

Melanie Molnar

Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau
Siebeldingen

Epidemiologie des Esca-Erregers
Phaeomoniella chlamydospora
und eine neue
Bekämpfungsmöglichkeit mittels
eines Wundverschlusses aus
elektrogesponnenen Polymeren



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt/Contact:
Melanie Molnar
Wilhelm-Wüst-Str. 6
76829 Landau

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind.

The publication series „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ publishes doctoral dissertations originating from research doctorates and completed at the Julius Kühn-Institut (JKI) either in close collaboration with universities or as an outstanding independent work in the JKI research fields.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.julius-kuehn.de Bereich Veröffentlichungen.

The monographs are distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB) and OPEN ACCESS through the JKI website www.julius-kuehn.de (see Publications).

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.julius-kuehn.de> Bereich Veröffentlichungen.

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.julius-kuehn.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek (German National Library)

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.dnb.de>.

ISBN 978-3-95547-075-3
DOI 10.5073/dissjki.2018.007

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany



Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons – Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen – 4.0 Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

This work is licensed under a [Creative Commons – Attribution – ShareAlike – 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).



UNIVERSITÄT
HOHENHEIM

200
1818
2018
JAHRE

Aus dem Institut für Phytomedizin
Universität Hohenheim
Fachgebiet Phytopathologie
Prof. Dr. Ralf Vögele

**Epidemiologie des Esca-Erregers *Phaeomoniella chlamydospora*
und eine neue Bekämpfungsmöglichkeit mittels eines
Wundverschlusses aus elektrogenesponnenen Polymeren**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Agrarwissenschaften

vorgelegt der Fakultät Agrarwissenschaften

von
Melanie Molnar
aus Augsburg

April 2018

Die vorliegende Arbeit wurde am 30.10.2018 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften" angenommen.

Datum der mündlichen Prüfung: 05.12.2018

Dekan:	Prof. Dr. Ralf Vögele
Leiter der Prüfung:	Prof. Dr. Stefan Böttinger
Berichterstatter, 1. Prüfer:	Prof. Dr. Ralf Vögele
Mitberichterstatter, 2. Prüfer:	Prof. Dr. Michael Fischer
3. Prüfer:	Prof. Dr. Dr. Claus Zebitz

...der Wein erfreue des Menschen Herz...

Psalm 104:15

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abbildungsverzeichnis.....	iv
Tabellenverzeichnis.....	vi
Abkürzungsverzeichnis.....	vii
Zusammenfassung.....	ix
Abstract.....	xi
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Esca-Krankheit.....	2
1.2. Sporen der Pilze des Esca-Komplexes.....	3
1.3. Molekulargenetischer Hintergrund von <i>Pch</i>	4
1.3.1. Nachweismethoden.....	5
1.3.2. Aktuelle Kontrollmechanismen.....	7
1.4. Electrospinning und seine Bedeutung für den Pflanzenschutz.....	8
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1. Lage und Beschreibung der Versuchsanlagen.....	11
2.2. Bonitur auf Esca-Symptomatik.....	11
2.3. Sporenfallen.....	13
2.4. Nachweis von <i>Pch</i> mittels Nested-PCR.....	14
2.5. Nachweis von Stammunterschieden mittels Nested-PCR.....	14
2.6. Verrechnung des Nachweises aus den Sporenfallen mit Wetterdaten.....	16
2.7. Stammsammlung von <i>Pch</i>	17
2.8. RAMS-Analyse.....	18
2.9. Klonierung von PCR-Amplifikaten.....	19
2.10. PCR mit Primern aus Polymorphismen.....	20
2.11. qPCR mittels SYBR Green®.....	20
2.12. verwendete elektrogewebene Vliese.....	21
2.13. Dichtigkeitstests von Vliesen.....	24
2.13.1. Im Labor.....	24
2.13.2. Im Saranhaus.....	24
2.14. Applikationstest von Vliesen.....	25
2.15. Alterungstests von Vliesen.....	25
2.15.1. Alterungstest im Freiland.....	25
2.15.2. Alterungstest im Labor.....	27

2.16.	Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	28
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Boniturergebnisse der Esca-Symptomatik in den Parzellen Chardonnay und Phoenix	31
3.2.	Nachweis von <i>Pch</i> in Sporenfallen	33
3.3.	Analyse der Sporenfallen mit Primern aus den RAMS-Analysen	36
3.4.	Quantitativer Nachweis von <i>Pch</i> in den Sporenfallen.....	38
3.5.	Korrelation des Sporennachweises mit den Wetterdaten	41
3.6.	Polymorphismen in den RAMS-Primern	43
3.7.	Sequenzierbare InDels in der Stammsammlung	44
3.7.1.	InDel bei RAMS5.....	44
3.7.2.	InDel bei RAMS9.....	46
3.7.3.	möglicher InDel bei RAMS2	48
3.8.	Polymorphismen aufgrund zusätzlicher Primer-Bindungsstellen	48
3.8.1.	RAMS1	48
3.8.2.	RAMS3	49
3.8.3.	RAMS10	50
3.8.4.	RAMS11	51
3.8.5.	RAMS12	51
3.9.	Clusterung der Stämme	52
3.10.	Vergleich der Haplotypen/Cluster mit dem geographischen Ursprung.....	54
3.11.	Vergleich der Fasermatten	55
3.12.	Materialveränderungen durch Klima- und Bestrahlungstests	57
3.13.	Dichtigkeitstests	59
3.13.1.	Dichtigkeitstests im Gewächshaus	59
3.13.2.	Dichtigkeitsversuche im Labor	60
3.13.3.	Einfluss der Polymerkonzentration und des Spinnverfahrens auf die Dichtigkeit....	63
3.14.	Dichtigkeitstest der Vliese nach Alterungstests	64
3.14.1.	Vliese aus PLGA.....	64
3.14.2.	Vliese aus PDLA	65
3.15.	Applikationstest.....	65
3.15.1.	Im Gewächshaus	65
3.15.2.	Im Freiland	67
3.16.	Abbaubarkeitstests der Vliese	69
3.16.1.	Abbaubarkeit im Boden einer Rebanlage.....	69
3.16.2.	Abbaubarkeit in der Traubenzone	71
4.	Diskussion	74

4.1.	Auftreten der Esca-Symptomatik in den Referenzanlagen	74
4.2.	Nachweis von <i>Pch</i> in den Sporenfallen.....	75
4.3.	Nachweis von <i>Pch</i> in den untersuchten Anlagen und Korrelation mit dem Wetter.....	76
4.4.	qPCR von <i>Pch</i> -DNA	78
4.5.	RAMS-Primer und mögliche Korrelation mit geographischem Ursprung.....	79
4.5.1.	Auswahl der RAMS-Primer und Analyse von <i>Pch</i> mittels RAMS-Primer.....	79
4.5.2.	Auswertung der mittels RAMS-Primern gefundenen Polymorphismen	81
4.5.3.	Zuordnung von Haplotypen und die Vermehrung von <i>Pch</i>	82
4.5.4.	Verwandtschaftsanalyse der in der Arbeit verwendeten Isolate.....	83
4.5.5.	Beziehung zwischen Haplotypen und geographischem Ursprung	84
4.6.	Nachweis von Stammgruppen in DNA-Proben von Sporenfallen und Rebholz.....	85
4.7.	Vergleich der Vliese.....	87
4.8.	Dichtigkeitstest.....	88
4.8.1.	Dichtigkeit in Abhängigkeit von der Sporenkonzentration.....	88
4.8.2.	Dichtigkeitstests verschiedener Materialien in Labor und im Gewächshaus	88
4.8.3.	Dichtigkeit nach künstlichem Alterungstest.....	91
4.8.4.	Einfluss der Porengröße und Fasermorphologie auf die Dichtigkeit	92
4.9.	Abbauverhalten der verwendeten Vliese.....	93
4.9.1.	Abbau von PDLLA	93
4.9.2.	Abbaubarkeit von PLGA.....	94
4.10.	Ausblick auf die Prophylaxe mittels eines Wundverschlusses.....	95
5.	Fazit	96
	Literaturverzeichnis.....	98
	Anhang	104
	Anhang A: Klimadiagramme des Standortes Siebeldingen der Jahre 2012-2015.....	104
	Anhang B: Korrelation der Wetterdaten untereinander	106
	Anhang C: Sequenzen der <i>Pch</i> -Stammsammlung nach PCR mit den Primern MM 5-450F	
	und MM5-450R.....	107
	Anhang D: Sequenzen der <i>Pch</i> -Stammsammlung nach PCR mit den Primern MM9-450F	
	und MM9-450R.....	110
6.	Veröffentlichungen und Tagungsteilnahmen	114
7.	Danksagung	115
8.	Lebenslauf	116
9.	Erklärung.....	117

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der RAMS-PCR	5
Abb. 2: Schematische Darstellung der Nested-PCR	6
Abb. 3: Die verschiedenen Methoden des Electrospinnings	9
Abb. 4: Lageplan des Julius Kühn-Institutes und der zu untersuchenden Parzellen.....	11
Abb. 5: Ausprägungen der Esca-Symptomatik	12
Abb. 6: Sporenfallen in der Anlage Phoenix.....	13
Abb. 7: Appliziertes PDLLA-Vlies auf Reben	25
Abb. 8: Aufbau des Abbaubarkeitstests im Boden.....	26
Abb. 9: Aufbau des Abbaubarkeitstests in der Traubenzone	27
Abb. 10: Bonitur der Chardonnay-Parzelle.....	31
Abb. 11: Auftreten der Esca Symptomatik in der Phoenix-Anlage	32
Abb. 12: Ausprägung der Esca Symptomatik in der der Phoenix Parzelle	33
Abb. 13: Nested-PCR mit DNA aus den Sporenfallen	34
Abb. 14: Nachweis von <i>Pch</i> in den Sporenfallen in der Chardonnay-Anlage	35
Abb. 15: Nachweis von <i>Pch</i> in den Sporenfallen in der Phoenix-Anlage.....	35
Abb. 16: Vergleich des <i>Pch</i> -Nachweises in den Laubwänden der Chardonnay- und der Phoenix-Anlage	36
Abb. 17: Vergleich des <i>Pch</i> -Nachweis in dem Traubenzonen der Chardonnay- und der Phoenix-Anlage	36
Abb. 18: Ergebnis der zweiten PCR der Nested-PCR von Sporenfallen mit den Primern MM5-200F und MM5-200R.....	37
Abb. 19: Dreifache Wiederholung der Nested-PCR zum Nacheis des im RAMS5 gefundenen Polymorphismus in Sporenfallen.....	37
Abb. 20: Maximalmengen von <i>Pch</i> in pg, die mittels qPCR in exemplarisch ausgewählten Sporenfallen gemessen wurden	38
Abb. 21: Minimalmengen von <i>Pch</i> in pg, die mittels qPCR in exemplarisch ausgewählten Sporenfallen gemessen wurden	38
Abb. 22: Mengen von <i>Pch</i> in pg, die mittels qPCR in exemplarisch ausgewählten Sporenfallen gemessen wurden.....	39
Abb. 23: DNA-Mengen von <i>Pch</i> in pg, die mittels qPCR in definierten Sporensuspensionen gemessen wurden.....	40
Abb. 24: Korrelation des Sporennachweises mit den Wetterdaten I.....	41
Abb. 25: Korrelation des Sporennachweises mit den Wetterdaten II	42
Abb. 26: Korrelation des Sporennachweises mit den Wetterdaten III	42
Abb. 27: PCR verschiedener Stämme mit den Primern RAMS10 und RAMS13.....	43
Abb. 28: Polymorphismus bei verschiedenen <i>Pch</i> -Isolaten nach PCR mit RAMS5	45
Abb. 29: Polymorphismus bei verschiedenen <i>Pch</i> -Isolaten nach PCR mit RAMS9	47
Abb. 30: PCR von genomischer DNA verschiedener <i>Pch</i> -Isolate mit RAMS 2	48
Abb. 31: PCR von genomischer DNA verschiedener <i>Pch</i> -Isolate mit RAMS1	49
Abb. 32: PCR von genomischer DNA verschiedener <i>Pch</i> -Isolate mit RAMS 3	50
Abb. 33: PCR von genomischer DNA verschiedener <i>Pch</i> -Isolate mit RAMS 10	50
Abb. 34: PCR von genomischer DNA verschiedener <i>Pch</i> -Isolate mit RAMS 11	51
Abb. 35: PCR von genomischer DNA verschiedener <i>Pch</i> -Isolate mit RAMS 12	52
Abb. 36: dimensionsloses Dendrogramm der 16 untersuchten <i>Pch</i> -Isolate.....	54
Abb. 37: Flächengewichte in mg/cm ² von PLGA-Vliesen der Fa. Evonik.....	55
Abb. 38: Porengröße in µm der Vliese der Fa. Evonik	56

Abb. 39: Porengröße der Fasermatten der Universität Bayreuth in μm in Abhängigkeit vom Material.....	56
Abb. 40: Querschnitt von Reben ein halbes Jahr nach vorangegangener künstlicher Infektion mit <i>Pch</i>	59
Abb. 41: Vliese aus a: PDLLA, b: PLGA-E, c: PLGA-BT, d: Eco+ auf PDA-Medium 24 h nach der Inokulation	60
Abb. 42: Vliese aus a: PDLLA, b: PLGA-E, c: PLGA-BT, d: Eco+ auf PDA-Medium nach vorangegangener Infektion mit einer Sporensuspension von <i>Pch</i> -Sporen	61
Abb. 43: Dichtigkeit der Materialien gegen Sporen von <i>Pch</i>	62
Abb. 44: Dichtigkeit der Materialien gegen Keimschläuche von <i>Pch</i>	63
Abb. 45: Dichtigkeit von PLGA-Vliesen der Fa. Evonik gegen <i>Pch</i> -Sporen in Abhängigkeit vom jeweiligen Polymeranteil in der Polymerlösung.....	63
Abb. 46: verschieden Fasermatten aus PLGA der Universität Bayreuth	64
Abb. 47: <i>Pch</i> -Kolonien auf PLGA nach alleinigem Klimatest (Klima) und Klimatest mit zusätzlichem Suntest (Suntest)	65
Abb. 48: <i>Pch</i> -Kolonien auf PDLLA nach alleinigem Klimatest (Klima) und Klimatest mit zusätzlichem Bewitterungstest (Bewitterung)	65
Abb. 49: PDLLA im Gewächshaustest	66
Abb. 50: Verhalten der Vliese während des Reblutens.....	66
Abb. 51: Materialermüdung der PLGA-Vliese	67
Abb. 52: frische horizontale und senkrechte Schnittwunden am Stammkopf und Stamm von Reben in der Chardonnay Anlage.....	67
Abb. 53: Verhalten von PDLLA auf Schnittwunden im Freiland.....	68
Abb. 54: PDLLA auf einer horizontalen und einer senkrechten Schnittwunde einer Rebe nach a: einem Monat, b: zwei Monaten, c: vier Monaten, und d: sieben Monaten.....	68
Abb. 55: Abbauverhalten von PDLLA nach a: einer, b: zwei, c: drei und d: vier Wochen im Boden.....	69
Abb. 56: Abbauverhalten von PDLLA innerhalb von a: zwei, b: drei, c: vier, d: fünf und e: sechs Monaten im Boden	69
Abb. 57: Abbauverhalten von PLGA nach a: einer, b: zwei, c: drei und d: vier Wochen im Boden.....	70
Abb. 58: Abbauverhalten von PLGA innerhalb von a: zwei, b: drei, c: vier, d: fünf und e: sechs Monaten im Boden	70
Abb. 59: Veränderung der molaren Masse von Vliesen im Boden.....	70
Abb. 60: Abbauverhalten von PDLLA in a: einer, b: zwei, c: drei und d: vier Wochen in der Traubenzone	71
Abb. 61: Abbau von PDLLA innerhalb von a: zwei, b: drei, c: vier, d: fünf und e: sechs Monaten in der Traubenzone.....	71
Abb. 62: Abbau von PLGA-L nach a: einer, b: zwei, c: drei und d: vier Wochen in der Traubenzone.	72
Abb. 63: Abbau von PLGA-S nach a: einer, b: zwei, c: drei und d: vier Wochen in der Traubenzone	72
Abb. 64: Abbau von PLGA-L und PLGA-S in der Traubenzone	72
Abb. 65: Veränderung der molaren Masse von PDLLA, PLGA-L und PLGA-S in der Traubenzone	73

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Boniturschema der Escasymptomatik.....	12
Tab. 2: Schritte der ersten Reaktion der Nested-PCR mit den Primern ITS1-F und ITS4 mit Super Hot Start Taq (Genaxxon).....	14
Tab. 3: Schritte der zweiten Reaktion Nested-PCR mit den Primern PCH5 und PCH3 mit Super Hot Start Taq (Genaxxon).....	14
Tab. 4: Liste der aus den Polymorphismen der RAMS-Primer entwickelten Primern	15
Tab. 5: Schritte der ersten Reaktion der Nested-PCR mit den Primern MM 5-450 F und MM 5-450R mit KAPA Hifi Hotstart Taq (Kapa).....	15
Tab. 6: Schritte der zweiten Reaktion der Nested-PCR mit den Primern MM 5-200F und MM 5-200R mit KAPA Hifi Hotstart Taq (Kapa).....	15
Tab. 7: Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (<i>Pch</i>).....	17
Tab. 8: Set der in dieser Arbeit verwendeten 17 RAMS Primern	18
Tab. 9: Schritte der PCR mit RAMS-Primern mit Kapa Hifi Hot start Taq (Kapa).	18
Tab. 10: Schritte für die PCR mit Primern aus RAMS-Polymorphismen und KAPA Hifi Hotstart Taq (Kapa).	20
Tab. 11: Protokoll für qPCR mittels <i>Pch</i> -spezifischer Primer und SYBR Green® Mastermix (Fisher scientific).....	20
Tab. 12: Liste der für die Fasermatten verwendeten Polymere.....	21
Tab. 13: Liste der in der Arbeit verwendeten Fasermatten, die von der Universität Bayreuth hergestellt wurden.....	22
Tab. 14: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fasermatten, die von der Fa. Evonik hergestellt wurden	23
Tab. 15: Abbauversuch der Vliese im Boden und in der Traubenzone.....	26
Tab. 16: Tageswerte für den künstlichen Alterungsversuch	27
Tab. 17: Nachweisgrenze von <i>Pch</i> in verschiedenen Verdünnungsreihen.....	34
Tab. 18: Übersicht der gefundenen Polymorphismen in den Bandenmustern	43
Tab. 19: Die optimale Annealing-Temperatur in °C für den jeweiligen verwendeten RAMS-Primer nach Durchführung einer Gradienten-PCR.	44
Tab. 20: Clusterung der Stämme aufgrund der unterschiedlichen Repeatlängen (3-5 facher Repeat) des im RAMS5 gefundenen InDels.	46
Tab. 21: Clusterung der Stämme aufgrund der unterschiedlichen Repeatlängen (3-5 facher Repeat) des im RAMS9 gefundenen InDels.	47
Tab. 22: Einteilung der <i>Pch</i> -Stammsammlung am JKI in drei Stammgruppen	52
Tab. 23: Zuordnung von <i>Pch</i> -Stämmen zu Haplotypen:.....	53
Tab. 24: Veränderung der PLGA-Proben der Fa. Evonik nach vorangegangenem Klima- und Suntest und Veränderung der PDLLA-Proben nach vorangegangenem Klima- und Bewitterungstest	58
Tab. 25: Ergebnis der dreifachen Wiederholungen der Nested-PCR bei den in 2014 mit <i>Pch</i> beimpften Reben.....	59
Tab. 26: Ergebnis der dreifachen Wiederholungen der Nested-PCR bei den in 2015 mit <i>Pch</i> beimpften Reben.....	60

Abkürzungsverzeichnis

AFLP	amplified fragment length polymorphisms
AIC	Akaike Informationskriterium
AMOVA	Analysis of molecular variance
Apo	Apoplex
bp	Basenpaare
BT	Universität Bayreuth
C	chronische Esca
CH	Chardonnay
CP	cophenetic correlation coefficient
dd	doppelt destilliert
DLR	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum
DNA	engl. Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
Eco	Ecoflex®
Eco+	Ecoflex® mit Polyguanidin
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
F	fehlender Stock
FG	Flächengewicht
<i>Fmed</i>	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
Fmin	minimale Luftfeuchte
Fwd	forward
glm	generalisiertes lineares Modell
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
H ₂ O	Wasser
HV	high voltage
kb	kilobase
KW	Kalenderwoche
InDel	Insertion und Deletion
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
JKI	Julius Kühn-Institut
LB	lysogeny broth
n	Wiederholung, Probenanzahl pro Versuch
NS	Niederschlag
<i>Pal</i>	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
<i>Pch</i>	<i>Phaeoconiella chlamyospora</i>
PCL-b-MPEG	Poly-ε-caprolacton-block-methoxy-polyethylenglycol

PCR	polymerase chain reaction
PDA	potato dextrose agar
PDLLA	Poly(D, L-lactide) acide
PG	Polyguanidin
PH	Phoenix
PLA	Polymilchsäure, engl. Poly lactic acid
PLGA	Poly(D, L-lactide-co-glycolide) acid
PLGA-BT	PLGA hergestellt von der Universität Bayreuth
PLGA-E	PLGA hergestellt von der Fa. Evonik
PLGA-L	leichtes PLGA
PLGA-S	schweres PLGA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVDF-HFP	Poly(vinylidene fluoride-hexafluoropropylene)
qPCR	quantitative PCR
RAMS	Random Amplified Microsatellites
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
Rev	reverse
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
Susp.	Suspension
T	toter Rebstock
Tmax	Maximaltemperatur
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
w(logM)	Molmasseverteilung

Zusammenfassung

Die Esca Krankheit hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer globalen Bedrohung für den Weinbau entwickelt. Als Hauptverursacher gilt dabei ein Komplex aus mindestens drei holzbewohnenden Pilzen: *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*), *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*), und *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*). Als Hauptinfektionsweg für diese Pilze werden Wunden am Holz angenommen, die den Reben besonders während des Winterschnitts zugefügt werden. Bisher gibt es keine effektiven Kontrollmechanismen gegen Esca.

Das Hauptziel dieser Arbeit war deshalb einen neuartigen Wundverschluss aus elektrogesponnenen Fasern zu testen, der auf die Schnittwunden appliziert werden und als physikalische Barriere gegen eindringende Sporen wirken soll. Zur Beurteilung, ob eine solche Maßnahme erfolgversprechend sein kann, wurde die Epidemiologie des Erregers *Pch* genauer untersucht, da dieser Erreger die Rebe bereits im Pflanzgutstadium infizieren kann. Zu diesem Zweck wurden verschiedene molekularbiologische Verfahren entwickelt um *Pch* sicher nachweisen und differenzieren zu können.

Für die epidemiologische Untersuchung wurde der Fokus auf das Sporenaufkommen von *Pch* im Weinberg gelegt. Hierfür wurden Fallen in Rebanlagen des Julius Kühn-Institutes in Siebeldingen sowohl in Anlagen mit chronischem Esca Befall, als auch in optisch symptomfreien Anlagen aufgehängt. Diese wurden über einen Zeitraum von drei Jahren wöchentlich untersucht. In dieser Arbeit wurde ein neues Verfahren entwickelt, um die Sporenfallen mittels *Pch*-spezifischer Nested-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) zu untersuchen, anstatt wie üblich die gefangenen Sporen auszuplattieren und zu zählen. Die Nested-PCR erwies sich als eine schnelle, zuverlässige und sensitive Nachweismethode, mit der *Pch* erstmals ganzjährig in einer deutschen Rebanlage nachgewiesen werden konnte. Insgesamt konnten Sporen des Pilzes über den gesamten Versuchszeitraum nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde eine Sammlung von 16 *Pch* Stämmen, mit Herkunft aus Deutschland, Italien und Südafrika, mittels eines Sets aus 17 RAMS (Random Amplified Microsatellites)-Primern untersucht um einzelnen Stämmen Haplotypen zuzuordnen. Bei der Analyse der Stammsammlung mit RAMS-Primern fielen Muster auf, die als Längenpolymorphismus gedeutet werden konnten. Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich hier tatsächlich um Längenpolymorphismen handelte und diese aus unterschiedlich langen Repeats einer Sequenz bestanden. Die Kombination von RAMS-Primern und anschließender Sequenzanalyse ermöglichten es die Stämme weiter zu differenzieren. Aus den Sequenzen konnten zudem Primer entwickelt werden, die eine direkte Analyse der einzelnen Stämme ermöglichte ohne eine vorherige RAMS-Analyse durchzuführen. Final konnten bei den 16 untersuchten Stämmen zehn Haplotypen und zwei Cluster mit jeweils drei Stämmen identifiziert werden. Eine eindeutige Zuordnung der Stämme zu ihrem geographischen Ursprung,

die Rückschlüsse auf die Ausbreitungswege des Pilzes hätte geben können, war jedoch nicht möglich.

Die mittels RAMS-Methode gefundenen Marker wurden anschließend verwendet, um die in den Sporenfallen gefundenen Pilzsporen genauer zu klassifizieren. Zudem wurden die Sporen aus der Luft mit Proben aus Reben in den Anlagen verglichen, um einen Eindruck zu gewinnen, ob die Sporen von Pilzen aus den Reben der Anlage oder aus anderen Quellen stammen. Die direkte Analyse mittels der neuen entwickelten Primer konnte in ersten Versuchen erfolgreich für die Auswertung der Sporenfallen verwendet und verschiedene Stamm-Gruppen von *Pch* nachgewiesen werden. Für eine exakte Zuordnung von Haplotypen müssen jedoch weitere Polymorphismen und Primerpaare gefunden werden, die sich für die Sporenfallenanalyse eignen.

Die epidemiologischen Untersuchungen zeigten deutlich, wie wichtig ein Wundverschluss für die Schnittwunden nach dem Rebschnitt sein kann, da Sporen in der Luft zu jeder Jahreszeit und insbesondere auch zur Zeit des Winterschnitts nachgewiesen werden können. Für den Wundverschluss wurden verschiedene elektrogewebene Fasermatten aus milchsäurebasierten Polymeren in Labor- und Gewächshausversuchen auf ihre Dichtigkeit gegen *Pch*-Sporen untersucht. Bei den Dichtigkeitstests im Gewächshaus konnte zudem die neu entwickelte Nested-PCR eingesetzt werden, um eine bestehende Vorinfektion der Pflanzen im Rahmen der Nachweisgenauigkeit auszuschließen sowie im Falle einer Neuinfektion zu bestätigen, dass sie tatsächlich durch den applizierten *Pch*-Stamm erfolgt ist.

Auch die Beständigkeit und das Abbauverhalten der Materialien wurden im Labor und Weinberg untersucht. Hierbei erwiesen sich Vliese mit einem erhöhten Glykolsäureanteil als weniger stabil. Unter den geprüften Materialien stellten sich die Faservliese basierend auf reiner Milchsäure als grundsätzlich geeignet heraus, um einen gut applizierbaren und infektionsdichten Wundverschluss herzustellen. Erste Ansätze mit diesem Vlies im Freiland bestätigten dieses gute Ergebnis, die langfristige Auswirkung dieser Maßnahme auf die Inzidenz der Esca-Erkrankung in den Weinbergen muss überprüft werden.

Abstract

Esca disease has become a global threat for viticulture over the last decades. It is caused by a complex of at least three different wood-inhabiting fungi *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*), *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*), und *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*). For all these fungi wounds in wood are seen as the main entrance way, especially pruning wounds, which are caused by winter pruning. Currently, there are no effective control mechanisms available

Therefore, it was the main aim of this project to test a new wound closure made of electrospun fibers, which shall be applied on the pruning wounds to build a physical barrier against invading spores. For evaluating the effectiveness of this treatment the epidemiology of the fungus *Pch* was investigated, as this fungus is one of the first of this complex invading the vine. For this purpose new molecular techniques have been developed to identify and differentiate *Pch* reliably.

For epidemiologic studies the focus was placed on the occurrence of spores of *Pch* in the vineyards during the year. Spore traps were placed in vineyards of the Julius Kühn-Institute which were showing severe symptoms of Esca and in vineyards which were free of foliar symptoms. Traps were analyzed during the whole three year project period on a weekly basis. In this study a new method was developed using a *Pch*- specific Nested-PCR (polymerase chain reaction) to analyze the spore traps instead of the usual method, in which the trapped spores are spread on media and counting germinated spores. The new Nested-PCR turned out to be a very fast, reliable and sensitive method. It was the first time *Pch* could be detected in a German vineyard year round. Spores of this fungus could be detected over the whole trial period.

Furthermore, a collection of 16 *Pch* strains with origins from Germany, Italy and South Africa was analyzed using a set of 17 RAMS (random amplified microsatellites) primer to link each one with a unique haplotype. By using this method some polymorphisms formed a pattern which could be interpreted as length polymorphisms. Further analyses of the sequences showed that there are in fact length polymorphisms which are based on repeats of the same sequence. The combination of RAMS primers and the sequence analysis resulted in a finer differentiation of isolates.

Primers were developed flanking these repetitive sequences to detect polymorphisms directly without a previous RAMS-analysis. In the end ten haplotypes and two clusters each containing three isolates were found. However, it was not possible to link haplotypes to their geographical origin to gain knowledge of the spread of the fungus.

Markers found using the RAMS-analysis were used to differentiate the fungal spores trapped in the spore traps. Furthermore, spores were also compared with strains found in vines of the same vineyard to verify, if the spores were possibly released by fungi in the plants or if they had a different source. This direct analysis was successful in first trials and proofed the existence of different strains in the traps. For an exact classification more markers and primer pairs have to be developed suitable for analyzing spore traps.

The epidemiologic survey of this pathogen clearly shows the necessity of a good working wound closure which has to be applied directly after pruning, as the spores are present all year round and especially at the time of winter pruning. For this purpose, different electrospun fibermats made of different fibers of lactic acid were tested under laboratory conditions and in greenhouses for their impermeableness against spores of *Pch*. During these tightness tests in the greenhouse the new developed Nested-PCR was used to exclude, within the scope of its detection limits, an already existing infection of the tested plants and to confirm that the a new infection was caused by the applied strain of *Pch*.

Furthermore the degradation and aging of the materials was tested under laboratory and field conditions. Fiber mats with an added amount of glycolic acid turned out to be less stable. Among the different materials fiber mats based on pure lactic acid turned out to be principally suitable to build an applicable and efficient wound closure. First trials in the vineyard confirmed this positive result. However, the long term effect of this treatment on the incidence of Esca disease in vineyards has to be proven.

1. Einleitung

Der Wein ist ein seit Jahrtausenden in vielen Kulturen geschätztes Getränk, das oftmals als göttlich bezeichnet wurde und daher in vielen Riten und Kulturen Verwendung findet; auch als Medizin wurde er verbreitet eingesetzt.

Die Kultur des Weinbaus hat daher eine lange Tradition. Funde in Georgien weisen darauf hin, dass dort schon 6000-5500 v.Chr. Wein angebaut und konsumiert wurde (This et al. 2006). Auch die alten Ägypter bauten Wein an und gaben ihn ihren Pharaonen amphorenweise mit ins Grab, damit sie auch im Jenseits nicht auf dieses edle Getränk verzichten müssten.

Von den Griechen ist bekannt, dass sie bereits Edelreben anbauten und ihre gehaltvollen Weine mit Wasser mischten. Dabei war der Wein nicht nur ein reines Genussmittel, sondern wurde auch verwendet, um den Geist anzuregen und zu philosophieren. Die resultierenden Symposien sind bis heute überliefert. Diese Art des Weingenusses wurde auch von den Römern übernommen. Da die Römer auf ihren Feldzügen nicht auf den Wein verzichten wollten, führten sie sowohl die Rebe als auch das Wissen um den Weinbau mit sich und verbreiteten so den Weinbau in ganz Europa, somit auch nach Frankreich und an den Rhein.

Im Mittelalter wurde der Wein ein Getränk, das ständeübergreifend konsumiert wurde. Seit dem 11.-12. Jahrhundert begannen Mönche mit der Züchtung und dem Anbau von Sorten und dem professionellen Weinbau zur Erzeugung von Qualitätsweinen.

Mit dem Siegeszug der Weinkultur in Europa und in Amerika nahmen jedoch auch die Krankheiten im Weinbau immer mehr zu. Ein erster bedeutender tierischer Schädling war die Reblaus (*Viteus vitifoliae*, Fitch 1855), die um 1860 mit der Einfuhr von amerikanischen Reben nach Europa kam. Dies führte in ganz Europa zu einer Zerstörung der Rebflächen, da die Reben der Europäischen Rebe (*Vitis vinifera*) keine Resistenz gegenüber der Reblaus besitzen. Neben der chemischen Bekämpfung mittels Injektionen von Insektiziden in den Boden wurde eine effektive Bekämpfungsmaßnahme in der Verwendung von Unterlagsreben gefunden, die aus dem amerikanischen Raum stammen. Diese Reben können den Schaden der Reblaus tolerieren und sind somit eine ideale Unterlage für die europäischen Reben, die aufgepfropft (Bassermann-Jordan 1975).

Neben tierischen Schädlingen nahmen auch die pilzlichen Schaderreger in Europa immer mehr zu. Fast zeitgleich mit der Reblaus, 1845, kam der Echte Mehltau, (anamorph: *Oidium tuckeri* Schwein. bzw. teleomorph: *Erysiphe necator* (Schwein. / Burtill), aus Amerika, wenig später folgte, 1878, der Falsche Mehltau (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni 1888) (Bassermann-Jordan 1975). Da die europäische Rebe für beide Schaderreger keine Resistenzen aufweist, wurde eine breite Vielfalt an Fungiziden entwickelt, die die Pilze eindämmen sollen (Gessler et al. 2011).

In den letzten Jahren ist eine weitere Krankheit pilzlichen Ursprungs erschienen, die dem globalen Weinbau zunehmend Probleme bereitet: die sogenannte Esca-Krankheit.

1.1. Die Esca-Krankheit

Die Esca-Krankheit der Weinrebe ist inzwischen eine der bedeutendsten Krankheiten im weltweiten Weinbau. Sie konnte bereits in der Antike im Mittelmeerraum nachgewiesen werden (Mugnai et al. 1999) und ist inzwischen aufgrund klimatischer Veränderungen und dem internationalen Handel mit Pflanzgut weltweit nachweisbar, z.B. in Italien (Mugnai et al. 1996), den USA (Scheck et al. 1998), Südafrika (Ferreira et al. 1994) und Australien (Pascole 1999). In Deutschland kann Esca seit den 80er Jahren nachgewiesen werden (Fischer u. Kassemeyer 2003). In Italien wird der Befall auf 20% aller Reben mit einem jährlichen Zuwachs von 4-5% geschätzt (Mugnai et al. 1999). Inzwischen gibt es bereits Weinberge mit 31,5% sichtbarem Befall (Marchi et al. 2006) und die Ausbreitung der Blattsymptomatik steigt weltweit an (Bertsch et al. 2013).

Die Krankheit selbst wird durch einen Komplex aus mindestens drei holzbewohnenden Pilzen, den Deuteromyceten *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) (Crous u. Gams 2000) und *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*) (Crous et al. 1996), dessen teleomorphe Form *Togninia minima* (Mostert et al. 2003), sowie dem Basidiomyceten *Fomitiporia mediterranea* (*Fmed*) (Fischer 2002), dem Mittelmeerfeuerschwamm, verursacht.

Die Rebe wird dabei zuerst von *Pch* und *Pal* befallen, infolge dessen sind beide Erreger schon in jungen Pflanzen und in veredelten Rebsetzlingen nachweisbar (Retief et al. 2006). Die Infektion führt zu einer Vorläufer-Krankheit von Esca, der sogenannten „Petri-Disease“ (Surico 2001). Dabei können im Holz erste Symptome wie Gummosis (dunkle, gummiartige Absonderungen) auftreten. Auch erste Symptome an den Beeren, sog. „black measles“, sind möglich.

Im weiteren Verlauf werden ältere Reben, meist ab einer Standzeit von ca. 5 Jahren, zusätzlich von *Fmed* befallen. Dies führt dann schließlich zur vollen Ausprägung der Esca-Symptomatik in Form von „Tigerstreifen“-Mustern an den Blättern (Larignon u. Dubos 1997; Mugnai et al. 1999), Lederbeeren und Holzsymptomen wie Gummosis, „brown wood streaking“ und Weißfäule. Letztere ist auch namensgebend für die Krankheit da Esca lateinisch ist und auf Deutsch Zunder bedeutend, was auf die Brenneigenschaften des trockenen weißfaulen Holzes zurückzuführen ist (Kaltschmidt 1839).

Die sichtbare Symptomatik der „chronischen Esca“ an Blättern tritt allerdings nicht jedes Jahr kontinuierlich oder in der gleichen Stärke an einem Rebstock auf. Zudem besteht eine Diskrepanz zwischen der Ausprägung der Symptome im Holz und in der Laubwand. Daher ist es möglich, dass in einem vierjährigen Beobachtungszeitraum rund 25% der Reben Symptome zeigen, im Holz jedoch von einem Befall von bis zu 90% ausgegangen werden kann (Fischer 2006). Durch die Diskontinuität der Symptomatik sind somit exakte Epidemiologiestudien sehr schwierig.

Ein weiteres Krankheitsbild der Esca ist die „akute Esca“, der sog. Apoplex. Hier stirbt die Pflanze ohne vorangegangene äußere Symptome innerhalb weniger Wochen ab. Im Holz hingegen können die oben genannten Symptome nachgewiesen werden.

Da alle Pilze dieses Komplexes holzbewohnend sind, werden Wunden im Holz als Haupteintrittspforte für Pilzsporen vermutet. Dies ist bei Reben aufgrund des Winterschnitts besonders problematisch, da hier der Pflanze, vor allem bei ersterem, große Wunden am mehrjährigen Holz zugefügt werden. Diese Schnittwunden gelten für einen Zeitraum von bis zu 12 Wochen nach dem Schnitt als hochanfällig gegenüber den Sporen (Larignon u. Dubos 2000). Elena u. Luque (2016) konnten bei künstlichen Infektionsversuchen an Reben noch 12 Wochen nach dem Schnitt eine 10% Anfälligkeit für *Pch* bei Reben nachweisen. Frisch nach dem Schnitt lag die Anfälligkeit noch bei 100%.

Die genauen Übertragungswege sind dabei noch nicht vollständig geklärt. Eine große Bedeutung kommt dem Sporenflug aus der Luft zu (Larignon et al. 2009). Des Weiteren können die Erreger durch infiziertes Schnittwerkzeug beim Winterschnitt oder in der Rebschule verbreitet werden (Retief et al. 2006). Auch wurden erste Untersuchungen zu einer Übertragung von Sporen durch Insekten, die als Vektoren dienen, durchgeführt (Rooney-Latham et al. 2005). Daneben sind Unkräuter im Weinberg nachweislich Träger für Sporen des Esca-Komplexes (Agustí-Brisach et al. 2011).

1.2. Sporen der Pilze des Esca-Komplexes

Die Sporen der einzelnen Pilze des Esca-Komplexes sind in ihrer Größe sehr unterschiedlich. Die Konidien von *Pch* sind immer gerade geformt und länglich-ellipsoid bis eiförmig. Mit einer Größe von 4.5-5.5 x 1-1.5 µm (Crous u. Gams 2000) sind sie die kleinsten des Komplexes. Auch die Konidien von *Pal* sind gerade geformt, jedoch sind sie mit den Abmessungen von 2-5 x 0,7-2.5 µm (Crous et al. 1996) bereits größer. Die Sporen von *Fmed* sind breit und elliptisch und mit einer Größe von 6-7 x 5-6 µm (Fischer 2002) deutlich größer als die Sporen von *Pch* und *Pal*.

Aus der Literatur ist die Verwendung von Sporenfallen zum Nachweis von Pilzen des Esca-Komplexes über einen längeren Zeitraum bereits häufig beschrieben. (Eskalen u. Gubler 2001; Larignon u. Dubos 2000; Quaglia et al. 2009; van Niekerk et al. 2010). Die Technik basiert dabei auf der von Eskalen und Gubler im Jahr 2001 publizierten Methode. Dabei werden mit Vaseline beschichtete Objektträger verwendet, die im Weinberg über einen definierten Zeitraum aufgehängt werden und in bestimmten Abständen, meist wöchentlich, getauscht werden. Anschließend werden die Fallen mit Wasser abgewaschen. Das Waschwasser wird zunächst durch einen Filter mit 5 µm Porengröße und anschließend durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm gefiltert. Die Filter werden daraufhin erneut ausgewaschen und dieses Waschwasser auf PDA-Platten ausplattiert. Dabei werden große Sporen, wie die von *Fmed*, und Schmutzpartikel aufgrund ihrer Größe im Filter mit 5µm-Poren gefangen. Kleinere Sporen hingegen, wie die von *Pch* und *Pal*,

passieren diese Porengröße und werden im Filter mit 0,45 µm gefangen (Eskalen u. Gubler 2001). Diese Methode gilt als zuverlässig für den Nachweis von *Pch* und *Pal*, jedoch wachsen beide Pilze sehr langsam und es besteht die Möglichkeit, dass die Pilze von anderen Erregern überwachsen werden (van Niekerk et al. 2010).

Da die Reben im Infektionsverlauf der Esca-Krankheit zuerst von den *Pch* und *Pal* befallen werden und ein Wundverschluss, der effektiv gegen *Pch*-Sporen ist, vermutlich auch vor *Pal* und *Fmed* Schutz bietet, da die Sporen von *Pch* die kleinsten im Komplex sind, soll der Fokus der folgenden Untersuchungen auf *Pch* gelegt werden.

1.3. Molekulargenetischer Hintergrund von *Pch*

Neben dem einfachen Sporennachweis in Fallen und dem Nachweis im Holz durch Auflegen von Holzfragmenten steht inzwischen auch eine Vielzahl molekulargenetischer Methoden zur Verfügung. Auch um die Ausbreitung der Pilze des Esca-Komplexes, *Pch* im Besonderen, in einzelnen Anbauregionen und auch global nachzuvollziehen, wird häufig auf Sequenzanalysen des Genoms der Pilze zurückgegriffen. Hierbei ist jedoch die geringe genetische Diversität von *Pch* problematisch. Vorangegangene Studien zur Untersuchung der genetischen Variabilität unter Verwendung von amplified fragment length polymorphisms (AFLP), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) und random amplified microsatellites (RAMS) zeigten nur eine geringe Anzahl an Polymorphismen auf. So wiesen bei Tegli (2000) 38,3% der mittels RAPD gefundenen Fragmente und 26,9% der mittels RAMS gefundenen Fragmente Polymorphismen auf. Im Vergleich dazu wiesen bei *Pal* 65,5% der mittels RAPD gefundenen Fragmente und 72,2% der mittels RAMS gefundenen Fragmente Polymorphismen auf.

Regionen wie die ITS (internal transcript spacer)-Region oder der Elongationsfaktor 1- α , die häufig zur Unterscheidung von Stämmen herangezogen werden, weisen ebenfalls nur eine geringe Variabilität auf. Bei Cobos u. Martin (2008) zeigten 36 Isolate im Bereich des 1- α Elongationsfaktors keine Polymorphismen. Darüber hinaus konnten in einer Sequenzanalyse von 30 *Pch*-Isolaten keine Polymorphismen in der ITS-Region gefunden werden (Tegli et al. 2000ab). Auch können *Pch*-Isolate aus verschiedenen Ländern, z.B. Neuseeland und Italien, bei der Analyse mit RAMS-Primern völlig identisch sein (Pottinger et al. 2002). Zudem hinaus konnte keine Korrelation zwischen den Genotypen und dem geographischen Ursprung der Isolate hergestellt werden (Tegli 2000). Nach Koenig et al. (1997) spalten sich jedoch asexuelle Pilze in verschiedenen Regionen durch Mutationen in unterschiedliche Klone auf. Da diese Aufspaltung bei *Pch* nicht erfolgt ist, führt dies zu der Theorie, dass der Pilz hauptsächlich über kloniertes Pflanzgut verbreitet wird (Tegli 2000). Da bis jetzt nur eine anamorphe, jedoch keine teleomorphe Form von *Pch* gefunden wurde, wird dies aktuell als sehr wahrscheinlich angesehen.

Allerdings lassen sich die Isolate mit diesen Methoden in einzelne Gruppen (Tegli 2000) einteilen und es ist in Einzelfällen sogar möglich, mehrere Genotypen auf einer Pflanze zu finden (Cobos u. Martin 2008).

1.3.1. Nachweismethoden

Eine etablierte Methode, um mögliche Polymorphismen in *Pch* nachzuweisen, ist die Verwendung von RAMS-Primern.

RAMS oder auch ISSR (inter simple sequence repeat) ist eine einfache Methode, die von Zietkiewicz (Zietkiewicz et al. 1994) entwickelt wurde und mit der genetische Variationen zwischen Pilzen charakterisiert werden können (Hantula et al. 1996). Hierbei werden Sequenzen von Mikrosatelliten (SSR-simple sequence repeats) als Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction - PCR), verwendet und die Region zwischen den Satelliten amplifiziert. Da Mikrosatelliten über das ganze Genom verteilt sind, ermöglicht diese Methode einen Ansatz über das ganze Genom und liefert ein spezifisches reproduzierbares Bandenmuster für die jeweils untersuchte Pilzart. In Folge dessen können sowohl Pilzarten als auch Stämme eines Pilzes unterschieden werden. Da diese Methode keine genaue Kenntnis über das untersuchte Genom benötigt, ist sie für *Pch* gut geeignet, da hier keine Referenzsequenz vorliegt.

