02,2 ± 0,11
9	08,3 ± 0,61	08,5 ± 0,37	10,3 ± 0,44	10,6 ± 0,37	03,4 ± 0,37
12	09,3 ± 0,65	10,3 ± 0,40	11,0 ± 0,47	13,4 ± 0,72	04,5 ± 0,41
15	10,3 ± 0,66	10,7 ± 0,54	11,4 ± 0,40	15,7 ± 0,65	05,7 ± 0,31
18	10,7 ± 0,54	11,5 ± 0,56	13,4 ± 0,49	16,9 ± 1,00	07,9 ± 0,38
21	10,9 ± 0,53	11,9 ± 0,40	14,2 ± 0,46	17,9 ± 1,09	09,9 ± 1,17
24	11,4 ± 0,49	12,6 ± 0,45	14,5 ± 0,48	18,8 ± 1,11	11,9 ± 0,59
27	12,2 ± 0,42	12,9 ± 0,60	14,7 ± 0,44	18,9 ± 0,65	12,9 ± 0,76
30	11,7 ± 0,51	13,4 ± 0,65	14,6 ± 0,37	19,4 ± 0,82	13,7 ± 0,82
33	12,0 ± 0,59	14,4 ± 0,66	16,1 ± 0,58	20,2 ± 1,35	14,9 ± 0,60
36	12,5 ± 0,37	15,1 ± 0,51	16,2 ± 0,56	20,7 ± 1,31	16,3 ± 1,03
39	12,7 ± 0,63	15,5 ± 0,56	17,2 ± 0,69	21,2 ± 1,24	18,9 ± 1,87

**A17** Tabelle zur Abbildung 50

Entwicklung der vertikalen Läsionslängen (mm) auf Hypokotyle der Sorten Cobra und Jet Neuf in der Interaktion mit dem Isolat Ila 1. Die Hypokotyle wurden bei Belichtung im 16 Std.-Tag und bei Beschattung inkubiert. Die Messungen wurden vom 18. bis zum 39. Tag nach der Inokulation durchgeführt (Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation	Jet Neuf		Cobra	
	hell $\bar{x} \pm se$	dunkel $\bar{x} \pm se$	hell $\bar{x} \pm se$	dunkel $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0
18	04,1 ± 0,28	05,3 ± 0,30	07,5 ± 0,52	09,9 ± 0,47
21	04,6 ± 0,38	07,0 ± 0,72	10,3 ± 0,58	15,8 ± 1,09
24	04,8 ± 0,44	09,8 ± 1,08	16,8 ± 1,03	23,2 ± 1,31
27	04,8 ± 0,63	10,5 ± 1,20	16,2 ± 1,69	25,6 ± 2,00
30	06,3 ± 0,60	10,9 ± 1,97	22,1 ± 2,19	27,5 ± 2,68
33	06,7 ± 0,90	12,6 ± 2,77	25,8 ± 2,27	32,8 ± 2,58
36	08,8 ± 1,52	12,3 ± 1,63	26,5 ± 2,99	31,6 ± 3,68
39	08,9 ± 1,24	13,0 ± 1,24	26,6 ± 2,76	32,8 ± 2,69

**A18** Tabelle zur Abbildung 51

Entwicklung der Läsionsumfänge (%) auf Hypokotyle der Sorten Cobra und Jet Neuf in der Interaktion mit dem Isolat Ila 1. Die Hypokotyle wurden bei Belichtung im 16 Std.-Tag und bei Beschattung inkubiert. Die Bonituren wurden vom 18. bis zum 39. Tag nach der Inokulation durchgeführt (Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation	Jet Neuf		Cobra	
	hell $\bar{x} \pm se$	dunkel $\bar{x} \pm se$	hell $\bar{x} \pm se$	dunkel $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0
18	17,8 ± 2,63	30,8 ± 2,58	45,9 ± 4,23	52,3 ± 3,00
21	19,7 ± 3,17	39,1 ± 4,43	56,1 ± 4,22	65,1 ± 4,23
24	18,1 ± 3,17	39,8 ± 4,63	58,4 ± 5,56	72,5 ± 4,45
27	20,0 ± 3,60	42,9 ± 4,89	56,7 ± 5,54	69,2 ± 4,86
30	25,3 ± 3,52	45,6 ± 6,44	71,8 ± 5,42	77,5 ± 6,05
33	26,6 ± 3,95	57,1 ± 11,95	74,1 ± 4,81	76,9 ± 5,46
36	27,0 ± 5,98	57,5 ± 10,13	70,0 ± 7,15	83,8 ± 7,30
39	26,9 ± 4,65	63,8 ± 9,44	71,3 ± 6,93	86,3 ± 6,25