Nach Hantula et al. (1996) werden die Mikrosatelliten mit einem Anker aus Wobbles (B=C/G/T, D=A/G/T, H=A/C/T und Y=A/C/G) am 5' Ende der Sequenz versehen, um ein Anlagern des Primers und eine Amplifikation des Mikrosatelliten zu garantieren. Es ist jedoch auch möglich, ankerlose Primer oder Primer mit dem Anker am 3' Ende zu verwenden. Bei ankerlosen Primern besteht jedoch die Gefahr einer geringen Reproduzierbarkeit des Bandenmusters, da sich die Bindestellen in jeder PCR ändern können. Auch die Amplifikatlänge ändert sich je nach Position des Ankers (Abb. 1).

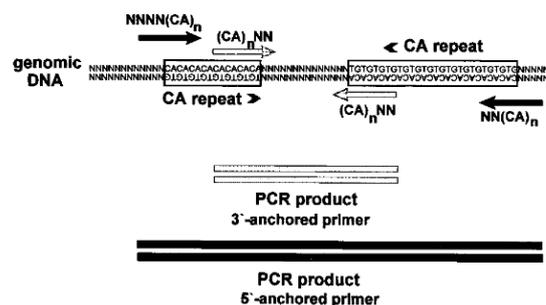


Abb. 1: Schematische Darstellung der RAMS-PCR:
 Die dunklen Pfeile stellen den Primer aus dem Repeat (CA)_n mit Anker am 5'-Ende und das daraus resultierende längere PCR-Produkt in schwarz dar. Die hellen Pfeile stellen den Primer aus dem Repeat (CA)_n mit Anker am 3'-Ende und das daraus resultierende kurze helle PCR-Produkt dar. (Quelle: Zietkiewicz et al. 1994)

Die Verwendung von RAMS-Primern zeigt Variationen des Genoms in der Form von fehlenden oder zusätzlichen Bindestellen. Zusätzliche Bindestellen des Primers führen im Genom zu einer höheren Bandenanzahl auf dem Gel, im weiteren Verlauf der Arbeit als „zusätzliche Banden“

bezeichnet. Möglich ist aber auch die Auswertung nach Insertionen und Deletionen (InDels) (siehe Material und Methoden 2.8 „RAMS-Analyse“).

Neben der Untersuchung des Genoms können die Pilze der Esca-Krankheit mit verschiedenen Formen der PCR in unterschiedlichen Substraten und Geweben nachgewiesen werden. Edwards et al. (2007) verglich verschiedene PCR Methoden und kam zu dem Schluss, dass die Nested-PCR eine der sensitivsten ist, um den Pilz *Pch* auch in geringen Konzentrationen nachzuweisen.

Eine Nested-PCR ist in zwei Schritte gegliedert. In der ersten PCR wird die Ziel-DNA mit äußeren Primern amplifiziert. Das Produkt der ersten Reaktion wird daraufhin in der zweiten Reaktion als Matrize (Template) verwendet. Die Primer der zweiten Reaktion binden dabei innerhalb („downstream“) der Primer für die erste Reaktion (Abb. 2).

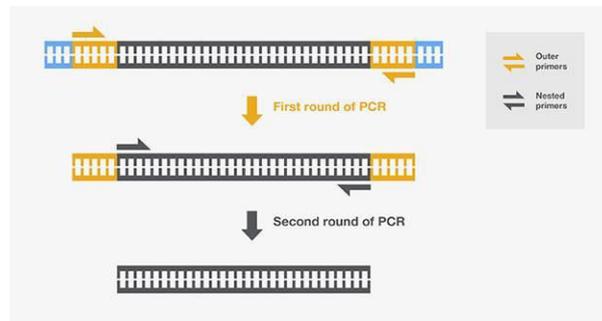


Abb. 2: Schematische Darstellung der Nested-PCR:

Die gelben Pfeile geben die Position der äußeren Primer auf der DNA für die erste PCR wieder. Das aus der ersten Reaktion resultierende Produkt wird als Template für die zweite Reaktion verwendet. Die grauen Pfeile geben die Position der inneren Primer auf dem DNA-Strang wieder, das kurze, graue untere Fragment ist dann das Amplifikat der beiden vorangegangenen Reaktionen. (Quelle: Thermo scientific)

Mit dieser Methode ist es möglich, geringe Mengen an DNA in einer Probe zu amplifizieren. Zudem wird durch diese Methode die Spezifität der PCR erhöht, da mögliche Bindungsstellen an Fremd-DNA, wie z.B. die anderer Pilze in Mischproben, eliminiert werden. Die Methode ist jedoch stark abhängig von der Effizienz der ersten Reaktion, da das Amplifikat der ersten Reaktion als „Template“ genutzt wird. Dennoch ist sie eine einfache aber effektive Methode um *Pch* und andere Pilze im Rebholz nachzuweisen.

Eine weitere sehr sensitive Methode, die nach Edwards et al. (2007) für den Nachweis von *Pch* geeignet ist, ist die qPCR (quantitative PCR). Diese ermöglicht, zusätzlich zur herkömmlichen PCR, eine Quantifizierung der amplifizierten DNA. Die Quantifizierung wird dabei durch eine Fluoreszenzmessung durchgeführt. Dabei steigt die Signalstärke der Fluoreszenz mit Zunahme der amplifizierten DNA an.

Für dieses Analyseverfahren hat sich die Verwendung von Farbstoffen wie SYBR®Green als geeignet herausgestellt. Dieser Farbstoff lagert sich in doppelsträngiger DNA an und liefert somit schnelle Ergebnisse für die Quantifizierung. Nachteilig an dieser Methode ist die Unspezifität des Farbstoffes, da er sich an jede Form von doppelsträngiger DNA anlagert und es somit zu

unspezifischem Hintergrundrauschen kommen kann. Somit ist diese Methode nicht für Multiplexreaktionen geeignet.

Die oben beschriebenen Methoden zeigen wie schwierig es ist die Ausbreitung von *Pch* anhand der Genetik nachzuverfolgen. Auch die unregelmäßig auftretende Blattsymptomatik erschwert exakte Diagnosen. Zudem tritt sie erst lange nach den Symptomen im Holz auf. Diese wiederum sind nicht zerstörungsfrei zu bonitieren, was neben dem Nachweis auch die Kontrolle der Pilze erschwert.

1.3.2. Aktuelle Kontrollmechanismen

In der Vergangenheit wurden bereits viele Bekämpfungsstrategien erprobt, die eine Ausbreitung der Erreger verhindern sollen (Bertsch et al. 2013). Dies beginnt mit der Desinfektion von Werkzeugen wie Rebscheren und Sägen bei deren Verwendung im Weinberg. Zudem wird empfohlen, Schnittgut und tote Stöcke aus dem Weinberg zu entfernen und keine Holzmiten neben dem Weinberg anzulegen, da daraus Sporen der Pilze austreten können (Empfehlung des Julius Kühn-Institutes (JKI) und des Dienstleistungszentrums Ländlicher Raum Rheinland-Pfalz (DLR)). Der Einsatz von Leimen und Harzen, zum Teil auch mit Fungiziden oder Kupfer versetzt, wurde zum Wundverschluss erprobt, führte aber zu keiner Verbesserung der Befallssituation (Sosnowski et al. 2005; Sosnowski et al. 2008). Arsenhaltige Fungizide, die noch bis 2001 in Frankreich eingesetzt wurden, sind inzwischen mangels Zulassung nicht mehr verfügbar. Aktuell gibt es biologische Produkte, z.B. das Fungizid Vintec[®] auf Basis des Pilzes *Trichoderma atroviridae*, der als Antagonist die Schnittwunden besiedeln und somit vor einem Eindringen von Sporen schützen soll (Belchim Crop Protection 2018).

Aufgrund mangelnder Erfolge der bisherigen Strategien steht jedoch zurzeit nur eine intensive Hygiene im Weinberg als Kontrollmaßnahme zur Verfügung.

Darüber hinaus gibt es erste Studien, die zeigen, dass auch die unterschiedlichen Schnittsysteme einen Einfluss auf den Befall haben können. So treten in einem Minimalschnitt-System weniger Esca-Infektionen auf als bei einer Bogenerziehung (Travadon et al. 2016).

Da die bisherigen Versuche die Krankheit zu bekämpfen keinen eindeutigen Erfolg brachten (Bertsch et al. 2013), soll in dieser Arbeit ein neuartiger Wundverschluss getestet werden, der dabei die folgenden Eigenschaften erfüllen soll:

- sicherer mechanischer Schutz gegen das Eindringen von Pathogenen
- permeabel für Wasser oder Pflanzensaft und Luft
- elastisch für eine gute Applizierbarkeit auf Schnittwunden
- stabil an der Pflanze für den Zeitraum in dem die Wunden empfindlich gegenüber Pathogenen sind
- biologisch abbaubar ohne schädliche Abbauprodukte

Ein sehr gutes Herstellungsverfahren bietet die Methode des Electrospinnings, da hiermit Fasermatten mit definierten Porengrößen erstellt werden können. Daher kann die Größe so gewählt

werden, dass sie klein genug gegen eindringende Pathogene sind, gleichzeitig jedoch einen Wasser- und Gasaustausch ermöglichen, der die Wundheilung der Rebe fördert. Die Grundlagen der Technik sollen im Anschluss kurz dargelegt werden.

1.4. Electrospinning und seine Bedeutung für den Pflanzenschutz

Mit dem Verfahren des Electrospinnings können Endlosfasern mit wenigen Nanometern im Durchmesser hergestellt werden. Das Prinzip basiert auf Bose, der bereits 1745 Aerosole durch das Anlegen hoher elektrischer Potentiale auf Flüssigkeitstropfen erzeugte (Greiner u. Wendorff 2007). Darauf basierend patentierte John F. Cooley 1902 ein Verfahren, Flüssigkeiten mithilfe elektrischer Ladungen zu versprühen (Cooley, John F. US 692631 A 1902). Doch erst in den 90er Jahren zeigten sich grundlegende Fortschritte in der Entwicklung des Prozesses durch die Forschungsarbeiten von Reneker (Reneker u. Chun 1996). Die erste kommerzielle Verwendung dieser Fasern bestand in der Filteranwendung von Vliesen in den 90ern. 2005 brachte die Firma Elmarco die erste kommerzielle Spinnmaschine, die nanospiderTM, auf den Markt (Greiner u. Wendorff 2007).

Beim Electrospinning gibt es zwei grundlegende Verfahren: das Nozzle-Electrospinning sowie das Nozzle-less-Electrospinning.

Für das Nozzle-Electrospinning wird eine Spindüse benötigt, die mit einer Hochspannung (High voltage) HV-Netzteil verbunden ist (Abb. 3 a). Eine Polymerlösung oder Schmelze, bestehend aus Polymer und einem Lösungsmittel, wird mit konstanter Vorschubgeschwindigkeit aus der Nadelspitze gefördert. Als Gegenelektrode zur Nadel dient der Kollektor, auf dem die Faser abgelegt wird. Wenn der Spannungsunterschied zwischen den beiden Elektroden groß genug ist, löst sich aus dem austretenden Tropfen ein Flüssigkeitsstrahl, der sogenannte Jet, der sich auf die Gegenelektrode zubewegt. Dabei gelangt der Jet aufgrund der angelegten Spannung auf eine Schlingerbahn, so dass sich der Jet bis auf wenige Nanometer verjüngt. Auf dem Weg zur Gegenelektrode verdampft dabei das Lösungsmittel bzw. erkaltet die Schmelze, so dass sich auf dem Kollektor dann eine feste Faser ablegt. Die Faser legt sich bei einem unbewegten Kollektor übereinander ab, sodass ein Vliesstoff mit nicht ineinander gewebten Fasern entsteht. Ein höherer Durchsatz kann dabei durch die Verwendung weiterer Düsen erreicht werden.

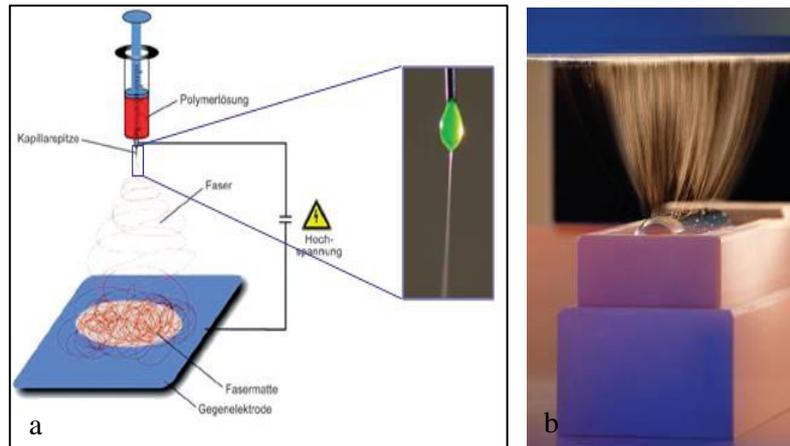


Abb. 3: Die verschiedenen Methoden des Electrospinnings:

a: schematische Darstellung des Nozzle-Electrospinnings, bei welchem zwischen der Nadel, durch die die Polymerschmelze gedrückt wird, und dem Kollektor, der als Gegenelektrode fungiert, Hochspannung angelegt wird, bis sich aus der Nadel ein Faden löst. Dieser erhärtet auf dem Weg zum Kollektor und legt sich dort als Fasermatte ab. (Quelle: Greiner u. Wendorff 2007)

b: Bild des Nozzle-less-Electrospinning, bei dem sich eine Walze in einer Polymerlösung dreht. Dabei wird an den Kollektor so viel Spannung angelegt, bis sich durch den Ladungsunterschied einzelne Fasern lösen. (ELMARCO s.r.o-Europe 2012)

Ein Beispiel für Nozzle-less Electrospinning ist die nanospider™ (Abb. 3 b). Hier wird die Polymerlösung auf Walzen aufgebracht, an die Hochspannung angelegt wurde. Durch das Überwinden der Oberflächenspannung mittels elektrostatischer Kräfte bilden sich Fasern, die sich auf dem Kollektor ablegen. Das auf dem Kollektor vorher aufgelegte Substrat dient hierbei als Trägermaterial für die Fasermatte.

Der Vorteil des Electrospinnings liegt unter anderem in der Vielzahl von Polymeren, die sich für diesen Prozess eignen. Dies können organische wie Polyvinylidenfluorid (PVDF), anorganische wie Titanoxid, metallische wie Kupfer, oder Biopolymere wie Polymilchsäure (PLA) sein.

Der Herstellungsprozess der Fasermatten wird von einer Vielzahl an Parametern beeinflusst, wie von dem verwendeten Polymer, dem gewählten Lösemittel und vom jeweiligen Mischungsverhältnis der Komponenten. Auch eine Verwendung von Polymermischungen oder Additiven ist möglich. Einen Einfluss auf die Herstellung haben auch die angelegte Spannung, die Leitfähigkeit und die Viskosität der Polymerlösung.

Neben den Spinnparametern wie Elektrodenabstand, Feldstärke und Vorschubgeschwindigkeit hat auch die Umgebung in der Spinnkammer einen großen Einfluss wie Temperatur, Luftfeuchte und Luftstrom. Die Luftfeuchte ist hier besonders hervorzuheben, da für den Prozess des Electrospinnings ein elektrisches Feld geschaffen werden muss, welches durch die Feuchte beeinflusst werden kann. Die Luftfeuchte beeinflusst zudem den Verdunstungsprozess des Lösungsmittels und damit die Trocknung der Fasern auf dem Weg zur Gegenelektrode. Zudem wirkt sie sich auf die Porengrößenverteilung aus und ist bei wasserlöslichen Polymeren für das Ablösen von Fasern verantwortlich (Spranger 2011).

Mit diesem Verfahren können somit Fasermatten geschaffen werden, die eine physikalische Barriere für Pathogene bilden können. Dieses neuartige Verfahren bietet daher die Möglichkeit, einen Wundverschluss für die Rebe herzustellen, der wie Harze oder Wachse gegen Pathogene abdichtet und gleichzeitig die Diffusion von Wasser ermöglicht, so dass die Wunde darunter abtrocknen kann und die Möglichkeiten einer Fäulnis verringert werden.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll mittels Versuchen unter kontrollierten Bedingungen im Labor, im Gewächshaus sowie im Freiland, ein prophylaktischer Wundverschluss aus elektrogesponnenen Fasern entwickelt und getestet werden, der die Schnittwunden der Rebe vor eindringenden Pathogenen der Esca-Krankheit schützt. In diesem Zusammenhang soll zunächst, mittels Bonitur der Symptome, der Befall in zwei Referenzanlagen über einen mehrjährigen Zeitraum erfasst werden. Dann soll mit molekularbiologischen Verfahren das Vorkommen und die Epidemiologie von *Pch* in den Referenzanlagen im Verlauf des Jahres untersucht werden. Dieser Teil umfasst die folgenden Einzelaspekte:

I) Vor allem im Hinblick auf den alljährlichen Winterschnitt soll das Auftreten von *Pch*-Sporen in den Bereichen Laubwand und Rebstamm mittels Sporenfallen und Nested-PCR erfasst werden. Zusätzlich soll eine erste quantitative Evaluierung mittels qPCR mit SybrGreen® erprobt werden, um ein verstärktes Sporenaufkommen in den einzelnen Jahreszeiten abschätzen zu können.

II) Aus dem Freiland in den Anlagen des JKI gewonnene Isolate von *Pch* sollen in Abstimmung mit Referenzisolaten unterschiedlicher geographischer Herkunft mittels RAMS-Primern molekularbiologisch charakterisiert werden, um einen Überblick über die vorliegende genetische Vielfalt von *Pch* zu gewinnen.

III) Mit spezifischen Primern sollen die Proben aus der Luft mit Isolaten aus dem Rebholz verglichen werden. Dies soll Rückschlüsse ermöglichen, inwieweit Pilz-Stämme bereits im Holz vorhanden sind und ob die Sporen aus dem Holz in den Anlagen oder aus anderen Quellen stammen, wie z.B. umliegende Weinberge.

Mit diesen Methoden sollen der Befallsdruck und mögliche Übertragungswege charakterisiert, sowie die mögliche Effektivität von Wundverschlussverfahren bewertet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Lage und Beschreibung der Versuchsanlagen

Der Nachweis von Sporen mittels Sporenfallen wurde in den Anlagen der Sorten Chardonnay (Koordinaten 49°13'12.6"N 8°02'32.3"E) und Phoenix (Koordinaten 49°13'01.2"N 8°02'55.1"E) auf den Liegenschaften des JKI in Siebeldingen durchgeführt.

Die Anlage Sorte Chardonnay, Pflanzjahr 2008, befindet sich am nordöstlichen Ende der Grundstücksfläche (Abb. 4) und wies bis zu Beginn der Bonitur noch keine Esca-Symptome auf. Die Anlage besteht aus 30 Reihen mit jeweils 25 Reben, welche in Nord-Süd Richtung gepflanzt wurden (Abb. 4).

Die Anlage Sorte Phoenix, Pflanzjahr 1995, befindet sich am südwestlichen Ende des Areal und zeigte bereits zu Versuchsbeginn deutliche Symptome chronischer Esca. In der Anlage sind 17 Reihen mit jeweils 90 Reben in Ost –West Richtung (Abb. 4).



Abb. 4: Lageplan des Julius Kühn-Institutes und der zu untersuchenden Parzellen:
 roter Stern: Anlage der Sorte Chardonnay, Koordinaten 49°13'12.6"N 8°02'32.3"E; roter Kreis: Anlage der Sorte Phoenix, Koordinaten 49°13'01.2"N 8°02'55.1"E; weißes Quadrat: Wetterstation, Koordinaten 49°12'59.4"N 8°02'52.4"E. (Quelle: Google Earth)

2.2. Bonitur auf Esca-Symptomatik

Die Anlagen der Sorten Chardonnay und Phoenix wurden alljährlich und regelmäßig auf sichtbare Esca-Symptome hin bonitiert.

Hierbei wurden äußere Symptome der Esca-Krankheit erfasst, wie chronische Tigerstreifen an den Blättern und Apoplex (Abb. 5 a und b; Tab.1: Boniturschema der Escasymptomatik). Der Boniturzeitraum umfasste jeweils die Monate Juni bis September. Von einer weiteren Bonitur zu einem späteren Zeitpunkt im Jahr wurde abgesehen, da die Blattsymptomatik besonders nach der Lese nicht mehr eindeutig zuzuordnen war. Der Gesamtzeitraum des Versuches betrug 3,5 Jahre, von 2012 bis 2015.

Symptom	Abkürzung
Tigerstreifen/chronische Esca	C
Apoplex	Apo
tote Stöcke	T
fehlende Stöcke	F

Tab. 1: Boniturschema der Escasyptomatik: Tigerstreifen/chronische Esca (C), apoplektische Stöcke (Apo), tote Stöcke (T) und fehlende Stöcke (F).

Vereinzelt zeigten auch einzelne Ruten der Rebe einen Apoplex (Abb. 5 c). In diesem Fall wurde die Rebe als apoplektisch und im Folgejahr bei gesunder Laubwand als gesund bonitiert. Möglich war auch, dass die Rebe Anzeichen eines Apoplexes zeigte, sich aber im Laufe des Jahres wieder erholte oder von den Winzern ein neuer Trieb oberhalb der Veredelungsstelle gezogen wurde. Auch hier wurde die Rebe als apoplektisch bonitiert.

Als tote Stöcke wurden solche bonitiert, die zu Jahresbeginn keinen Austrieb zeigten oder unter dem Jahr durch andere Gründe als Esca und/oder Apoplexie (Abb. 5 d) abstarben.

Die Anzahl der fehlenden Stöcke stieg durch das Entfernen von Totholz aus der Anlage an. Die Boniturdaten von Juni bis August im Jahr 2014 stammen aus der Masterarbeit von Pia Schneider (Schneider 2014).



Abb. 5: Ausprägungen der Esca-Symptomatik: a: Rebe mit Tigerstreifenmuster; b: Rebe mit Apoplex; c: Teilapoplex an den vorderen Trieben; d: abgestorbene Laubwand aufgrund eines gespaltenen Stammes.

2.3. Sporenfallen

Zu Versuchsbeginn 2013 in der Kalenderwoche (KW) 16 wurden Sporenfallen in 2 cm Entfernung von Schnittwunden an Stammköpfen von Reben (Abb.6 a), die im Vorjahr sichtbare Esca-Symptome gezeigt hatten, angebracht. Hierfür wurden die Anlagen der Sorten Phoenix und Chardonnay ausgewählt (Abb. 4) und jeweils zwei Fallen pro Anlage platziert. In der Anlage Chardonnay wurde zusätzlich zwischen den beiden Stammköpfen eine dritte Falle in der Traubenzone aufgehängt.

2014 wurde der Versuch um jeweils eine Falle in der Laubwand erweitert (Abb. 6 b), um ein mögliches zeitgleiches oder zeitversetztes Auftreten von Sporen dort mit dem Sporenaufkommen in der Traubenzone aufzuzeigen. Bis zum Ende des Versuchs im Winter 2015 wurden die Sporenfallen über den ganzen Versuchszeitraum in einem wöchentlichen Rhythmus gewechselt.



Abb. 6: Sporenfallen in der Anlage Phoenix:

a: Sporenfalle an einem Stammkopf einer Phoenixrebe; b: Sporenfalle am hohen Draht in der Laubwand der Phoenix Anlage.

Als Fallen wurden Objektträger verwendet, die beidseitig mit Vaseline beschichtet wurden. Zur Auswertung wurden die Sporenfallen mit 15 ml sterilem Leitungswasser mit einem Tropfen Tween gewaschen. Das Filtrat wurde anschließend durch zwei Filter aus Zellulose-Acetat gefiltert (ms scientific). Der erste Filter hatte eine Porengröße von 5 μm und sollte größere Partikel wie Erde, Pollen und große Sporen zurückhalten. Der zweite Filter hatte eine Porengröße von 0,45 μm und sollte kleine Sporen wie die von *Pch* auffangen.

Anschließend wurde die DNA der im Filter enthaltenen Sporen mithilfe des „InnuPrep PlantDNA Extraktions Kit“ Kits (Analytik Jena, Jena, Deutschland) isoliert. Da die DNA von *Pch* auch in den Filtern mit 5 μm Porengröße nachweisbar war (vgl. Ergebnis 3.2 „Nachweis von *Pch* in Sporenfallen“), wurde die DNA aus beiden Filtern extrahiert. Wenn Fallen im Einzelnen erwähnt werden, so lautet die Bezeichnung wie folgt: 1. die Anlage in der die Falle platziert wurde (CH = Chardonnay bzw. PH = Phoenix), 2. die Fallenummer selbst und 3. die KW in der die Falle beprobt wurde, z.B. CH 2 KW 38 bedeutet Falle an Position 2 in der Chardonnay-Anlage, die in der KW 38 beprobt wurde.

2.4. Nachweis von *Pch* mittels Nested-PCR

Die aus den Sporenfallen extrahierte DNA wurde grundsätzlich mittels Nested-PCR untersucht, da eine direkte PCR aufgrund geringer DNA-Konzentration nicht möglich war. Für beide Reaktionen wurde Taq DNA Polymerase (Super Hot Start Taq, Genaxxon bioscience GmbH) verwendet.

Die erste PCR wurde mit den Primern ITS1-F (Gardes u. Bruns 1993) und ITS4 (White et al. 1990) zur Amplifikation der ITS Region durchgeführt. Für die PCR wurde ein 20 µl Ansatz mit 11,65 µl H₂O, 4 µl Puffer (5x), 0,4 µl dNTP (10 nM each), 0,4 µl PrimerFwd (10 nM), 0,4 µl PrimerRev (10 nM) 3 µl Template und 0,15 µl (0,75 units) TaqPolymerase verwendet und die Reaktion mit folgenden Parametern durchgeführt (Tab.2):

Schritt	Dauer	Zyklen
Denaturierung bei 95 °C	5 min	1 x
Denaturierung bei 95 °C	20 s	30 x
Annealing bei 53 °C	15 s	
Elongation bei 72 °C	30 s	
Finale Elongation bei 72 °C	1 min	1 x

Tab. 2: Schritte der ersten Reaktion der Nested-PCR mit den Primern ITS1-F und ITS4 mit Super Hot Start Taq (Genaxxon).

Anschließend wurde 1 µl des PCR-Produkts aus der ersten Reaktion als Template in die zweite Reaktion gegeben. Die zweite PCR, ein 20 µl Ansatz mit gleicher Zusammensetzung wie die erste Reaktion, wurde unter Verwendung *Pch*-spezifischer PCH5 (5'-AAT CTA GAG AGA CTT CTG CAA CAA AAC AAT AG-3') und PCH3 (5'-AAC TCG AGG TGA CGT CTG AAC GGT TCC ATC-3') (Fischer unpub.) mit folgenden Parametern (Tab.3) durchgeführt:

Schritt	Dauer	Zyklen
Deanturierung bei 95 °C	5 min	1 x
Denaturierung bei 95 °C	20 s	30 x
Annealing bei 63 °C	15 s	
Elongation bei 72 °C	20 s	
Finale Elongation bei 72 °C	1 min	1 x

Tab. 3: Schritte der zweiten Reaktion Nested-PCR mit den Primern PCH5 und PCH3 mit Super Hot Start Taq (Genaxxon).

Die Auftrennung der Banden erfolgte mittels Gelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und anschließender Bildauswertung.

2.5. Nachweis von Stammunterschieden mittels Nested-PCR

Eine weiterführende Untersuchung der DNA aus den Sporenfallen wurde mit Primern durchgeführt, die aus den sequenzierten Polymorphismen der RAMS-Analyse (vgl. Material und Methoden 2.8 „RAMS-Analyse“) entwickelt worden waren (Tab.4).

Primername	Sequenz in 5'-3'
MM 5-450F	GGA GAT TCT GAA CCC TCA CG
MM 5-450R	ATA AAA ACG CCC CCA AAT TC
MM 5-200F	ACC CTC ACG ATC AAG AAC CT
MM 5-200R	CTC CTG CCC AAA ACC TGT TC
MM 9-450F	CCC CAA ATT CAT CCC AAC GA
MM 9-450R	TCT TTC ACT TCA CCT CAC CTC
MM 9-300F	CTC CTG CCC AAA ACC TGT TC
MM 9-300R	CAC CGG AGA TTC TGA ACC CT

Tab. 4: Liste der aus den Polymorphismen der RAMS-Primer entwickelten Primern:

Die Primer MM5-450F/ MM5-450R flankieren den Polymorphismus der beim RAMS5 gefunden wurde. Die Primer MM5-200F/ MM5-200R dienen als innere Primer für eine mögliche Nested-PCR. Die Primer MM9-450F/ MM9-450R flankieren den Polymorphismus der beim RAMS9 gefunden wurde. Die Primer MM9-300F/ MM9-300R dienen als innere Primer für eine mögliche Nested-PCR.

Da auch hier eine direkte PCR nicht zum Erfolg führte (vgl. Ergebnisse 3.3“Analyse der Sporenfallen mit Primern aus den RAMS-Analysen“), wurden Primer für eine Nested-PCR entworfen. Beide Reaktionen der Nested-PCR wurden mit Taq DNA Polymerase (KAPA HiFi Hotstart Taq, Peqlab, Erlangen, Deutschland) in einem 20 µl Ansatz mit 11,4 µl H₂O, 4 µl Puffer (5x), 0,2 µl dNTP (10 nM each), 0,6 µl PrimerFwd (10nM) 0,6 µl PrimerRev (10 nM), 3 µl Template und 0,2 µl TaqPolymerase durchgeführt. Für die erste Reaktion mit den äußeren Primern wurde folgendes Protokoll verwendet (Tab. 5):

Schritt	Dauer	Zyklen
Denaturierung bei 95 °C	5 min	1 x
Denaturierung bei 98 °C	20 s	20 x
Annealing bei 53 °C	15 s	
Elongation bei 72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation bei 72 °C	1 min	1 x

Tab. 5: Schritte der ersten Reaktion der Nested-PCR mit den Primern MM 5-450 F und MM 5-450R mit KAPA Hifi Hotstart Taq (Kapa).

Aus der ersten Reaktion wurde 1 µl des PCR-Produkts als Template in der zweiten Reaktion eingesetzt. Der PCR-Ansatz war identisch mit dem der ersten Reaktion. Die PCR wurde mit den inneren Primern (vgl. Ergebnisse 3.3“Analyse der Sporenfallen mit Primern aus den RAMS-Analysen“) wie folgt durchgeführt (Tab. 6):

Schritt	Dauer	Zyklen
Deanturierung bei 95 °C	5 min	1 x
Denaturierung bei 98 °C	20 s	20 x
Annealing bei 63 °C	15 s	
Elongation bei 72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation bei 72°C	1 min	1 x

Tab. 6: Schritte der zweiten Reaktion der Nested-PCR mit den Primern MM 5-200F und MM 5-200R mit KAPA Hifi Hotstart Taq (Kapa).

Die Auswertung erfolgte mittels eines 2%igen Agarosegels (Carl Roth) um eine verbesserte Auftrennung der Längenpolymorphismen zu gewährleisten.

2.6. Verrechnung des Nachweises aus den Sporenfallen mit Wetterdaten

Die in dieser Arbeit verwendeten Wetterdaten stammten von einer Wetterstation des Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) am Standort Siebeldingen (Abb. 4). Die Wetterdaten sind als Tageswerte auf der Homepage des DLR verfügbar und wurden zur Verrechnung mit den Nachweisen von *Pch* aus Sporenfallen in Wochenwerten zusammengefasst.

Die Auswahl geeigneter Wetterparameter, die für die Sporulation von *Pch* in Frage kommen, erfolgte anhand von Literatur (vgl. Ergebnisse 3.5 „Korrelation des Sporennachweises mit den Wetterdaten“ und Diskussion 4.3 „Nachweis von *Pch* in den untersuchten Anlagen und Korrelation mit dem Wetter“). Hierzu gehörten die Temperatur (Maxima und Minima), die relative Feuchte (Maxima und Minima) und der Niederschlag. Die Auswahl der verwendeten Wetterparameter erfolgte nach einer Unabhängigkeitsanalyse der einzelnen Parameter voneinander. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass Parameter verwendet wurden, die miteinander bereits korrelieren (vgl. Anhang A). Für die finale Auswertung wurden die Parameter Maximaltemperatur (Tmax), minimale Luftfeuchte (Fmin), Niederschlag (NS) und das Jahr berücksichtigt.

Alle Berechnungen wurden mit der Statistiksoftware R (Version 3.0.3) durchgeführt. Das Auftreten von Sporen in Sporenfallen im Zusammenhang mit Wetterdaten wurde mittels eines binomialen generalisierten linearen Modells (glm) berechnet, bei dem die Wahrscheinlichkeit (p) des Auftretens von Sporen (0=nein / 1=ja) von den Wetterfaktoren und deren Interaktion untereinander abhängt. Die Formel in R hierfür lautet:

$$\text{glm}(\text{Nachweis} \sim \text{Tmax} * \text{Fmin} * \text{NS} * \text{Jahr})$$

Das gefundene Modell wurde anschließend soweit vereinfacht, bis das am „besten-erklärende“ Modell gefunden wurde. Als Wert hierfür gilt das Akaike Informationskriterium (AIC) eines Modells. Das Modell mit dem kleinsten AIC-Wert gilt hierbei als das am besten Erklärende.

Das finale Modell für die Berechnung enthielt die Abhängigkeit des Auftretens von Sporen in Abhängigkeit von Tmax, Fmin, NS und Jahr, sowie den Interaktionen von Tmax und Fmin, Tmax und NS, Fmin und NS, Tmax und Jahr, Fmin und Jahr, NS und Jahr, Tmax, Fmin und Jahr und Tmax, NS und Jahr. Die Formel hierfür lautet:

$$\text{glm}(\text{Nachweis} \sim \text{Tmax} + \text{Fmin} + \text{NS} + \text{Jahr} + \text{Tmax:Fmin} + \text{Tmax:NS} + \text{Fmin:NS} + \text{Tmax:Jahr} + \text{Fmin:Jahr} + \text{NS:Jahr} + \text{Tmax:Fmin:Jahr} + \text{Tmax:NS:Jahr})$$

Anschließend wurde das Modell auf seine Eignung überprüft. Da die Parameter Tmax, Fmin und NS einen Einfluss haben wurden alle drei Parameter untersucht. Hierfür wurde im ersten Schritt die Wahrscheinlichkeit des Sporenauftretens (p) bei einer Feuchte von 0-100% berechnet. Für die

Temperatur wurde der Median sowie die Minimal- und Maximalwerte von T_{min} verwendet. Für den Niederschlag wurde der Mittelwert gewählt.

Des Weiteren wurde die Wahrscheinlichkeit (p) in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Hierfür wurden Temperaturen von -10 °C bis 40 °C angenommen. Für die Niederschläge wurden die gemessenen Minimal- und Maximalwerte sowie der Mittelwert verwendet. Für die Luftfeuchte wurde der Mittelwert als konstante gewählt.

Zuletzt wurde die Wahrscheinlichkeit (p) in Abhängigkeit des Niederschlages von 0-8 mm berechnet. Für die Temperatur wurde der Median sowie die Minimal- und Maximalwerte von T_{min} verwendet. Für den Niederschlag wurde erneut der Mittelwert gewählt.

Da das Jahr mit den einzelnen Parametern in Interaktion steht, wurden alle Berechnungen für die Jahre 2013-2015 separat durchgeführt.

2.7. Stammsammlung von *Pch*

Für die molekulargenetische Untersuchung von *Pch* stand am JKI eine Stammsammlung (Tab. 7) zur Verfügung, die im Laufe der Arbeit um die Isolate aus Stellenbosch (Südafrika) (Sammlung F. Halleen) und eigene Isolate aus der „Phoenixanlage“ in Siebeldingen (von P. Schneider) erweitert wurde:

Stammbezeichnung	Ursprung
07/93	Neumagen
52/3	Italien
CK V	Blankenhornsberg, Freiburg
H32	Siebeldingen
H37	Siebeldingen
H3K	WBI, Freiburg
H53	Siebeldingen
H67	Siebeldingen
HT3	Hohentwiel
M1	Mosel
M2	Mosel
Pch133	Italien
Pch35	Sizilien
Pch37	Italien
Ste63	Stellenbosch, Südafrika
Ste77	Stellenbosch, Südafrika

Tab. 7: Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*) und ihre geographische Herkunft. Die Stämme aus Siebeldingen stammen von Reben aus der Phoenix Anlage.

2.8. RAMS-Analyse

Für die Analyse der Stammsammlung wurde ein Set aus 17 RAMS-Primern verwendet (Tab. 8). Diese enthielten bis auf die Primer 11 und 14-17 einen Anker aus Wobbles, der eine genaue Bindung der Primer gewährleisten sollte.

Primer	Sequenz	Quelle	Primer	Sequenz	Quelle
RAMS1	HBH(AG) ₇ A	Mahuku et al. (2002)	RAMS10	DBY(CAT) ₅	Zhou et al. (2001)
RAMS2	DBDA(CA) ₇	Mahuku et al. (2002)	RAMS11	(CAG) ₅	Zhou et al. (2001)
RAMS3	DVD(CT) ₇ C	Mahuku et al. (2002)	RAMS12	DHY(ACTG) ₄	Zhou et al. (2001)
RAMS4	YHY(GT) ₇ G	Hantula et al. (1997)	RAMS13	BYB(GATA) ₄	Zhou et al. (2001)
RAMS5	BDB(ACA) ₅	Hantula et al. (1996)	RAMS14	(CATA) ₄	Zhou et al. (2001)
RAMS6	DDB(CCA) ₅	Hantula et al. (1997)	RAMS15	(GGAT) ₄	Zhou et al. (2001)
RAMS 7	DHB(CGA) ₅	Hantula et al. (1996)	RAMS 16	(GACA) ₄	Zhou et al. (2001)
RAMS 8	HYH(GT) ₇	Zhou et al. (2001)	RAMS 17	(CTTC) ₄	Zhou et al. (2001)
RAMS 9	BBD(AAC) ₅	Zhou et al. (2001)			

Tab. 8: Set der in dieser Arbeit verwendeten 17 RAMS Primern: Die Anker bestehen aus drei Wobbles B=C/G/T, D=A/G/T, H=A/C/T und Y=A/C/G. (Quellen: Hantula et al. (1997); Zhou et al. (2001))

Die PCR wurde mit einem RAMS-Primer durchgeführt, der gleichzeitig als Fwd- und Rev-Primer fungierte. Für die PCR wurde die „KAPA HiFi Hotstart Taq“ und folgende Parameter verwendet (Tab. 9). Die spezifische Annealingtemperatur wurde für jeden Primer mittels einer Gradienten-PCR ermittelt (vgl. Ergebnisse 3.6 „Polymorphismen in den RAMS-Primern“ Tab. 19)

Schritt	Dauer	Zyklen
Denaturierung bei 95 °C	5 min	1 x
Denaturierung bei 98 °C	20 s	25 x
Annealing bei der jeweiligen spezifischen Temperatur	15 s	
Elongation bei 72°C	1,5 min	
Finale Elongation bei 72 °C	5 min	1 x

Tab. 9: Schritte der PCR mit RAMS-Primern mit Kapa Hifi Hot start Taq (Kapa).

Jeder Primer erzeugte ein spezifisches Bandenmuster mit Fragmentlängen zwischen 100 bp und 3.000 bp. Die Auftrennung der Banden erfolgte durch Gelelektrophorese mittels eines 2,5%igen Agarosegels.

Für die Bestimmung der Polymorphismen zwischen einzelnen Stämmen wurden drei technische Wiederholungen pro Primer durchgeführt und nur die reproduzierbaren Banden für die Analyse verwendet. Banden mit derselben Größe wurden als identisch angesehen.

Banden, die nur in einzelnen Genotypen nachweisbar sind, wurden als Allele mit 1 für einen positiven Nachweis und 0 für eine Abwesenheit der Bande gewertet.

Banden, die in der Auswertung als „Zick-Zack“-Muster (vgl. Ergebnisse 3.7.1 „InDel bei RAMS5“ Abb. 28) auftraten, wurden als Längenpolymorphismus aufgrund eines InDels gewertet. Hier gilt 1 für eine Insertion und 0 für eine Deletion. Die Fragmente mit potentiellen InDels wurden kloniert und sequenziert.

Für einen Vergleich der Sequenzen mit quantitativen Merkmalen (0/1 Auswertung) wurden die Sequenzen in Kombinationsclustern zusammengefasst. Diese konnten ebenfalls binär ausgewertet werden (1 = ja und 0 = nein). Damit konnten sie gemeinsam mit den übrigen binären Merkmalen verglichen und den Stämmen Haplotypen zugeordnet werden, die sowohl Sequenzen als auch binäre Loci enthielten.

Eine anschließende Stammbaumanalyse wurde mittels UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Methode durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die binären Daten in eine euklidische Distanz umgewandelt, die die Distanz der einzelnen Haplotypen untereinander widerspiegelt. Danach wurde die UPGMA durchgeführt. Die UPGMA ist, wie eine Neighbor Joining Analyse distanzbasiert, jedoch wurde sie der Neighbor Joining Analyse vorgezogen, da sie die Distanzen zuverlässiger wiedergibt. Dies wurde durch den cophenetic correlation coefficient (CP) ermittelt, der die Zuverlässigkeit des Dendrogramms beschreibt. Je näher der Wert bei 1 liegt, desto zuverlässiger ist das Model.

2.9. Klonierung von PCR-Amplifikaten

Die für die Klonierung aus dem Gel ausgeschnittenen Banden der RAMS-PCR wurden nach dem Protokoll des PCR clean-up Gel extraction Kit (Quiagen) aufgereinigt. Die anschließende Ligation der Fragmente in den Vector „pJET1.2/blunt“ erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland).

Die darauf folgende Transformation in die chemokompetenten Zellen, NEB® 5-alpha Competent *E. coli*, (Bezeichnung: *Escherichia coli*, Genotyp *fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) wurde nach dem „blunt end cloning“ Protokoll von New England Biolabs GmbH durchgeführt. Anschließend wurden einmal 50 µl und einmal 100 µl des Ansatzes auf Petrischalen mit auf 37 °C angewärmtem LB (Lysogeny broth)-Medium mit Ampicillin ausplattiert. Die Petrischalen wurden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Vektor ermöglicht eine Positivselektion, da er ein letales Gen enthält, das durch Ligation eines DNA-Inserts in die Klonierungsstelle unterbrochen wird. Somit können nur Zellen mit rekombinanten Plasmiden Kolonien bilden. Plasmide, die kein Insert aufweisen, exprimieren ein letales Restriktionsenzym, wodurch die *E. coli*-Wirtszelle nach der Transformation abgetötet wird. Daher musste keine weitere Selektion der Kolonien erfolgen. Resultierende Einzelkolonien wurden als Übernachtskultur in flüssigem LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C inkubiert und die

DNA mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers (Thermo Fisher Scientific) extrahiert.

Anschließend wurde ein Verdau mit dem Enzym *Bg/III* durchgeführt, um die Größe des Inserts zu verifizieren. Bei einem fehlerhaften Insert war nach der Gelelektrophorese neben dem ca. 3 kb-Fragment des Vektors ein Insert mit falscher Länge nachweisbar. Bei erwarteter Größe des Amplikons wurde die DNA anschließend sequenziert (Seqlab). Sequenzierprimer waren dabei pJETfwd oder pJETrev, für die sich auf dem Vektor Primerbindestellen befinden.

2.10. PCR mit Primern aus Polymorphismen

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden die DNA Fragmente auf Polymorphismen sowie InDels untersucht. Hierfür wurde die Software Bioedit verwendet. Anschließend wurden anhand der Sequenzen Primer entworfen, die diesen Marker flankieren und die Stammsammlung mit diesen Markern analysiert. Hierfür wurde die „KAPA HiFi Hotstart Polymerase“ mit folgendem Protokoll verwendet (Tab.10):

Schritt	Dauer	Zyklen
Denaturierung bei 95°C	5 min	1 x
Denaturierung bei 98°C	20 s	25 x
Annealing bei der jeweiligen spezifischen Temperatur	15 s	
Elongation bei 72°C	1 min/kb	
Finale Elongation bei 72°C	1 min	1 x

Tab. 10: Schritte für die PCR mit Primern aus RAMS-Polymorphismen mit KAPA Hifi Hotstart Taq (Kapa).

2.11. qPCR mittels SYBR Green®

Die qPCR zur quantitativen Auswertung wurde mit Primern *PchFTaq3* 5'TCT GCC AGT AGC CCA ACC AA 3' und *PchRTaq* 5'CAT TTC GCT GCG TTC TTC ATC 3' für die *Pch* spezifische ITS – Region durchgeführt (Nicolai Haag, unpub.). Die PCR mit anschließender Dissoziation wurde mit dem Power SYBR Green Mastermix (Thermo Fisher Scientific), 20 µl Ansatz mit 10 µl SYBR Green® Mastermix, 6 µl H₂O dd, 2 µl Template, 1 µl PrimerFwd (5 µM) und 1 µl PrimerRev (5 µM), mit folgenden Parametern durchgeführt (Tab. 11):

Schritt	Dauer	Zyklen
Ramp bei 50 °C	2 min	1 x
Denaturierung 95 °C	10 min	1 x
Denaturierung 95 °C	15 s	40 x
Annealing 60 °C	1 min	
Dissociation 95 °C	15 s	1 x
60 °C	1 min	1 x
95 °C	15 s	1 x
60 °C	15 s	1 x

Tab. 11: Protokoll für qPCR mittels *Pch*-spezifischer Primer und SYBR Green® Mastermix (Fisher scientific).

Als Template wurde sowohl genomische DNA aus Pilzmyzel als auch positiv getestete DNA, die von den Sporenfallen isoliert wurde, verwendet. Die quantitative Bestimmung erfolgte über eine externe Verdünnungsreihe (100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg) für die genomische DNA des *Pch*-Stammes CKV verwendet wurde. Für ein genaues Ergebnis und zum Ausschluss möglicher Fehler wurde jede Probe dreimal pro Durchlauf getestet und jeweils drei technische Wiederholungen durchgeführt.

2.12. verwendete elektrogesponnene Vliese

Die in dieser Arbeit verwendeten Polymere werden jeweils von der Firma Evonik (Darmstadt) und der Universität Bayreuth (BT) hergestellt (Tab. 12).

Abkürzung/ Handelsname	Gemisch	Formel
PDLLA/ Resomer® R 202 S	Poly(D,L-lactide) acid	
PLGA	Poly(D,L-lactide-co-glycolide) acid 50:50	
PVDF-HFP	Poly(vinylidene fluoride-hexafluoropropylene)	
PBAT/ Ecoflex®	Polybutylenadipat-terephthalat	

Tab. 12: Liste der für die Fasermatten verwendeten Polymere (Strukturformeln von Viola Buchholz (Universität Bayreuth)).

PLGA, PDLLA und Ecoflex® gelten dabei als biologisch abbaubar. PDLLA und PLGA zerfallen durch Hydrolyse in Kompostieranlagen in CO₂ und Wasser. Die Hydrolyse findet auch im menschlichen Körper statt, so wird PLGA auch in der Medizin in Depotarzneien und in Implantaten eingesetzt (Panyam u. Labhasetwar 2003). Im Gartenbau gibt es bereits Mulchfolien aus PLA-Blends, die sich unter UV-Licht zersetzen (Hartmann Brockhaus 2018). Auch Ecoflex® gilt nach der Europäischen Norm EN 13432 als biologisch abbaubar. PVDF-HFP ist nicht biologisch abbaubar, wurde aber für Vergleichstest im Labor verwendet.

Für die Versuche mit elektrogesponnenen Fasermatten wurden Vliese von zwei Herstellern, der Fa. Evonik und der Universität Bayreuth verwendet. Die Vliese der Fa. Evonik stammten aus einem „Nozzle“-Verfahren und wurden auf einen Teller, der mit Backpapier als Trägermaterial belegt war, als Gegenelektrode gesponnen. Die Vliese der Universität Bayreuth wurden ebenso mit einem „Nozzle“-Verfahren hergestellt, jedoch mit einer rotierenden Walze als Kollektor.

Die Vliese, die an der Universität Bayreuth hergestellt und in Labortests verwendet wurden bestanden aus PLGA, Poly(vinylidene fluoride-hexafluoropropylene) (PVDF-HFP) und Ecoflex®. Letzteren wurden in einer Variante mit Polyguanidin (PG) vorbehandelt (Tab 13). Für die Vliese der Fa. Evonik wurden die Polymere Polylactidacid (PDLLA) und Poly(D, L-lactid-co-glycolid) (PLGA) verwendet. (Tab. 14).

Für den Vergleich der unterschiedlichen Materialien, Herstellungsverfahren und Chargen wurde jeweils das Flächengewicht (FG) mg/cm² verwendet.

Die Bestimmung des Flächengewichtes der einzelnen Vlies-Chargen wurde am JKI in Siebeldingen durchgeführt. Hierfür wurden die eingewogenen Fasermatten mit einem Größenstandard mit bekannter Fläche fotografiert. Die Fläche wurde im Anschluss anhand der Pixelzahl des Vlieses und der Pixelzahl des Standards ausgerechnet. Das Auszählen der Pixel erfolgte mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms CorelDraw.

Die Bestimmung der Porengröße einzelner Vliese in µm wurde von den jeweiligen Herstellern an einzelnen Vliesen durchgeführt und gilt exemplarisch für alle Vliese des gleichen Materials. Die Ergebnisse der Messungen wurden am JKI zusammengeführt und mit den jeweiligen Vliesgewichten verrechnet.

Material	Charge	FG (mg/cm ²)	Porengröße (µm+/- Fehler)	Geänderte Fasermorphologie/ Zusätze
PLGA	130717-02	0,97	4,2+/-0,5	
PLGA	141006-01	1,27	2,9+/-0,1	„beads“ in der obersten Schicht
PLGA	130717-01	1,59	3,0+/-0,5	
PLGA	130715-01	2,07	2,8+/-0,2	
PLGA	150701-1	2,42	1,3+/-0,2	dünne Ober- und dicke Unterschicht
PLGA	130716-01	2,43	3,2+/-0,5	
PLGA	150806-01	8,66	1,8+/-0,1	dicke Ober- und Unterschicht
PLGA	150707-01	2,60	3,5+/-0,2	
PLGA	130826-01	3,35	3,6+/-0,3	
PLGA	130801-01	4,23	4,1+/-0,3	
PVDF	150331-04	0,66	4,1+/-0,9	
PVDF	150421-01	8,47	2,1+/-0,6	
Ecoflex®	151222-03	1,44	1,2+/-0,1	
Ecoflex®+	150831-01	0,60	0,8+/-0,1	mit Polyguanidin
Ecoflex®+	151221-01	2,76	0,6+/-0,1	mit Polyguanidin

Tab. 13: Liste der in der Arbeit verwendeten Fasermatten, die von der Universität Bayreuth hergestellt wurden: Verwendete Materialien PLGA, PVDF, Ecoflex® und Ecoflex mit Polyguanidin (Ecoflex®+), die Chargennummern und die dazugehörigen Flächengewichte (FG), Die Porengrößen wurden von der Universität Bayreuth angegeben. Die letzte Spalte enthält Abweichungen von der Standardherstellung (3 h Spinddauer und 50% Polymeranteil) wie veränderte Fasermorphologien und Zusätze wie Polyguanidin (PG).

Material	Charge	FG (mg/cm ²)	Porengröße ($\mu\text{m} \pm$ Fehler)	Geänderte Spinddauer/ Polymeranteile
PDLLA	161	0,67	4,1 \pm 0,2	1 h Spinddauer
PDLLA	160	1,31	2,7 \pm 0,9	2 h Spinddauer
PDLLA	157	1,53	2,0 \pm 0,9	
PDLLA	123	1,69		
PDLLA	208	1,82		
PDLLA	207	2,01		
PDLLA	131	2,04		
PDLLA	209	2,05		
PDLLA	206	2,12		
PDLLA	132	2,28		
PDLLA	163	2,35		
PDLLA	133	2,51		
PDLLA	154	2,53	2,2 \pm 1,0	4 h Spinddauer
PLGA	162	2,10	3,2+1,3	1 h Spinddauer
PLGA	163	2,35		1 h Spinddauer
PLGA-L	211	2,90		leicht
PLGA	254	3,20		30%Polymer
PLGA	152	4,32	1,3 \pm 0,6	2 h Spinddauer
PLGA	153	4,36	1,5 \pm 0,5	
PLGA	223/224/225	4,73		
PLGA-L	204	3,83		leicht
PLGA-L	205	4,70		leicht
PLGA-L	201	4,38		leicht
PLGA	129	5,29		
PLGA	257	5,80		2 h Spinddauer; 30% Polymer
PLGA-S	200	5,97		schwer
PLGA	158	6,15		
PLGA	126	6,15		
PLGA	158	6,15		
PLGA	127	6,17		
PLGA-S	203	6,22		schwer
PLGA	125	6,34		
PLGA-S	199	6,4		schwer
PLGA-S	210	6,44		schwer
PLGA	130	6,49		
PLGA	128	6,50		
PLGA	155	6,82	1,7 \pm 0,6	4 h Spinddauer
PLGA	156	6,88		4 h Spinddauer
PLGA	327	7,165		45 min; 25%Polymer
PLGA	328	7,17		45 min; 25%Polymer
PLGA	258	7,30		30%Polymer
PLGA	322/323	8,02		45 min; 22%Polymer
PLGA	256	10,10		30%Polymer
PLGA	255	13,80		30%Polymer

Tab. 14: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fasermatten, die von der Fa. Evonik hergestellt wurden: Verwendete Materialien, die Chargennummern und die dazugehörigen Flächengewichte (FG) Die Porengrößen wurden von der Fa. Evonik gemessen und gelten exemplarisch für alle Vliese dieses Materials. Die letzte Spalte enthält Abweichungen von der Standardherstellung (3 h Spinddauer und 50% Polymeranteil) wie veränderte Spinddauern oder veränderte Polymeranteile.

2.13. Dichtigkeitstests von Vliesen

2.13.1. Im Labor

Die Dichtigkeitstests wurden mit allen in Tab. 13 und Tab14 aufgeführten Vliesen durchgeführt. Die Vliese wurden dazu mit einer Sporensuspension in den Konzentrationen 1×10^3 Sporen/ml, 1×10^4 Sporen/ml und 1×10^5 Sporen/ml mit jeweils sechs Tropfen à 5 µl beimpft. Für die Gewinnung der Suspension wurde der Stamm CK V verwendet. Hier wurden die Sporen, die zylindrisch geformt und $1 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ groß sind, mit autoklaviertem Leitungswasser abgewaschen. Die Konzentration der Suspension wurde mit einer „Neubauer improved“ Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt und die finale Konzentration mit sterilem Leitungswasser eingestellt.

Die Vliese wurden vor dem Beimpfen 45 min unter UV-Licht sterilisiert und anschließend zur Beimpfung auf PDA-Medium gelegt. Aufgrund der unterschiedlichen Materialverfügbarkeiten wurden bei den Vliesen der Fa. Evonik pro Versuch drei, bei den Vliesen der Universität Bayreuth sechs Wiederholungen durchgeführt.

Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die Vliese jeweils auf neue Platten mit PDA-Medium überführt. Alle Platten wurden anschließend drei Tage bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Sporen auf der „24 h Platte“ unter dem Binokular ausgezählt und somit die Anzahl der „durchgefallenen“ Sporen bestimmt. Auf der Platte nach 72 h wurde anhand der gekeimten Sporen die Anzahl der durchgewachsenen Keimschläuche bestimmt. Als Kontrolle wurden jeweils sechs Tropfen jeder Sporensuspension ausplattiert, die gekeimten Sporen ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Rate der durchgefallenen Sporen und der durchgewachsenen Keimschläuche wurde in Relation zu den gekeimten Sporen in der Kontrolle berechnet.

Da bei den Tests keine signifikante Korrelation zwischen der Dichte der Materialien gegen Sporen und der Konzentration der Sporensuspension festgestellt werden konnte, wurden die Ergebnisse der unterschiedlichen Konzentrationen pro Vlies in der Endauswertung zusammengefasst (vgl. Diskussion 4.8.1 „Dichtigkeit in Abhängigkeit von der Sporenkonzentration“).

2.13.2. Im Saranhaus

Auch auf Reben applizierte Vliese wurden auf ihre Dichtigkeit gegenüber *Pch*-Sporen getestet. Der Test wurde an nicht infizierten, getopften, vierjährigen Weißburgunderreben im Saranhaus durchgeführt.

Dafür wurden im Januar 2014 neun Reben mit aufgebrachtem PDLLA-Vlies mit einer Sporensuspension mit 1×10^4 Sporen/ml auf das Vlies beimpft. Als Kontrolle diente zusätzlich die gleiche Anzahl an Reben, die ohne Vlies beimpft wurden. Nach sieben Monaten wurden die Reben abgeschnitten und jeweils ein 1 cm-langes Stück Holz unterhalb der beimpften Stelle entnommen. Die DNA des Holzstückes und der darin enthaltenen Pilze wurde mittels „InnuPrep PlantDNA

Extraktions Kit“ (Analytik Jena) Kits präpariert und anschließend mittels Nested-PCR auf eine Infektion mit *Pch* untersucht. Eine Wiederholung des Versuches wurde im Jahr 2015 durchgeführt.

2.14. Applikationstest von Vliesen

Die Applikationstests wurden zunächst mit drei Vliesvarianten aus PLGA und PDLLA mit unterschiedlicher Spinddauer im Saranhaus an Topfreben durchgeführt. Jede Variante wurde jeweils auf sechs Pflanzen appliziert. Der im Januar 2014 begonnene Versuch wurde 2015 wiederholt.

Die Vliese aus PDLLA wurden nur an die Schnittstelle der Rebe angedrückt (Abb. 7 a). Jahr 2015 wurden bei den Vliesen aus PLGA zusätzliche Befestigungsmöglichkeiten getestet. Jeweils zwei Vliese wurden mit den Befestigungsmethoden Parafilm, Draht und Wundbalsam (Scotts Celaflo GmbH) erprobt.

Gleichzeitig wurden bei den gleichen Vliesen Dichtigkeitsversuche gegen *Pch*-Sporen durchgeführt (Material und Methoden 2.12 „verwendete elektrogesponnene Vliese“ Tab. 14).

Basierend auf vorangegangenen Ergebnissen des Saranhaustests (vgl. Ergebnisse 3.13.1 „Dichtigkeitsversuche im Gewächshaus“) wurde der Applikationstest im Freiland nur mit Vliesen aus PDLLA durchgeführt. Hierfür wurden drei Reben in der Anlage Chardonnay ausgewählt und die Vliese auf frische im Winterschnitt entstandenen Schnittwunden unterschiedlicher Größe und unterschiedlichen Neigungswinkeln angebracht. Um eine prinzipielle Eignung des Vlieses für Wunden am Stamm zu testen, wurde auch eine senkrechte Wunde mit einbezogen (Abb. 7 b).



Abb. 7: Appliziertes PDLLA-Vlies auf Reben:
a: Vlies auf getopfter Rebe im Saranhaus; b: Vlies auf Rebe in der Chardonnay-Anlage.

2.15. Alterungstests von Vliesen

2.15.1. Alterungstest im Freiland

Um die Abbaubarkeit der Vliese im Freiland zu testen wurden zwei Vliesvarianten der Fa. Evonik, PLGA und PDLLA mit je drei Wiederholungen in einem Dauerversuch im Boden zwischen Rebstöcken in einer Junganlage eingegraben (Abb. 8).

Der Versuchszeitraum betrug ein halbes Jahr, 15.08.2013-10.02.2014, wobei im ersten Monat die Entnahme von Proben wöchentlich erfolgte, da in diesem Zeitraum die größten Materialveränderungen zu erwarten waren. Im weiteren Versuchsverlauf wurden die Vliese im monatlichen Turnus entnommen. Zu Versuchsbeginn wurde von allen Proben das Trockengewicht (TG) bestimmt. Der Materialabbau wurde dann anhand des TG-Verlustes, der Optik der Vliese und Messung der Molmasse, welche an der Universität Bayreuth durchgeführt wurde, bestimmt.

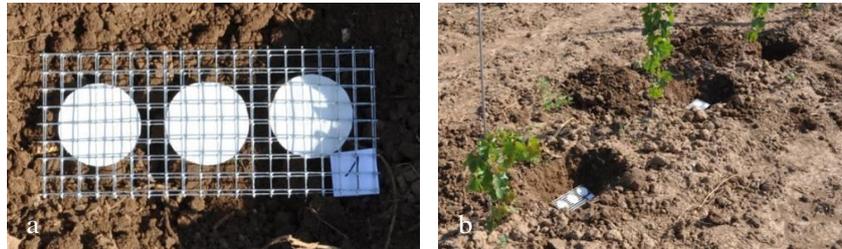


Abb. 8: Aufbau des Abbaubarkeitstests im Boden:
a: drei PLGA-Vliese pro Boniturzeitpunkt im Haltegitter und b: Proben zwischen den Reben vor dem Bedecken mit Erde.

Darüber hinaus wurde das Verhalten der Vliese in der Stammkopfhöhe (Abb. 9) über den Verlauf eines halben Jahres, 20.05.2014-04.11.2014, getestet. Hierfür wurden drei Vliesvarianten (Tab. 15) getestet, eine Variante PDLLA sowie zwei Varianten PLGA, die durch ihr Gewicht in zwei Gruppen gegliedert wurden. Auch im diesem Versuch erfolgte die Beprobung der Vliese im ersten Monat wöchentlich und im weiteren Verlauf monatlich. Es wurden pro Variante und Probenstermin drei Wiederholungen durchgeführt. Die Materialveränderungen wurden dann mit den Wetterparametern Temperaturminima und -maxima, der Niederschlagsmenge sowie der Strahlungssumme korreliert.

Material	Gewicht in mg/cm ²	Versuch
PDLLA	45-69	Boden
PLGA	85-123	Boden
PDLLA	36-42	Traubenzone
PLGA leicht	77-89	Traubenzone
PLGA schwer	115-179	Traubenzone

Tab. 15: Abbauersuch der Vliese im Boden und in der Traubenzone:
Verwendete Vliese aus PDLLA und PLGA mit den dazugehörigen Flächengewichten in mg/cm² und der jeweilige Ausbringungsort.

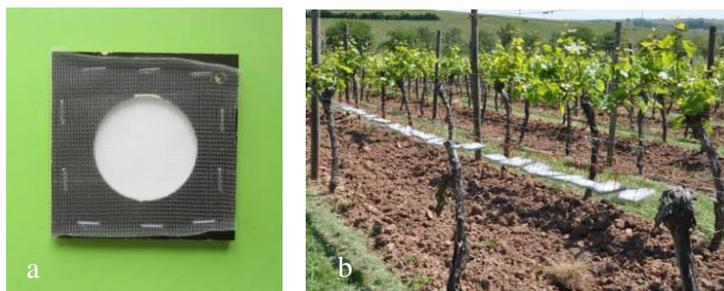


Abb. 9: Aufbau des Abbaubarkeitstests in der Traubenzone:
a: PLGA-Probe im Holzrahmen und b: Proben in der Phoenixparzelle ausgehängt.

2.15.2. Alterungstest im Labor

In den Laboren der Fa. Evonik wurden Vliese aus PLGA und PDLA einem sechs monatigen künstlichen Alterungstest unterzogen. Die Parameter wurden aus den Wetterdaten der Monate November bis März der Jahre 2012 bis 2014 (Tab. 16) ermittelt, da das Vlies in diesem Zeitpunkt an der Rebe haften und dicht gegen Sporen sein sollte. Zunächst wurde über einen Zeitraum von sechs Monaten der Temperaturwechsel in einer Klimakammer der Evonik simuliert.

Bei einer Wiederholung des Alterungstests wurde zusätzlich eine künstliche Bestrahlung im Anschluss durchgeführt, um einen möglichen Einfluss von Sonneneinstrahlung auf die Vliesalterung und die Dichtigkeit zu testen.

Bei den Vliesen aus PLGA wurde für die Tests eine Lampe vom Typ „Xenontest Beta LM“ mit einer Bestrahlungsleistung von 60 W/m² verwendet. Bei den Vliesen aus PDLA wurde hierfür eine „Xenontest Alpha+“ mit einer Bestrahlungsleistung von 180 W/m² verwendet. Beide Geräte werden in der Kunststoffprüfung zur Testung von Witterungen verwendet.

Die Belichtungszeiten wurden aufgrund der unterschiedlichen Leistungen angepasst und die Belichtungstests unabhängig voneinander bewertet. Daher wird der Belichtungstest bei den Vliesen aus PLGA nachfolgend als Suntest, bei den Vliesen aus PDLA nachfolgend als Bewitterungstest bezeichnet.

	Tageslänge (h)	Temperatur (°C)	rel. Feuchte (%)	Strahlung (W/m ²)
Tag	8	0	90	124
Nacht	16	-5	80	0

Tab. 16: Tageswerte für den künstlichen Alterungsversuch:
Tageslänge in Stunden (h), Temperatur (°C), die relative Luftfeuchte (%) und die Strahlung (W/m²) gemittelt an den Jahreswerten der Monate November bis März in den Jahren 2012-2014 (Daten stammen aus der Wetterstation am Standort Siebeldingen).

Wie bei den Abbaubarkeitstests in der Traubenzone und im Boden erfolgte die Beprobung der Vliese im ersten Monat wöchentlich und im weiteren Verlauf monatlich. Nach diesem Zeitraum für die künstliche Alterung erfolgte dann ein Dichtigkeitstest.

2.16. Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalienliste:

Malzextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
6x Ladepuffer	PEQLAB GmbH, Erlangen, Deutschland
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bacto-Trypton	Hartenstein Gesellschaft für Labor und Medizintechnik mbH, Würzburg, Deutschland
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNA Stain Clear G	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol 99%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kartoffelextrakt-Glucose-Agar/Potato-Dextrose-Agar (PDA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LE-Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
DNA Leiter 100bp extended	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Leiter 100bp+	PEQLAB GmbH, Erlangen, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Naturen Bio Wundbalsam	Scotts Celaflor GmbH, Mainz, Deutschland
Power Sybr®	Applied Biosystems™ (jetzt Thermo Fisher Scientific, Inc.) Schwerte, Deutschland
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Verwendete Kits:

CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc., Schwerte, Deutschland
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc., Schwerte, Deutschland
InnuPrep PlantDNA Extraktions Kit	Analytik Jena, Jena, Deutschland
PCR Aufreinigung	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR clean-up Gel extraction	Machery Nagel, Düren, Deutschland
peqGOLD Gel Extraction Kit (S-Line)	PEQLAB GmbH, Erlangen, Deutschland

Verwendete Polymerasen, Oligotide und Enzyme

Fast Digest <i>Bg</i> /II	Thermo Fisher Scientific, Inc. Schwerte, Deutschland
KAPA HiFi Hot Start PCR Kit	PEQLAB GmbH, Erlangen, Deutschland
Primersynthese Metabion GmbH	Metabion GmbH Planegg, Deutschland
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems™ (jetzt Thermo Fisher Scientific, Inc.) Schwerte, Deutschland
SuperHot Taq	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland

Vektoren und kompetente Zellen

NEB 5-Alpha competent E.coli	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
pJET Vector	Thermo Fisher Scientific, Inc., Schwerte, Deutschland

Filter und Filterhalter

0,45µm-Filter Celluloseacetat	msscscientific Chromatographie-Handel GmbH, Berlin, Deutschland
5µm-Filter Celluloseacetat	msscscientific Chromatographie-Handel GmbH, Berlin, Deutschland
Inline Filterhalter	msscscientific Chromatographie-Handel GmbH, Berlin, Deutschland

Geräte

7500 Fast Real Time PCR System 9700	Applied Biosystems TM (jetzt Thermo Fisher Scientific, Inc.) Schwerte, Deutschland
Analysenwaage AC 210S	Satorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav DX-65	Systec, Karlsruhe, Deutschland
Binokular	Olympus Deutschland GmbH, Düsseldorf
div.Gefrierschränke bis -20°C	Liebherr –International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Geldokumentation	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Gelelektrophoresekammern	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Leica DM4000 B LED	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle R239	SHARP electronics GmbH, Deutschland
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Inc., Schwerte, Deutschland
Peqstar Gradientencycler	PEQLAB GmbH, Erlangen, Deutschland
Pipetten diverse Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten, diverse Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Powersupply Consort EV243	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Reagenzglasschüttler Vortex Genie 2	Scientific industries über VWR International, Darmstadt, Deutschland
Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Inc., Schwerte, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tissue Lyser II	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vakuumentrifuge Concentrator plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waage	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Wärmeschrank Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific, Inc. Schwerte, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Software

Bio 1D	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9	Ibis Bio Science, Carlsbad, California
BLAST	National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland
Corel Draw Graphic Suite X6	Corel GmbH, München, Deutschland
DendroUPGMA: A dendrogram construction utility	Santi Garcia-Vallvé and Pere Puigbo Biochemistry and Biotechnology Department. 2002, Tarragona, Spanien
Primer 3 v. 0.4.0	Whitehead Institute for Biomedical Research
Quantum SD4	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
R version 3.0.3	R Development Core Team

Medien

PDA Medium:

39,5 g PDA
1.000 ml H₂O

MA Medium:

20 g Malzextrakt
Spatelspitze Hefeextrakt
1.000 ml H₂O

LB Medium (flüssig):

5 g Hefeextrakt
10 g Trypton
5 g Natriumchlorid
1.000 ml H₂O

LB Medium (fest):

5 g Hefeextrakt
10 g Trypton
5 g Natriumchlorid
15 g Agar Agar
1.000 ml H₂O

TAE-Puffer

242 g Tris-Base
57,1 ml Eisessig
100 ml EDTA pH 8 aus 0,5 M Stock-Lösung

3. Ergebnisse

3.1. Boniturergebnisse der Esca-Symptomatik in den Parzellen Chardonnay und Phoenix

In der Parzelle Chardonnay zeigten 2012 nur zwei Reben Tigerstreifensymptomatik (Abb. 10). In den Jahren 2013 und 2014 konnten in der Anlage keine Symptome beobachtet werden. Im Jahr 2015 zeigten zwei weitere Reben Tigerstreifen, die Symptome traten jedoch nicht an Reben auf, die 2012 schon auffällig waren.

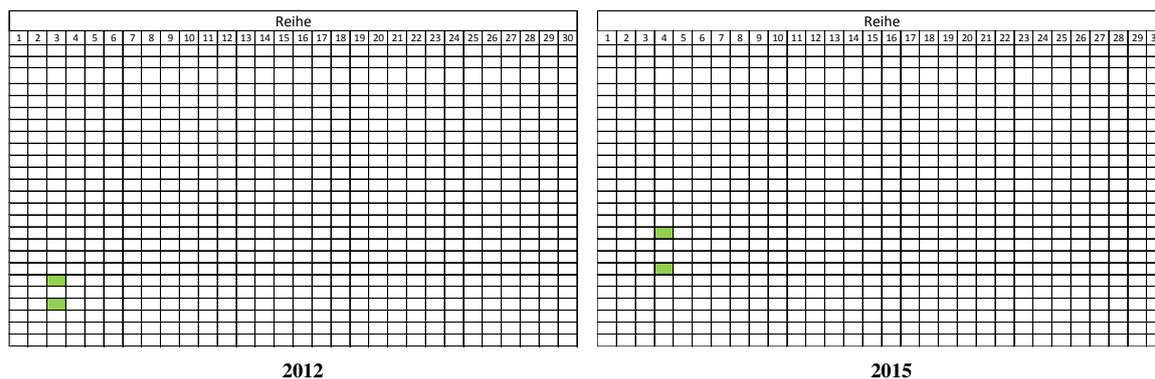


Abb. 10: Bonitur der Chardonnay-Parzelle:
Zeitpunkte: links: Ende September 2012 und rechts: Ende September 2015; grün: Rebstöcke mit chronischer Esca-Symptomatik; weiß: Stöcke ohne Symptome. In den Jahren 2013 und 2014 war die Parzelle symptomfrei.

In der Anlage Phoenix zeigten im ersten Boniturjahr 2012 ca. 7% der Stöcke ein Tigerstreifenmuster (Abb. 11). Ein Apoplex war nur vereinzelt beobachtbar. Im Jahr 2013 nahm die Anzahl der apoplektischen Stöcke im Jahresverlauf deutlich zu. Auch die Zahl der Stöcke mit Blattsymptomatik stieg im Vergleich zum Vorjahr um 14,7% an. Im darauffolgenden Jahr zeigte sich erneut eine starke Zunahme der Apoplexsymptomatik und der Tigerstreifen. Hier stieg die Blattsymptomatik um bis zu 30,4% und die Anzahl der Apoplexe um 57,9% im Vergleich zum Vorjahr an. Das Jahr 2015 stand dazu in einem starken Gegensatz, da im Vergleich zu den Vorjahren die Symptome von Apoplex um 76% und die Blattsymptomatik um 57% zurückgingen (Abb. 11).

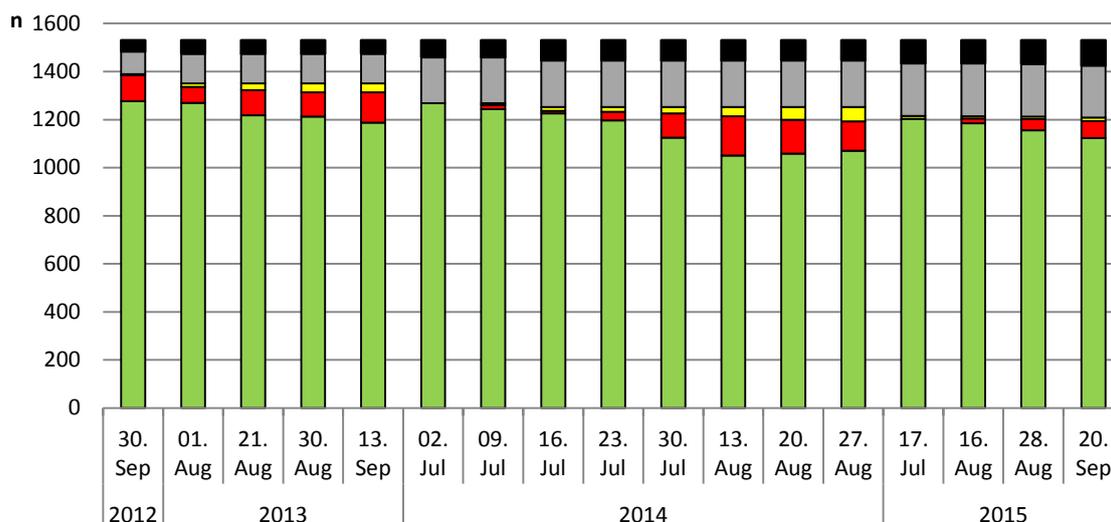


Abb. 11: Auftreten der Esca Symptomatik in der Phoenix-Anlage:
 Zeiträume: September 2012, August bis September 2013, Juli bis August 2014, Juli bis September 2015; schwarz: entfernte Stöcke; grau: tote Stöcke; gelb: apoplektische Stöcke; rot: Stöcke mit chronischer Esca; grün: optisch gesunde Reben; n: Gesamtanzahl der Stöcke in der Parzelle: 1530.

Am Beispiel der Bonituren im Phoenix von 2014 und 2015 zeigte sich deutlich, dass vor Juli keine Symptome chronischer Esca in der Laubwand zu erwarten sind. Auffällig bei den Bonituren war die zufällige Verteilung der Symptomatik (Abb. 12). Es gab keine deutlich erkennbaren Herde, von welchen aus sich die Symptomatik weiter ausbreitete. Ein Auftreten der Symptome am gleichen Stock trat im ganzen Zeitraum insgesamt nur 59-mal auf. Dabei gab es keinen Stock, der alle vier Jahre hintereinander eine Tigerstreifensymptomatik aufwies. In sieben Einzelfällen zeigten Stöcke an drei aufeinanderfolgenden Jahren Blattsymptome.

Auffällig war eine starke Zunahme von Totstöcken und den daraus resultierenden fehlenden Stöcken in der Anlage über den Zeitraum von vier Jahren (Abb. 12).



Abb. 12: Ausprägung der Esca Symptomatik in der der Phoenix Parzelle:
 Zeitpunkte: Ende der Bonitur im September der Jahre 2012-2015 grün: Stöcke mit chronischer Esca, orange: Stöcke mit Apoplex; hellgrau: tote Stöcke und schwarzgrau: fehlende Stöcke.

3.2. Nachweis von *Pch* in Sporenfallen

Neben der Symptomatik wurde in den Anlagen Chardonnay und Phoenix auch das Aufkommen von *Pch*-Sporen untersucht. Dabei konnte der Pilz in den Sporenfallen über den gesamten Versuchszeitraum nachgewiesen werden. Jedoch war ein Nachweis jedoch nur mittels Nested-PCR möglich, da für eine sofortige Amplifikation mit Spezies-spezifischen Primern die DNA-Mengen in den Proben offensichtlich zu gering waren (Abb. 13 a und b).

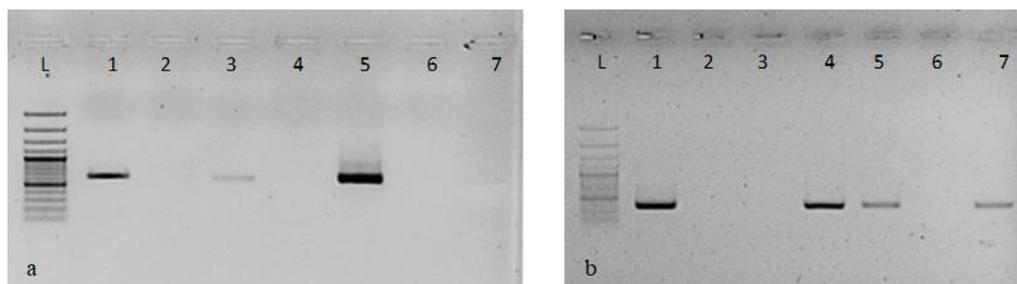


Abb. 13: Nested-PCR mit DNA aus den Sporenfallen:
a: erste Reaktion der PCR mit den Primern ITS1-F/ ITS4; **b:** zweite Reaktion der Nested-PCR mit den Primern PCH3/ PCH5; jeweils von links nach rechts: L: Leiter 100bp+ (peqlab); Proben 1-7: DNA aus Sporenfallen.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen von *Pch*-DNA 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg und 1 fg mit dem Protokoll der Nested-PCR untersucht. Die Verdünnung wurde einmal mit autoklaviertem destilliertem Wasser und einmal mit einer Suspension (Susp.) verschiedener ubiquitärer Pilzstämmen hergestellt. Es zeigte sich, dass bei den Verdünnungen mit H₂O bei drei Wiederholungen *Pch* bis zu einer Konzentration von 10 fg nachgewiesen werden konnte. Bei den Konzentrationen, die mit dem Gemisch eingestellt wurden, war ein kontinuierlicher Nachweis nur bis 1 pg möglich (Tab. 17).

		Konzentration					
		100 pg	10 pg	1 pg	100 fg	10 fg	1 fg
Verdünnung mit	H ₂ O	1	1	1	1	1	0
	H ₂ O	1	1	1	1	1	0
	H ₂ O	1	1	1	1	1	1
	Susp.	1	1	1	1	0	0
	Susp.	1	1	1	1	1	0
	Susp.	1	1	1	0	0	0

Tab. 17: Nachweisgrenze von *Pch* in verschiedenen Verdünnungsreihen:
 Getestet wurde eine Reihe von 100 pg bis 1 fg genomischer DNA von *Pch* in jeweils drei Wiederholungen (Auswertung: 1=pos/ 0=neg). Dabei wurde die Konzentration einmal mit Wasser und einmal mit einer Suspension (Susp.) eingestellt, die genomische DNA verschiedener ubiquitärer Pilzstämmen enthielt.

2013 konnte in den Sporenfallen der Laubwand in der Chardonnay-Parzelle *Pch* im Beprobungszeitraum zwischen KW 16 und KW 47 nur zwischen den KW 21 und KW 36 nachgewiesen werden (Abb. 14). Dabei waren Unterschiede im Nachweiszeitraum zwischen den drei Sporenfallen feststellbar.

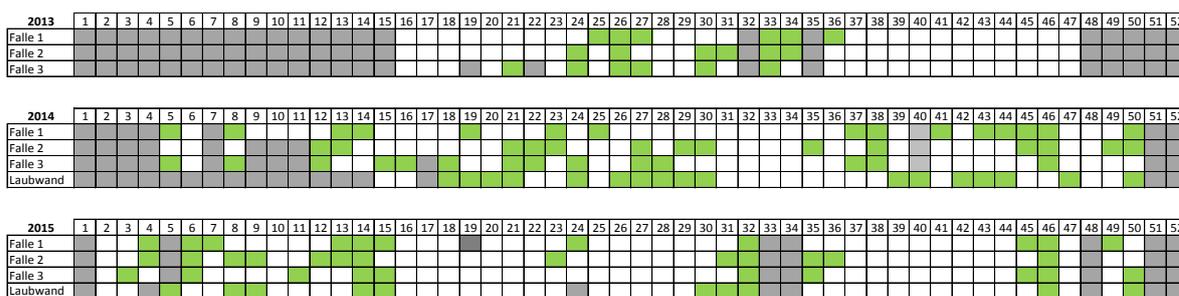


Abb. 14: Nachweis von *Pch* in den Sporenfallen in der Chardonnay-Anlage: Fallen 1-3 in der Traubenzone und die Falle in Laubwand im Zeitraum KW 1-52 (oben) in 2013, (mitte) in 2014 und (unten) in 2015; grün: positiver Nachweis in der Nested-PCR; weiß: negativer Nachweis; grau: fehlender Datenpunkt in grau.

Im Jahr 2014 konnte *Pch* beginnend ab KW 5 das ganze Jahr über hinweg nachgewiesen werden. Ein zeitlicher Unterschied im Auftreten des Pilzes zwischen der Falle in der Laubwand und den Fallen in der Traubenzone war nicht feststellbar. Auffällig war hierbei jedoch die Nachweislücke zwischen der KW 31 und 36, die in allen Fallen beobachtbar war, mit einer Ausnahme in Falle 2 in KW 35.

Auch 2015 konnte *Pch* über das ganze Jahr hinweg detektiert werden. Besonders auffällig war, dass der erste Nachweis bereits in der KW 3 erbracht werden konnte und die Sporen auch in der KW 50 noch nachweisbar waren. Auch 2015 konnte kein Unterschied zwischen dem Nachweis in der Laubwand und in der Traubenzone festgestellt werden.

In der Phoenixanlage kann *Pch* 2013 im Probezeitraum von KW 16 bis KW 47 nur im Zeitraum zwischen KW 21 und 34 nachgewiesen werden (Abb. 15).

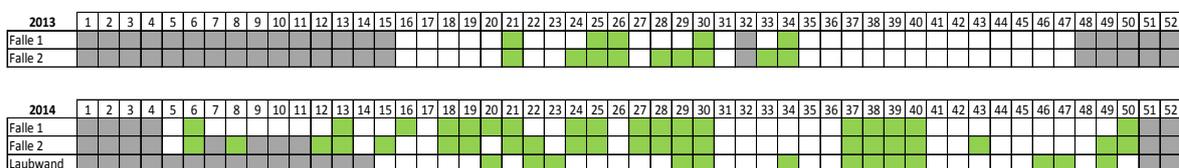


Abb. 15: Nachweis von *Pch* in den Sporenfallen in der Phoenix-Anlage: Falle 1 und 2 in der Traubenzone und eine Falle in Laubwand im Zeitraum KW 1-52 (oben) in 2013, (mitte) in 2014 und (unten) in 2015; grün: positiver Nachweis in der Nested-PCR; weiß: negativer Nachweis; grau: fehlender Datenpunkt.

2014 war der Nachweis hingegen ab KW 6 ganzjährig möglich. Dabei war der Nachweis in der Traubenzone in den Sommermonaten tendenziell häufiger als in der Laubwand. Wie im Chardonnay traten auch hier Lücken im Nachweis in den Wochen 31-36 auf. Zusätzlich gab es eine weitere Nachweislücke in den Wochen 41-45.

2015 konnte *Pch* bereits ab KW 3 detektiert werden. Ein Unterschied zwischen Traubenzone und Laubwand war nicht beobachtbar. Jedoch gab es Lücken im Nachweis zwischen KW 16-29 und KW 37-44.

Beim Vergleich der Fallen in der Laubwand (Abb. 16) ist in den Jahren 2014 und 2015 kein Unterschied zwischen den beiden Standorten erkennbar.

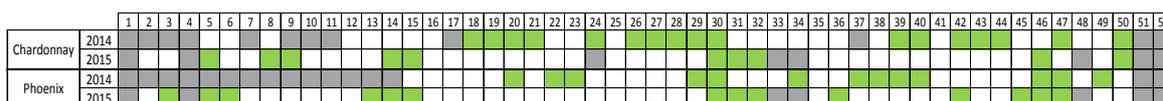


Abb. 16: Vergleich des *Pch*-Nachweises in den Laubwänden der Chardonnay- und der Phoenix-Anlage: Sporenfallen der Laubwand der Chardonnay- und der Phoenix-Anlage im Zeitraum KW 1-52 in den Jahren 2014 und 2015; grün: positiver Nachweis in der Nested-PCR; weiß: negativer Nachweis; grau: fehlender Datenpunkt.

Beim Vergleich des *Pch*-Nachweises in den Fällen der Traubenzonen der Anlagen Chardonnay und Phoenix konnte im jeweiligen Vergleichsjahr kein Unterschied zwischen den beiden Anlagen beobachtet werden (Abb.17). Die oben beschriebenen Nachweislücken in den jeweiligen Jahren treten dabei in beiden Anlagen gleichzeitig auf.

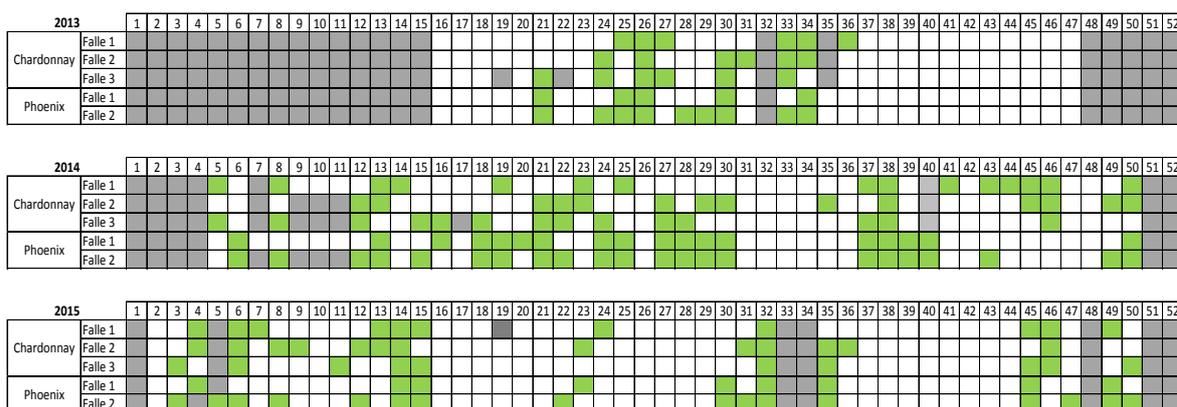


Abb. 17: Vergleich des *Pch*-Nachweises in den Traubenzonen der Chardonnay- und der Phoenix-Anlage: Sporenfallen der Traubenzone der Chardonnay- und der Phoenix-Anlage im Zeitraum KW 1-52 (oben) in 2013, (mitte) in 2014 und (unten) in 2015; positiver Nachweis in der Nested-PCR; weiß: negativer Nachweis; grau: fehlender Datenpunkt.

3.3. Analyse der Sporenfallen mit Primern aus den RAMS-Analysen

Neben dem allgemeinen Nachweis von *Pch* in den Sporenfallen wurde die DNA aus Sporenfallen stichprobenartig mit Primern (MM5-450F/ MM5-450R) untersucht, die auf dem gefundenen Polymorphismus des RAMS 5 Primers basieren. Auch hier war aufgrund der geringen DNA Menge eine Analyse mittels Nested-PCR notwendig. Aufgrund dessen wurde die PCR mit den Primern MM5-450F/ MM5-450R als äußere Primer und den Primern MM5-200F/ MM5-200R als innere Primer durchgeführt.

Sporenfallen, die bereits positiv mit *Pch*-Primern getestet wurden, zeigten dabei auch einen positiven Nachweis bei der Nested-PCR mit den spezifischen Primern (Abb. 18). Durch die Analyse der Längenpolymorphismen können die im Weinberg gefundenen *Pch*-Stämme in mindestens zwei genetische Gruppen mit unterschiedlichen Bandenlängen 200 bp bzw. 212 bp unterteilt werden. Dabei waren beide Gruppen sowohl in der Anlage Chardonnay als auch in der Anlage Phoenix nachweisbar.

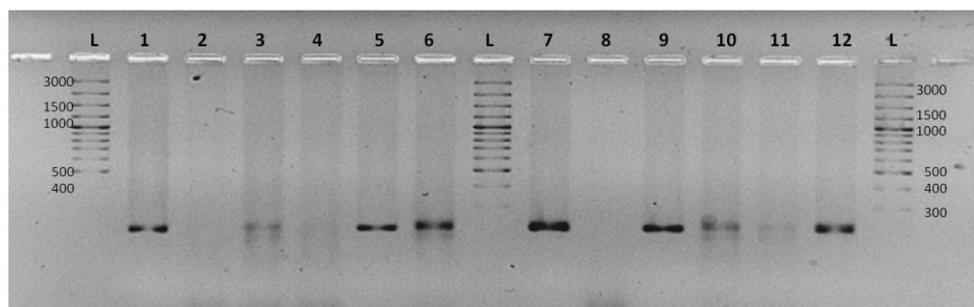


Abb. 18: Ergebnis der zweiten PCR der Nested-PCR von Sporenfallen mit den Primern MM5-200F und MM5-200R:

von links nach rechts: L: Leiter 100bp+ (peqlab); Probe 1-6: Sporenfallen aus der Phoenix-Parzelle; L: Leiter 100bp+ (peqlab); Proben 7-12: Sporenfallen aus der Chardonnay-Parzelle; L: Leiter 100bp+ (peqlab). Die Proben 1, 2, 5, 9 und 12 zeigen dabei den kurzen Polymorphismus von 200 bp, die Proben 6, 7, 10 und 11 den langen Polymorphismus mit 212 bp.