**A19** Tabelle zur Abbildung 52

Entwicklung der Läsionsflächen (%) auf Hypokotyle der Sorten Cobra und Jet Neuf in der Interaktion mit dem Isolat Ila 1. Die Hypokotyle wurden bei Belichtung im 16 Std.-Tag und bei Beschattung inkubiert. Die Bonituren wurden vom 18. bis zum 39. Tag nach der Inokulation durchgeführt (Durchschnittswerte von 16 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation	Jet Neuf		Cobra	
	hell $\bar{x} \pm se$	dunkel $\bar{x} \pm se$	hell $\bar{x} \pm se$	dunkel $\bar{x} \pm se$
0	0	0	0	0
18	06,7 ± 0,83	11,1 ± 1,09	14,3 ± 1,16	21,1 ± 2,06
21	08,8 ± 0,92	16,7 ± 2,23	21,4 ± 1,89	26,4 ± 2,37
24	09,9 ± 1,22	20,3 ± 3,34	23,1 ± 1,82	40,9 ± 4,38
27	08,9 ± 1,33	18,6 ± 2,62	28,8 ± 3,70	41,7 ± 4,90
30	12,3 ± 1,19	21,3 ± 6,46	32,5 ± 3,41	43,1 ± 6,81
33	14,4 ± 1,75	21,5 ± 6,55	31,3 ± 3,10	43,8 ± 6,60
36	15,2 ± 2,39	21,8 ± 2,20	35,0 ± 3,54	42,5 ± 4,21
39	15,1 ± 1,89	24,0 ± 2,16	32,5 ± 1,44	44,0 ± 4,84

**A20** Tabelle zur Abbildung 53

Läsionsentwicklung und Bildung von Sirodesmin PL durch das aggressive Isolat Iia 1 in den kompatiblen Interaktionen mit den Rapssorten Jet Neuf und Cobra auf beschatteten Hypokotylen. Gemessen wurden die vertikalen Läsionslängen (mm) und die Bildung von Sirodesmin PL ( $\mu\text{g} / \text{g}$  FGW) vom 18. bis zum 39 Tag nach der Inokulation (Durchschnittswerte für die Läsionslängen von 16 Wiederholungen, für die Sirodesmin PL Bildung von 4 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation	$\mu\text{g}$ Sirodesmin PL / g Frischgewicht		mm vertikale Läsionslänge	
	Jet Neuf $\bar{x} \pm \text{se}$	Cobra $\bar{x} \pm \text{se}$	Jet Neuf $\bar{x} \pm \text{se}$	Cobra $\bar{x} \pm \text{se}$
0	0	0	0	0
18	0	0	05,3 $\pm$ 0,30	09,9 $\pm$ 0,47
21	0,3 $\pm$ 0,32	1,2 $\pm$ 1,19	07,0 $\pm$ 0,72	15,8 $\pm$ 1,09
24			09,8 $\pm$ 1,08	23,2 $\pm$ 1,31
27	0,8 $\pm$ 0,84	4,0 $\pm$ 1,09	10,5 $\pm$ 1,20	25,6 $\pm$ 2,00
30			10,9 $\pm$ 1,97	27,5 $\pm$ 2,68
33	0,7 $\pm$ 0,72	5,4 $\pm$ 1,73	12,6 $\pm$ 2,77	32,8 $\pm$ 2,58
36			12,3 $\pm$ 1,63	31,6 $\pm$ 3,68
39	5,5 $\pm$ 2,49	11,0 $\pm$ 3,70	13,0 $\pm$ 1,24	32,8 $\pm$ 2,69

**A21** Tabelle zur Abbildung 54

Läsionsentwicklung und Bildung von Sirodesmin PL durch das aggressive Isolat Iia 1 in den kompatiblen Interaktionen mit den Rapssorten Jet Neuf und Cobra auf unbeschatteten Hypokotylen. Die Hypokotyle waren dem Tageslicht und der Zusatzbeleuchtung im Gewächshaus ausgesetzt. Gemessen wurden die vertikalen Läsionslängen (mm) und die Bildung von Sirodesmin PL ( $\mu\text{g} / \text{g}$  FGW) vom 18. bis zum 39 Tag nach der Inokulation (Durchschnittswerte für die Läsionslängen von 16 Wiederholungen, für die Sirodesmin PL Bildung von 4 Wiederholungen).

Tage nach der Inokulation	$\mu\text{g}$ Sirodesmin PL / g Frischgewicht		mm vertikale Läsionslänge	
	Jet Neuf $\bar{x} \pm \text{se}$	Cobra $\bar{x} \pm \text{se}$	Jet Neuf $\bar{x} \pm \text{se}$	Cobra $\bar{x} \pm \text{se}$
0	0	0	0	0
18	0	0	04,1 $\pm$ 0,28	07,5 $\pm$ 0,52
21	0	1,6 $\pm$ 1,56	04,6 $\pm$ 0,38	10,3 $\pm$ 0,58
24			04,8 $\pm$ 0,44	16,8 $\pm$ 1,03
27	0	0,7 $\pm$ 0,71	04,8 $\pm$ 0,63	16,2 $\pm$ 1,69
30			06,3 $\pm$ 0,60	22,1 $\pm$ 2,19
33	0	1,6 $\pm$ 0,78	06,7 $\pm$ 0,90	25,8 $\pm$ 2,27
36			08,8 $\pm$ 1,52	26,5 $\pm$ 2,99
39	0,7 $\pm$ 0,30	1,4 $\pm$ 0,18	08,9 $\pm$ 1,24	26,6 $\pm$ 2,76

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. H.-H. Hoppe für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung bedanken. Seine ständige Bereitschaft zu fruchtbaren Diskussionen und die Gewährung relativ großer Eigenständigkeit haben diese Arbeit wesentlich gefördert.

Einen weiteren Dank richte ich an alle früheren Mitarbeiter im Fachgebiet Phytomedizin des FB 11 in Witzenhausen, die mich in einer freundlichen und hilfsbereiten Atmosphäre unterstützten.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken, die das Vorhaben aus dem Titel Ho 613/10 förderte.

Schließlich, aber sicher nicht zuletzt danke ich meiner Frau für die Unterstützung und Geduld, mit der sie zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.