Eine Wiederholung der Nested-PCR mit der gleichen extrahierten DNA aus einer Sporenfalle führte zu dem Ergebnis, dass beide Gruppen, also das lange und das kurze Fragment in der gleichen Probe nachweisbar war (Abb. 19). Dabei hing der amplifizierte Polymorphismus, das lange oder das kurze Fragment, von der ersten Reaktion der Nested-PCR ab.

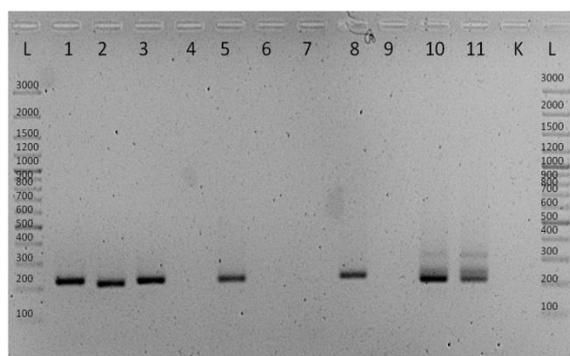


Abb. 19: Dreifache Wiederholung der Nested-PCR zum Nachweis des im RAMS5 gefundenen Polymorphismus in Sporenfallen:

Dargestellt ist die zweite Reaktion der Nested-PCR mit den Primern MM200F und MM200R. Von links nach rechts: L: Leiter 100bp+ (peqlab); Proben 1-3: die Wiederholung der Probe PH1 KW 23 (0,45 µm-Filter), die in den Reaktionen Nr. 1 und 3 den langen und in der Wiederholung Nr. 2 den kurzen Polymorphismus aufweist; Proben 4-6: die Probe PH1 KW 23 (5 µm-Filter), die nur in Reaktion Nr. 5 den langen Polymorphismus aufweist; Proben 7-9: die Probe PH1 KW 30, die in Spur 7 den langen, in Spur 8 den kurzen und in Reihe 9 keinen Polymorphismus zeigt; Proben 10 und 11: der Stamm M1 als Referenz; K: Kontrolle H₂O und L: Leiter 100bp+ (peqlab).

Die Nachsequenzierung von beiden Fragmentlängen aus einer Probe bestätigte, dass beide Polymorphismen in einer Probe vorhanden sein konnten. Eine Doppelbande, als Resultat einer möglichen gleichzeitigen Amplifikation beider Polymorphismen in einer Probe, trat dabei nicht auf.

Auch der InDel der im RAMS9 gefundenen wurde, wurde mittels Nested PCR in den Sporenfallen untersucht. Die Ergebnisse der PCR waren in jeder Wiederholung negativ, so dass der InDel des RAMS9 bei den Sporenfallen nicht berücksichtigt werden konnte.

3.4. Quantitativer Nachweis von *Pch* in den Sporenfallen

Darüber hinaus wurde die DNA von *Pch* in den Sporenfallen stichprobenartig mittels qPCR quantifiziert. Die Menge an extrahierter DNA konnte dabei stark schwanken. Die höchste gemessene Menge in den ausgewählten Stichproben betrug 370 pg in einer Probe aus der Chardonnay-Anlage (Abb. 20).

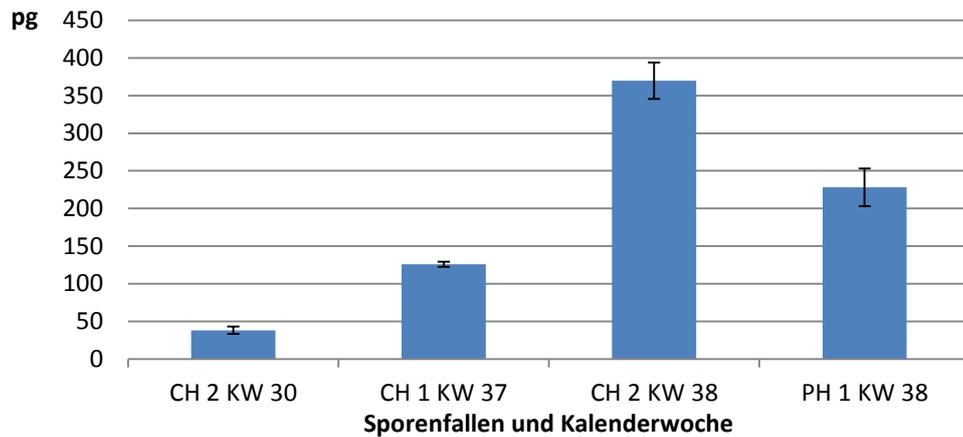


Abb. 20: Maximalmengen von *Pch* in pg, die mittels qPCR in exemplarisch ausgewählten Sporenfallen gemessen wurden.
Fehlerbalken: Standardabweichung (n=3)).

Der kleinste Wert, der kontinuierlich nachweisbar war, lag bei 0,1 pg in einer Probe, die aus einem 5 µm-Filter stammte (Abb. 21). Vereinzelt wurden auch geringere Konzentrationen mit bis zu 0,001 pg in Fallen gemessen, diese Ergebnisse waren jedoch nicht konstant reproduzierbar.

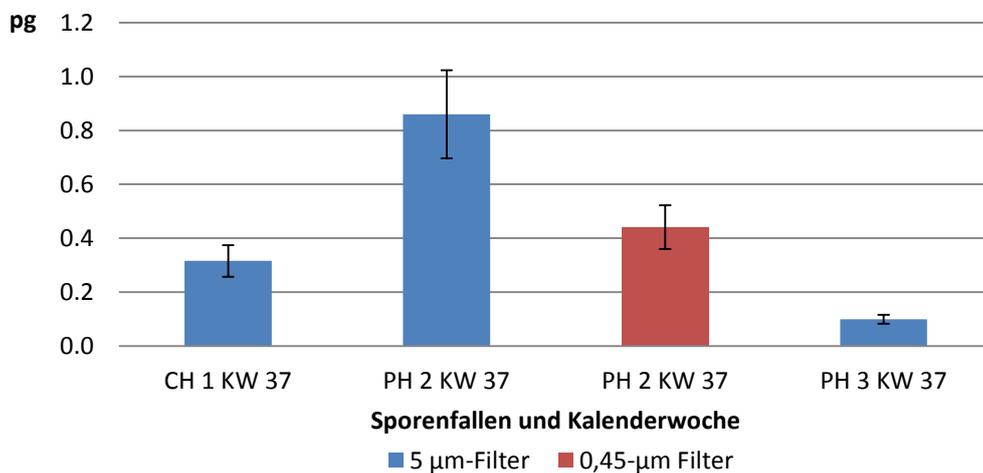


Abb. 21: Minimalmengen von *Pch* in pg, die mittels qPCR in exemplarisch ausgewählten Sporenfallen gemessen wurden.
blau: Konzentrationen, die im 5 µm-Filter gemessen wurden; rot: Konzentrationen, die im 0,45 µm-Filter gemessen wurden; Fehlerbalken: Standardabweichung, (n=3)).

Bei der Analyse von beiden Filtern pro Probe bestätigte sich das Resultat der Nested-PCR, dass sowohl im 5µm als auch im 0,45 µm-Filter einer Probe Sporen hängen blieben, deren DNA extrahierbar und amplifizierbar ist (Abb. 22).

Darüber hinaus war es möglich, dass im 5µm-Filter mehr DNA nachweisbar war (vgl. Falle CH 3 KW 27), in beiden Filtern ähnliche große Mengen (vgl. Falle PH 1 KW 37) oder im 0,45 µm-Filter die größere Menge detektierbar war (vgl. Falle CH 3 KW 38).

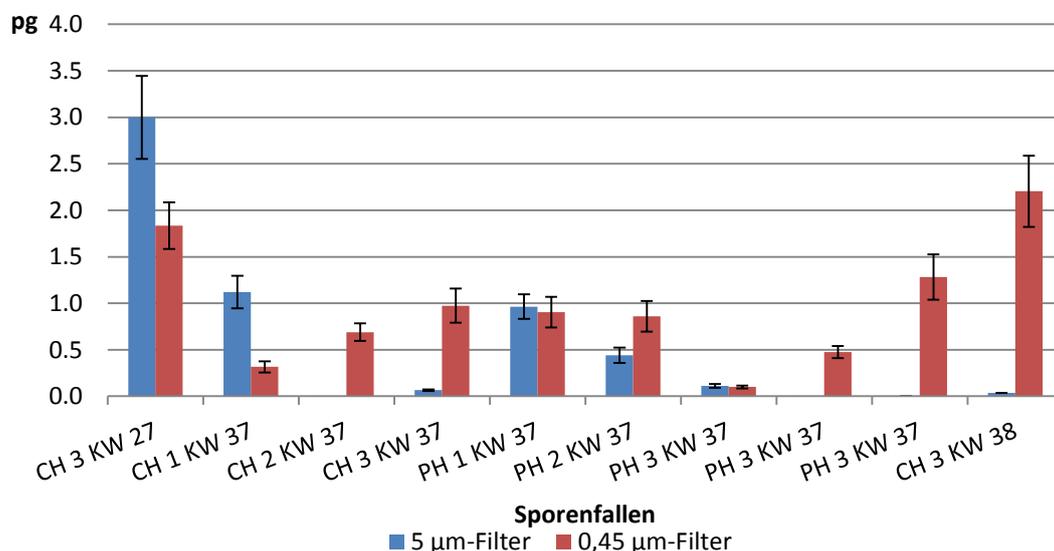


Abb. 22: Mengen von *Pch* in pg, die mittels qPCR in exemplarisch ausgewählten Sporenfallen gemessen wurden. blau: Konzentrationen, die im 5 µm-Filter gemessen wurden; rot: Konzentrationen, die im 0,45 µm-Filter gemessen wurden; Fehlerbalken: Standardabweichung, (n=3)).

Auch die DNA-Mengen der untersuchten Verdünnungsreihe konnten stark schwanken. So konnten bei einem beimpften Objektträger, der mit einer Suspension von ca. 1000 Sporen/µl beimpft worden war, 17 pg im 5µm-Filter nachgewiesen werden, bei den Suspensionskonzentrationen 100 Sporen/µl, 10 Sporen/µl und 1 Spore/µl fiel die Nachweismenge jedoch deutlich geringer aus (Abb. 23). Dabei waren in Bezug auf die nachgewiesene DNA-Menge kein eindeutiger Unterschied zwischen den Konzentrationen 10 Sporen/µl und 1 Spore/µl auszumachen. Darüber hinaus waren bei den künstlich infizierten Fällen, im Gegenzug zu den Fällen aus dem Freiland, die nachgewiesenen Mengen in den 5 µm-Filtern jedoch immer größer als im 0,45 µm-Filter.

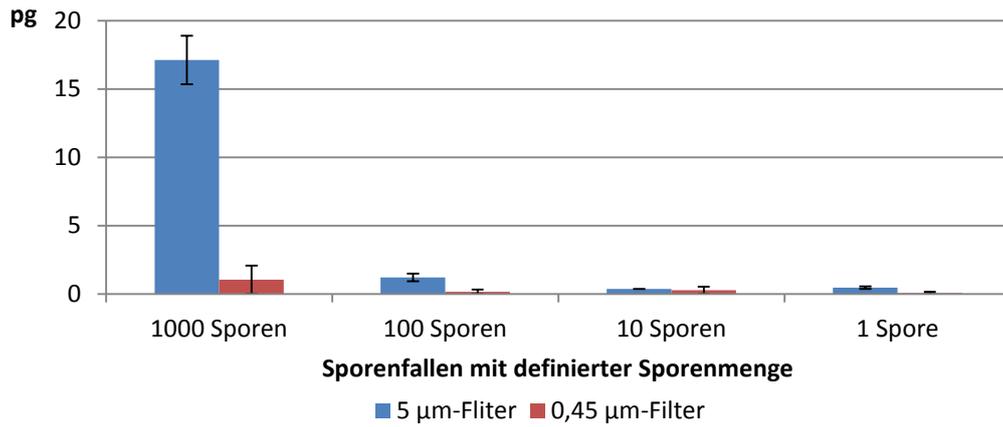


Abb. 23: DNA-Mengen von *Pch* in pg, die mittels qPCR in definierten Sporensuspensionen gemessen wurden. Die DNA wurde nach filtrieren einer definiertem Sporensuspension mit den Konzentrationen 1000 Sporen/µl, 100 Sporen/µl, 10 Sporen/µl und 1 Spore/µl durch einen Filter mit 5 µm-Poren und anschließend einen Filter mit 0,45 µm Porengröße gemessen.

blau: Konzentrationen, die im 5 µm-Filter gemessen wurden; rot: Konzentrationen, die im 0,45 µm-Filter gemessen wurden; Fehlerbalken: Standardabweichung, (n=3).

3.5. Korrelation des Sporennachweises mit den Wetterdaten

Die Ergebnisse des *Pch*-Nachweises in den Sporenfallen wurden mit den Wetteraufzeichnungen der institutseigenen Wetterstation verglichen. Für die Berechnungen wurde das jeweilige Erhebungsjahr als mögliche Variable mit in die Berechnungen einbezogen. Da es sich jedoch als signifikanter Faktor im Modell herausstellte, können die Ergebnisse nur in Abhängigkeit vom jeweiligen Jahr betrachtet werden und sind nicht allgemein über den gesamten Zeitraum gültig.

Auffällig ist, dass die Luftfeuchte in allen Jahren einen großen Einfluss auf den Nachweis von *Pch* in den Fallen hat. Die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises sinkt mit der Zunahme der Luftfeuchte (Abb. 24). Dieser Einfluss ist jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt, so sinkt die Wahrscheinlichkeit 2013 erst ab einer Feuchte von ca. 80%, während sie 2014 und 2015 konstant abnimmt. Die Temperatur hingegen hat in den Jahren 2013 und 2014 keinen großen Einfluss, da die einzelnen Wahrscheinlichkeiten nah bei einander liegen (Abb. 24). Dennoch steigt die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises mit der Temperatur tendenziell an. Hier steht das Jahr 2015 in scharfen Kontrast zu den anderen beiden Jahren, da hier die Wahrscheinlichkeit bei einer Temperatur von 15 °C höher ist als bei 27 °C. mit steigender Temperatur sinkt. Da auch die Linien der Grafik im Jahr 2015 weiter auseinander liegen als in den Jahren zuvor zeigt dies einen stärkeren Einfluss der Temperatur.

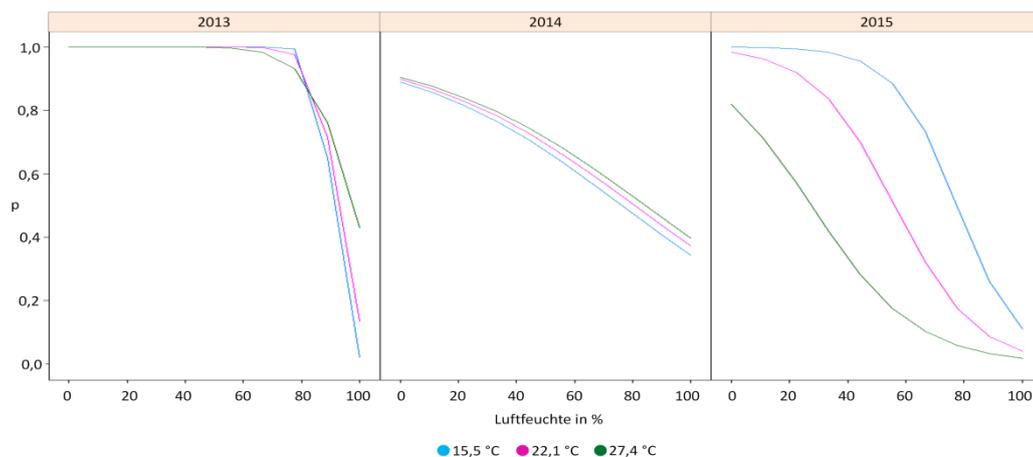


Abb. 24: Korrelation des Sporennachweises mit den Wetterdaten I: Wahrscheinlichkeit des Sporennachweises (p) in Abhängigkeit der Luftfeuchte (0-100%) im Weinberg für die Jahre 2013, 2014 und 2015. Es werden drei verschiedene Temperaturen angenommen: blauer Graph = 15,5 °C, rosa Graph = 22 °C, grüner Graph = 27 °C. Die Graphen zeigen, wie die Wahrscheinlichkeit des Sporenauftretens, in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit, durch die Temperatur im Weinberg beeinflusst wird. (Graphik erstellt mit R).

Dies kann verdeutlicht werden, wenn man die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises in Korrelation zur Temperatur betrachtet (Abb. 25). Hier steigt die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises 2013 und 2014 mit der steigenden Temperatur. In beiden Jahren liegt bis zu einer Temperatur von 28 °C die Wahrscheinlichkeit des Sporenfluges bei höherem Niederschlag über der Wahrscheinlichkeit bei geringerem Niederschlag (siehe grüne und blaue Linie in Abb. 25).

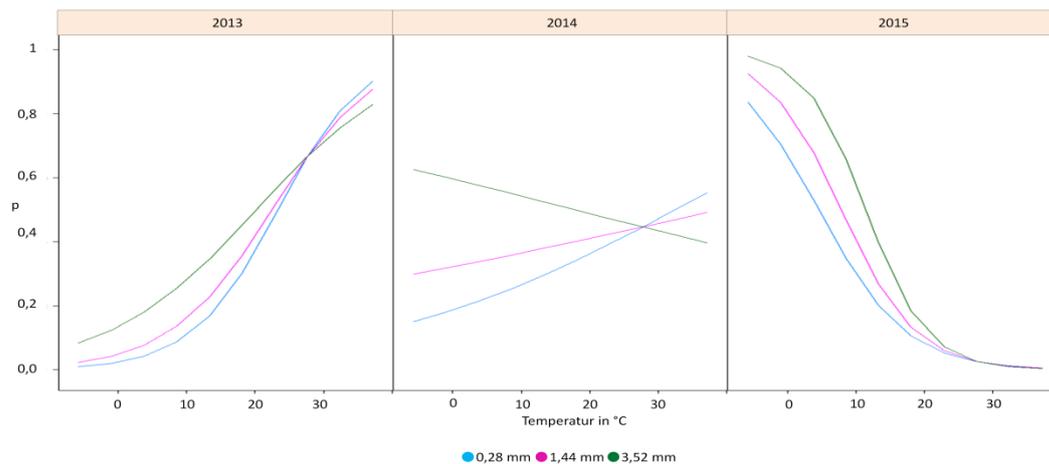


Abb. 25: Korrelation des Sporennachweises mit den Wetterdaten II: Wahrscheinlichkeit des Sporennachweises (p) in Abhängigkeit von der Temperatur im Weinberg (Bereich -5°C - 40°C) für die Jahre 2013, 2014 und 2015. Es werden verschiedene Niederschlagsmengen angenommen: blauer Graph = 0,28 mm, rosa Graph = 1,44 mm, grüner Graph = 3,25 mm. Die Graphen zeigen, wie die Wahrscheinlichkeit des Sporenauftritts, in Abhängigkeit von der Temperatur, durch die Niederschlagsmenge im Weinberg beeinflusst wird (Graphik erstellt mit R).

Dies ändert sich in 2015. Die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises sinkt deutlich, wie in Abb. 25 bereits gezeigt, mit der steigenden Temperatur und ist somit negativ korreliert. Die höhere Wahrscheinlichkeit bei höheren Niederschlägen bleibt jedoch wie in den Jahren 2013 und 2014 bestehen. Der gleichbleibende Einfluss des Niederschlages wird in der Auflösung des Modells nach dem Niederschlag sichtbar (Abb. 26).

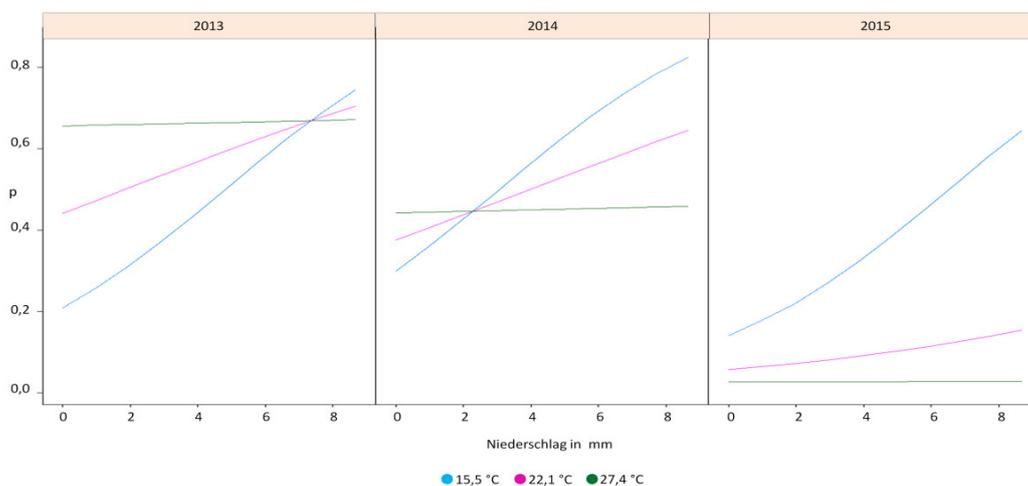


Abb. 26: Korrelation des Sporennachweises mit den Wetterdaten III: Wahrscheinlichkeit des Sporennachweises (p) in Abhängigkeit vom Niederschlag in mm im Weinberg (0-9 mm) für die Jahre 2013, 2014 und 2015. Es werden drei verschiedenen Temperaturen angenommen: blauer Graph = 15,5 °C, rosa Graph = 22 °C, grüner Graph = 27 °C. Die Graphen zeigen, wie die Wahrscheinlichkeit des Sporenauftritts, in Abhängigkeit von der Niederschlagsmenge, durch die Temperatur im Weinberg beeinflusst wird (Graphik erstellt mit R).

Hier zeigt sich in allen drei Versuchsjahren eine positive Korrelation bei niedrigen Temperaturen (15,5 °C blaue Linie), die mit steigender Temperatur abflacht (27 °C grüne Linie). Unterschiedlich ist dabei die Menge des Niederschlages ab welcher die Korrelation eintritt. 2013 liegt diese bei 6 mm, während sie 2014 bei 2 mm liegt und 2015 keine bestimmte Menge nötig ist.

3.6. Polymorphismen in den RAMS-Primern

Bei der Analyse der *Pch*-Stammsammlung (Liste siehe Material und Methoden 2.7 „Stammsammlung von *Pch*“ Tab. 7) mit dem Set der 17 RAMS Primer zeigte sich nur eine geringe Anzahl von Polymorphismen. So wiesen nur sieben der 17 getesteten Primer Polymorphismen in ihren Bandenmustern auf (Auflistung siehe Ergebnisse 3.6 „Polymorphismen in den RAMS-Primern“ Tab. 18 und Abb. 27-38), die verbleibenden zehn Primer waren in ihren Bandenmustern homolog.

Primer	Polymorphismus
RAMS1	Doppelbande bei 2,5 kb
RAMS1	zusätzliche Bande bei 1,1kb
RAMS2	möglicher InDel bei 1,1 kb
RAMS3	Doppelbande bei 650 bp
RAMS5	InDel bei 450 bp
RAMS9	InDel bei 400 bp
RAMS11	Doppelbande bei 450 bp
RAMS12	zusätzliche Bande bei 2,3kb
RAMS12	möglicher InDel bei 450 bp

Tab. 18: Übersicht der gefundenen Polymorphismen in den Bandenmustern nach einer PCR von genomischer *Pch*-DNA mit den jeweiligen RAMS-Primern.

Dabei war die Anzahl der Bindungsstellen der jeweiligen Primer sehr unterschiedlich. Einige Primer, wie der RAMS10, erzeugten ein Muster von 26 Banden mit Fragmentlängen zwischen 200 und 3000 bp, während Primer wie der RAMS13 nur eine einzelne Bande aufwiesen (vgl. Abb. 27).

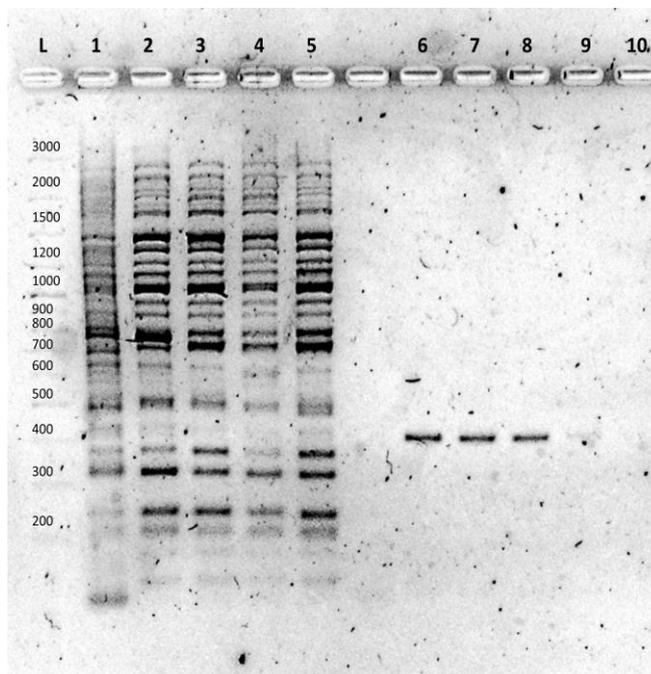


Abb. 27: PCR verschiedener Stämme mit den Primern RAMS10 und RAMS13: von links nach rechts: L: Leiter 100bp+ (peqlab); Proben 1-5: die Stämme CKV, Pch133, 07-93, M1 und HT3 mit RAMS10; Proben 6-10: CKV, Pch133, 07-93, M1 und HT3 (ohne Bande) mit RAMS13; auf einem 2,5% Agarosegel mit 3 h Laufzeit bei 90 V.

Die optimale Template-Menge wurde für die vorliegende Arbeit experimentell bestimmt, da eine zu große Menge durchwegs zu einer verringerten Bandenzahl mit einzelnen dicken Banden führte. Eine zu geringe Menge hingegen führte zu einem schwachen Bandenmuster, so dass schwächere Banden nicht erkennbar waren. Die optimale Menge wurde bei 3 ng genomischer DNA für einen 20 µl Ansatz gefunden und als Standardtemplate für alle Reaktionen verwendet.

Darüber hinaus wurde für jeden Primer mittels Gradienten-PCR die optimale Annealing-Temperatur (Tab. 19) ermittelt; eine zu hohe Temperatur führte regelmäßig zu einer verminderten Bandenzahl, eine zu niedrige zu einem „Schmier“ auf dem Gel.

Primer	optimale Temperatur (°C)
RAMS1	49
RAMS2	49
RAMS3	53
RAMS4	53
RAMS5	49
RAMS6	34
RAMS7	56
RAMS8	49
RAMS9	49
RAMS10	47
RAMS11	50
RAMS12	52
RAMS13	47
RAMS14	35
RAMS15	47
RAMS16	46
RAMS17	48

Tab. 19: Die optimale Annealing-Temperatur in °C für den jeweiligen verwendeten RAMS-Primer nach Durchführung einer Gradienten-PCR.

3.7. Sequenzierbare InDels in der Stammsammlung

RAMS-Primer, die Polymorphismen in Form von „Zick-Zack“- Mustern aufwiesen, wurden auf mögliche InDels untersucht.

3.7.1. InDel bei RAMS5

Im Vergleich der Bandenmuster nach einer PCR mit RAMS5 wurde bei 450 bp ein „Zick-Zack“-Muster gefunden, das sich neben der traditionellen binären Auswertung als möglicher InDel interpretieren lässt (Abb. 28 links). Diese Banden wurden nach erfolgreicher Klonierung und Transformation sequenziert (Abb. 28 rechts).

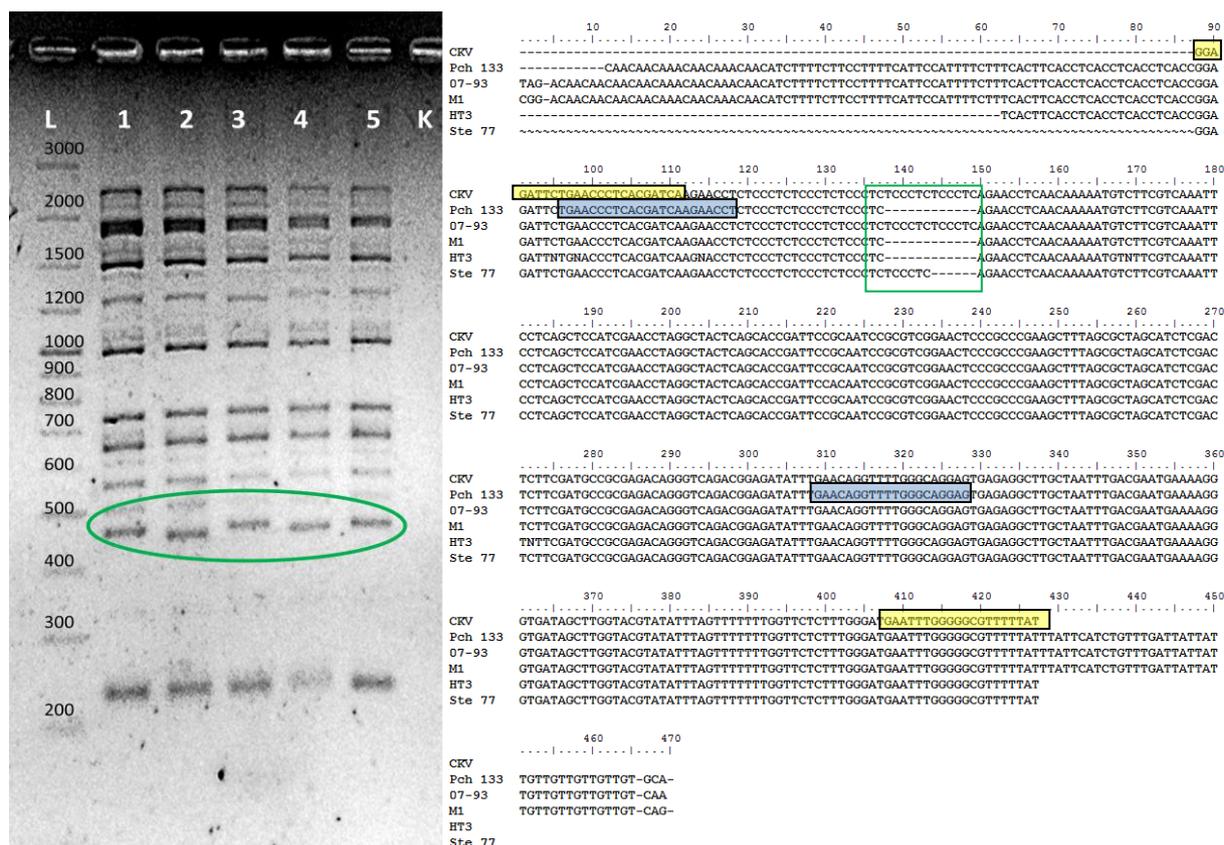


Abb. 28: Polymorphismus bei verschiedenen *Pch*-Isolaten nach PCR mit RAMS5:
links: PCR von genomischer DNA verschiedener *Pch*-Isolate mit RAMS5; grün umrahmt: der InDel des RAMS5 bei 450 bp; von links nach rechts: L:Leiter 100bp+ (peqlab); Proben 1-5: die Stämme CKV, Pch133, 07-93, M1, und HT3; K: Kontrolle H₂O; 2,5% Agarosegel mit 3 h Laufzeit bei 90 V.
rechts: Sequenz des InDels RAMS5 bei 450 bp: Sequenzen der Stämme CKV, PCH133, 07-93, M1, HT3 und Ste77; grün: der gefundene Polymorphismus; gelb: Sequenzen des äußeren Primerpaares MM5-450F und MM5-450R; blau: Sequenzen des innenliegende Primerpaares MM5-200F und MM5-200R.

Dabei zeigte sich, dass von 12 sequenzierten Stämmen die Stämme 07-93, H53, H37 (Sequenz von H53 und H37 im Anhang B dargestellt) und CKV in ihrer Sequenz eine Insertion von 12 Basen 5' TCCCTCTCCCTC 3' aufwiesen. Dieser InDel ist ein Teil einer repetitiven Sequenz 5' TCCCTC 3', die sich in der kurzen Variante dreimal, in der langen fünfmal wiederholt. Eine Ausnahme machen die Stämme Ste77 und H3K, in welchen die Sequenzen viermal vorkommen. Somit lassen sich die Stämme aus der Stammsammlung in drei Gruppen unterteilen (Tab. 20). Weitere Polymorphismen wie SNPs lassen sich in diesem Fragment mit einer Gesamtlänge von 470 bp Länge nicht finden.

3-facher Repeat	4-facher Repeat	5-facher Repeat
Pch 133	H3K	07-93
H32	Ste77	CKV
H67		H37
HT3		H53
M1		
M2		
Pch35		
Pch37		
Ste63		
52/3		

Tab. 20: Clustering der Stämme aufgrund der unterschiedlichen Repeatlängen (3-5 facher Repeat) des im RAMS5 gefundenen InDels.

Für das gefundene Fragment ließen sich zwei spezifische Primerpaare entwickeln. Das erste Paar MM5-450F 5' GGA GAT TCT GAA CCC TCA CG 3' und MM5-450R 5' ATA AAA ACG CCC CCA AAT TC 3' flankiert den Marker. Für eine spätere Nested-PCR wurde ein weiter innenliegendes Primer-Paar entworfen MM5-200F 5' ACC CTC ACG ATC AAG AAC CT 3' und MM5-200R 5' CTC CTG CCC AAA ACC TGT TC 3'. Die Spezifität der Primer wurde neben der Nachsequenzierung der Fragmente auch durch eine Negativ-PCR mit *Pal* und *Fmed*-Stämmen bestätigt.

3.7.2. InDel bei RAMS9

Ein weiterer InDel konnte in einem „Zick-Zack“-Muster des RAMS9 gefunden werden (Abb. 29 links). Auch hier besteht der Polymorphismus, wie beim vorangegangenen Primer RAMS5, in der Wiederholung einer Repeatsequenz (Abb. 29 rechts).

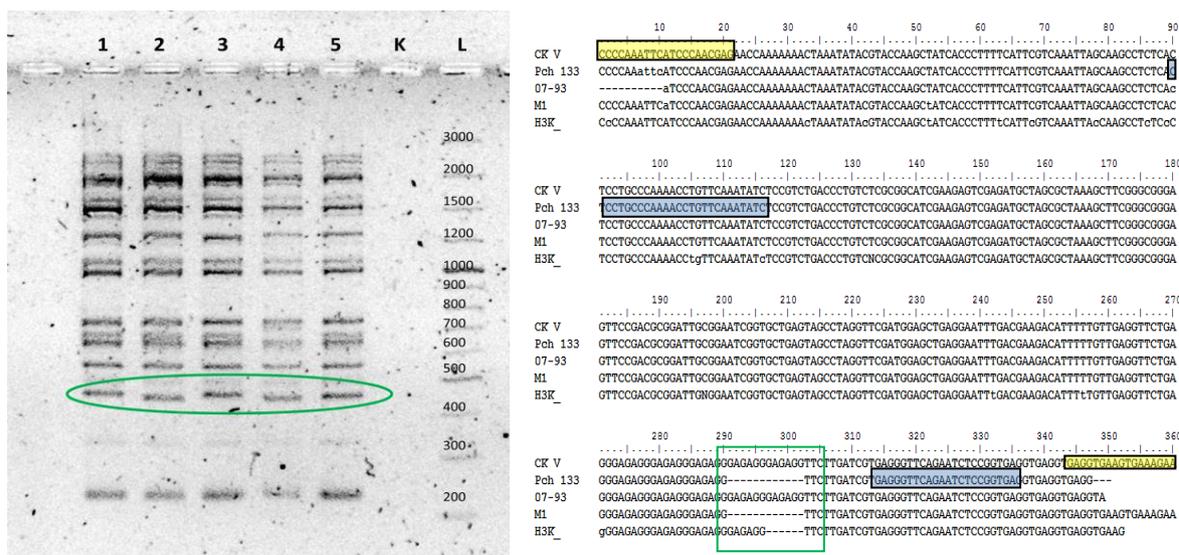


Abb. 29: Polymorphismus bei verschiedenen *Pch*-Isolaten nach PCR mit RAMS9:
links: PCR von genomischer DNA verschiedener *Pch*-Isolate mit RAMS9; grün umrahmt: InDel des RAMS 9 bei 450 bp; von links nach rechts: Proben 1-5: die Stämme CKV, Pch133, 07-93, M1 und H3K; K: Kontrolle H₂O; L: Leiter 100bp+ (peqlab); 2,5% Agarosegel mit 3 h Laufzeit bei 90 V.
rechts: Sequenz des InDels RAMS9 bei 450 bp: Sequenzen der Stämme CKV, Pch133, 07-93, M1, und H3K; grün: der gefundene Polymorphismus; gelb: Sequenz des äußeren Primerpaares MM9-450F und MM9-450R; blau: Sequenz des inneren Primerpaares MM9-300F und MM9-300R.

Hier kommt der Repeat der Sequenz 5'GAGAGG 3' in den kurzen Fragmenten der Stämme M1, Pch37, Pch35, H67, 52/3, HT3, 133, Ste63, H32 und M2 (Sequenzen in Anhang C dargestellt) in dreifacher Wiederholung, in den langen Sequenzen bei 07-93, H53, H37 und CKV in fünffacher Wiederholung vor. Eine Ausnahme bilden die Stämme H3K und Ste77, bei welchen der Repeat 4-fach wiederholt wird. Auch für RAMS9 konnten nach der Sequenzierung der Stämme drei Gruppen gebildet werden (Tab. 21).

3 facher Repeat	4 facher Repeat	5 facher Repeat
M1	Ste77	07-93
Pch37	H3K	H53
Pch35		H37
H67		CKV
52/3		
HT3		
133		
Ste63		
H32		
M2		

Tab. 21: Clusterung der Stämme aufgrund der unterschiedlichen Repeatlängen (3-5 facher Repeat) des im RAMS9 gefundenen InDels.

Aus dem gefundenen Fragment lässt sich das Primerpaar MM9-450F 5'CCC CAA ATT CAT CCC AAC GA 3' und MM9-450R 5'TCT TTC ACT TCA CCT CAC CTC 3'entwickeln, das den Polymorphismus flankiert. Als innenliegendes Primerpaar wurden MM9-300F 5'CTC CTG CCC AAA ACC TGT TC 3' und MM9-300R 5' CAC CGG AGA TTC TGA ACC CT 3' entworfen. Die

Spezifität der Primer wurde neben der Nachsequenzierung der Fragmente auch durch eine Negativ-PCR mit *Pal* und *Fmed*-Stämmen bestätigt.

3.7.3. möglicher InDel bei RAMS2

Auch bei den Bandenmustern des RAMS2 trat ein „Zick-Zack“-Muster auf (Abb. 30) und die Vermessung der Fragmente legt auch hier einen InDel mit verschiedenen Längen nahe. Bei erstmaliger Vermessung konnten die Fragmentlängen in drei Cluster von ca. 1147 bp, ca. 1073 bp und ca. 1026 bp gruppiert werden (vgl. Abb. 30).

Dieser mögliche Polymorphismus wurde jedoch nicht in die endgültige Analyse einbezogen, da die Längen der einzelnen Stämme in weiteren Wiederholungen nicht einwandfrei auswertbar waren und somit eine qualitative Auswertung nicht möglich war.

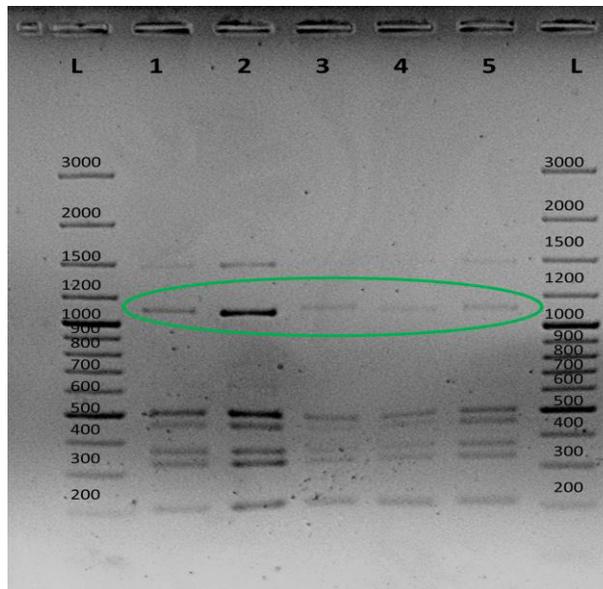


Abb. 30: PCR von genomischer DNA verschiedener *Pch*-Isolate mit RAMS 2:
 grün umrahmt: möglicher Längenpolymorphismus bei 1,1 kb: von links nach rechts: L: Leiter 100bp+ (peqlab);
 Proben 1-5: die Stämme 52/3, 07-03, CKV, Ste63 und Ste77; L: Leiter 100bp+ (peqlab); 2,5% Agarosegel mit 3 h
 Laufzeit bei 90 V.

Eine Klonierung der Fragmente, die einen möglichen InDel bestätigt oder zumindest eine exakte Bestimmung der Fragmentlängen ermöglicht hätte, blieb ohne Erfolg, so dass hier keine Sequenzen zur Verfügung stehen.

3.8. Polymorphismen aufgrund zusätzlicher Primer-Bindungsstellen

3.8.1. RAMS1

Die Analyse der Stämme mit RAMS1 zeigt eine Doppelbande bei 2,5 kb bei Ste63 im Vergleich zu den Stämmen M2, H53 und H32 sowie einen Polymorphismus bei 1,2 kb in Form einer zusätzlichen Bande bei den Stämmen Ste63, H53, H32 im Vergleich zum M2 Stamm (Abb. 31). Da die zusätzliche Bande bei 2,5 kb bei Wiederholungen nicht eindeutig reproduziert werden konnte,

wurde der Polymorphismus nicht in die Auswertung mit einbezogen. Der Polymorphismus der zusätzlichen Bande bei 1,1 kb hingegen wurde aufgrund seiner Reproduzierbarkeit qualitativ ausgewertet und entsprechend berücksichtigt.

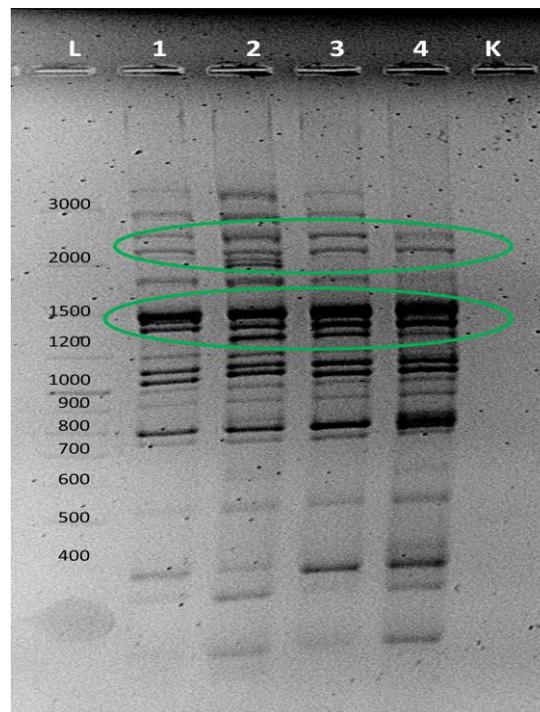


Abb. 31: PCR von genomischer DNA verschiedener *Pch*-Isolate mit RAMS1: grün umrahmt: gefundene Polymorphismen nach PCR mit RAMS1; oben: zusätzliche Bande bei 2,5 kb; unten: zusätzliche Bindestelle bei 1,1 kb; von links nach rechts: L: Leiter 100bp+ (peqlab); Proben 1-4: die Stämme M2, Ste63, H53 und H32; K: Kontrolle H₂O; 2,5% Agarosegel mit 3 h Laufzeit bei 90 V.

3.8.2. RAMS3

Das Muster bei RAMS3 zeigt eine zusätzliche Bande auf der Höhe von ca. 580 bp (Abb. 32). Diese tritt nur bei den Stämmen CKV, M1, Ste77, Ste63, und H32 auf und war auf dem Gel in Wiederholungen mehrfach reproduzierbar und wurde so in die folgenden Analysen mit einbezogen. Jedoch konnte die Sequenz nicht erfolgreich kloniert werden, so dass für die spezifischen Bindungsstellen keine Primer entwickelt werden konnten. Daher wurde der Polymorphismus qualitativ mit 0/1 ausgewertet (vgl. Tab. 4).



Abb. 32: PCR von genomischer DNA verschiedener *Pch*-Isolate mit RAMS 3:
 grün umrahmt: gefundener Polymorphismus bei 580 bp; von links nach rechts: L:Leiter DNA Leiter 100bp extended (Roth); Proben 1-5: die Stämme CKV, HT3, M1, Ste77 und Ste63; L: Leiter DNA Leiter 100bp extended (Roth); 2,5% Agarosegel mit 3 h Laufzeit bei 90 V.

3.8.3. RAMS10

Die Analyse der Stammsammlung mit dem Primer RAMS10 ergab einen Polymorphismus in Form einer zusätzlichen Bande bei ca. 1,1 kb (Abb. 33). Ein weiterer möglicher Polymorphismus bei 350 bp, der in einer möglichen Doppelbande bestand, konnte in Wiederholungen der PCR nicht bestätigt werden und wurde daher in der Analyse nicht berücksichtigt.

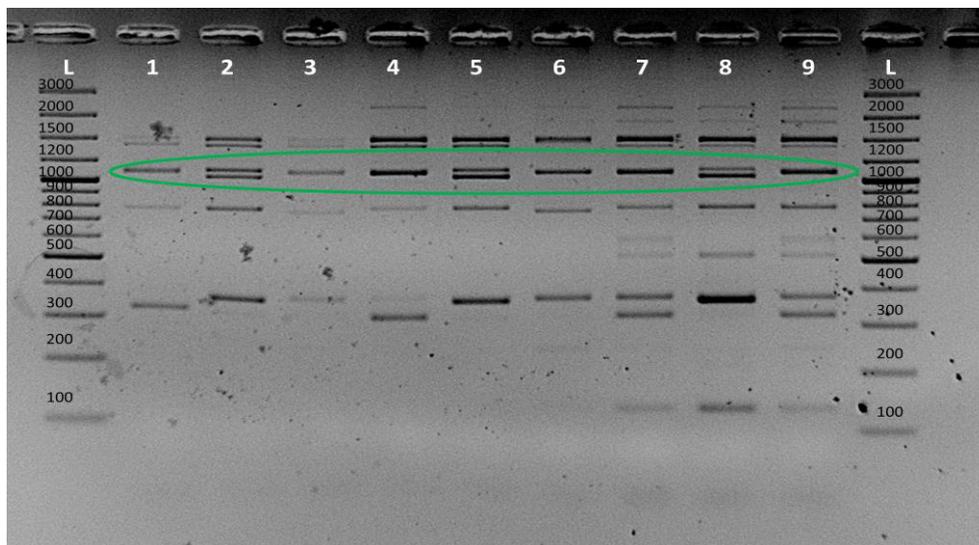


Abb. 33: PCR von genomischer DNA verschiedener *Pch*-Isolate mit RAMS 10:
 grün umrahmt: gefundener Polymorphismus bei 1,1kb; von links nach rechts: L:Leiter 100bp+ (peqlab); Proben 1-9: die Stämme H3K, M1, CKV, HT3, H32, Pch35, Pch133, 52/3 und 07-93; L: Leiter 100bp+ (peqlab); 2,5% Agarosegel mit 3 h Laufzeit bei 90 V.

3.8.4. RAMS11

Bei dem ankerlosen Primer RAMS11 wiesen alle Stämme mit Ausnahme der Stämme H53 und H37 eine Doppelbande bei 450bp auf (Abb. 34). Eine erfolgreiche Klonierung des Fragments und anschließende Sequenzauswertung war nicht möglich. Daher konnte der Polymorphismus nur qualitativ ausgewertet werden.

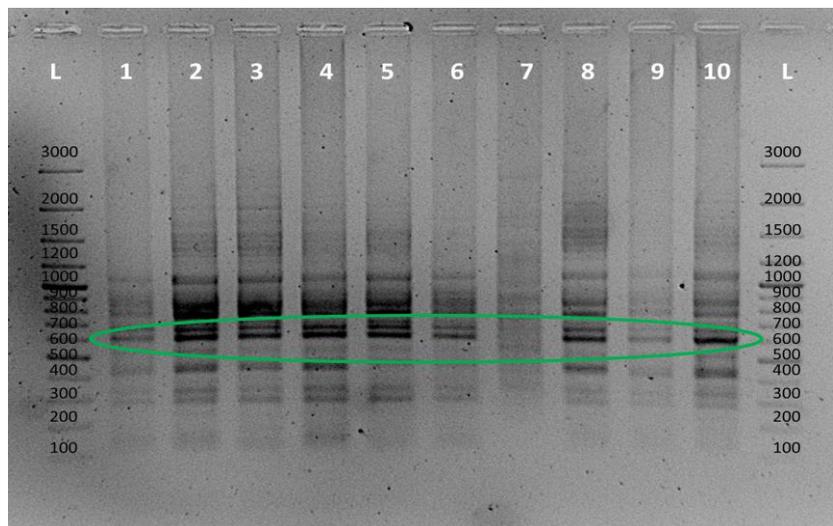


Abb. 34: PCR von genomischer DNA verschiedener *Pch*-Isolate mit RAMS 11: grün umrahmt: gefundener Polymorphismus bei 450 bp; von links nach rechts L: Leiter 100bp+ (peqlab); Proben 1-10: die Stämme HT3, Pch133, Pch35, H67, H53, H37 CKV, Ste77, Ste63 und H32; L: Leiter 100bp+ (peqlab); 2,5% Agarosegel mit 3 h Laufzeit bei 90 V.

3.8.5. RAMS12

Bei Analyse mit dem Primer RAMS 12 tritt bei den Stämmen 07-93, Pch133, H3K, Pch35, H53, Ste77, M2 und H32 eine zusätzliche Bande bei 2,3 kb auf (Abb. 35). Die Sequenzierung der Fragmente von H3K, Pch35 und Pch133 ergab einen SNP bei Position 2270 von G/C nach T/A. Abgesehen davon waren die drei Sequenzen auf der gesamten Länge von 2,3 kb identisch. Auch hier wurden nach der Sequenzierung Primer entwickelt, die die spezifische Bindungsstelle des RAMS12 flankieren sollten. Da diese Primer die spezifische Bindung bestehend aus Repeat und Anker aber nicht wiedergeben konnten, wurde der Polymorphismus bei der Eingruppierung der Stämme nur qualitativ mit 0/1 ausgewertet.

Darüber hinaus wurde ein weiter möglicher Polymorphismus bei 450 bp gefunden. Auch dieser war aber in den Wiederholungen nicht eindeutig reproduzierbar.

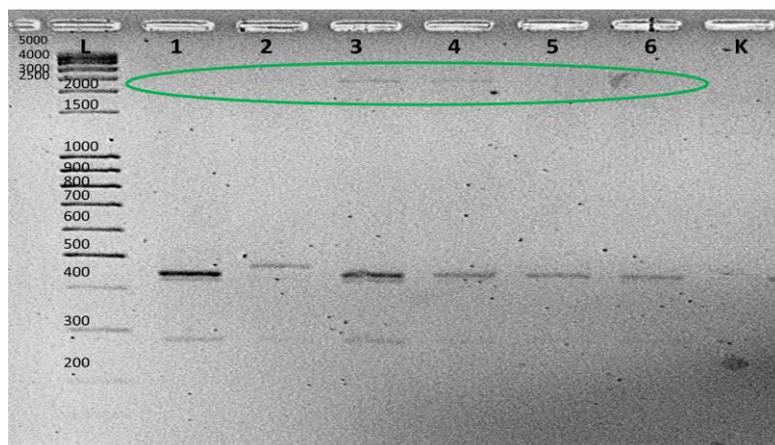


Abb. 35: PCR von genomischer DNA verschiedener *Pch*-Isolate mit RAMS 12; grün umrahmt: gefundener Polymorphismus bei 2,3 kb; von links nach rechts: L: DNA Leiter 100bp extended (Roth); Proben 1-6: die Stämme HT3, M1, 07-93, Pch133, CKV und Pch37; K: Kontrolle; 2,5% Agarosegel mit 3 h Laufzeit bei 90 V.

3.9. Clusterung der Stämme

Aufgrund der sequenzierten Längenpolymorphismen bei den Primern RAMS5 und RAMS9 (vgl. Tab. 20 und Tab. 21) sind die Stämme rechnerisch in neun Gruppen einteilbar (3x3 Kombinationsmöglichkeiten).

Bei genauer Eingruppierung zeigt sich, dass von neun möglichen Gruppen nur drei in der verwendeten Stammsammlung auftreten, nämlich die Gruppe A (RAMS5 kurz/ RAMS9 kurz), die Gruppe B (RAMS5mittel/ RAMS9 mittel) und die Gruppe C (RAMS5 lang/ RAMS9 lang) (Tab. 22).

Gruppe	Stamm	Herkunft
A kurzer Repeat bei RAMS5/ kurzer Repeat bei RAMS9	M1	Mosel
	Pch37	Italien
	Pch35	Sizilien
	H67	Sieboldingen
	52/3	Italien
	HT3	Hohentwiel
	Pch133	Italien
	Ste63	Stellenbosch, Südafrika
	H32	Sieboldingen
	M2	Mosel
B mittlerer Repeat bei RAMS5/ mittlerer Repeat bei RAMS9	H3K	WBI, Freiburg
	Ste77	Stellenbosch, Südafrika
C langer Repeat bei RAMS5/ langer Repeat bei RAMS9	07-93	Neumagen
	H53	Sieboldingen
	H37	Sieboldingen
	CKV	Blankenhornsberg

Tab. 22: Einteilung der *Pch*-Stammsammlung am JKI in drei Stammgruppen: Gruppe A: kurzer Repeat bei RAMS5 und kurzer Repeat bei RAMS9; Gruppe B: mittlerer Repeat bei RAMS5 und mittlerer Repeat bei RAMS9 und Gruppe C: langer Repeat bei RAMS5 und langer Repeat bei RAMS9 nach vorangegangener Sequenzanalyse (siehe oben).

Für eine weitere Verrechnung mit den binär ausgewerteten Polymorphismen, die in den Primern RAMS1, RAMS3, RAMS10, RAMS11, RAMS12 gefunden wurden, wurden die Gruppen A, B und C ebenfalls in eine binäre Auswertung übertragen. Somit folgt auf Gruppe A mit 1/0 die Gruppe B 1/0 und die Gruppe C 1/0. Dies ermöglicht eine weitere Feingruppierung und es ist möglich, den einzelnen Stämmen einen Haplotyp zuzuordnen (Tab. 23).

Eine eindeutige Zuordnung ist in zehn von 16 Stämmen möglich. So ließen sich die Stämme H67, 53/2 und M1 auch nach der Analyse von 6 Primern nicht eindeutig trennen, da sie die gleiche Kombination (10010011) aufweisen. Sie wurden im Cluster „C1“ zusammengefasst.

Das gleiche Phänomen tritt bei den Stämmen Pch133 und Pch35 auf. Auch hier weisen die Stämme Pch133 und Pch35 die gleiche Kombination (10000110) auf. Zudem ist eine eindeutige Trennung von M2 nicht möglich, da der RAMS10 bei M2 nicht eindeutig auswertbar ist. Sie wurden im Cluster „C2“ zusammengefasst.

Final können somit für die 16 Isolate 2 Cluster gebildet und den Stämmen HT3, H32, Ste63, Ste77, H3K, 07-93, H53, H37 und CKV jeweils ein eindeutiger Haplotyp zugeordnet werden.

Stamm	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	RAMS 1	RAMS 3	RAMS 12	RAMS 11	RAMS 10	Haplotyp/ Cluster Nr
HT3	1	0	0	1	0	0	1	0	1
52/3	1	0	0	1	0	0	1	1	C1
M1	1	0	0	1	0	0	1	1	C1
H67	1	0	0	1	0	0	1	1	C1
H32	1	0	0	0	1	1	1	1	2
Ste63	1	0	0	0	1	0	1	?	3
Pch37	1	0	0	0	0	0	?	1	4
Pch35	1	0	0	0	0	1	1	0	C2
Pch133	1	0	0	0	0	1	1	0	C2
M2	1	0	0	0	0	1	1	?	C2
Ste77	0	1	0	0	1	1	1	0	5
H3K	0	1	0	0	0	1	1	0	6
07-93	0	0	1	0	1	1	1	0	7
H53	0	0	1	0	0	1	0	?	8
H37	0	0	1	0	0	0	0	?	9
CKV	0	0	1	0	1	0	1	0	10

Tab. 23: Zuordnung von Pch-Stämmen zu Haplotypen:

Die einzelnen Pch-Stämme wurden nach binärer Auswertung der einzelnen Polymorphismen jeweils einzelnen Haplotypen (1-10) bzw. Clusternummern (C1 oder C2) zugeordnet; 1=Polymorphismus vorhanden; 0=Polymorphismus abwesend; ?= Bandenmuster nicht eindeutig erkennbar).

Die Haplotypen/ Cluster können in einer Distanzanalyse miteinander verglichen werden. Das durch die UPGMA-Methode entstandene Dendrogramm zeigt hierbei deutlich die Distanz der Stämme untereinander (Abb. 38).

Hier zeigt sich eine nahe Verwandtschaft der Stämme H53 und H37, die beide aus der Phoenix-Anlage am Geilweilerhof stammen. Auch CKV und 07-93 zeigen eine enge Verwandtschaft, da sie

sich nur in einem Locus unterscheiden (vgl. Tab. 23). Gleiches gilt für H3K und Ste77 bzw. H32 und Ste63.

Deutliche Unterschiede zu allen anderen Stämmen sind bei Pch37 zu sehen. Die weiteste Distanz besteht zwischen H53 und dem Cluster 1 (vgl. Abb. 36) da sie sich in der binären Auswertung in mindestens 5 von 8 Loci unterscheiden. Bei einem Blick auf die ursprünglichen Stammcluster (vgl. Tab. 22) wird die Distanz noch größer, da sich Cluster 1 und H53 sowohl in der Sequenz des RAMS5 Fragments als auch in der des RAMS9 Fragments unterscheiden.

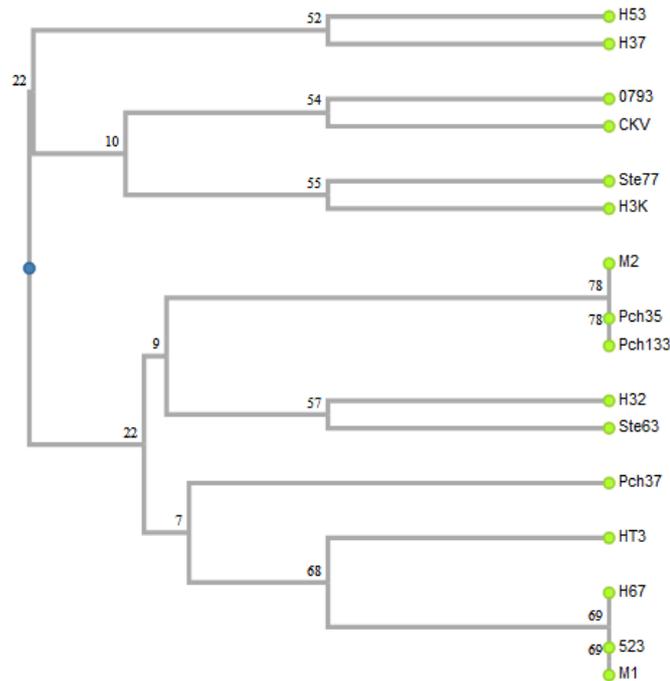


Abb. 36: dimensionsloses Dendrogramm der 16 untersuchten *Pch*-Isolate:
 Das Denrogramm basiert auf der Euklidischen Distanz und Clusterung nach UPGMA-Methode inklusive Bootstrap Analyse (100 Dendrogramme).

3.10. Vergleich der Haplotypen/Cluster mit dem geographischen Ursprung

Die drei Stammgruppen, die nach der Sequenzierung der Sequenzen aus RAMS5 und RAMS9 gebildet werden konnten (vgl. Tab. 22), wurden mit den Fundorten der Isolate verglichen. So konnte bestätigt werden, dass die Stämme der Gruppe C (Tab. 22) (07-93, H53, H37 und CKV) alle in Deutschland isoliert wurden. Darüber hinaus konnte jedem Stamm ein eigener Haplotyp zugeordnet werden (vgl. Tab. 23). Die Stämme H3K, 07-93, CKV und HT3 stammen alle aus dem Freiburger Raum, besitzen jedoch jeweils einen eigenen Haplotyp, der sich in mindestens einem Locus, bei 07-93 und CKV, und maximal 4 Loci, zwischen CKV und HT3, unterscheidet.

Die Stämme aus Südafrika, Ste63 und Ste77 hingegen konnten in kein gemeinsames Cluster eingeordnet werden. Zwar besitzen sie jeweils einen eigenen Haplotyp, sind aber den Gruppen A

bzw. B zugeordnet. Darüber hinaus unterscheiden sie sich in mindestens einem Locus (vgl. Tab. 23).

Die Stämme aus Italien und Sizilien sind alle in der Gruppe A zu finden. Pch35 und Pch133 konnte dabei kein eigener Haplotyp zugeordnet werden, so dass sie in einem Cluster C2 zusammengefasst wurden. Der aus Italien stammende Stamm 52/3 hingegen konnte von den Stämmen M1 und H67, die in deutschen Weinbergen isoliert wurden, nicht unterschieden werden und wurde im Cluster C1 mit ihnen zusammengefasst. Pch37 konnte hingegen ein eigener Haplotyp zugeordnet werden, der sich vom Cluster C2 in mindestens einem Locus unterscheidet (vgl. Tab. 23).

3.11. Vergleich der Fasermatten

Für die Vergleichbarkeit der Vliese aus verschiedenen Polymeren wurde zunächst die Spinnndauer herangezogen. Diese betrug nach Angaben der Fa. Evonik drei Stunden. Jedoch konnten am JKI beim Vergleich der Gewichte verschiedener Chargen aus PLGA bei gleicher Spinnndauer Schwankungen vom mehr als 2 mg/cm² im Flächengewicht festgestellt werden (Abb. 37 links).

Darüber hinaus konnte bei einem Vergleich von PLGA-Vliesen mit unterschiedlicher Spinnndauer keine eindeutige Korrelation zwischen Spinnndauer und Flächengewicht hergestellt werden. Das Flächengewicht steigt zwar um 2 mg/cm² pro zusätzlicher Stunde Spinnndauer an (Abb. 37 rechts), die gleiche Spanne kann aber auch mit gleichbleibender Spinnndauer auftreten. Im Folgenden wurden die Vliese nur anhand ihres Flächengewichtes und nicht anhand der Spinnndauer charakterisiert.

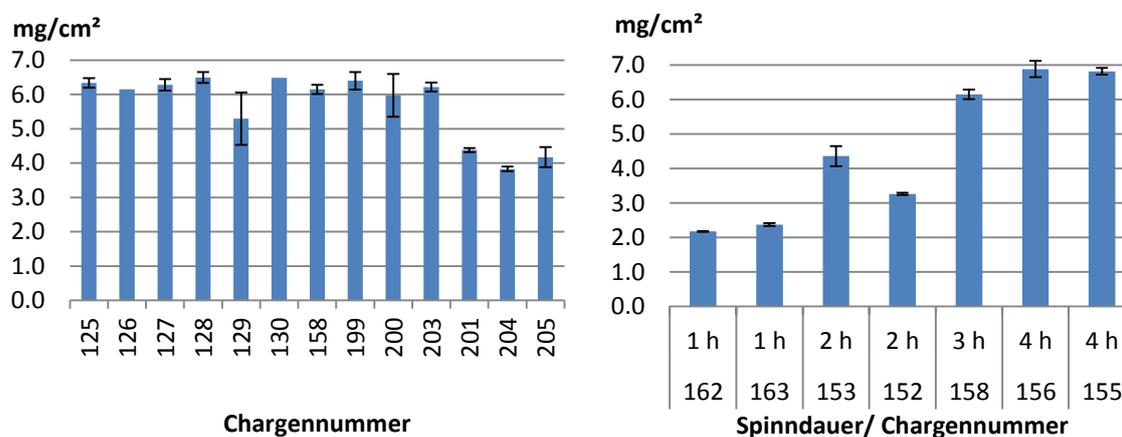


Abb. 37: Flächengewichte in mg/cm² von PLGA-Vliesen der Fa. Evonik:
links: Flächengewichte verschiedener Vlies-Chargen aus mit jeweils drei Stunden Spinnndauer; Fehlerbalken: Standardabweichung (n=3).
rechts: Flächengewicht in Abhängigkeit der Charge und der jeweiligen Spinnndauer in h; Fehlerbalken: Standardabweichung (n=3).

Beim Vergleich der Porengrößen mit der Spinnndauer zeigte sich, dass die Porengröße bei den Fasermatten aus PDLA der Universität Bayreuth zunächst abnahm, sich jedoch nach 2 Stunden Spinnndauer nicht weiter verringerte (Abb. 38).

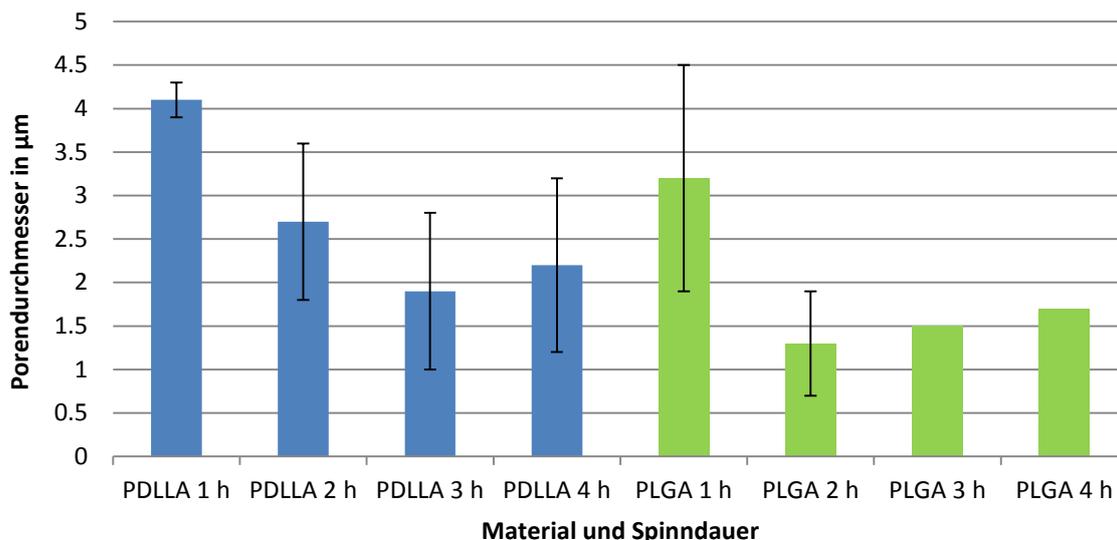


Abb. 38: Porengröße in µm der Vliese der Fa. Evonik:
Die Porengröße in Abhängigkeit von Spinddauer 1-4 Stunden (h) und Materialien PDLLA und PLGA; Diagramm erstellt nach Messungen der Fa. Evonik; Fehlerbalken: Standardabweichung (n=3).

Auch bei den PLGA-Fasermatten der Fa. Evonik verringerte sich die Porengröße nach 2 Stunden Spinddauer nicht signifikant. Insgesamt war die durchschnittliche Porengröße bei beiden Materialien > 1 µm, so dass sich rein rechnerisch keine ausreichende Barriere für *Pch*-Sporen mit der 4.5 – 5.5 x 1.0 – 1.5 µm ergibt.

Auch die Fasermatten der Universität Bayreuth wiesen grundsätzlich eine Porengröße von > 1 µm auf (Abb. 39 und vgl. Abb. 46). Somit war auch hier ein Durchdringen von Sporen theoretisch möglich. Eine Ausnahme bildeten die Vliese aus Ecoflex® und Ecoflex® mit PG. Diese waren in der Porengröße kleiner als 1 µm.

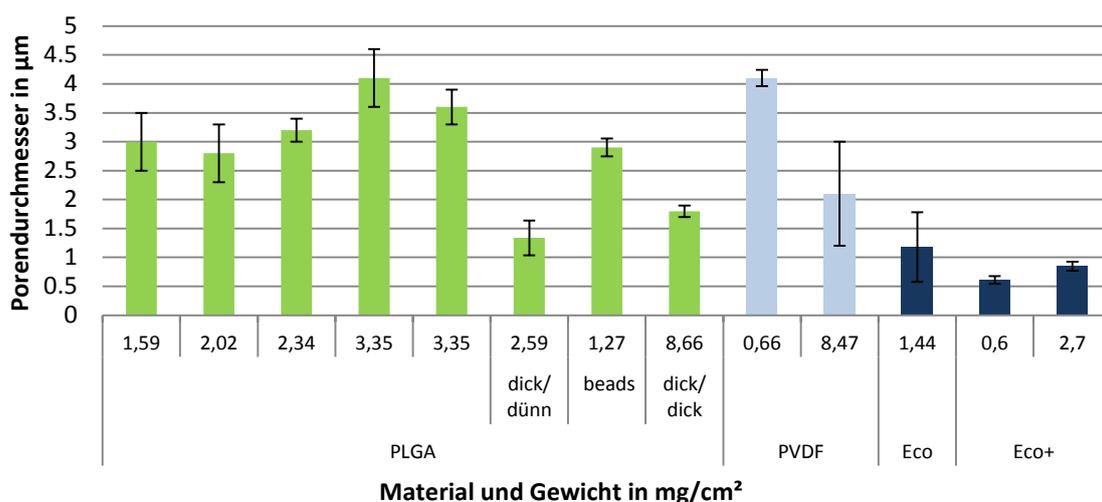


Abb. 39: Porengröße der Fasermatten der Universität Bayreuth in µm in Abhängigkeit vom Material:
Verwendete Materialien: PLGA, PVDF, Eco und Eco+; spezielle Verarbeitungsformen von PLGA sind wie folgt ausgewiesen: ein Vlies aus einer dicken und eine dünnen Schicht, eine Schicht mit beads und zwei dicken Schichten; Fehlerbalken: Standardabweichung (n=3).

3.12. Materialveränderungen durch Klima- und Bestrahlungstests

Bei den Proben aus PLGA, die nur dem Klimatest unterzogen wurden, traten während des gesamten Zeitraumes keine optischen Materialveränderungen auf (Tab. 24, Spalten 1 und 2). Bei Proben mit zusätzlichem Suntest konnten bereits ab dem Zeitpunkt „24 h“ erste Veränderungen durch die zusätzliche Bestrahlung festgestellt werden (Tab. 24, Spalten 3 und 4). Das Material wurde spröde und bekam erste Risse. Dieser Effekt verstärkte sich während des Alterungstests, so dass zum Zeitpunkt „3 Wochen“ beide Proben nur noch in Fragmenten vorhanden waren. Die Vliese zum Zeitpunkt „1 und 2 Monate“ blieben trotz steigender UV-Behandlung dennoch in ihrer Form intakt.

Die Proben der Zeitpunkte „3 und 4 Monate“ sind in ihrer Grundform fast intakt und gleichen den Fragmenten des Zeitpunktes „2 Wochen“.

Die Proben aus PDLLA wiesen durch den alleinigen Klimatest keine optische Veränderung auf (Tab. 24, Spalten 5 und 6). Ein Einfluss des zusätzlichen UV-Tests auf das Material wurde ab dem Zeitpunkt „1 Woche“ sichtbar (Tab. 24, Spalten 7 und 8). Auch hier wurde das Material brüchig und riss ein. Bis zu dem Zeitpunkt „2 Monate“ nahm auch die Sprödigkeit des Materials zu, woraufhin zum Zeitpunkt „2 Monate“ nur noch Fragmente vorhanden waren, die ca. $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Fläche ausmachten. Ab dem Zeitpunkt „3 Monate“ waren die Vliese mit zwei Ausnahmen wieder völlig intakt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Verwendung einer neuen Charge zum Zeitpunkt „3 Monate“ bzw. eine Änderung von Bewitterungstest auf den Suntest.

Eine von der Fa. Evonik durchgeführte Messung des Molekulargewichts zeigte jedoch bei keinem der verwendeten Materialien einen Materialabbau. Dies geschah unabhängig von dem durchgeführten Test.

	PLGA				PDLLA			
	Klimakammer		Klimakammer+Suntest		Klimakammer		Klimakammer+Bewitterungstest	
24 h								
1 Woche								
2 Wochen								
3 Wochen								
1 Monat								
2 Monate								
3 Monate								
4 Monate								
5 Monate								
6 Monate								

Tab. 24: Veränderung der PLGA-Proben der Fa. Evonik nach vorangegangenem Klima- und Suntest und Veränderung der PDLLA-Proben nach vorangegangenem Klima- und Bewitterungstest: PLGA-Proben im Verlauf: Spalten 1 und 2 nach der Klimakammer; Spalten 3 und 4 nach Klimakammer und zusätzlichem Suntest; grau: fehlende Proben. PDLLA-Proben im Verlauf: Spalten 5 und 6 nach Klimakammer; Spalten 7 und 8: nach Klimakammer und zusätzlichem Bewitterungstest.

3.13. Dichtigkeitstests

3.13.1. Dichtigkeitstests im Gewächshaus

Die Ruten aus dem Beimpfungsversuch wurden zunächst visuell auf Symptome einer *Pch*-Infektion untersucht. Dabei konnten weder bei den Reben mit Vlies, noch bei den direkt beimpften Reben die typischen Symptome wie Gummosis oder Verbräunungen im Querschnitt beobachtet werden. (Abb. 40). Bei beiden Varianten war durchweg am oberen Rand eine ca. 1 mm dicke Eintrocknungszone erkennbar.

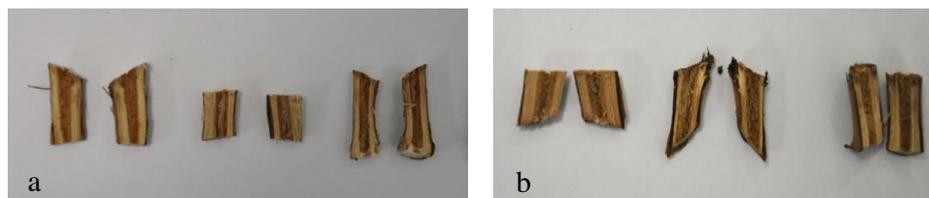


Abb. 40: Querschnitt von Reben ein halbes Jahr nach vorangegangener künstlicher Infektion mit *Pch*: a: Reben die vor der Infektion mit einem Vlies aus PDLLA geschützt wurden; b: Reben die vor der Infektion nicht mit einem Vlies aus PDLLA geschützt wurden.

Für die Ermittlung einer möglichen Infektion wurden oberflächensterilisierte Holzstückchen sowohl auf ein Nährmedium gelegt, als auch eine Nested-PCR mit *Pch*-spezifischen Primern durchgeführt. Das Auflegen der Holzprobe führte zu keinem Nachweis von *Pch* auf dem Nährmedium. Bei der Auswertung des ersten Beimpfungsversuches im Jahr 2014 konnten in einer dreimaligen Wiederholung der Nested-PCR mit spezifischen Primern MM5-450F/ MM5-450R und MM5-200F/ MM5-200F zwei der sechs mit PDLLA-Vlies bedeckten und infizierten Reben als frei von *Pch*-bonitiert werden (Tab. 25). Bei den verbliebenen vier Proben konnte der Pilz in mindesten einer von drei Wiederholungen detektiert werden. Bei den Reben, die direkt mit *Pch* beimpft wurden, wurden fünf von sechs Reben in allen Wiederholungen positiv auf den Pilz getestet.

	Beimpfte Rebe mit PDLLA-Vlies						Beimpfte Rebe ohne PDLLA-Vlies					
	V.1	V.2	V.3	V.4	V.5	V.6	R.1	R.2	R.3	R.4	R.5	R.6
PCR1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
PCR2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
PCR3	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1

Tab. 25: Ergebnis der dreifachen Wiederholungen der Nested-PCR bei den in 2014 mit *Pch* beimpften Reben: Proben von Reben, die vor der Infektion mit einem Schutzvlies aus PDLLA versehen waren (V.1-6) oder ohne Vlies (R.1-6); 0 und weiß = kein Nachweis; 1 und grün = Nachweis.

Der Versuch wurde im Jahr 2015 wiederholt. Hier konnten drei von vier infizierten Reben mit zusätzlichem Schutzvlies als frei von *Pch* analysiert werden (Tab. 26). Bei den beimpften Reben ohne Vlies konnte *Pch* bei drei von fünf Reben eindeutig nachgewiesen werden.

	Beimpfte Rebe mit PDLLA-Vlies					Beimpfte Rebe ohne PDLLA-Vlies				
	V.1	V.2	V.3	V.4	V.5	R.1	R.2	R.3	R.4	R.5
PCR1	0	0		0	0	1	1	0	1	1
PCR2	0	0		0	0	1	1	0	0	1
PCR3	0	0		0	1	1	1		1	1

Tab. 26: Ergebnis der dreifachen Wiederholungen der Nested-PCR bei den in 2015 mit *Pch* beimpften Reben: Reben, die vor der Infektion mit einem Schutzvlies aus PDLLA versehen waren (V.1-6) oder ohne Vlies (R.1-6); 0 und weiß = kein Nachweis; 1 und grün = Nachweis; grau=fehlender Datenpunkt.

Somit konnte bei den in 2014 beimpften Reben eine schützende Wirkung des PDLLA-Vlieses ermittelt werden, die sich im darauffolgenden Jahr wiederholen lies. Darüber hinaus ließ sich optisch keine Beeinträchtigung der Wunde, wie z.B. Fäulnis, durch das Vlies feststellen.

3.13.2. Dichtigkeitsversuche im Labor

Bei der Auswertung der Dichtigkeitstests im Labor wiesen die Materialien große Unterschiede in Bezug auf ihre hydrophoben Eigenschaften auf. Die Vliese aus PDLLA waren stark hydrophob und die Sporensuspension konnte nur sehr langsam hindurch diffundieren. Die Tropfen waren daher bis zu 24 h auf dem Vlies zu sehen (Abb. 41 a). Bei den Fasermatten aus PLGA hing die Hydrophobizität von der Herstellungsart ab und zeigte diesbezüglich starke Unterschiede. So diffundierten die Tropfen auf Vliesen der Fa. Evonik schneller durch das Material als bei den Vliesen aus Bayreuth (Abb. 41 b und c). Auch die untersuchten Matten aus Ecoflex® waren nicht hydrophob und ließen die Tropfen in den ersten Stunden hindurch diffundieren (Abb. 41 d).

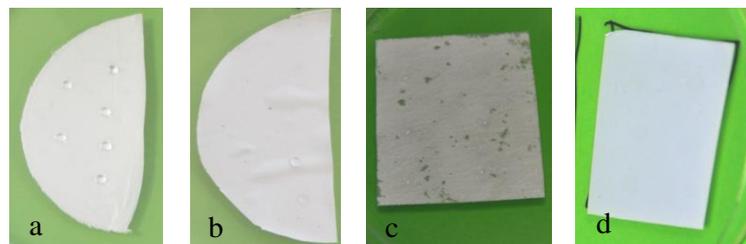


Abb. 41: Vliese aus a: PDLLA, b: PLGA-E, c: PLGA-BT, d: Eco+ auf PDA-Medium 24 h nach der Inokulation: Deutlich sichtbar sind die Tropfen der Sporensuspension auf den Matten PDLLA und PLGA-E. Auf den Fasermatten a PLGA-BT und Eco+ sind keine Tropfen erkennbar.

Im weiteren Versuchsverlauf konnten CFUs (Colony Forming Units) auf den Vliesen beobachtet werden (Abb. 42 a-d). Auch hier hing die Entwicklung stark von den verwendeten Materialien ab. So wuchsen auf Fasermatten aus PDLLA und Eco+ keine CFUs (Abb. 42 a und d). Auf den Matten aus PLGA konnten CFUs unabhängig von der verwendeten Herstellungsart und Materialdicke beobachtet werden.

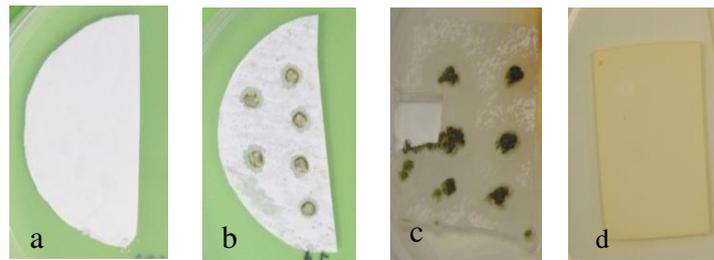


Abb. 42: Vliese aus a: PDLLA, b: PLGA-E, c: PLGA-BT, d: Eco+ auf PDA-Medium nach vorangegangener Infektion mit einer Sporensuspension von *Pch*-Sporen zu Versuchsende mit deutlichen CFU auf PLGA-E und PLGA-BT und ohne CFU auf PDLLA und Eco+.

Bei den Versuchen zur Dichtigkeit erwiesen sich die Fasermatten aus PDLLA und Ecoflex® mit PG unabhängig von ihrem Flächengewicht als vollständig dicht (Abb. 43).

Bei den Vliesen aus PLGA gab es Unterschiede in der Dichtigkeit sowohl bedingt durch die Produktionsweise der jeweiligen Hersteller als auch durch das Gewicht. So nahm die Dichtigkeit der Fasermatten, die von der Universität Bayreuth hergestellt wurden, mit zunehmendem FG zu. Eine vollständige Dichtigkeit wurde bei einem Vlies mit einem FG von 2,6 mg/cm² erreicht. Danach nahm die Dichtigkeit trotz zunehmendem FGs wieder ab. Bei den PLGA-Vliesen, die von der Fa. Evonik hergestellt wurden, konnte eine 100%-Dichtigkeit bei einem FG von 4,32 mg/cm² erreicht werden. Ab einem FG von 7,3 mg/cm² verringerte sich die Dichte gegen Sporen deutlich und das Vlies mit dem höchsten Gewicht von 13,8 mg/cm² zeigte eine ähnliche Wirksamkeit wie das Vlies mit dem geringsten Gewicht von 2,9 mg/cm². Bei den Vliesen aus PVDF konnte zwar eine Steigerung der Dichtigkeit mit Zunahme des Gewichtes erreicht werden, diese war jedoch maximal nur zu 90% möglich. Bei einem Test von purem Ecoflex® konnte nur eine Dichtigkeit von 97% beobachtet werden. Eine 100%ige-Dichtigkeit wurde bei den Vliesen aus Ecoflex® nur durch die Zugabe von PG erreicht.

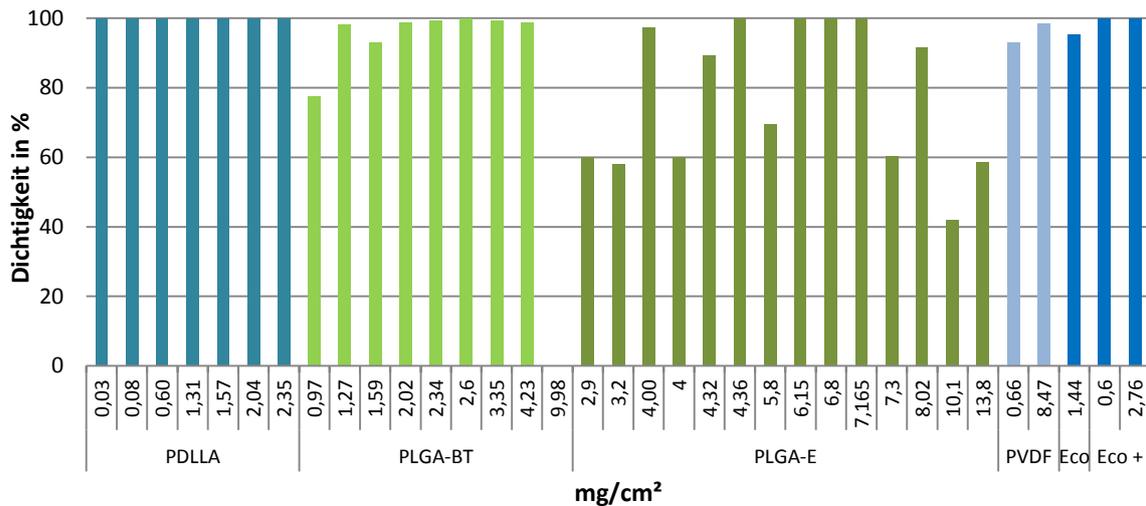


Abb. 43: Dichtigkeit der Materialien gegen Sporen von *Pch*: Dichtigkeit von PDLLA, PLGA der Universität Bayreuth (PLGA-BT) und der Fa. Evonik (PLGA-E), PVDF, Eco Eco+ in Prozent, in Abhängigkeit vom jeweiligen FG in mg/cm²(n=3); 100% stellt die vollständige Dichtigkeit gegen Sporen dar.

Darüber hinaus wurden die Vliese auch auf die Dichtigkeit gegenüber Keimschläuchen untersucht. Auch hier erwiesen sich die Matten aus PDLLA (Ausnahme bei FG 0,6 mg/cm²) und Eco+ als dicht (Abb. 44). Die Dichtigkeit der PLGA Vliese aus Bayreuth gegenüber Keimschläuchen sind mit der Dichtigkeit gegenüber Sporen vergleichbar. Diese steigt mit zunehmendem Gewicht der Vliese an. Eine Ausnahme bildet das schwerste Vlies mit 9,8 mg/cm². Hier konnte aufgrund von Materialveränderungen keine Bonitur vorgenommen werden. Auch die Ergebnisse der Vliese aus PVDF und Ecoflex® sind mit den Ergebnissen aus den Sporen-Tests vergleichbar. Auch hier konnte eine 100%ige Dichtigkeit gegen Keimschläuche nur bei Ecoflex® mit zusätzlichem PG erreicht werden.

Bei PLGA-E wurde die maximale Dichtigkeit von 98% bei den Vliesen mit 6,15 und 6,8 mg/cm² erreicht. Bei den schweren Vliesen mit 10 und 13 mg war keine 100%ige Dichtigkeit festzustellen.

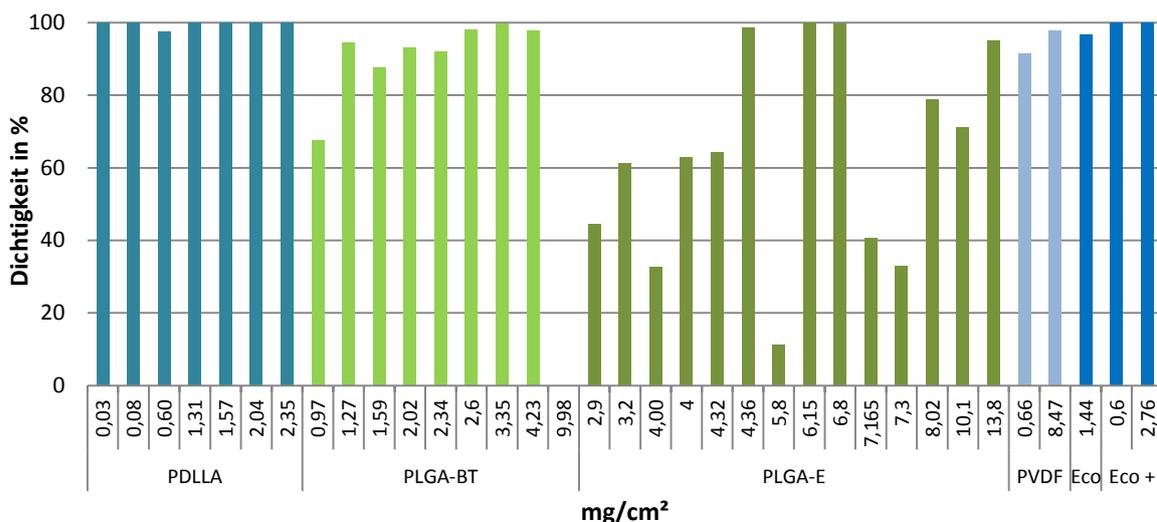


Abb. 44: Dichtigkeit der Materialien gegen Keimschläuche von *Pch*: Dichtigkeit von PDLLA, PLGA der Universität Bayreuth (PLGA-BT) und der Fa. Evonik (PLGA-E), PVDF, Eco und Eco+ in Prozent in Abhängigkeit vom jeweiligen FG in mg/cm²(n=3); 100% stellt die vollständige Dichtigkeit gegen Sporen dar.

3.13.3. Einfluss der Polymerkonzentration und des Spinnverfahrens auf die Dichtigkeit

Ein Einfluss der verwendeten Polymerkonzentration auf die Dichtigkeit gegen Sporen konnte bei Vliesen der Fa. Evonik beobachtet werden. Bei einer Gegenüberstellung von Vliesen mit 20% bzw. 30% Polymer in der Schmelze erwiesen sich die Vliese mit 20% Polymeranteil als dichter gegen durchfallende Sporen (Abb. 45). Die Steigerung der Spindauer und die damit verbundene Zunahme des FG führen zu keiner Verbesserung des Ergebnisses.

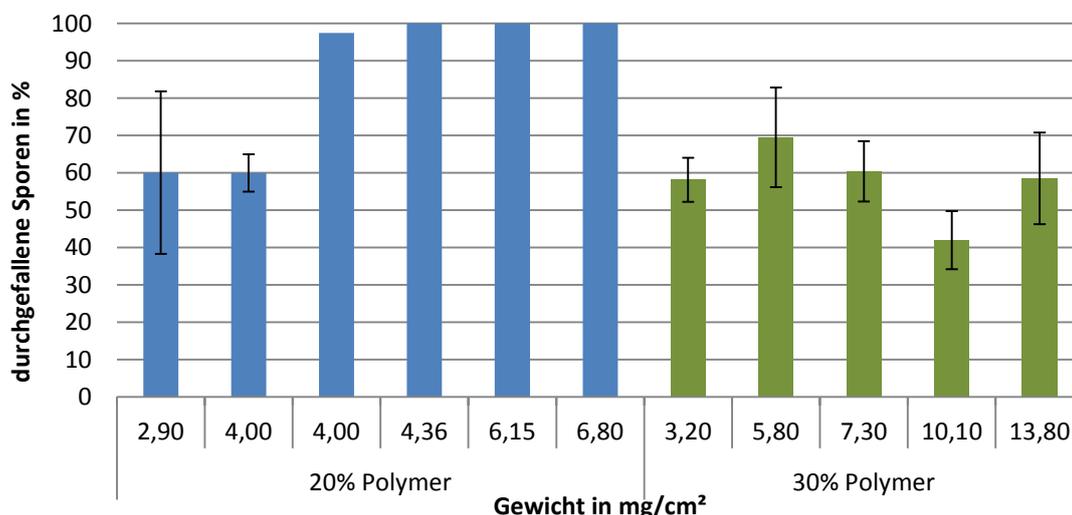


Abb. 45: Dichtigkeit von PLGA-Vliesen der Fa. Evonik gegen *Pch*-Sporen in Abhängigkeit vom jeweiligen Polymeranteil in der Polymerlösung: blau: Vliese, die mit 20% Polymer in der Lösung hergestellt wurden; grün: Vliese die mit 30% Polymer in der Lösung hergestellt wurden, das jeweilige FG in mg/cm², bei gleichbleibender Spindauer von 3 h, Fehlerbalken: Standardabweichung(n=3).

An der Universität Bayreuth wurden neben einfach gesponnenen Vliesen auch Vliese mit unterschiedlichen Schichten hergestellt. Die erste Vliesvariante enthielt „beads“ in den Fasern der oberen Lage mit einem FG von insgesamt 1,27 mg/cm², die zweite eine untere Lage aus dicken und eine obere Lage aus dünnen Fasern mit einem FG von 2,6 mg/cm² und die dritte zwei dicke Lagen mit einem FG von 9,98 mg/cm² (Abb. 46).

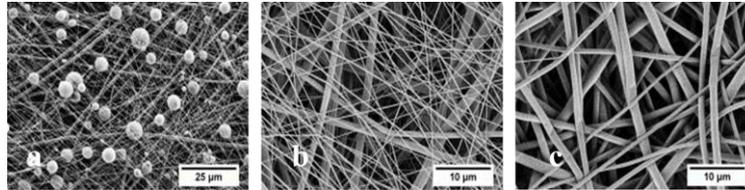


Abb. 46: verschieden Fasermatten aus PLGA der Universität Bayreuth:
a: mit Beads in den Fasern, b: mit dünner Oberschicht und c: zwei dicken Schichten. (Quelle: Viola Buchholz Universität Bayreuth)

Beim Vergleich der morphologisch unterschiedlichen Fasermatten konnte mit den zusätzlichen „beads“ eine höhere Dichtigkeit erreicht werden als mit Fasermatten mit einem ähnlichen FG von 1,59 mg/cm² welche mit dem ursprünglichen Verfahren ohne Schichten hergestellt wurden (vgl. Abb. 43 und Abb. 44).

Die Fasermatte aus zwei verschiedenen Schichtdicken (Abb. 46 b) zeigte hingegen ähnliche Ergebnisse wie Matten mit vergleichbarem Gewicht, die mit dem ursprünglichen Verfahren hergestellt wurden. Die Matte mit zwei dicken Schichten wies die geringste Dichtigkeit aller PLGA Matten aus Bayreuth auf, obwohl sie das höchste Gewicht aufwies (Abb. 44). Da sie sich zudem im Testverlauf zusammenzog, konnte sie letztlich gar nicht auf CFU bonitiert werden (Abb. 45).

3.14. Dichtigkeitstest der Vliese nach Alterungstests

3.14.1. Vliese aus PLGA

Beim Test auf Dichtigkeit gegen durchfallende Sporen zeigte sich, dass die Fasermatten mit einer Ausnahme (Zeitpunkt „1 Woche“) bis zum Zeitpunkt „2 Monate“ dicht gegen durchfallende Sporen waren (Abb. 47 oben). Ab diesem Zeitpunkt konnten vermehrt Sporen durchdringen. Dies scheint jedoch unabhängig von einem zusätzlichen Suntest zu sein, da beide Varianten gleichermaßen durchlässig waren.

Neben dem Durchfallen der Sporen wurde auch ein Durchwachsen von Keimschläuchen und die damit verbundene Bildung von CFUs untersucht. Diese trat bei allen Testdauern und bei der Kontrolle auf, die nicht dem Alterungstest unterzogen wurde.

Dennoch konnte die Bildung von CFUs ab dem Zeitpunkt „2 Monate“ fast durchgehend beobachtet werden, was auf einen negativen Einfluss des Klimatests im Allgemeinen zurückgeführt werden kann.

Durchgefallen

	Kontrolle	24 Stunden	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	1 Monat	2 Monate	3 Monate	4 Monate	5 Monate
Klimatest			■				■	■		■
Suntest								■	■	■

CFU auf Vlies

	Kontrolle	24 Stunden	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	1 Monat	2 Monate	3 Monate	4 Monate	5 Monate
Klima		■	■	■	■	■	■	■	■	■
Suntest	■		■	■	■	■	■	■	■	■

Abb. 47: Pch-Kolonien auf PLGA nach alleinigem Klimatest (Klima) und Klimatest mit zusätzlichem Suntest (Suntest):

Undichtigkeit in Abhängigkeit der jeweiligen Testdauer (24 Stunden- 5 Monate) neben der unbehandelten Kontrolle: grün: positiver Nachweis; weiß: negativer Nachweis, grau: nicht auswertbare Vliese, schwarz: fehlende Vliese; oben: direkt durchgefallene Sporen, unten: CFU auf dem Vlies.

3.14.2. Vliese aus PDLA

Bei den Vliesen aus PDLA konnten, bis auf eine Probe mit dem Zeitpunkt „3 Monate“, keine durchfallenden Sporen im Dichtigkeitsversuch beobachtet werden (Abb. 48 oben). Ein zusätzlicher Bewitterungstest veränderte die Dichtigkeit nicht.

Vermehrt konnte die Bildung von CFUs bei Vliesen mit zusätzlichem Bewitterungstest beobachtet werden. Dieser Effekt tritt ab dem Zeitpunkt „2 Monate“ bis auf eine Ausnahme beim Zeitpunkt „5 Monate“ nicht mehr auf (Abb. 48 unten).

Durchgefallen

	Kontrolle	24 Stunden	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	1 Monat	2 Monate	3 Monate	4 Monate	5 Monate	6 Monate
Klima								■			
Bewitterung											

CFU auf Vlies

	Kontrolle	24 Stunden	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	1 Monat	2 Monate	3 Monate	4 Monate	5 Monate	6 Monate
Klima								■	■		
Bewitterung		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Abb. 48: Pch-Kolonien auf PDLA nach alleinigem Klimatest (Klima) und Klimatest mit zusätzlichem Bewitterungstest (Bewitterung):

Undichtigkeit in Abhängigkeit der jeweiligen Testdauer (24 Stunden- 6 Monate) neben der unbehandelten Kontrolle: grün: positiver Nachweis; weiß: negativer Nachweis, grau: nicht auswertbare Vliese; oben: direkt durchgefallene Sporen, unten: CFU auf dem Vlies.

3.15. Applikationstest

3.15.1. Im Gewächshaus

Für die Applikationstests wurden im Januar 2013 zwei Chargen PDLA und eine Charge PGLA getestet. Da die Vliese aus PDLA aufgrund ihrer Materialeigenschaften elektrostatisch sind, konnten sie unabhängig von ihrer Charge alleine durch Andrücken befestigt werden (Abb. 49 a). Die Vliese aus PLGA waren steif und ließen sich ohne zusätzliche Befestigung nur durch Falten des Materials anbringen und fielen nach zwei Tagen wieder ab. Daher wurde bei den Vliesen aus PLGA eine Befestigung mit Parafilm und eine weitere aus Draht getestet.



Abb. 49: PDLLA im Gewächshaustest:

a: PDLLA Direktapplikation auf Schnittwunden von Topfreben und anschließender Infektion mit Sporensuspension, b: nach drei Monaten, c: nach sechs Monaten und d: nach 12 Monaten mit Rissen am Rand der Schnittwunde.

Ein besonderes Augenmerk des Versuchs lag auf dem Verhalten des Vlieses während des Rebblutens. Während dieses Zeitraums wurden die Vliese aus PDLLA feucht und durchsichtig und der Blutungssaft schien unter dem Vlies entlang zu laufen (Abb. 50 a und b). Das Material trocknete jedoch nicht sofort wieder ab, sondern blieb noch einige Tage lang feucht. Nach der Trocknung klebte es jedoch noch fester an der Schnittwunde, zeigte aber bräunliche Flecken auf dem Material (Abb. 49 b).

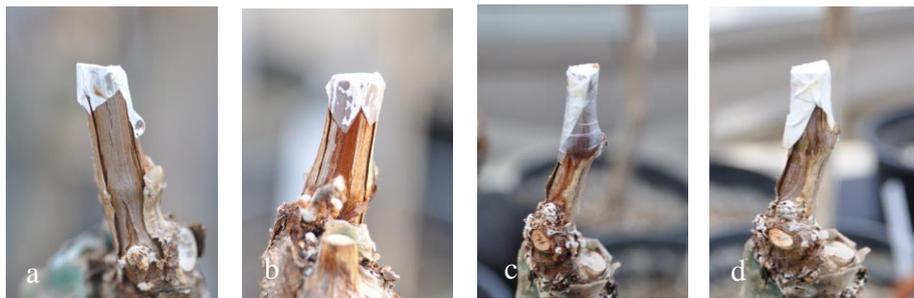


Abb. 50: Verhalten der Vliese während des Rebblutens:

a und b: Rebbluten bei Reben mit Fasermatten aus PDLLA und c: bei mit Fasermatten PLGA, das mit Parafilm befestigt wurde. Hier war ein Abtrocknen erst nach Entfernung des Parafilms möglich, siehe (d).

Bei der Variante PLGA mit Parafilm staute sich der Blutungssaft innen am Vlies und lief nur langsam aus (Abb. 50 c). Das Material trocknete jedoch nach Entfernen des Parafilms und dem Ende des Blutens innerhalb von 24 h wieder ab (Abb. 50 d). Nach dem Rebbluten fühlte sich das Material weicher an. Im Gegensatz zu PDLLA haftete es bei Überlappung jedoch weder auf sich selber noch auf den Reben und blieb als lose Kappe auf der Schnittfläche sitzen. Bei der Verwendung von Draht konnte das Material während des Rebblutens schnell abtrocknen und blieb in seiner Konsistenz unverändert.

Im weiteren Versuchsverlauf blieb das Vlies aus PDLLA flexibel und konnte sich dem Wachstum der Triebe anpassen (Abb. 49 c), während es gleichzeitig an der Schnittwunde haften blieb. Erste Materialermüdungen traten erst nach 12 Monaten in Form von Rissen auf (Abb. 49 d). In der Grundform blieb es aber intakt und mit der Schnittwunde verbunden, wodurch es nicht rückstandsfrei abgelöst werden konnte. Bei den Vliesen aus PLGA hingegen zeigten sich im

Versuchsverlauf schnell Risse in der Auflagefläche und an den Falzfalten der Faserplatte (Abb. 51 a und b).

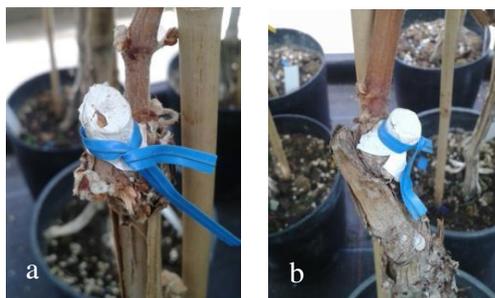


Abb. 51: Materialermüdung der PLGA-Vliese:
a: Risse in der Mitte und b: am Rand der Faserplatten aus PLGA mit zusätzlicher Drahtbefestigung zwei Monate nach der Applikation auf Topfreben.

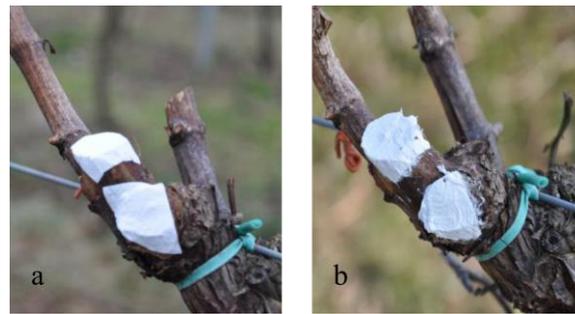
3.15.2. Im Freiland

Im Februar 2015 wurden auf drei Reben in der Anlage der Sorte Chardonnay auf den Schnittwunden des Winterschnitts 2014 Vliese aus PDLLA appliziert (Abb. 52 a und b). Dabei wurden sowohl senkrechte als auch waagrechte Schnittwunden in unterschiedlichen Größen gewählt (Abb. 52 a und d). Die Vliese wurden nur durch Andrücken befestigt.



Abb. 52: frische horizontale und senkrechte Schnittwunden am Stammkopf und Stamm von Reben in der Chardonnay Anlage:
a und b: frische Oberflächen vor der Applikation; c und d: nach der Applikation von Faserplatten aus PDLLA.

Bereits nach einem Monat zerfaserten die Vliese an den exponierten waagrechten Stellen stark und es zeigte sich der aus den Abbauprüfungen im Freiland bereits beobachtete „Pappmaché-Effekt“ (Abb. 53 b).



**Abb. 53: Verhalten von PDLA auf Schnittwunden im Freiland:
a: frisch appliziertes PDLA-Vlies auf zwei Schnittwunden am Stammkopf und b: der eintretende „Pappmache“-Effekt des Vlieses nach einem Monat.**

Das Vlies, das seitlich am Stamm befestigt wurde, blieb hingegen unverändert an der Schnittwunde kleben (Abb. 54 a). Nach einem weiteren Monat war das Vlies auf der waagrecht exponierten Schnittstelle fast vollständig abgetragen und nur an der Rinde und an regengeschützten Stellen blieb das Vlies intakt (Abb. 54 b).

Im weiteren Versuchsverlauf trat der „Pappmaché-Effekt“ an den geschützteren Stellen am Stammkopf auf und das Vlies wurde abgetragen. Dennoch blieb das Vlies auf der Schnittstelle haften (Abb. 54 c).

Im September 2015 wurden die Trauben maschinell gelesen. Auch danach waren am Stammkopf noch Fragmente des Vlieses an der Rinde zu finden. Das Vlies am Stamm war weiterhin intakt (Abb. 54 d).



**Abb. 54: PDLA auf einer horizontalen und einer senkrechten Schnittwunde einer Rebe nach a: einem Monat, b: zwei Monaten, c: vier Monaten, und d: sieben Monaten:
Deutlich erkennbar ist der Materialverlust auf der horizontalen Schnittwunde, die bereits nach zwei Monaten nicht mehr bedeckt ist (b) während das Vlies die senkrechte Wunde am Stamm auch nach 7 Monaten vollständig bedeckt (d).**

3.16. Abbaubarkeitstests der Vliese

3.16.1. Abbaubarkeit im Boden einer Rebanlage

Im Juni 2013 wurde mit einem sechsmonatigen Freilandversuch begonnen, in dem die Abbaubarkeit der Fasermatten aus PDLA und PLGA getestet werden sollte. Dafür wurden beide Vliesarten im Boden zwischen den Rebstöcken einer Junganlage vergraben.

Die Vliese aus PDLA wiesen bereits nach einer Woche deutliche Verschmutzungen mit Erde auf (Abb. 55 a), die sich auch durch Abwaschen nicht vollständig entfernen ließen. Nach den ersten drei Wochen entstanden Löcher in dem Material (Abb. 55 c und d), die auf mechanische Belastung durch Erde und Steinchen zurückzuführen sind.

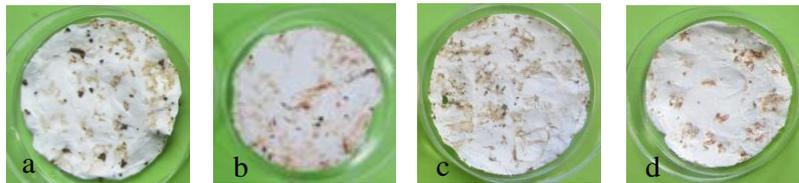


Abb. 55: Abbauverhalten von PDLA nach a: einer, b: zwei, c: drei und d: vier Wochen im Boden: Die Fasermatten blieben intakt, jedoch sind Einlagerung von Erdklumpen zwischen den Fasern zu sehen.

Des Weiteren lösten sich einzelne Fasern von der Matte, die sich ineinander verzwirbeln (Abb. 56 a). In den weiteren fünf Monaten blieben die Vliese in ihrer Grundform intakt und optisch ist kein Abbau der Fasern zu erkennen (Abb. 56 a-e).

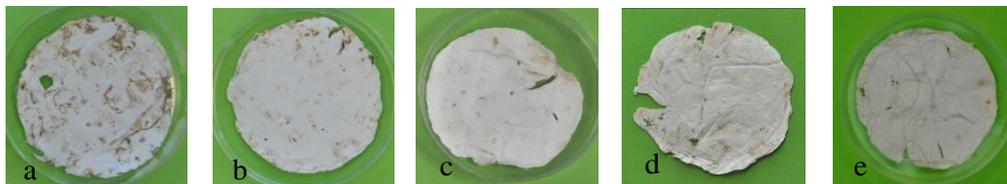


Abb. 56: Abbauverhalten von PDLA innerhalb von a: zwei, b: drei, c: vier, d: fünf und e: sechs Monaten im Boden:

Insgesamt blieb die Grundform der Vliese erhalten. Die Löcher in den Materialien vgl. (a-e) sind auf Steinchen zurückzuführen, welche das Vlies durchschlugen. Zudem lösten sich gegen Versuchsende einzelne Fasern, die sich mit Erdkrümeln verzwirbelten und so braun erscheinen (e).

Die PLGA Vliese wiesen in den ersten vier Wochen bereits starke Materialveränderungen auf. Das Material wurde steif und stark brüchig, weshalb bereits nach einer Woche Risse auftraten (Abb. 57 a). Im weiteren Versuchsverlauf zerfielen die Fasermatten in kleine Fragmente, die zum Teil nicht mehr vollständig im Boden auffindbar waren (Abb. 57 c).

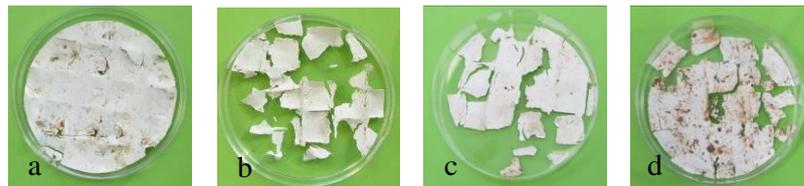


Abb. 57: Abbauverhalten von PLGA nach a: einer, b: zwei, c: drei und d: vier Wochen im Boden: Bereits nach einer Woche zeigt sich eine starke Fragmentierung der Fasermatte, die im Versuchsverlauf deutlich zunimmt.

In den weiteren fünf Monaten des Versuches zerfiel das Vlies weiter in kleine Fragmente, die zu Versuchsende kaum mehr aufzufinden waren (Abb. 58 a-e). Darüber hinaus begann das Vlies über den ganzen Versuchsverlauf immer stärker mit der Erde zu verkleben und war nicht zerstörungsfrei ablösbar.

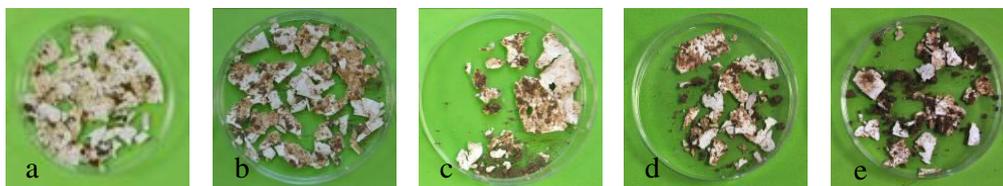


Abb. 58: Abbauverhalten von PLGA innerhalb von a: zwei, b: drei, c: vier, d: fünf und e: sechs Monaten im Boden: Im Versuchsverlauf nimmt die Fragmentierung des Materials weiter zu. Zudem binden sich Erdreste an das Material, die nicht zerstörungsfrei zu entfernen sind.

Neben den optischen Veränderungen der Materialien wurden die Proben an der Universität Bayreuth mittels einer Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)-Analyse hinsichtlich eines Materialabbaus auf molekularer Ebene untersucht (Abb. 59). Ein molekularer Materialabbau, der in Form eines deutlichen „Peak-shifts“ nach links in der Abbildung sichtbar wäre, konnte jedoch weder für PDLA noch für PLGA nachgewiesen werden.

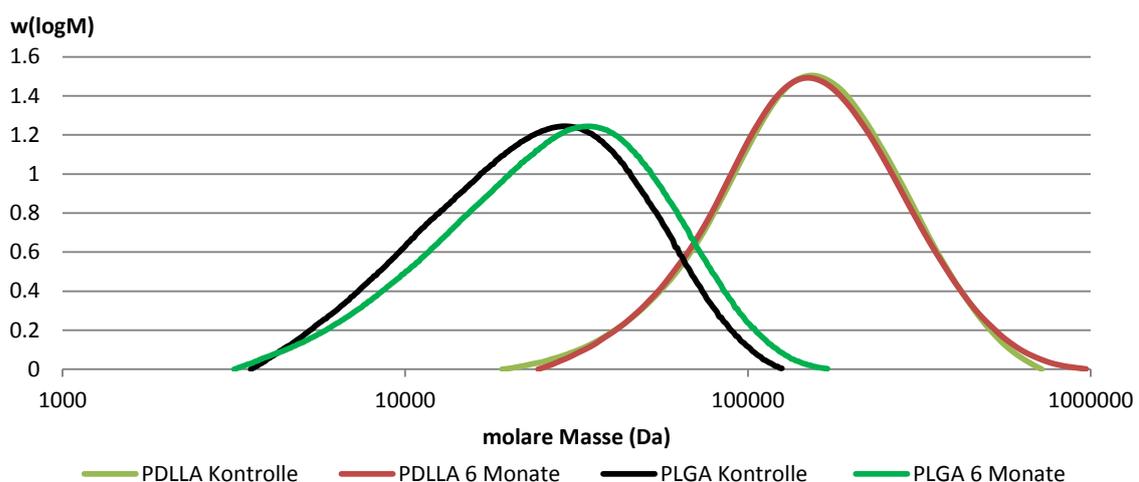


Abb. 59: Veränderung der molaren Masse von Vliesen im Boden: Veränderungen der molaren Masse, in Da, von PDLA und PLGA nach sechs Monaten im Boden im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (Graphen erstellt nach GPC-Messungen von Viola Buchholz an der Universität Bayreuth).

3.16.2. Abbaubarkeit in der Traubenzone

Im Mai 2014 wurde mit dem Abbauersuch der Materialien PDLLA und PLGA in der Traubenzone der Anlage Phoenix begonnen. Innerhalb der ersten vier Wochen kam es bei den Vliesen aus PDLLA zu ersten optischen Materialveränderungen (Abb. 60 a-d). Die Vliese begannen sich in der dritten Woche irreversibel zu wellen und steif zu werden. Durch die Feuchte der Regenfälle begann sich das Material zusätzlich zusammenzuziehen (Abb. 60 d).

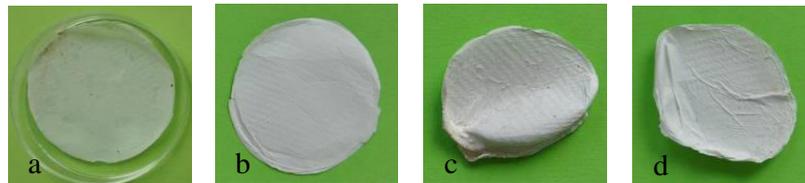


Abb. 60: Abbauverhalten von PDLLA in a: einer, b: zwei, c: drei und d: vier Wochen in der Traubenzone: Insgesamt blieben die Fasermatten in ihrer Gesamtheit intakt, begannen sich aber nach drei Wochen zu wellen (c).

Innerhalb eines weiteren Monats bildeten sich zudem Risse im Material (Abb. 61 a). Im weiteren Verlauf zerfaserten die Vliese immer weiter und die Struktur wurde Pappmaché-artig (Abb.61 b-e). Zudem kam es zu Materialverlusten, so dass nach zwei Monaten von den Matten nur noch Fragmente zu finden waren, die sich zum Teil auch nicht mehr vom Trägermaterial lösen ließen (Abb. 61 d). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Ergebnissen des Abbauersuchs im Boden, wo das Material fast vollständig intakt geblieben war.

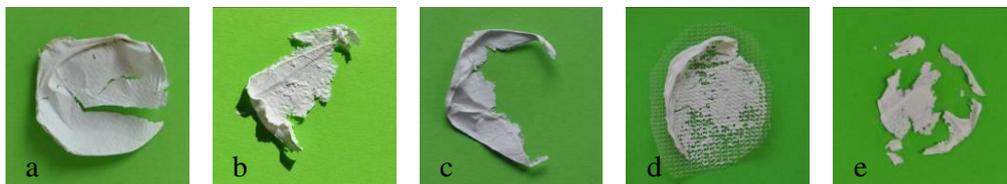


Abb. 61: Abbau von PDLLA innerhalb von a: zwei, b: drei, c: vier, d: fünf und e: sechs Monaten in der Traubenzone: Während dieser Zeit wurden die Fasermatten Pappmaché-artig und zerfielen in Fragmente.

Bei den Vliesen aus PLGA ließ sich in den ersten vier Wochen ein Unterschied zwischen den Gruppen „leicht“ (= L) und „schwer“ (= S) beobachten. Die Gruppe der leichteren Vliese zerfiel bereits in der ersten Woche in Fragmente (Abb. 62 a-d). Die Fasermatten aus der „schweren“ Gruppe blieben hingegen in den ersten vier Wochen stabiler und bekamen nur vereinzelt Risse (Abb. 63 a-d). Eine Gemeinsamkeit der beiden Vliestypen war die Verflüssigung und anschließende Aushärtung der Vliese an den Rändern (Abb. 63 c unten). Dies ist auf die Temperaturen während der Sommermonate im Weinberg zurückzuführen, da PLGA sich bereits bei etwa 30°C verflüssigt und durchsichtig wird.

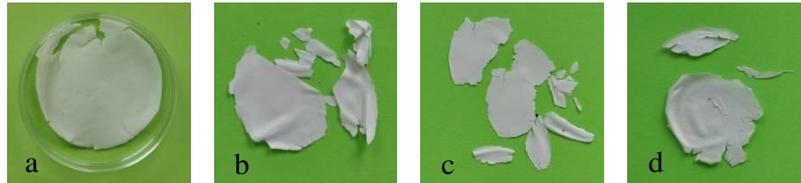


Abb. 62: Abbau von PLGA-L nach a: einer, b: zwei, c: drei und d: vier Wochen in der Traubenzone.

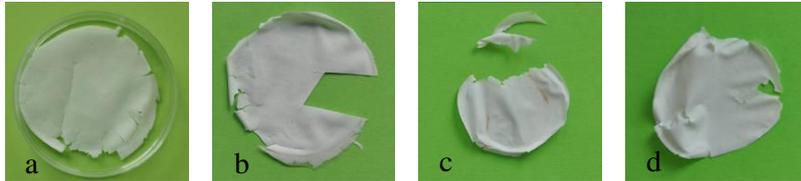


Abb. 63: Abbau von PLGA-S nach a: einer, b: zwei, c: drei und d: vier Wochen in der Traubenzone.

Im weiteren Versuchsverlauf nahm der Zerfall bei den Vliesen der „leichten“ Gruppe immer weiter zu (Abb. 64 oben a-e). Die Vliese der „schweren Gruppe“ blieben in großen Fragmenten erhalten. Auch hier gab es einen Unterschied zu den PLGA-Vliesen aus dem Abbauersuch im Boden, wo die Vliese nicht in kleine Fragmente zerfallen waren. Zudem waren sie von dem verwendeten Träger gut ablösbar und klebten nicht am dem als Träger verwendeten fest.

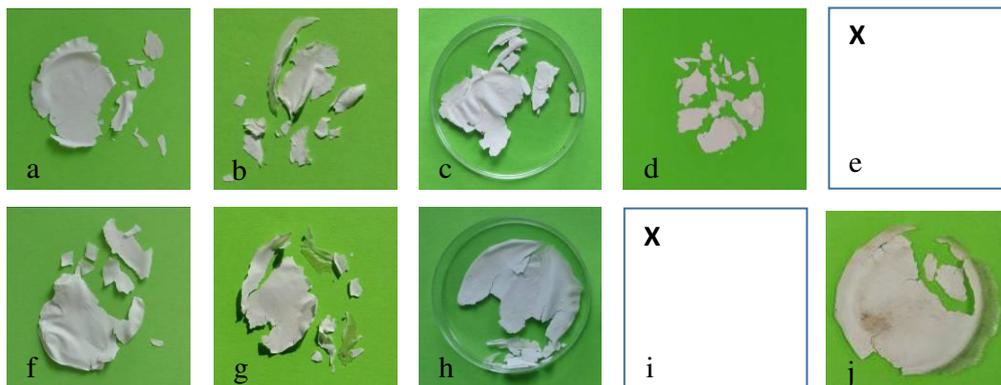


Abb. 64: Abbau von PLGA-L und PLGA-S in der Traubenzone:
 oben: Abbau von PLGA-L nach a: zwei, b: drei, c: vier, d: fünf und e: sechs Monaten in der Traubenzone.
 unten: Abbau von PLGA-S nach f: zwei, g: drei, h: vier, i: fünf und j: sechs Monaten in der Traubenzone. Bei beiden Varianten zerfielen die einzelnen Vliese über den Versuchszeitraum in Fragmente. Deutlich war das „Schmelzen“ der Polymere zu beobachten (vgl. b, g, und j) (fehlende Bilder mit X gekennzeichnet).

Auch bei diesen Proben wurde neben dem mechanischen Abbau der Verlust der molaren Masse mittels GPC bestimmt (Abb. 65). Wie bei den Proben im Boden konnte bei beiden Materialien keine Reduzierung der molaren Masse gemessen werden. Für PLGA war dies auch unabhängig von der verwendeten Materialstärke.

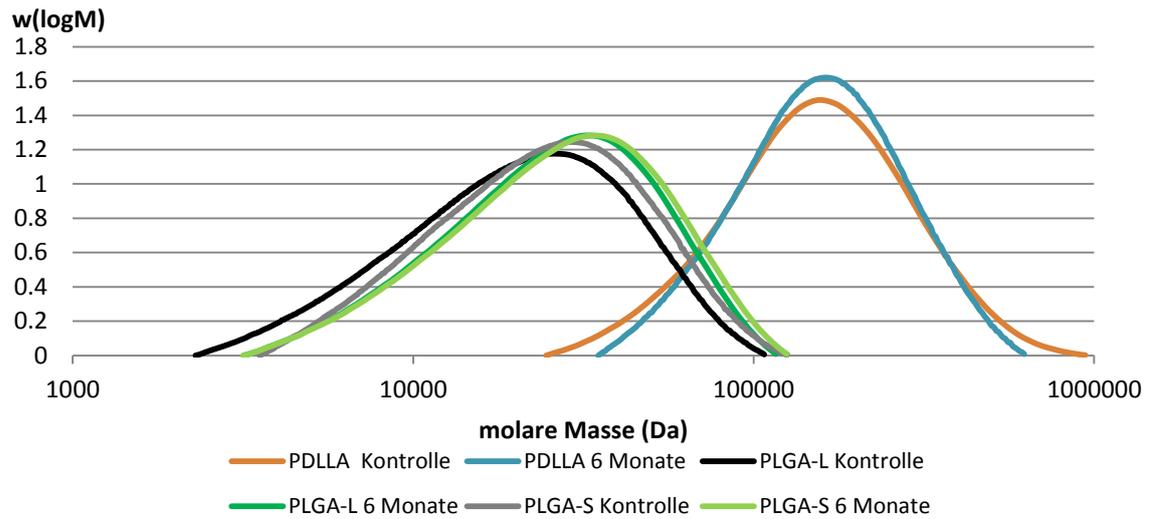


Abb. 65: Veränderung der molaren Masse von PDLLA, PLGA-L und PLGA-S in der Traubenzone: Veränderungen der molaren Masse, in Da, nach sechs Monaten in der Traubenzone im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (Graphen erstellt nach GPC-Messungen von Viola Buchholz (Universität Bayreuth)).

4. Diskussion

4.1. Auftreten der Esca-Symptomatik in den Referenzanlagen

Die zwei Referenzanlagen wurden bezüglich der sichtbaren Symptomatik in einem Zeitraum von vier Jahren jeweils von März bis September monatlich bonitiert. Dabei zeigte sich die deutlich unterschiedliche Art der Ausprägung in beiden Anlagen der Sorten Chardonnay und Phoenix. Diese kann jedoch durch das unterschiedliche Alter der Anlagen erklärt werden. Generell ist in Ertragsanlagen nach einer Infektion erst ab dem fünften Standjahr ein Auftreten von Blattsymptomen zu erwarten, da für die Ausprägung der vollständigen Esca-Symptomatik eine Infektion mit *Fmed* nötig ist, die erst im langjährigen Verlauf der Krankheitsentwicklung stattfindet (Surico 2001). Da sich die Anlagen durch ihr Alter beträchtlich unterscheiden, war ein vermehrtes Auftreten von Esca-Symptomen in der Phoenix-Anlage, die im Jahr 1998 gepflanzt wurde, im Vergleich zur Chardonnay-Anlage, die im Jahr 2003 gepflanzt wurde, gut nachvollziehbar.

Darüber hinaus ist die Diskontinuität der Blattsymptome über mehrere Jahre seit langem bekannt. So zeigten beispielsweise in einem Weinberg in Italien, der in vier Jahren kontinuierlich bonitiert wurde, nur 3% der infizierten Reben in allen vier Jahren Blattsymptome; 53% der Reben zeigten in diesem Zeitraum nur einmal Symptome (Mugnai et al. 1999). Auch die Intensität des Auftretens kann jährlich stark schwanken. Die Bonitur von Weinbergen durch Surico et al. (2000) ergab, dass in einem Weinberg im ersten Boniturjahr 63,37% der Reben Symptome zeigten, der sichtbare Befall im darauffolgenden Jahr jedoch auf 19,62% zurückging. Zudem war es vereinzelt möglich, dass apoplektische Stöcke im darauffolgenden Jahr erneut austrieben (Surico et al. 2000).

Das häufig beschriebene unregelmäßige Auftreten der Symptome führt zu der Problematik, dass für einzelne Jahre keine genaue Aussage über den Befall einer Anlage anhand der Symptomatik getroffen werden kann, sondern die Anlage hierfür über einen längeren Zeitraum betrachtet werden muss. Surico et al. (2000) empfiehlt daher eine Bonitur über einen Zeitraum von mindestens fünf Jahren für eine genauere Bestimmung. Folglich ist es möglich, dass auch in dieser Arbeit der Befall der Reben höher ist als die Symptomatik vermuten lässt. Darüber hinaus ist es irreführend, den Befallsgrad der Anlagen über die Blattsymptomatik zu bestimmen. So konnte Fischer (2006) zeigen, dass in Anlagen nur 5% der Reben Blattsymptome zeigen, der Befall mit den Pilzen *Pch* und *Pal* im Holz, abhängig vom Alter der Anlage, jedoch bis zu 90% betragen kann. Daher ist auch in der Phoenix-Anlage von einem Befall von bis zu 90% der Stöcke zu befürchten. Auch in der Anlage Chardonnay ist ein weit höherer Infektionsgrad im Holz nicht auszuschließen, auch wenn die Symptomatik der Laubwand sehr gering ist.

Neben dem Alter der Anlage kann das Auftreten der Symptomatik bzw. das Sporenauftreten durch Faktoren wie Temperatur und Niederschlag beeinflusst werden (vgl. Ergebnis 3.5 „Korrelation des Sporennachweises mit den Wetterdaten“). Laut Surico et al. (2000) treten die Blattsymptome in niederschlagsreichen und feuchten Jahren stärker auf als in trockenen Jahren. Zunächst zeigen sich

die Blatt-Symptome eher vereinzelt in Monaten Juni und Juli treten sie dann verstärkt auf. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt auch Marchi et al. (2006). Letztere sehen auch eine Tendenz, dass stärkere Regenfälle im Mai zu einem stärkeren Ausbruch von Esca-Symptomen führen. Die Zunahme von Blattsymptomen in den Sommermonaten lässt sich auch in der Phoenix-Anlage beobachten, ein Einfluss der Temperaturen oder des Niederschlags auf die Blattsymptome hingegen nicht.

Im Gegensatz zur Blattsymptomatik tritt die Apoplexie tendenziell verstärkt bei Trockenstress und hohen Temperaturen auf (Surico et al. 2000). Dieses Phänomen war auch in der Phoenixanlage zu beobachten, da 2014 im Vergleich zu den Jahren 2013 und 2015 vermehrt die Apoplexie auftrat. Gleichzeitig war 2014 im Vergleich zu den anderen ein extrem heißes Jahr (siehe auch Diskussion 4.3. „Nachweis von *Pch* in den untersuchten Anlagen und Korrelation mit dem Wetter“ und Anhang A: „Klimadiagramme des Standorts Siebeldingen“). Um eine genauere Aussage über das Auftreten von Symptomen in Bezug auf Wettereinflüsse zu treffen, müsste die Bonitur der Parzellen jedoch noch über weitere Zeiträume durchgeführt werden, da der jetzige Zeitraum für eine sinnvolle statistische Auswertung zu gering war. Zudem müssten auch weitere Anlagen mit einbezogen werden, die sich an anderen Standorten befinden, um letztendlich einen Standorteinfluss wie den Boden auszuschließen.

Dennoch haben die jetzigen Ergebnisse verdeutlicht wie komplex die Ausprägung der Blattsymptomatik sein kann und wie schwer es ist den Zustand der Anlage anhand der vorliegenden Symptomatik zu beurteilen.

4.2. Nachweis von *Pch* in den Sporenfallen

Da der Nachweis von Sporen durch die herkömmliche Methode mittels Ausplattieren zu falschen negativen Resultaten führen kann (van Niekerk et al. 2010), wurde in dieser Arbeit eine neue Methode etabliert. So soll die DNA von *Pch*-Sporen in Sporenfallen mittels Nested-PCR nachgewiesen werden. Hierfür wurde zunächst die Nachweisgrenze experimentell überprüft. Die Bestimmung der Nachweisgrenze ist notwendig, da die erste Reaktion der Nested-PCR durch größere DNA-Mengen weiterer Pilze, deren ITS-Regionen genauso und zum Teil häufiger amplifiziert werden, inhibiert werden kann (Retief et al., 2006). Folglich ist es möglich, dass die DNA-Menge, die in der zweiten Reaktion der PCR als Template dient, zu gering für einen Nachweis ist. So konnten in Reaktionen mit ausschließlich genomischer DNA von *Pch* Mengen bis zu 10 fg verlässlich nachgewiesen werden. Wird jedoch eine Mischung unterschiedlicher pilzlicher DNA verwendet, konnten nur noch Mengen bis zu 1 pg sicher nachgewiesen werden. Dies ist bereits von anderen Mischproben, wie zum Beispiel Pilzisolaten aus Rebholz, bekannt (Retief et al. 2006). Folglich ist es auch mit dieser Methode möglich, dass es bei der Analyse der Sporenfallen zu „falsch negativen“ Ergebnissen kommt und in den aus den Sporenfallen isolierten DNA-Proben

Pch möglicherweise häufiger enthalten war, als es durch die gewählte Methode der Nested-PCR nachweisbar ist.

Die Analyse von DNA aus dem 5 µm und dem 0,45 µm-Filter mittels Nested-PCR ergab, dass die DNA von *Pch* prinzipiell in beiden Filtern aufzufinden ist. Folglich wurden im weiteren Versuchsverlauf sowohl der 5 µm als auch der 0,45 µm-Filter jeder Sporenfalle untersucht. Der Nachweis in den Filtern war dabei nicht gleichmäßig verteilt. So konnte der Nachweis in beiden Filtern einer Probe positiv sein oder nur jeweils in einem von beiden. Bei der von Eskalen und Gubler beschriebenen Methode wurde nur der Filter mit der geringeren Porengröße von 0,45 µm analysiert (Eskalen u. Gubler 2001). Daher kann es sein, dass es in bisherigen Analysen, die den 5 µm-Filter nicht berücksichtigten final zu einem geringeren Nachweis von *Pch* kam, als es der eigentlichen Prävalenz entspricht; so zum Beispiel in der Analyse von Larignon u. Dubos (2000). Zudem wurden in der Originalarbeit die Filter abgewaschen, das Waschwasser auf einen Nährboden ausgestrichen und anschließend die gekeimten Sporen ausgezählt. Da *Pch*-Sporen schnell von anderen Pilzen überwachsen werden können, besteht auch in diesem Punkt die Möglichkeit eines „falsch negativen“ Ergebnisses (van Niekerk et al. 2010). Somit stellt der neue Ansatz der molekularbiologischen Auswertung der Sporenfallen mittels Nested-PCR im Vergleich zum herkömmlichen Ausplattieren eine sensitivere und schnellere Nachweismethode für *Pch* dar, da bereits kleinere Mengen sicher nachgewiesen werden können und die Inkubationszeit der Platten von mindesten zwei Wochen entfällt. Diese neue Methode wurde nach ihrer Etablierung, für die Untersuchung der Sporenfallen in den Anlagen Chardonnay und Phoenix eingesetzt.

4.3. Nachweis von *Pch* in den untersuchten Anlagen und Korrelation mit dem Wetter

Um ein mögliches Auftreten von *Pch*-Sporen im Jahresverlauf in beiden Referenzanlagen zu ermitteln, wurden in beide Anlagen Fallen aufgehängt. Nach Beginn der Beprobung in 2013 KW 16 konnte *Pch* mit der neuen Methode in beiden Anlagen nur in den Sommermonaten nachgewiesen werden. Der fehlende Nachweis von *Pch*-Sporen in kalten Monaten wurde bereits in Südafrika (van Niekerk et al. 2010) und in Italien (Quaglia et al. 2009) beschrieben. In beiden Quellen wird eine Korrelation des Sporenfluges mit der Temperatur beobachtet, so dass der Nachweis mit der sinkenden Temperatur abnimmt, was mit der Abnahme des Nachweises in den Referenzanlagen zum Winter hin übereinstimmt.

Im Gegensatz dazu stehen die Versuchsjahre 2014 und 2015. Hier war ein Nachweis von *Pch*-Sporen auch in den kalten Wintermonaten möglich. Ein Nachweis in kalten Monaten ist bereits aus Frankreich bekannt (Larignon u. Dubos 2000). Als mögliche Quelle für den Sporenflug im Winter können dabei Pyknidien angenommen werden, die sich in Rissen im Rebstamm nachweisen lassen (Edwards et al. 2001). Zudem können Sporen auch am Boden haften oder aus anderen Weinbergen über die Luft verteilt werden.

Die scheinbar widersprüchlichen Aussagen bezüglich des Sporenauftretens, die beide in der Literatur bereits beschrieben wurden, kann der verwendeten Methode geschuldet sein, da die Proben bei allen Arbeiten nur mittels Isolierung der vorhandenen Pilze auf Nährböden und nicht durch molekularbiologische Methoden untersucht wurden.

Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis zu jeder Jahreszeit kann auf die höhere Sensitivität der Nested-PCR zurückgeführt werden, da somit auch Sporen nachgewiesen werden, die beim Ausplattieren übersehen wurden, da *Pch* leicht überwachsen werden kann.

Des Weiteren ist eine Schwankung der Sporenmenge im Verlauf der Jahreszeiten denkbar. So wäre die Sporendichte im Winter zum Teil zu gering, um mittels Ausplattieren erfasst zu werden. Auch hier liefert Quaglia et al. (2009) erste Hinweise, da die Anzahl der gefangenen Sporen im Winter gegen Null tendierte, im Laufe des Jahres mit der Temperatur anstieg. Diese möglichen Schwankungen sind mittels der hier verwendeten Methode jedoch nicht zu erfassen. Hier wird ein quantitativer Ansatz benötigt, der im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur in einem stichprobenartigen Versuch durchgeführt werden konnte und zu keinen einheitlichen Ergebnissen führte (siehe Ergebnisse 3.4. „Quantitativer Nachweis von *Pch* in den Sporenfallen und Diskussionsteil 4.5. „qPCR von *Pch*-DNA“). Auffällig sind die Nachweislücken von *Pch* während der heißen Wochen in den Jahren 2014 und 2015. Diese traten in allen Fallen und in beiden Anlagen auf. Nach Eskalen et al. (2007) und Larignon u. Dubos (2000) trat die Sporulation von *Pch* verstärkt nach Regenfällen auf. Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass sie mit der Trockenheit abnimmt und daher der Nachweis aufgrund des geringen Sporenfluges nicht möglich war (vgl. Ergebnisse: 3.5. „Korrelation der Sporennachweise mit den Wetterdaten“). Der negative Einfluss auf den Nachweis durch zunehmende Hitze wird im Modell gut dargestellt. Da es 2014 ab Mai überdurchschnittlich warm war, könnte es auch hier sein, dass es für die Sporulation zu heiß wurde.

Somit liefert das in dieser Arbeit verwendete Model zur Berechnung der Sporulationswahrscheinlichkeit mit dem Wetter gute Ergebnisse (vgl. Material und Methoden 2.6: „Verrechnung des Nachweises aus den Sporenfallen mit Wetterdaten“), jedoch muss das Ergebnis in einem Langzeittest getestet werden, um an Verlässlichkeit zu gewinnen. Zudem muss in Langzeittests der Einfluss des jeweiligen Jahres und der Wetterparameter im selbigen erneut überprüft werden.

Eine Wetterkonstellation, die Sporulation eindeutig begünstigt oder unterbindet, konnte in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Sie scheint zumindest von kalten Temperaturen unabhängig zu sein und mit der Temperatur bis zu einem gewissen Grade anzusteigen. Gleichzeitig hat das Zusammenspiel von Niederschlag und Temperatur einen großen Einfluss auf die Sporulation. Wie oben beschrieben steigt das Sporenaufkommen mit dem Niederschlag an, dieser Anstieg scheint bei kühlen Temperaturen jedoch stärker als bei hohen.

Der in dieser Arbeit ganzjährige Nachweis von *Pch*-Sporen ist im Hinblick auf den Rebschnitt von besonderer Bedeutung. Da die Sporen auch im Winter in der Luft nachweisbar sind, können sie

frisch geschnittene Reben nach dem Winterschnitt direkt infizieren. Darüber hinaus gelten Schnittwunden für den Zeitraum eines Monats als hochanfällig (Michelon et al. 2006), können aber auch noch bis zu vier Monate nach dem Schnitt infiziert werden (Elena u. Luque 2016). Die lange Anfälligkeit der Rebe und der hier erbrachte ganzjährige Nachweis von Sporen bestätigt die Notwendigkeit einer verlässlichen Wundverschlusses, da es keinen Zeitraum gibt, an dem ein Rebschnitt ohne Sporendruck aus der Luft durchgeführt werden kann.

Auffällig ist auch, dass sich der Nachweis in der Laubwand zeitlich nicht vom Nachweis in der Traubenzone unterscheidet (siehe Ergebnisse: 3.2 „Nachweis von *Pch* in Sporenfallen“ Abb. 14 und Abb. 15). Da sich die Laubwand erst ab April aufbaut und vor Juni nicht vollständig ausgebildet ist, wäre hier eine Abnahme der Nachweishäufigkeit mit wachsender Laubwand zu vermuten, da der Wind die Sporen nicht aus umliegenden Anlagen verteilen könnte. In der vorliegenden Arbeit hatte die Laubwand somit keinen Einfluss auf den Nachweis von *Pch*. Daher ist es möglich, dass die ganze Anlage in eine „Sporenwolke“ gehüllt ist und sich der Nachweis saisonal nicht unterscheidet. Hierfür war eine rein qualitative Analyse mittels Nested-PCR jedoch nicht aussagekräftig genug. Daher müssen zur Klärung dieser Fragestellung zusätzlich auch quantitative Methoden verwendet werden.

Zudem gab es beim Vergleich der Nachweishäufigkeit keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Anlagen, was jedoch aufgrund des Alters der Anlagen und der unterschiedlichen Ausprägung der Symptomatik durchaus denkbar gewesen wäre. Das gleichmäßige Aufkommen ist allerdings einerseits erklärbar durch die Möglichkeit, dass Reben befallen sind und somit sporulieren können, auch wenn sie optisch keine Symptome aufweisen (Fischer 2006) andererseits können Sporen auch aus anderen umliegenden infizierten Weinbergen stammen. Somit kann nicht davon ausgegangen werden, dass in jungen Anlagen weniger Sporen vorhanden sind als in alten Beständen. Daher müssen beim Rebschnitt von optisch gesunden Anlagen die gleiche Sorgfalt und der gleiche Pflanzenschutz erfolgen, wie bei eindeutig infizierten.

4.4. qPCR von *Pch*-DNA

Um einen ersten Einblick über eine mögliche Anwendbarkeit einer qPCR auf die DNA aus Sporenfallen zu gewinnen und um die Fragestellung eines quantitativen Nachweises in den Fallen zu klären, wurden stichprobenartig einige Proben mittels einer qPCR mit SybrGreen® untersucht. Die ersten Versuche in dieser Arbeit zeigten, dass eine quantitative Analyse von Misch-DNA aus Sporenfallen prinzipiell möglich ist. Allerdings gab es in diesem Ansatz große Schwankungen in den Ergebnissen, da die einzelnen Proben in den Wiederholungen eine sehr hohe Abweichung in den Konzentrationen aufwiesen. Zudem kann sich auch bei dieser Methode zusätzliche Fremd-DNA inhibierend auswirken.

In einer Studie von Martín et al. (2012) konnte genomische DNA von *Pch* mittels eines TaqMan Assays bis zu einer Konzentration von 108 fg als Template reproduzierbar nachgewiesen werden.

In 57% der Reaktionen waren sogar bis zu 10 fg möglich. Für den Nachweis von Sporen in Suspensionen wurde jedoch nur die Sporenanzahl ermittelt. Hier war ein konsistenter Nachweis bis 50 Sporen/ml möglich, dabei wurde die Sporensuspension direkt als Template eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Sporensuspensionen getestet, die zuvor nach der von Eskalen u. Gubler (2001) beschriebenen Methode gefiltert worden waren. Nach DNA-Extraktion konnten bei 12 von 12 Wiederholungen DNA-Mengen bis zu 6,38 pg reproduzierbar nachgewiesen werden. Folglich erwies sich die Nested-PCR als die sensitivere Methode im Vergleich zur qPCR, da im Sensitivitätstest der Nested-PCR bis zu Konzentrationen von 1 fg nachgewiesen werden konnte (s. oben). Dieses Phänomen wurde bereits bei Edwards et al. (2007) beschrieben. Auch hier stellte sich in einer Vergleichsstudie die Nested-PCR als die sensitivere Methode im Vergleich zur qPCR heraus; der Vorteil der qPCR liegt aber darin begründet, dass in diesem Fall nur eine Reaktion nötig ist und dieses System somit schneller und weniger kontaminationsanfällig ist als die Nested-PCR. Edwards et al. (2007) betonen auch, dass die quantitative Aussage der qPCR stark von der verwendeten Sporenkonzentration abhängt und geringere DNA-Konzentrationen zu größeren Abweichungen führen als höhere Konzentrationen.

Beim Vergleich der Sensitivität beider Reaktionen mit Misch-DNA in den Sporenfällen ist das Ergebnis konträr zu dem vorherigen, da in der Nested-PCR Konzentrationen bis zu 1 pg und in der qPCR bis zu 0,11 pg konsistent nachgewiesen werden konnten. Die erhöhte Sensitivität der qPCR bei der Analyse der DNA aus Sporenfällen lieferte eine Erklärung für 5 der 26 Proben, die in der qPCR positiv, in der Nested-PCR aber negativ getestet worden waren.

Die Schwankungen in den ermittelten Konzentrationen sind, wie bereits in den oben angeführten Studien beschrieben, als kritisch anzusehen. Daher kann auch in dieser Arbeit keine eindeutige Aussage über die genaue Konzentration von Sporen bzw. DNA von *Pch* in den Sporenfällen getroffen werden. Diese Schwankungen erlauben auch keine Aufsummierung der Konzentrationen aus beiden Filtern einer Probe zur Abschätzung des Gesamtgehalts. Jedoch ist die qPCR prinzipiell geeignet und könnte auch Antworten auf die Frage liefern, ob die Sporenkonzentration im Winter geringer ist als in den Sommermonaten oder ob sich die Konzentrationen zwischen Laubwand und Traubenzone unterscheiden.

4.5. RAMS-Primer und mögliche Korrelation mit geographischem Ursprung

4.5.1. Auswahl der RAMS-Primer und Analyse von *Pch* mittels RAMS-Primer

Für die Bestimmung einer möglichen genetischen Diversität innerhalb von *Pch*-Stämmen wurde eine Analyse mit RAMS-Primern durchgeführt. Diese Methode wurde gewählt, da sie das ganze Genom mit einbezieht und die zu analysierende Sequenz nicht bekannt sein muss. Da es für *Pch* zu Beginn der Arbeit kein Referenzgenom gab, musste ein Ansatz verwendet werden, der für

unbekannte Sequenzen geeignet war. 2014 wurde ein Projekt gestartet, das als Ziel die vollständige Sequenzierung von *Pch* hatte (Antonielli et al. 2014). Die Sequenz lag jedoch bis zum Ende dieses Projektes nicht vor.

Die Auswahl des RAMS-Primer Sets aus 17 Primern erfolgte nach Angaben aus der Literatur (Hantula et al. 1996; Hantula et al. 1997; Mahuku et al. 2002; Zhou et al. 2001) (Auflistung siehe Material und Methoden 2.8 „RAMS-Analyse“ Tab.8). Diese Primer waren zum Teil auch schon in vorangegangenen Arbeiten an *Pch* getestet worden, z.B. der RAMS 4 und der RAMS7 (Pottinger et al. 2002; Tegli et al. 2000a; Tegli et al. 2000b). Darüber hinaus testete Tello et al. (2010) in ihrer Arbeit die Primer RAMS5, RAMS6, RAMS8 und den ankerlosen RAMS11. Diese Primer scheinen für die Aufindung von Polymorphismen prinzipiell geeignet, jedoch werden in der Arbeit von Tello et al. (2010) Primer erwähnt, die bei Hantula et al. (1996) und (1997) bereits verwendet werden. Jedoch wird keine Auskunft über mögliche Anker der Primer gegeben. Da aber bereits bekannt ist, dass unterschiedliche Ankersequenzen in Kombination mit identischen Wiederholungssequenzen zu unterschiedlichen Bandenmustern führen können, sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht mit vorangegangenen Arbeiten zu vergleichen. Zudem ist die Anzahl der Banden auch stark von der Länge der Elongation in der PCR abhängig. So wurde in den Vorversuchen zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses Elongationszeit und Polymorphismen die Zeit von 1 min auf 1,5 min erhöht. Dies führte besonders in den Bereichen >1 kb zu einer erhöhten Bandenzahl, die auch zu einer erhöhten Anzahl von Polymorphismen führte.

Nur bei sieben von 17 Primern konnten letztlich Polymorphismen detektiert werden. Eine Möglichkeit für die geringe Anzahl an Polymorphismen könnte am geringen GC-Gehalt der einzelnen Primer liegen, da in einigen Studien ein GC-Gehalt <50% zu deutlicheren Banden und gleichzeitig geringerem Hintergrundrauschen führte (Zhou et al. 2001). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit aber nicht beobachtet werden.

Auffällig war, dass Primer mit dinukleotiden oder trinukleotiden Repeats häufiger zu polymorphen Bandenmustern führen. Auch diese Tendenz, untersucht an verschiedenen *Botryosphaeria*-Stämmen, wurde von Zhou et al. (2001) bereits beschrieben. Eine Erklärung hierfür wäre die Tatsache, dass SSRs, die aus dinukleotiden und trinukleotiden Repeats bestehen, häufiger im Genom von Organismen vorkommen als tetranukleotide Repeats (Karaoglu et al. 2005).

Die vergleichsweise geringe Polymorphismusrate bei *Pch* mittels RAMS-Primern ist bereits in der Literatur belegt. So konnten Pottinger et al. (2002) in 39 *Pch*-Isolaten aus sechs verschiedenen Weinbergen in Neuseeland und sechs Isolaten aus fünf unterschiedlichen Weinbergen in Italien keine Polymorphismen mit den Primern RAMS4 und RAMS7 feststellen. Dies ist allerdings konträr zu den Ergebnissen von Tegli et al. (2000b), da hier mit den gleichen Primern 29 Isolate in neun Haplotypen unterschieden werden konnten. Diese Untersuchungen zeigen auch, wie stark sich das Ausmaß an Polymorphismen unter Verwendung der gleichen Primer je nach verwendeter Polymerase, Template-Menge, Annealing-Temperatur der Primer und Konzentration des

Agarosegels unterscheiden können. Das optimale Verhältnis von Primer zu DNA muss daher von Fall zu Fall experimentell bestimmt werden. Prinzipiell stößt die Reproduzierbarkeit von publizierten Daten auf praktische Schwierigkeiten und ein Vergleich mit bestehenden Literaturdaten ist nur bedingt möglich. Die oben beschriebenen Parameter und die daraus resultierenden Ergebnisse hängen zu sehr vom jeweiligen durchführenden Labor ab.

Generell scheinen Polymorphismen bei *Pch* nur selten vorzukommen. Häufig werden für einschlägige Studien auch AFLPs (Comont et al. 2010), RAPDs (Borie et al. 2002; Cobos u. Martin 2008; Tegli et al. 2000b) oder Mikrosatelliten (Smetham et al. 2008 und 2010) verwendet; das Ausmaß an Polymorphismen bleibt aber durchwegs gering. Dies gilt auch für die Untersuchung anderer Gen-Regionen wie die ITS-Region (Comont et al. 2010; Sofia et al. 2015), das β -Tubulin-Gen oder den Elongationfaktor 1- α (Cobos u. Martin 2008).

4.5.2. Auswertung der mittels RAMS-Primern gefundenen Polymorphismen

Zunächst erfolgte die Auswertung der Polymorphismen, wie in der Literatur mehrfach beschrieben, rein qualitativ über die Auszählung der Banden und der binären Auswertung mit 0 & 1 (Pottinger et al. 2002; Tegli et al. 2000b). Diese Auswertung wurde für die Polymorphismen der Primer RAMS1, RAMS2, RAMS3, RAMS10 und RAMS12 angewendet. Diese Form der Auswertung ist einfach, zeitsparend und kostengünstig. Eine Herausforderung besteht jedoch in der exakten Positionierung der Banden. Entsprechend wurde jede PCR 3-mal wiederholt, um sicherzustellen, dass der mögliche Polymorphismus reproduzierbar war. Besonders deutlich zeigte sich die Problematik der exakten Auswertung bei RAMS2. Hier konnten zwar unterschiedliche Bandenlängen auf einer Höhe von etwa 2,5 kb gefunden werden (vgl. Ergebnisse 3.7.3 „möglicher InDel bei RAMS2“ Abb. 30), in der Wiederholungs-PCR war der Längenunterschied jedoch nicht mehr eindeutig zu erkennen, so dass der Polymorphismus nicht mit in die finale Auswertung einfluss. Diese Problematik zeigte sich auch bei der Auswertung von RAMS1 (vgl. Ergebnisse 3.8.1 „RAMS1“ Abb. 31).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Verfahren entwickelt, wobei die Auswertung der Banden nach Sequenz der Längenpolymorphismen erfolgt. Diese wird für RAMS-Primer nicht angewandt, da der Polymorphismus unabhängig von der zugrundeliegenden Sequenz dominant ausgewertet wird. Für eine Auswertung nach Längenpolymorphismen müssen hingegen die Sequenzen bekannt sein. Die Sequenzierung ist ein zusätzlicher und dabei zeit- und kostenintensiver Schritt, der die Vorteile der RAMS-Methode relativiert. Dabei kann sich nach der Sequenzierung ein vermeintlicher Längenpolymorphismus als zwei völlig unterschiedliche Sequenzen herausstellen. Daher ist die Annahme von Längenpolymorphismen bei „Zick-Zack“-Mustern zwar riskant, jedoch nicht völlig von der Hand zu weisen, wie sich in dieser Arbeit gezeigt hat.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Banden für RAMS5, RAMS9 und RAMS12 erfolgreich kloniert und anschließend sequenziert werden. Die Sequenzen bei RAMS5 und RAMS9 zeigten dabei drei unterschiedliche Längenpolymorphismen, während die Sequenzen von RAMS12 identisch waren. Die Sequenzierung erwies sich somit als die deutlich sensitivere Methode, da die Sequenzen nach der Analyse des RAMS5 und des RAMS9-Polymorphismus in jeweils drei Cluster eingeteilt werden konnten statt mit der herkömmlichen Auswertung nur in zwei. Folglich sind damit auch mehr Gruppen, 3x3 statt 2x2, zuordbar. Diese feine Auftrennung ist auf einem Gel nicht exakt zu bestimmen, da längere Laufzeiten bei diesen geringen Längenunterschieden eher zu einer dickeren Bande oder einem „Schmier“ auf dem Gel führen. Insgesamt konnte somit eine feinere Clusterung erreicht werden, in die leicht weitere Stämme, die zukünftig in die Stammsammlung am JKI aufgenommen werden, integriert werden können. Als nützlich erwies sich die Sequenzauswertung auch im Hinblick auf die Analyse der Sporenfallen. Mithilfe der aus den Sequenzen entwickelten Primer konnten die Fallen direkt auf die gefundenen Polymorphismen untersucht werden (vgl. Ergebnisse 3.3 „Analyse der Sporenfallen mit Primern aus den RAMS-Analysen“). Eine direkte PCR mit RAMS-Primern hingegen hätte hier zu keinem Ergebnis geführt, da die Methode nicht für Mischproben geeignet ist.

Die Sequenzanalyse legt auch die Vermutung nahe, dass die innerartliche Diversität von *Pch* größer ist als mithilfe von RAMS-Primern ermittelt werden konnte. Auch wenn Methoden wie RAPD bei der Untersuchung der gleichen *Pch*-Isolaten mehr Haplotypen erzeugen können (Tegli et al. 2000a; Tegli et al. 2000b), müssten zukünftig mehr Sequenzierungen durchgeführt werden, um ein exakteres Bild zu liefern.

Trotz der per Sequenzierung festgestellten erhöhten Diversität ist davon auszugehen, dass das Genom von *Pch* im Allgemeinen stark konserviert ist, da in den Sequenzen die durch die Primer RAMS5 und RAMS9 erzeugt wurden, neben dem jeweiligen InDel keine weiteren Polymorphismen gefunden werden konnten und auch die 2,3 kb-lange Sequenz des RAMS12 im Vergleich von drei Isolaten nur 1 SNP in der Sequenz aufwies. Diese geringe Rate an SNPs konnte auch in Isolaten aus Spanien gezeigt werden: Hier wurden bei 35 Isolaten nur 2 SNPs in der ITS-Sequenz gefunden, zudem waren die Sequenzen des β -Tubulin-Gens und des Elongationsfaktors α zu 100% homolog (Cobos u. Martin 2008).

4.5.3. Zuordnung von Haplotypen und die Vermehrung von *Pch*

Aus den gefundenen Polymorphismen können für einzelne Stämme Haplotypen gebildet werden. Dies ist besonders von Bedeutung, wenn die Quelle von Infektionen geklärt werden soll. Dabei steht die gezeigte geringe Polymorphismusrate einer Zuordnung von Haplotypen nicht im Wege. In der vorliegenden Arbeit konnte 10 von 16 Stämmen ein eigener Haplotyp zugeordnet werden. Den

übrigen 6 Stämmen konnte ein Cluster zugeordnet werden; für eine weitere Differenzierung wären hier Tests mit einem erweiterten RAMS-Primerset durchzuführen.

Für eine weitere Feinclusterung sind RAMS-Primer prinzipiell weiterhin geeignet, da Bandenmuster wie das für RAMS1 oder RAMS2 (vgl. Ergebnisse 3.6 „Polymorphismen in den RAMS-Primern“ Abb. 30 und Abb. 31) ein großes Potential für weitere Polymorphismen gezeigt haben. Dennoch sollte die Sequenzierung von einzelnen Banden in den Bandenmustern weiter mitberücksichtigt werden, da diese Arbeit die Limitierung von RAMS-Primern deutlich gezeigt hat.

Trotz der zahlreich gefundenen Haplotypen, wie beispielsweise 72 Haplotypen innerhalb von 74 Isolaten aus vier unterschiedlichen Weinbauregionen in Frankreich (Comont et al. 2010), muss davon ausgegangen werden, dass *Pch* sich ausschließlich oder zumindest überwiegend asexuell vermehrt. Ein Beleg hierfür ist die in dieser und in anderen Arbeiten gezeigte starke Konservierung der sequenzierten Fragmente (Cobos u. Martin 2008; Smetham et al. 2010; Tegli et al. 2000ab). Zum anderen wird ein hohes Kopplungsungleichgewicht (engl. Linkage disequilibrium) bei den Haplotypen selbst angegeben (Smetham et al. 2008). Für genauere Aussagen müsste aber auch in der vorliegenden Arbeit die Probenanzahl erhöht werden.

4.5.4. Verwandtschaftsanalyse der in der Arbeit verwendeten Isolate

Die übliche Auswertung der mittels RAMS-Primern gewonnenen Daten erfolgt durch eine Analyse mittels Neighbor Joining Algorithmus und der anschließenden Erstellung eines Dendrogramms zur visuellen Vereinfachung (Pottinger et al. 2002; Tegli et al. 2000ab). Der Vorteil dieser Methode ist, dass hier auch Ergebnisse aus verschiedenen Primern kombiniert und auch RAPD und AFLP Ergebnisse berücksichtigt werden können. Die einzige Voraussetzung hierbei ist die binäre Auswertung.

Eine Herausforderung dieser Arbeit war die Einarbeitung der Sequenzdaten in die binären Daten, besonders da pro Primer anstatt zwei nun drei Polymorphismen vorlagen. Für Sequenzdaten werden zur Analyse von Verwandtschaftsbeziehungen üblicherweise andere Algorithmen verwendet, die für binäre Daten nicht einsetzbar sind. Eine Lösung war die Umwandlung der drei Gruppen A, B, und C (siehe Ergebnisteil 3.9. „Clusterung der Stämme“ Tab. 23) in einen binären Datensatz. Dies ermöglichte zwar eine Auswertung zur besseren Visualisierung der Ergebnisse, liefert jedoch kein statistisch abgesichertes Ergebnis.

Neben Neighbor Joining kann mit binären Daten prinzipiell auch eine AMOVA (analysis of molecular variance) durchgeführt werden (Tegli 2000). Neben der problematischen Verknüpfung von Sequenzdaten mit binären Daten zeigten Nelson u. Anderson (2013), dass für eine AMOVA aber mindestens 30 Loci benötigt werden, damit die Statistik zuverlässig ist. Da in dieser Arbeit nur acht Loci verwendet werden konnten, wurde von einer AMOVA abgesehen und lediglich eine

UPGMA durchgeführt, wie sie bei Tello et al. (2010) beschrieben wurde. Diese ist durchführbar, auch wenn bei Tello nur die RFLP-Ergebnisse in der finalen Auswertung verwendet wurden, da sowohl RAMS als auch RFLP-Ergebnisse dominant ausgewertet wurden. Dennoch dient auch diese Methode nur der besseren Visualisierung der Ergebnisse.

4.5.5. Beziehung zwischen Haplotypen und geographischem Ursprung

Die Korrelation von Haplotypen mit dem geographischen Ursprung der Isolate wird seit langem in der Literatur diskutiert. So ist bei Pottinger et al. (2002) eine Einteilung von Isolaten in Gruppen zwar möglich, jedoch bestehen diese Gruppen aus Isolaten verschiedenen geographischen Ursprungs. Auch bei der Untersuchung von verschiedenen Stämmen mittels AFLP aus Australien, Frankreich, dem Iran, Italien, Neuseeland, Slovenien und den USA konnte kein Zusammenhang zwischen geographischem Ursprung und dem Genotyp gefunden werden (Mostert et al. 2006). Der Vergleich von Isolaten aus Südafrika und Frankreich führt auch bei Smetham et al. (2008) zu keiner Korrelation mit dem jeweiligen Land, da zwar Haplotypen gefunden wurden, diese aber in beiden Regionen vorkommen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen dieser Arbeit überein. So konnten in der Phoenixanlage Stämme gefunden werden, die in einem Cluster gemeinsam mit Stämmen aus Italien oder Sizilien gruppiert sind: z.B. H67 aus Siebeldingen und 52/3 aus Sizilien. Zudem konnten Isolate aus der JKI-Stammsammlung wie der Mosel-Stamm aus Deutschland mit Pch35 aus Sizilien und Pch133 aus Italien in einem Cluster C1 zusammengeführt werden (vgl. Ergebnisteil „Clustering der Stämme“ Tab. 23 und Abb. 36).

Auch beim Vergleich von Isolaten aus verschiedenen Rebflächen eines Landes lassen sich zwar Haplotypen bzw. Cluster bilden, diese können aber nicht einer bestimmten Region zugeordnet werden (Borie et al. 2002; Sofia et al. 2015; Tello et al. 2010). Dies war auch in der vorliegenden Arbeit der Fall, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Probenanzahl zu gering ist, um eine statistisch abgesicherte Aussage zu treffen.

Problematisch bei der Zuordnung von Isolaten zu einer Region ist auch die Tatsache, dass an einer Pflanze mehrere genetisch unterschiedliche Isolate gefunden werden können (Cobos u. Martin 2008). Die verwendeten Isolate aus der Phoenixanlage sind auch hier ein gutes Beispiel, da sie alle einen unterschiedlichen Haplotyp aufweisen. Dieser liegt zwar bei H53 und H37 eng zusammen, die Distanz von H53 zu H67 ist jedoch die größte, die beim Vergleich aller untersuchten Isolate gefunden wurde (vgl. Ergebnis 3.9 „Clustering der Stämme“ Abb. 36).

Das Auffinden identischer Genotypen in verschiedenen Anlagen legt daher nahe, dass Sporen in der Luft und infiziertes Pflanzenmaterial eine große Rolle bei der Verbreitung des Pilzes spielen (Mostert et al. 2006). Eine große Bedeutung kommt hier der Verbreitung durch vorinfizierte Unterlagen oder Edelreiser zu (Retief et al. 2006; Whiteman et al. 2007). Auch Smetham et al. (2008) kommen zu dem Schluss, dass der Pilz von Frankreich nach Australien importiert wurde. Eine eindeutige Aussage zu dieser These kann in dieser Arbeit nicht getroffen werden, da die

untersuchten Isolate aus Südafrika sich zwar von den Stämmen aus Italien und Deutschland unterscheiden, die Probenanzahl für eine repräsentative Aussage aber nicht ausreicht. Da sich die Stämme aus Italien und dem davon getrennten Sizilien in den gleichen Clustern wiederfinden, wie die Stämme aus Deutschland, liegt die Vermutung nahe, dass die Stämme mit dem Pflanzgut importiert wurden, sofern die gleichen Stämme auch bei den Unterlagserzeugern oder Rebveredlern nachgewiesen werden können.

4.6. Nachweis von Stammgruppen in DNA-Proben von Sporenfallen und Rebholz

Neben dem generellen Nachweis von *Pch* sollte auch das Vorkommen und die Verteilung verschiedener Stämme in den Sporenfallen untersucht werden. Dies sollte zusätzlich klären ob Stämme, die in den Sporenfallen gefunden wurden, auch im Rebholz der Phoenixanlage vorhanden waren und die gleichen Reben die Sporen entließen. Hierfür sollten für einen raschen und zuverlässigen Nachweis die in den RAMS-Primern gefundenen Polymorphismen des RAMS5 und RAMS9 direkt auf die Mischproben der Sporenfallen angewendet werden.

Zudem sollte mit den neuen Polymorphismen analysiert werden, ob bei Reben, die künstlich infiziert wurden, der verwendete *Pch*-Stamm nachweisbar war oder ob die Infektion durch einen anderen Stamm erfolgte. In ersten Versuchen stellte sich heraus dass eine direkte PCR mit Primern für den Polymorphismus des RAMS5 oder RAMS9 in Misch-DNA Proben erfolglos blieb, was auf eine zu geringe Templatemenge zurückgeführt werden kann. Da mit dem Ansatz der Nested-PCR wie bereits gezeigt ein Nachweis von genetisch verschiedenen Isolaten in der Misch-DNA aus den Fallen prinzipiell möglich ist (vgl. Ergebnisteil 2.5. „Nachweis von Stammunterschieden mittels Nested-PCR“), wurden für beide Polymorphismen Nested-Primer entwickelt (vgl. Ergebnisteil: 3.3 „Analyse der Sporenfallen mit Primern aus den RAMS-Analysen). Dennoch gelang der Nachweis letztlich nur bei demjenigen Polymorphismus, der im RAMS5 gefunden wurde, da nur hier eine erfolgreiche Nested-PCR möglich war. Eine mögliche Erklärung für die nicht erfolgreiche Nested-PCR beim Polymorphismus des RAMS9 liegt in der niedrigen Templatekonzentration und dem Grad der Verunreinigung durch Fremd-DNA, die die Reaktion inhibieren kann (siehe oben). Für weitere Untersuchungen von Sporenfallen wie z.B. auf den Polymorphismus des RAMS9 müssten zudem weitere äußere und innere Primerpaare auf ihre Eignung getestet werden.

Bei der mehrfachen Wiederholung der Nested-PCR mit den Primern MM5-450F/ MM5-450R und MM5-200F/ MM5-200R mit der gleichen Sporenfallenprobe konnten mindestens zwei der drei Polymorphismusvarianten auf dem Gel anhand der Bandenlänge unterschieden werden. Jedoch waren nie Doppelbanden auf dem Gel zu sehen (vgl. Ergebnissteil 2.5. „Nachweis von Stammunterschieden mittels Nested-PCR" Abb. 19), eine Resequenzierung der einzelnen Banden aus den Wiederholungen bestätigte dieses Ergebnis. Dass bei der stichprobenartigen Untersuchung die mittellange Form des Polymorphismus, in der der Repeat vier Mal wiederholt wird, nicht

gefunden werden konnte, heißt somit im Umkehrschluss nicht unbedingt, dass er nicht vorhanden ist. Eine Erklärung hierfür liegt im Ablauf der Nested-Reaktion. Da die erste Reaktion die zweite bedingt und in der ersten Reaktion immer nur eine der möglichen drei Gruppen amplifiziert wurde, sind die weiteren auf dem Gel nicht sichtbar. Andernfalls müssten zwei Polymorphismen als Doppelbande sichtbar werden. Somit kann aus einer einzelnen Nested-PCR mit polymorphismusspezifischen Primern kein Schluss bzgl. des Vorhandenseins des Polymorphismus gezogen werden. Auch hier stößt die Sensitivität an ihre Grenzen (siehe oben) zumal sich die maximalen Grenzen von 10^1 Sporen in 90ml oder 50 fg (Retief et al. 2006; van Niekerk et al. 2010; Whiteman et al. 2002) auf eine Nested-PCR der ITS-Region beziehen, die von der Anzahl her sehr häufig vorkommt. Die Anzahl der Wiederholungen im Genom in der sich der Polymorphismus der RAMS5 Region befindet, kann jedoch nicht abgeschätzt werden.

Hier müssten weitere Untersuchungen mit sensitiveren Methoden wie einer qPCR mit TaqMan-Sonden durchgeführt werden, die speziell für die einzelnen Polymorphismusvarianten entwickelt wurden. Diese sind in der Lage die einzelnen Polymorphismen direkt zu amplifizieren. Darüber hinaus können bereits geringere DNA Mengen zuverlässig amplifiziert werden (siehe Diskussion 4.4 „qPCR von *Pch-DNA*“).

Die Frage ob die Isolate, die z.B. in der Phoenix-Anlage gefunden wurden, auch im Chardonnay vorkommen oder sich auf die Phoenixanlage beschränken, kann daher nicht eindeutig beantwortet werden, da sowohl die lange, als auch die kurze Version des RAMS5 Polymorphismus in den Einzelproben der beiden Anlagen gefunden werden konnte. Für eine detailliertere Analyse müsste die genomische DNA vorliegen, damit diese mit den RAMS-Primern untersucht und den jeweiligen Haplotypen zugeordnet werden kann.

Auch in künstlich infiziertem Holz ist der Polymorphismus aus RAMS5 bei *Pch* mittels der Nested-PCR nachweisbar, jedoch kann es auch hier zu falsch negativen Befunden aufgrund der geringen Templatmenge und Inhibierung durch pflanzliche DNA kommen. Dieser Nachweis ist von besonderer Bedeutung, um die Frage zu klären, ob der reisolierte Pilz tatsächlich der ist, mit welchem die Infektion durchgeführt wurde, oder ob die Jungreben bereits von einem anderen *Pch*-Stamm befallen war, auch wenn die Rebe vorher symptomfrei war (Pierron et al. 2015; Pouzoulet et al. 2013). Zudem können auch mehrere *Pch*-Stämme in einer Rebe gleichzeitig gefunden werden (Mostert et al. 2006) (vgl. Diskussion 4.8.1 „Dichtigkeit in Abhängigkeit von der Sporenkonzentration“). Diese Frage lässt sich in dieser Arbeit nicht mit Sicherheit beantworten, da die Nested-PCR mit polymorphismusspezifischen Primern bei den durchgeführten Infektionsversuchen die gleiche „Gruppe“ ergab wie der Pilzstamm CKV, mit dem der Versuch durchgeführt wurde. Für eine eindeutige Identifizierung müsste der Pilz allerdings erneut aus dem Holz isoliert und der Haplotyp bestimmt werden.

Eine exakte Aussage über die Anzahl bzw. die Diversität an beteiligten Stämmen in einer Probe kann somit in diesem ersten Ansatz nicht getroffen werden. Somit ist in Ermangelung von

geeigneten Nested-Primern für die einzelnen Loci weiterhin eine Reisolierung des Pilzes und die Analyse der genomischen DNA nötig. Dennoch ist dieser Ansatz vielversprechend und konnte bei den Dichtigkeitstests im Gewächshaus eingesetzt werden, um bei einer Neuinfektion der Reben zu bestätigen, dass sie tatsächlich durch einen Stamm der gleichen Gruppe wie des applizierten *Pch*-Stammes CKV erfolgt ist.

4.7. Vergleich der Vliese

Für den Vergleich von Ergebnissen aus den Dichtigkeitstests von Vliesen musste zunächst ein geeignetes System entwickelt werden, das es ermöglichte, die Vliese untereinander zu vergleichen. Denn die Fasermatten wurden zum Teil dem gleichen Material, jedoch von unterschiedlichen Herstellern, gefertigt. Außerdem wurden Vliese aus verschiedenen Materialien gefertigt, die sich in ihrer Fasermorphologie unterscheiden. Diese Morphologie, beruhend auf der Gleichmäßigkeit der Fasern und der Faserdicke, wird durch die Parameter Spannung, Abstand der Elektroden zueinander, Kabinenfeuchte, Kabinentemperatur und Kanülengröße bestimmt (Greiner und Wendorff, 2007). Ein Beispiel für den Einfluss der Luftfeuchte in der Kabine auf die Fasern sind die PLGA-Vliese, die für den Abbaubarkeitstest in der Traubenzone verwendet wurden. Hier führte eine Erhöhung der Luftfeuchte in der Spinnkammer von 20% auf 30% zu leichteren Vliesen, da sich die Fasern auf dem Kollektor aufgrund der höheren Luftfeuchte und dem veränderten Spannungsfeld in einem größeren Radius ablegen, was in einer Fasermatte mit größerem Durchmesser resultiert. Letztlich führt dies bei gleichbleibender Polymermenge und Spindauer zu einer im Gewicht leichteren Fasermatte (pers. Mitteilung Ulrike Lang, Fa. Evonik). Des Weiteren wird bei einer Erhöhung der Luftfeuchte eine zunehmende Porosität der gesponnenen Fasern beschrieben (Casper et al. 2004), was zu einer erhöhten Brüchigkeit führt und die sich auch auf die Hydrophobizität der Fasern auswirken kann. Auch die Erhöhung des Polymeranteils in der Schmelze führt zu einer Veränderung der Morphologie, da eine Konzentrationssteigerung des Polymers zu dickeren Fasern führt (Ashammakhi et al. 2006). So betrug das Gewicht der PLGA-Vliese der Fa. Evonik mit 20 % Polymer in der Schmelze im Durchschnitt 4,7 mg/cm², das Gewicht der Vliese mit 30 % Polymer in der Schmelze jedoch 7,68 mg/cm² (vgl. Material und Methoden und Ergebnisse 3.13.2 „Dichtigkeitsversuche im Labor“ Abb. 44).

Die Fasermorphologie hat jedoch nach Greiner u. Wendorff (2007) keinen Einfluss auf die Porengröße der Fasermatte. Diese wird allein durch die Spindauer beeinflusst, da durch längere Spindauer weitere Lagen auf die Fasermatte aufgetragen werden, die die Porengröße verringern.

Die Vliese und die Testergebnisse müssen daher sowohl in Abhängigkeit des verwendeten Polymers als auch in Abhängigkeit ihrer Herstellungsart (vgl. Material und Methoden Tab. 14) getrennt voneinander beurteilt werden. So sind Vliese aus PLGA je nach Herstellungsart der Universität Bayreuth und der Fa. Evonik nur bedingt miteinander vergleichbar.

Um einzelne Chargen einer Herstellungsart miteinander zu vergleichen, wurde auf Vorschlag der Firma Fa. Evonik zunächst die Spinddauer als Vergleichswert herangezogen. Zwischen den Chargen eines Materials mit der gleichen Spinddauer konnten jedoch hohe Gewichtsschwankungen festgestellt werden (vgl. Kapitel 3.11 „Vergleich der Fasermatten“ Abb. 37). Zudem korreliert das Gewicht nicht mit der jeweiligen Spinddauer. Für den Vergleich der in dieser Arbeit verwendeten Fasermatten wird somit das Gewicht im Verhältnis zur Fläche angegeben. Dies ist inzwischen auch eine gängige Angabe der Industrie für die Beschreibung von Fasermatten (Greiner u. Wendorff 2007). Eine Gewichtsangabe in Abhängigkeit vom Volumen des Vlieses erscheint nicht sinnvoll, da sich die Dicke der Matte nur näherungsweise bestimmen lässt und somit nicht als Parameter verwendet werden kann. Die in dieser Arbeit für jedes Vlies ermittelte Gewichtsangabe pro Fläche in mg/cm^2 eignete sich hervorragend zur Vergleichbarkeit der Fasermatten untereinander und wurde anschließend auch zur Bewertung der Dichtigkeitstest herangezogen.

4.8. Dichtigkeitstest

4.8.1. Dichtigkeit in Abhängigkeit von der Sporenkonzentration

Die Dichtigkeit aller Vliestypen wurde mit drei unterschiedlich konzentrierten Sporensuspensionen durchgeführt, um den möglichen Sporendruck abzuschätzen, den das Vlies maximal aushält (vgl. Material und Methoden 2.4 „Nachweis von *Pch* mittels Nested-PCR“). So war es denkbar, dass ein Vlies bei einer niedrigen Konzentration zwar dicht gegen Sporen war, die Dichtigkeit ab einer bestimmten Grenze aber aufgrund der erhöhten Sporenkonzentration überwunden wurde. Im Versuchsverlauf konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Sporenkonzentration und Dichtigkeit festgestellt werden. Da die jeweils verwendete Sporenkonzentration keinen Einfluss auf das Ergebnis hatte, wurden in der Endauswertung die einzelnen Konzentrationen pro Vlieswiederholung miteinander verrechnet und das Gesamtergebnis ausgewiesen.

4.8.2. Dichtigkeitstests verschiedener Materialien in Labor und im Gewächshaus

Die Dichte der Vliese wurde zunächst im Labor untersucht um die Tauglichkeit der einzelnen Materialien zu testen und den möglichen Einfluss von Sporendichten, welche dem Befallsdruck im Freiland entspricht, zu untersuchen.

Obwohl die Fasermatten aus PLGA und PVDF der Universität Bayreuth Dichtigkeitstests mit definierten Aerosolpartikeln in Vorversuchen an der Universität Bayreuth bestanden, erwiesen sie sich bei den Dichtigkeitstests mit verschiedenen konzentrierten Sporensuspensionen als undicht. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre das Trägermaterial „Wasser“, mit welchem die Sporen sich durch das Vlies bewegen könnten (Greiner, persönliche Mitteilung). Ein Test mit einer entsprechenden Partikellösung konnte in Bayreuth aber nicht durchgeführt werden.

Auch wurde der Einfluss verschiedener Schichten auf die Dichte anhand eigens von der Universität Bayreuth dafür hergestellter Fasermatten getestet. Dabei stellte sich eine zweischichtige Fasermatte mit einer dicken Unter- und einer dünnen Oberschicht mit einem FG von 2,6 mg/cm² als sehr effektiv heraus (vgl. Ergebnisse 3.13.3 „Einfluss der Polymerkonzentration und des Spinnverfahrens auf die Dichtigkeit“). Auch hier scheint die Fasermorphologie einen größeren Einfluss zu haben als die Porengröße, da eine Matte aus zwei dicken Schichten mit einem FG von 9,98 mg/cm² im Vergleichstest deutlich schlechter Ergebnisse erzielte, obwohl die Porengrößen mit 1,3 µm bei dem Vlies mit 9,98 mg/cm² und 1,8µm bei dem Vlies mit einem FG von 2,6 mg/cm² vergleichbar waren (vgl. Material und Methoden Tab.13).

Einzig die Vliese aus Ecoflex® mit PG waren in den Versuchen vollständig dicht gegen Sporen. Dies kann sowohl durch den Zusatz von PG als auch durch die Porengröße von etwa 0,8 µm erklärt werden. Ein Vergleichs-Vlies mit reinem Ecoflex® zeigte eine geringere Dichte gegen Sporen, die sowohl dem Fehlen von PG als auch einer höheren Porengröße von etwa 1,2 µm geschuldet sein kann. Folglich ist der Effekt von PG auf *Pch* nicht zu 100% für die Dichtigkeit des Materials verantwortlich zu machen.

Die Versuche von Vliesen der Fa. Evonik aus PLGA mit unterschiedlicher Spindauer bei sonst gleichbleibender Herstellungsart zeigten, dass die Dichtigkeit gegen Sporen nicht mit dem Gewicht der Vliese korrelieren muss (vgl. Ergebnisse 3.11 „Vergleich der Fasermatten“ Abb. 43). Auch dies ist ein Indiz dafür, dass die Porengröße, die mit der steigenden Spindauer abnimmt, nicht alleinig für die Dichtigkeit des Materials verantwortlich sein kann. In Laborversuchen wurde festgestellt, dass die Vliese auch von Keimschläuchen durchwachsen werden. Dies wird belegt durch die Entwicklung von CFU, die auf dem Vlies wachsen und dabei Nährstoffe von der darunter befindlichen Agarplatte aufnehmen (vgl. Abb. 42). Hier erwies sich PDLLA als das widerstandsfähigste Material, obwohl die Poren nach Angaben der Fa. Evonik größer waren als *Pch*-Sporen. Eine mögliche Erklärung wurde in der ausgeprägten Hydrophobie des Materials vermutet. Diese Hypothese wurde mit einem Vlies aus PVDF überprüft, das als extrem-hydrophob gilt (Liang et al. 2013). Jedoch war dieses Material im Versuch nicht zu 100 % dicht gegen Sporen, sodass die erhöhte Hydrophobizität als alleiniger Grund für die Materialdichte nicht ausreicht.

Aufgrund der Ergebnisse der Dichtigkeitstests im Labor wurden für die Tests im Gewächshaus nur die Vliese aus PLGA und PDLLA von der Fa. Evonik verwendet, da sie als biologisch abbaubar gelten und nach erfolgreichem Test im Gewächshaus auch im Freiland erprobt werden sollten. Aufgrund der Ergebnisse der Applikationstests wurden jedoch anschließend nur die Vliese aus PDLLA für die Dichtigkeitstests verwendet.

Nach Abschluss des Tests an Reben waren die Querschnitte der künstlich infizierten Reben bei visueller Bonitur alle symptomfrei, dennoch konnte *Pch* im Holz mittels Nested-PCR in beimpften Reben ohne Vlies nachgewiesen werden. Dass der Erreger auch in optisch nicht beeinträchtigtem Holz vorhanden sein kann, ist bereits für *Pal* beschrieben worden (Pierron et al. 2015; Pouzoulet et

al. 2013). Daher ist es neben einem generellen Nachweis von *Pch* auch hier wichtig zu wissen ob die Infektion von dem Isolat stammt, mit welchem die künstliche Infektion durchgeführt wurde oder ob sie von einem anderen Stamm verursacht wurde und bereits, wenn auch nicht sichtbar, vorhanden war. Eine vorherige Infektion der Reben mit *Pch* kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da bei mehrfachen vorgeschalteten spezifischen PCR-Ansätzen kein Nachweis von *Pch* möglich war, wobei zu berücksichtigen ist, dass bei der Nested-PCR aus Holz „falsch Negative“ Resultate auftreten können (Ridgway et al. 2002).

Nach dem Infektionsversuch wurde mit den Primern MM5-450F/ MM5-450R und MM5-200F/ MM5-200R eine Nested-PCR bei den auf *Pch* positiv getesteten Reben durchgeführt. Diese ergab, dass es sich bei den nachgewiesenen Pilzen um *Pch*-Stämme mit demselben RAMS5 Polymorphismus handelt, wie er auch beim Stamm CKV auftritt, der für diesen Versuch benutzt wurde. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass der reisolierte Pilz unter dem Vlies tatsächlich den für die Infektion verwendeten Stamm CKV darstellt (siehe auch Diskussion 4.6 „Nachweis von Stammgruppen in DNA-Proben von Sporenfallen und Rebholz“).

Da im Dichtigkeitsversuch 2014 und in der Wiederholung 2015 die Infektion mit *Pch* bei den Reben ohne Vlies häufiger nachgewiesen werden konnte als bei den Reben mit Vlies, kann davon ausgegangen werden, dass das Vlies aus PDLLA eine Schutzwirkung aufgrund seiner Barrierefunktion ausübt. Darüber hinaus ist aufgrund der Ergebnisse der Dichtigkeits-tests von PDLLA (vgl. Ergebnisse 3.13.2 „Dichtigkeitsversuche im Labor“) im Labor eine hohe Schutzwirkung dieses Materials zu erwarten.

Eine eindeutige Aussage bezüglich der Dichtigkeit auf Schnittwunden lässt sich aber nicht treffen, da der Nachweis durch Fremd-DNA (z.B. pflanzliche) inhibiert sein kann und die Konzentration von *Pch*-DNA im Gesamtgemisch zu gering wäre. Folglich könnte eine Infektion mit *Pch* erfolgreich gewesen sein, die allerdings unter der Nachweisgrenze liegt. Da eine der Versuchsreben im Jahr 2014 bei zwei von drei Tests positiv auf den Befall von *Pch* getestet wurde, liegt die Vermutung nahe, dass bei der dritten Wiederholung während der ersten der beiden Nested Reaktionen, der ITS-Reaktion, ein anderer Pilz, der sich ebenfalls in der Probe befand, amplifiziert wurde, der dann in der zweiten Reaktion mit *Pch*-spezifischen Primern ein leeres Gel ergibt. Für einen eindeutigen Nachweis müsste die Untersuchung mit sensitiveren Methoden durchgeführt werden.

Da die Reben mit Vlies im Querschnitt keine optischen Veränderungen auch nicht in Hinblick auf die „typischen“ Symptome im Vergleich zu den Reben ohne Vlies aufwiesen, ist davon auszugehen, dass das Vlies aus PDLLA keinen negativen Einfluss auf die Wundheilung der Rebe hat. Aufgrund der fehlenden aktiven Wundheilung der Rebe, z.B. in Form von Kallusbildung (Sun et al. 2006), muss ein Eintrocknen der Schnittfläche gewährleistet sein, um die passive Wundheilung der Rebe zu ermöglichen. Dieses Eintrocknen konnte trotz der Applikation von

PDLLA dokumentiert werden (vgl. Ergebnisteil 3.15.1 „Im Gewächshaus“) und zeigt wie geeignet das Material für einen Wundverschluss ist.

4.8.3. Dichtigkeit nach künstlichem Alterungstest

Neben den frischen Vliesen wurde bei Vliesen aus PLGA und PDLLA der Fa. Evonik ein künstlicher Alterungstest mit anschließendem Dichtigkeitstest durchgeführt, um einen ersten Eindruck über mögliche Veränderungen in der Dichtigkeit im Laufe der Zeit zu gewinnen. Bei den Vliesen aus PLGA ist ein Durchwachsen von Keimschläuchen bereits in den unbehandelten Kontrollen zu beobachten. Somit kann die zunehmende Anzahl von CFUs nicht eindeutig auf die Behandlung mit Klimatest und einem zusätzlichem Suntest zurückgeführt werden. Da sich zudem laut Aufzeichnungen der Fa. Evonik die Stundenanzahl der Bestrahlung, dem Suntest, bei den Punkten „2 Wochen“ und „2 Monaten“ nicht unterscheidet, ist dies ein weiterer Indikator dafür, dass die Dichtigkeit von PLGA - wenn überhaupt - stärker durch den Klimatest alleine als durch den zusätzlichen Suntest, sprich eine Zusatzbehandlung mit UV- und IR-Strahlung, beeinflusst wird.

Eine optische Veränderung der Vliese aus PLGA konnte durch den Klimatest alleine nicht nachgewiesen werden. Diese trat erst durch die zusätzliche Bestrahlung im Suntest auf, was den Schluss nahelegt, dass die Brüchigkeit der Fasern von der zusätzlichen UV- und IR-Strahlung abhängt. In wie weit die Dichtigkeit durch die zusätzliche Bestrahlung beeinflusst wird, lies sich aber aufgrund der hohen Befallsrate in beiden Tests nicht klären.

Bei den Vliesen aus PDLLA war aufgrund des Klimatests alleine keine Veränderung der Dichtigkeit zu beobachten. Dies steht im vollkommenen Gegensatz zu den Ergebnissen mit PLGA Vliesen (s.o.). Bedingt durch den zusätzlichen Bewitterungstest konnte jedoch auf den Fasermatten bereits zum Zeitpunkt „24 Stunden“ eine Bildung von CFUs beobachtet werden. Darüber hinaus wurde das Material steif und brüchig (vgl. Ergebnisse, 3.13.4. „Dichtigkeitstest der Vliese nach Alterungstests“ Tab. 24). Folglich kann auch hier davon ausgegangen werden, dass sich die Porengröße aufgrund gebrochener Fasern durch UV-Bestrahlung änderte und sie dadurch durchlässig für Keimschläuche wurden. Da die Fasermatten ab dem Zeitpunkt „2 Monate“ stark fragmentiert waren, wurde der Bewitterungstest von der Fa. Evonik beendet und stattdessen der Suntest wie bei den Vliesen aus PLGA durchgeführt. Dadurch lassen sich die Vliestypen ab diesem Zeitpunkt nicht mehr miteinander vergleichen. Da die Vliese aus dem Suntest dichter waren als die Vliese mit dem zusätzlichen Bewitterungstest, kann davon ausgegangen werden, dass die Wärmestrahlung auf die Brüchigkeit der Fasern einen höheren Einfluss hat als die UV-Strahlung, die in beiden Versuchen gleich blieb.

4.8.4. Einfluss der Porengröße und Fasermorphologie auf die Dichtigkeit

Die Vliese wurden vom jeweiligen Hersteller auf die durchschnittliche Porengröße hin untersucht. Dabei waren die Poren aller Vliese aus PLGA und PVDF aus Bayreuth im Durchschnitt größer als $1\ \mu\text{m}$ und somit können *Pch*-Sporen, mit einem Format von $4.5 - 5.5 \times 1.0 - 1.5\ \mu\text{m}$, theoretisch diese Vliese passieren. Für die Verwendung spricht jedoch, dass die getestete Vliese, die an der Universität Bayreuth hergestellt wurden, mittels Aerosolpartikeln gleicher Größe auf eine ausreichende Barrierewirkung im Labor getestet wurden (Buchholz et al. 2016). Einzig die Vliese aus Ecoflex® mit PG-Zusatz waren mit ihrer Porengröße von $0,8\ \mu\text{m}$ klein genug, um Sporen vollständig aufzufangen.

Auch die Poren der PDLLA- und PLGA-Vliese der Fa. Evonik waren nach Herstellerangaben konstant größer als $1\ \mu\text{m}$. Folglich hätten auch hier rein rechnerisch die Sporen das Material passieren können. Da jedoch die Vliese aus PDLLA in Labortests und in Gewächshaustests dicht gegen *Pch*-Sporen waren, kann die Porengröße alleine nicht ausschlaggebend für die Materialdichte sein. Eine mögliche Erklärung hierfür wurde in der Hydrophobizität von PDLLA gefunden, da hier die Tropfen der Sporenlösung vergleichsweise länger auf dem Material stehen.

Die Hydrophobizität der Fasermatten aus Bayreuth und der Fa. Evonik wurde durch Kontaktwinkelmessungen von Wassertropfen auf den jeweiligen Materialien bestimmt. Nach Angaben der Fa. Evonik betrug der durchschnittliche Kontaktwinkel der PDLLA-Vliese $144 \pm 8^\circ$ und der der PLGA-Vliese $131 \pm 7^\circ$. Der Kontaktwinkel verschiedener PLGA-Vliese der Universität Bayreuth lag unabhängig von der Herstellungsart bei ca. $130-132^\circ$, PVDF-Vliese wiesen einen Winkel von 137° auf und waren damit hydrophober als PLGA. Eine eindeutige Aussage zum Einfluss der Hydrophobizität auf die Dichtigkeit der Materialien kann jedoch nicht getroffen werden, da der Tropfen nur im Moment der Messung auf dem Vlies verbleibt und dies somit nur eine Momentaufnahme darstellt und mögliche Änderungen der Hydrophobizität im Verlauf nicht erfasst werden. Zudem wird der Tropfen für die Messung auf ein Vlies, das auf einer trockenen Glasplatte lag, appliziert. Da das Medium in Petrischalen jedoch feucht ist, kann hier ein Einfluss des Mediums nicht ausgeschlossen werden. Nach 24 Stunden Inkubationszeit auf Medium waren nur bei den Fasermatten aus PDLLA noch Tropfen auf dem Vlies zu erkennen; bei den Vliesen aus PVDF verschwanden sie jedoch binnen Minuten, obwohl diese mit einem Kontaktwinkel von 137° als hydrophob gelten. Die Geschwindigkeit der Diffusion wirkte sich nur bedingt auf die Dichtigkeit der Materialien aus (vgl. Ergebnisse 3.13.2 „Dichtigkeitsversuche im Labor“).

4.9. Abbauverhalten der verwendeten Vliese

4.9.1. Abbau von PDLLA

Von allen getesteten Materialien waren nur die Vliese aus PDLLA aufgrund ihrer Molekularstruktur flexibel und leicht elektrostatisch. Sie hafteten ohne zusätzliche Klebstoffe auf Schnittwunden der Rebe und konnte somit sowohl im Gewächshaus als auch in den Freilandtests verwendet werden (vgl. Ergebnisse 3.15 „Applikationstest“).

Im Verlauf der Applikationstests im Gewächshaus blieb das Material insgesamt intakt und zeigte nur Ermüdungserscheinungen in Form von Rissen. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen der Tests zur Abbaubarkeit im Boden, da auch hier das Material insgesamt intakt blieb. Zwar wurde PDLLA aufgrund seiner guten biologischen Abbaubarkeit für die Herstellung der Vliese ausgewählt, diese Eigenschaft konnte in den Untersuchungen am JKI und in der GPC-Analyse jedoch nicht belegt werden.

Prinzipiell gelten Stoffe aus reiner PLA (Polylacticacid) aufgrund der potenziellen Hydrolyse des Materials, das daraufhin in H₂O und CO₂ umgewandelt wird, als biologisch abbaubar. Dies geschieht jedoch nur in Anwesenheit von Mikroorganismen. Es sind jedoch nur wenige Organismen beschrieben, die Kunststoffe aus PLA unter Laborbedingungen abbauen können (Pranamuda et al. 1997; Tokiwa et al. 2009).

Ein grundlegendes Problem besteht darin, dass es bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine exakte Definition für „biologische Abbaubarkeit“ für Kunststoffe aus PLA gibt. Diese gelten nach der aktuellen EU-Norm 13432 als biologisch abbaubar, wenn sich 90% des Materials innerhalb von sechs Monaten in CO₂ umwandeln. Zudem muss es unter Normbedingungen ohne giftige Rückstände kompostierbar sein (ISO 18451, 18452 für aerobe wässrige Abbaubarkeit, ISO 18543 für anaerobe wässrige Abbaubarkeit und 18455 für aerobe Kompostierung). In den am JKI durchgeführten Versuchen war es jedoch nicht möglich, dies für PDLLA zu zeigen. Generell ist bekannt, dass PLA-Mischungen nur sehr langsam im Boden abgebaut werden (Urayama et al. 2002) und ein Abbau von PDLLA unter den Bedingungen nach ASTM 6003, dem amerikanischen Pendant zur EU 13432, kaum stattfindet (de Paula et al. 2011).

Der Einfluss des Bodens auf den molekularen Abbau des Materials kann somit nicht vollständig geklärt werden. Der Boden der Versuchsanlage am Geilweilerhof besteht aus lehmigem Sand mit einem Humus-Anteil von 3,9% und einem pH-Wert von 7,3 (LUFA-Untersuchung, November 2014). Die vorherigen Abbauprobversuche wurden, soweit in der oben genannten Literatur beschrieben, in feuchtem Kompost oder Humus bei 30 °C durchgeführt und sind somit aufgrund der Bodenzusammensetzung nicht vergleichbar. Es ist aber anzunehmen, dass die Organismen für einen biologischen Abbau am JKI-Standort fehlten. Da diese auch in der Luft nicht vorkommen, ist dies eine Erklärung für den nicht messbaren Abbau des Materials.

Einen Einfluss auf die Materialveränderungen hatten hingegen die Niederschläge im Weinberg. So wurde in den Tests zur Abbaubarkeit und zur Applikation im Freiland ein „Pappmache“-Effekt beobachtet, der in den übrigen Tests nicht auftrat. Zudem zeigte das senkrecht am Stamm befestigte Vlies, das somit vor direktem Niederschlag geschützt war, diesen Effekt nicht und blieb länger intakt als Vliese an exponierter Stelle. Auch die Vliese im Topfversuch im Gewächshaus wurden nicht nass, da die Reben nur von unten gegossen wurden. In den künstlichen Bewitterungstests fehlte der „Pappmache“-Effekt aufgrund der dort fehlenden Feuchtigkeit. Da PDLLA stark hydrophob ist, könnten sich die einzelnen Schichten des Vlieses unter dem Einfluss von Wasser trennen und somit nacheinander durch weitere mechanische Faktoren wie Wind abgetragen werden. Dies konnte auch durch Beobachtungen beim Abbauversuch im Boden beobachtet werden, da sich hier einzelne Fasern aus der Matte lösten und neu verwirbelten. Auch hier wurde das Vlies regelmäßig nass.

Ebenso kann ein Einfluss von UV- und Wärme-Strahlung bei PDLLA beobachtet werden: im Alterungstest wurde eine zunehmende Fragmentierung von PDLLA durch den zusätzlichen Bewitterungstest beobachtet, die auch in einer erhöhten Durchlässigkeit für Keimschläuche resultierte. Eine Änderung von Bewitterungstest auf Suntest hatte zwar eine Reduzierung der Wärmestrahlung zur Folge, die UV-Strahlung wurde dabei jedoch nicht reduziert. Somit kann angenommen werden, dass die UV-Strahlung die Fasern brüchig werden lässt, was in größeren Poren und in einer Fragmentierung der Matte resultiert. Wie in den GPC-Analysen gezeigt hatte dies jedoch keine Veränderung in der molaren Masse zur Folge.

4.9.2. Abbaubarkeit von PLGA

Bei den Vliesen aus PLGA war aufgrund des PGA-Anteils grundsätzlich eine geringere Hydrophobizität und eine schnellere biologische Abbaubarkeit zu erwarten (Makadia u. Siegel 2011). Letzteres konnte jedoch in den Versuchen am JKI nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung ist auch hier das Fehlen von geeigneten Bakterien wie von bei Tokiwa et al. (2009) und Pranamuda et al. (1997) beschrieben. Andererseits sollte nach Wu u. Wang (2000) eine Erhöhung des PGA-Anteiles alleine ausreichen, um die Abbaubarkeit durch Hydrolyse zu erhöhen. Das Maximum für eine erhöhte Abbaugeschwindigkeit liegt nach Makadia u. Siegel (2011) bei einem Mischungsverhältnis von 50:50. Somit wurde in dieser Arbeit die optimale Formulierung für eine Abbaubarkeit verwendet, das Gemisch wird durch den Zusatz von 50% PGA aber steifer als reines PDLLA, was eine Anpassung an Schnittwunden und die Hafteigenschaften an Oberflächen verringert. Zudem wurde das Material brüchiger, was besonders beim Abbauversuch im Boden beobachtet werden konnte. Hierbei brachen die PLGA-Vliese der „Leichten Gruppe“ noch schneller als die der „Schweren Gruppe“ (vgl. Ergebnisse 3.16 „Abbaubarkeitstests der Vliese Abb.

64 und Abb. 65). Dies ist erklärbar durch die veränderte Fasermorphologie aufgrund der erhöhten Luftfeuchte, die schon von Casper et al. (2004) beschrieben wird.

In den Tests konnte ein deutlicher Einfluss der Temperatur auf das Material gezeigt werden, da die Vliese, die im Freiland einer direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt waren, nach zwei Monaten an den Rändern geschmolzen waren. Dies konnte bei den Applikationstests im Gewächshaus nie beobachtet werden. In früheren Studien wurde eine Aggregation (= eine Verklumpung) von PLGA bereits bei 26 °C beschrieben, die bei 37 °C irreversibel wird (De u. Robinson 2004). Zudem wird eine Lagerung bei 4°C empfohlen, um Materialveränderungen zu vermeiden.

Die Tg (Glasübergangstemperatur) ist bei PLGA durch die Zugabe von 50% PGA mit 42,6 °C +/- 0,5 geringer als die von PDLLA mit 52,2 °C +/- 0,1 (Passerini u. Craig 2001). Daher konnte ein Anschmelzen der Vliese nur bei PLGA, jedoch nicht bei PDLLA beobachtet werden: Die Temperaturen waren während des Versuches im Weinberg im Sommer 2015 nur hoch genug um die Tg von PLGA zu überschreiten. Die Tg von PDLLA wurde jedoch beim Bewitterungstest der Fa. Evonik überschritten, so dass auch hier ein Schmelzen der Fasern mit anschließendem Verklumpen beobachtet werden konnte (vgl. Ergebnisse 3.14 „Dichtigkeitstest der Vliese nach Alterungstests“ Tab. 24). Nach der Teständerung von Bewitterungstest auf Suntest trat dieser Schaden nicht mehr auf, was auf ein Nicht-Erreichen der Tg schließen lässt. Somit zeigten sich die Fasermatten aus PDLLA in den Abbaubarkeitstests unabhängig von ihrem FG als die geeigneteren für einen länger wirksamen Wundverschluss.

4.10. Ausblick auf die Prophylaxe mittels eines Wundverschlusses

Die ganzjährige Präsenz von *Pch*-Sporen im Weinberg zeigt deutlich, wie wichtig ein Schutz frischer Wunden am Rebholz gegen eindringende Pathogene ist. Hierbei ist es wichtig die jungen Weinreben zu schützen, um mögliche Erstinfektionen mit Pathogenen zu verhindern oder hinauszuzögern. PDLLA hat in den vorangegangenen Versuchen eine lange Haltbarkeit an der Rebe im Freiland und in den Dichtigkeitsversuchen eine eindeutige Wirkung gegen *Pch*-Sporen gezeigt. Die Dichtigkeit gegenüber anderen Sporen des Komplexes z.B. *Pal* und *Fmed* muss noch erforscht werden.

Ob ein prophylaktischer Rebschutz wirtschaftlich sinnvoll ist, hängt von verschiedenen Parametern ab, wie eine einfache Applizierbarkeit des Vlieses auf der Rebe, die Kosten des Vlieses und die Applikationskosten. Ebenso können der Verkaufspreis des Weines und der möglichen Vertragsausfall bei einer Infektion mit Esca relevante Einflussfaktoren sein.

5. Fazit

Auch in dieser Arbeit erwies sich eine Prognose des Befalls von Rebanlagen mit Esca aufgrund der visuellen Bonitur der Blattsymptomatik als unzureichend. Dennoch verdeutlichte der starke Befall einzelner Anlagen wie groß die Problematik der Krankheit bereits ist und wie dringend neue Lösungsansätze gefunden werden müssen, um die weitere Ausbreitung der Krankheit einzudämmen und um Neuinfektionen vorzubeugen.

Im Rahmen der Epidemiologiestudien zum Esca-Erreger *Pch* konnte mit der neuen Kombination von etablierten Methoden wie Sporenfallen und Nested-PCR eine sichere und schnelle Methode gefunden werden um *Pch*-Sporen in der Luft nachzuweisen. Der Nachweis von *Pch*-Sporen war ganzjährig möglich und wurde in dieser Form auch das ersten Mal für Deutschland beschrieben. Die Ergebnisse der Sporenfallenanalyse zeigen, dass ein Schutz der Reben nach dem Winterschnitt unabdingbar ist, da die Sporen zu jedem Zeitpunkt im Weinberg vorhanden sein können.

Neben dem allgemeinen Nachweis wurde auch der Versuch eines quantitativen Nachweises unternommen, um die Frage des Befallsdrucks zu den verschiedenen Jahreszeiten zu klären. Die hier verwendete qPCR erwies sich hier als prinzipiell geeignete Methode und zeigt ein großes Potential. Auch die Frage ob das Aufkommen von Sporen mit Temperaturen oder Niederschlägen korreliert konnte nicht eindeutig geklärt werden, aber es wurde ein Modell gefunden, welches für zukünftige Analysen verwendet werden kann. Zudem zeigten die ersten Analysen mit dem Modell, dass die einzelnen Wetterkomponenten miteinander interagieren und die Sporulation nicht von einem einzelnen Wetterparameter abhängt.

Auch die Frage nach dem Vorkommen einzelner *Pch*-Stämme im Weinberg wurde untersucht. Hier wurde zunächst mit Hilfe der RAMS-Primer Isolate aus den Anlagen mit Isolaten einer bestehenden Stammsammlung verglichen. Hier konnten 16 Stämmen 12 Haplotypen zugeordnet werden. Dies war unter anderem dadurch möglich, dass in dieser Arbeit ein neuer Ansatz verfolgt wurde und die gefundenen Polymorphismen sequenziert wurden. Dies führte zu einer genaueren Eingruppierung, da hier Polymorphismen sichtbar wurden, die bei einer herkömmlichen Analyse mittels Gelbildern nicht sichtbar waren. Die Kombination der Analyse von RAMS-Primern und Nachsequenzierung zeigte, dass das Genom von *Pch* mehr Polymorphismen aufweisen kann als häufig in der Literatur dargestellt. Aus den gefundenen Polymorphismen wurden Primer entwickelt, die in einer Nested-PCR verwendet werden konnten, um auch in Sporenfallen und im Rebholz verschiedene Isolate zu finden. In den Sporenfallen war ein prinzipieller Nachweis von verschiedenen Isolaten möglich und so bietet die hier beschriebene Methode eine gute Basis für weitere Analysen, die auch auf andere Substrate, wie z.B. Böden, angewendet werden kann.

Beim Testen eines neuen Wundverschlusses gegen eindringende Pathogene der Esca-Krankheit wurden mit den Vliesen aus PDLLA ein geeignetes Material gefunden, dass sowohl im Labor als auch in Gewächshaustests eine 100 %ige Dichtigkeit gegen die Sporen von *Pch* aufweist und im

Vergleich zu anderen Materialien ohne zusätzliche Fungizide auskommt. Gleichzeitig kann es ohne zusätzliche Hilfsmittel oder Kleber appliziert werden und wies in Freiland und Alterungstests eine längere Haltbarkeit auf als andere getestete Materialien. Ob ein Vlies aus PDLA eine zufriedenstellende Lösung für das Problem der Infektion von Reben darstellt, muss allerdings in zukünftigen Langzeitversuchen geklärt werden.

Literaturverzeichnis

- Agustí-Brisach C, Gramaje D, León M, García-Jiménez J, Armengol J** (2011) Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of Black-foot and Petri Disease pathogens. *Plant Disease* (95): 803–810.
- Antonielli L, Compant S, Strauss J, Sessitsch A, Berger H** (2014) Draft genome sequence of *Phaeoconiella chlamydospora* strain RR-HG1, a grapevine trunk disease (Esca)-related member of the ascomycota. *Genome Announcements* (2).
- Ashammakhi N, Ndreu A, Piras A, Nikkola L, Sindelar T, Ylikauppila H, Harlin A, Chiellini E, Hasirci V, Redl H** (2006) Biodegradable nanomats produced by Electrospinning. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (6): 2693–2711.
- Bassermann-Jordan Fv** (1975) Rebschädlinge. In: Bassermann-Jordan, F. von. *Geschichte des Weinbaus*. Pfälzische Verlagsanstalt GmbH: 657–711.
- Belchim Crop Protection** (2018) *Trichoderma atroviridae*, der als Antagonist die Schnittwunden besiedeln und somit vor einem Eindringen von Sporen schützen soll. <http://www.belchim-agro.de/vintec> 10.04.2018.
- Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, Spagnolo A, Clément C, Fontaine F** (2013) Grapevine trunk diseases. *Plant Pathology* (62): 243–265.
- Borie B, Jacquiot L, Jamaux-Despréaux I, Larignon P, Péros J-P** (2002) Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France. *Plant Pathology* (51): 85–96.
- Buchholz V, Molnar M, Wang H, Reich S, Agarwal S, Fischer M, Greiner A** (2016) Protection of vine plants against Esca disease by breathable electrospun antifungal nonwovens. *Macromolecular Bioscience* (16): 1391–1397.
- Casper CL, Stephens JS, Tassi NG, Chase DB, Rabolt JF** (2004) Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers. *Macromolecules* (37): 573–578.
- Cobos R und Martin MT** (2008) Molecular characterisation of *Phaeoconiella chlamydospora* isolated from grapevines in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* (47): 20–27.
- Comont G, Corio-Costet M-F, Larignon P, Delmotte F** (2010) AFLP markers reveal two genetic groups in the French population of the grapevine fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydospora*. *European Journal of Plant Pathology* (127): 451–464.
- Cooley** (1902) US 692631 A Apparatus for electrically dispersing fluids.
- Crous PW und Gams W** (2000) *Phaeoconiella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and Esca. *Phytopathologia Mediterranea* (39): 112–118.
- Crous PW, Gams W, Wingfield MJ, van Wyck PS** (1996) *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia* (88): 786–796.
- De S und Robinson DH** (2004) Particle size and temperature effect on the physical stability of PLGA nanospheres and microspheres containing Bodipy. *AAPS PharmSciTech* (5): e53.

- de Paula LE, Mano V, Pereira FV** (2011) Influence of cellulose nanowhiskers on the hydrolytic degradation behavior of poly(d,l-lactide). *Polymer Degradation and Stability* (96): 1631–1638.
- Edwards J, Constable F, Wiechel T, Salib S** (2007) Comparison of the molecular tests - single PCR, nested PCR and quantitative PCR (SYBR Green and TaqMan) - for detection of *Phaeomoniella chlamydospora* during grapevine nursery propagation. *Phytopathologia Mediterranea* (46): 58–72.
- Edwards J, Marchi G, Pascole IG** (2001) Young Esca in Australia. *Phytopathologia Mediterranea* (40): 303–310.
- Elena G und Luque J** (2016) Seasonal susceptibility of grapevine pruning wounds and cane colonization in Catalonia, Spain following artificial infection with *Diplodia seriata* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease* (100): 1651–1659.
- ELMARCO s.r.o-Europe** (2012) nozzle less electrospinning.
http://www.elmarco.com/upload/obrazky/galerie_obrazku/electrospinning-process-35.jpg
10.04.2012.
- Eskalen A, Feliciano AJ, Gubler WD** (2007) Susceptibility of Grapevine Pruning Wounds and Symptom Development in Response to Infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease* (91): 1100–1104.
- Eskalen A und Gubler WD** (2001) Association of spores of *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea* (40): 429–432.
- Ferreira JHS, van Wyck PS, Venter E** (1994) Slow dieback of grapevine: association of *Phialophora parasitica* with slow dieback of grapevines. *South African Journal for Enology and Viticulture* (15): 9–11.
- Fischer M** (2002) A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine. *Mycological Progress* (1): 315–324.
- Fischer M** (2006) Esca und Vorläuferkrankheiten. *Das Deutsche Weinmagazin* (1/7): 28–31.
- Fischer M und Kassemeyer HH** (2003) Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis* (42): 109–116.
- Gardes M und Bruns TD** (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* (2): 113–118.
- Gessler C, Pertot I, Perazzoli M** (2011) *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* (50): 3–44.
- Greiner A** (2012) persönliche Mitteilung Dichtigkeit von Vliesen.
- Greiner A und Wendorff JH** (2007) Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie (International Edition in English)* (46): 5670–5703.
- Hantula J, Dusabenyagasani M, Hamelin RC** (1996) Random amplified microsatellites (RAMS)- a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Plant Pathology* (26): 159–166.
- Hantula J, Lilja A, Parikka P** (1997) Genetic variation and host specificity of *Phytophthora cactorum* isolated in Europe. *Mycological Research* (101): 565–572.

- Hartmann Brockhaus** (2018) Mulchfolie biologisch abbaubar - für längere Kulturdauer. <http://www.hartmann-brockhaus.de/detail/Mulchfolie-biologisch-abbaubar---fuer-laengere-Kulturdauer> 07.01.2018.
- Kaltschmidt JH** (1839) neulat. Esca übersetzt Zunder. In: Kaltschmidt, Jacob Heinrich. Sprachvergleichendes Wörterbuch der deutschen Sprache. Hinrichs.
- Karaoglu H, Lee CMY, Meyer W** (2005) Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. *Molecular Biology and Evolution* (22): 639–649.
- Koenig RL, Ploetz RC, Kistler HC** (1997) *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* consists of a small number of divergent, globally distributed clonal lineages. *Phytopathology* (87): 915–923.
- Lang U** (2013) persönliche Mitteilung Herstellung der Faservliese.
- Larignon P und Dubos B** (1997) Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* (103): 147–157.
- Larignon P und Dubos B** (2000) Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea* (39): 184–189.
- Larignon P, Fontaine F, Farine S, Clément C** (2009) Esca et black dead arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences III-Vie* (333): 765–783.
- Liang S, Kang Y, Tiraferri A, Giannelis EP, Huang X, Elimelech M** (2013) Highly hydrophilic polyvinylidene fluoride (PVDF) ultrafiltration membranes via postfabrication grafting of surface-tailored silica nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces* (5): 6694–6703.
- Mahuku GS, Henríquez MA, Munõz J, Buruchara RA** (2002) Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the bean angular leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology* (92): 580–589.
- Makadia HK und Siegel SJ** (2011) Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* (3): 1377–1397.
- Marchi G, Peduto F, Mugnai L, Di Marco S, Calzarano F, Surrico G** (2006) Some observations on the relationship of manifest and hidden esca to rainfall. *Phytopathologia Mediterranea* (45): 117–126.
- Martín MT, Cobos R, Martín L, López-Enríquez L** (2012) Real-time PCR detection of *Phaeoacremonium chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* (78): 3985–3991.
- Michelon L, Pellegrini C, Pertot I** (2006) Esca disease: spore trapping, symptom evolution and incidence in Trentino Region, Italy symptoms and evaluation of incidence. *Phytopathologia Mediterranea* (29): 105(Abstract).
- Mostert L, Abeln ECA, Halleen F, Crous PW** (2006) Genetic diversity among isolates of *Phaeoacremonium chlamydospora* on grapevines. *Australasian Plant Pathology* (35): 453.
- Mostert L, Crous PW, Ewald Groenewald JZ, Gams W, Summerbell RC** (2003) Togninia (Calosphaeriales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia* (95): 646–659.
- Mugnai L, Graniti A, Surrico G** (1999) Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking. *Plant Disease* (83): 404–418.

- Mugnai L, Imbriani R, Surico G** (1996) Indagine sulla diffusione e gravità del ‘mal dell’esca’ in alcuni vigneti della Toscana. *Informatore Fitopatologico* (): 50–56.
- Nelson MF und Anderson NO** (2013) How many marker loci are necessary? Analysis of dominant marker data sets using two popular population genetic algorithms. *Ecology and Evolution* (3): 3455–3470.
- Panyam J und Labhasetwar V** (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* (55): 329–347.
- Pascole IG** (1999) Grapevine trunk diseases – black goo decline, Esca, Eutypa dieback and others. *The Australian Grape Grower and Winemaker* (414): 135–136.
- Passerini N und Craig DQ** (2001) An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC. *Journal of Controlled Release* (73): 111–115.
- Pierron R, Gorfer M, Berger H, Jacques A, Sessitsch A, Strauss J, Compant S** (2015) Deciphering the niches of colonisation of *Vitis vinifera* L. by the Esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum* using a gfp marked strain and cutting systems. *PLOS ONE* (10): e0126851.
- Pottinger B, Stewart A, Carpenter M, Ridgway HJ** (2002) Low genetic variation detected in New Zealand populations of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* (41): 199–211.
- Pouzoulet J, Mailhac N, Couderc C, Besson X, Daydé J, Lummerzheim M, Jacques A** (2013) A method to detect and quantify *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. *Applied Microbiology and Biotechnology* (97): 10163–10175.
- Pranamuda H, Tokiwa Y, Tanaka H** (1997) Polylactide degradation by an *Amycolatopsis sp.* . *Applied and Environmental Microbiology* (63): 1637–1640.
- Quaglia M, Covarelli L, Zizzerini Antonia** (2009) Epidemiological survey on Esca disease in Umbria, central Italy. *Phytopathologia Mediterranea* (48): 84–91.
- Reneker DH und Chun I** (1996) Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* (7): 216–223.
- Retief E, McLeod A, Fourie PH** (2006) Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine Nurseries. *European Journal of Plant Pathology* (115): 331–339.
- Ridgway HJ, Sleight BE, Stewart A** (2002) Molecular evidence for the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. *Australasian Plant Pathology* (31): 267.
- Rooney-Latham S, Eskalen A, Gubler WD** (2005) Occurrence of *Togninia minima* perithecia in Esca-affected vineyards in California. *Plant Disease* (89): 867–871.
- Scheck HJ, Vasquez SJ, Gubler WD, Fogle D** (1998) First report of three *Phaeoacremonium spp.* causing young grapevine decline in California. *Plant Disease* (82): 590.
- Schneider P** (2014) Esca-Syndrom der Weinrebe: Analysen zur Pathogenverteilung und Symptomausprägung in Abhängigkeit von klimatischen Faktoren. Masterarbeit. Universität Hohenheim. Hohenheim:1-108.

- Smetham G, Ades P, Ford R** (2008) Development of microsatellite markers for the grapevine fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydospora*. *Molecular Ecology Resources* (8): 1052–1054.
- Smetham GM, Ades PK, Péros J-P, Ford R** (2010) Genetic structure of the grapevine fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydospora* in southeastern Australia and southern France. *Plant Pathology* (59): 736–744.
- Sofia J, Trovão J, Portugal A, Paiva de Carvalho H, Mesquita N, Nascimento T, Rego Cecília, Gonçalves MT** (2015) Molecular and phenotypic characterisation of *Phaeoconiella chlamydospora* isolates from the demarcated wine region of Dão (Portugal). *Phytopathologia Mediterranea* (54): 403–413.
- Sosnowski MR, Creaser ML, Wicks TJ** (2005) Field evaluation of pruning wound treatments for control of eutypa dieback. *Phytopathologia Mediterranea* (44): 114.
- Sosnowski MR, Creaser ML, Wicks TJ, Lardner R, SCOTT ES** (2008) Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* (14): 134–142.
- Spranger J** (2011) Electrospinning -Technologie und Möglichkeiten-. 26. Hofer Vliesstofftage.
- Sun Q, Rost TL, Matthews MA** (2006) Pruning-induced tylose development in stems of current-year shoots of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *American Journal of Botany* (93): 1567–1576.
- Surico G** (2001) Towards commonly agreed answers to some basic questions on Esca. *Phytopathologia Mediterranea* (40): 487–490.
- Surico G, Marchi G, Braccini P, Mugnai L** (2000) Epidemiology of Esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* (39): 190–205.
- Tegli S** (2000) A hypothesis about the reproductive modes of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* (39): 289–298.
- Tegli S, Bertelli E, Surico G** (2000a) Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea* (39): 134–149.
- Tegli S, Santilli E, Bertelli E, Surico G** (2000b) Genetic variation within *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* (39): 125–133.
- Tello ML, Gramaje D, Gómez A, Abad-Campos P, Armengol J** (2010) Analysis of phenotypic and molecular diversity of *Phaeoconiella chlamydospora* isolates in Spain. *Journal of Plant Pathology* (92): 195–203.
- This P, Lacombe T, Thomas MR** (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends In Genetics* (22): 511–519.
- Tokiwa Y, Calabria BP, Ugwu CU, Aiba S** (2009) Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences* (10): 3722–3742.
- Travadon R, Lecomte P, Diarra B, Lawrence DP, Renault D, Ojeda H, Rey P, Baumgartner K** (2016) Grapevine pruning systems and cultivars influence the diversity of wood-colonizing fungi. *Fungal Ecology* (24): 82–93.

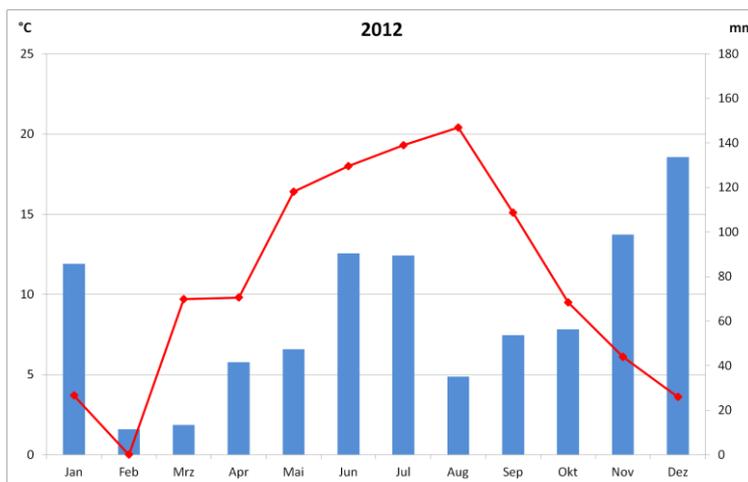
- Urayama H, Kanamori T, Kimura Y** (2002) Properties and biodegradability of polymer blends of poly(L-lactide)s with different optical purity of the lactate units. *Macromolecular Materials and Engineering* (287): 116–121.
- van Niekerk JM, Calitz FJ, Halleen F, Fourie PH** (2010) Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* (127): 375–390.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, Michael A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc.: 315–322.
- Whiteman S, Jaspers M, Stewart A, Ridgway H** (2002) Detection of *Phaeoconiella chlamydospora* in soil using species-specific PCR. *New Zealand Plant Protection* (55): 139–145.
- Whiteman SA, Stewart A, Ridgway HJ, Jaspers MV** (2007) Infection of rootstock mother-vines by *Phaeoconiella chlamydospora* results in infected young grapevines. *Australasian Plant Pathology* (36): 198.
- Wu L und Wang B** (2000) A potential vorticity tendency diagnostic approach for tropical cyclone motion*. *Monthly Weather Review* (128): 1899–1911.
- Zhou S, Smith DR, Stanosz GR** (2001) Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research* (105): 919–926.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D** (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* (20): 176–183.

Anhang

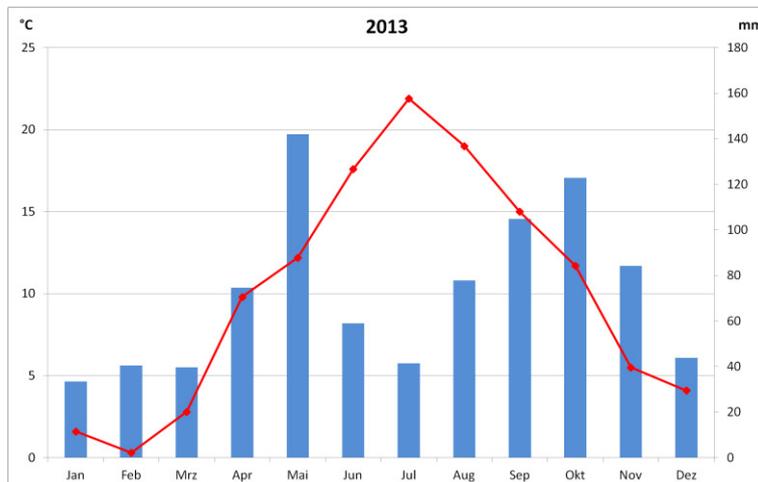
Anhang A: Klimadiagramme des Standortes Siebeldingen der Jahre 2012-2015

Klimadiagramme der Jahre 2012 bis 2015: monatliche Durchschnittstemperatur in °C und monatliche Durchschnittsniederschlagsmenge in mm. Die Daten stammen von der Wetterstation am Julius Kühn-Institut in Siebeldingen.

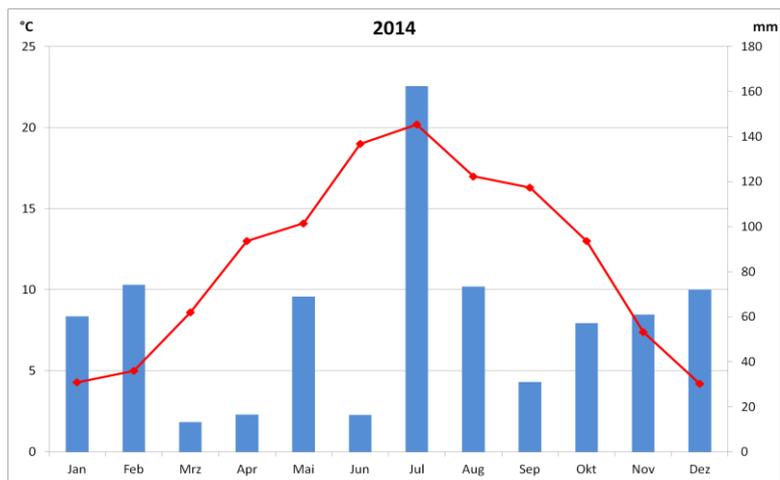
Klimadiagramm 2012



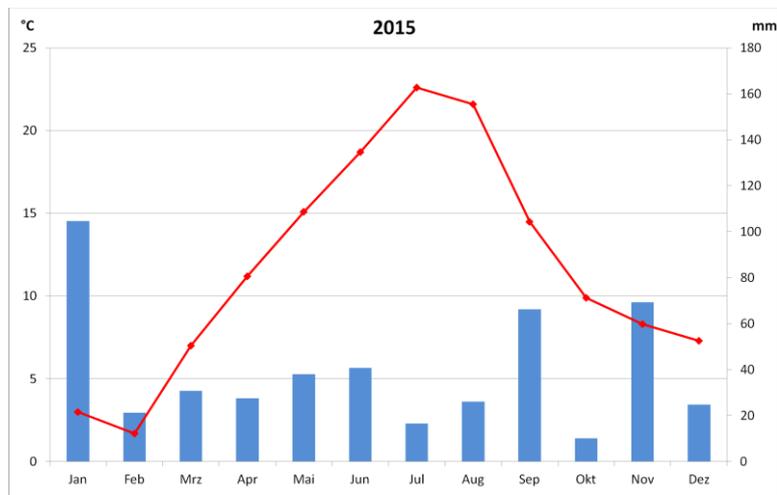
Klimadiagramm 2013



Klimadiagramm 2014



Klimadiagramm 2015

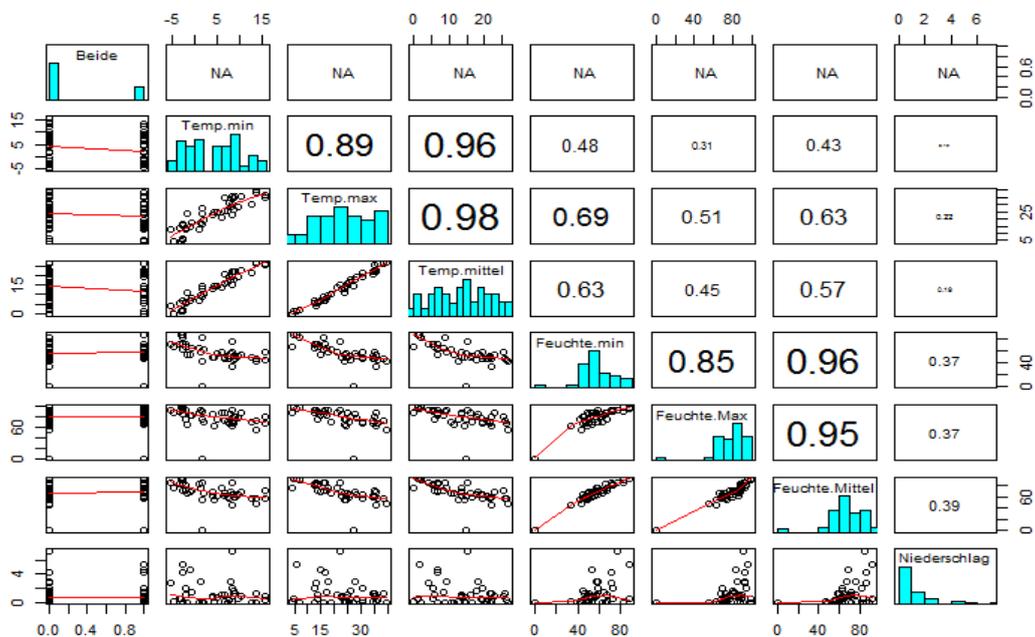


Anhang B: Korrelation der Wetterdaten untereinander

Formel in R für den Plot „Korrelation der Wetterdaten“

```
> plot(md[,c(4,7:13)])
> ?pairs
> panel.hist <- function(x,. ..)
+ {
+   usr <- par("usr"); on.exit(par(usr))
+   par(usr = c(usr[1:2], 0, 1.5) )
+   h <- hist(x, plot = FALSE)
+   breaks <- h$breaks; nB <- length(breaks)
+   y <- h$counts; y <- y/max(y)
+   rect(breaks[-nB], 0, breaks[-1], y, col = "cyan",. ..)
+ }
> panel.cor <- function(x, y, digits = 2, prefix = "", cex.cor,. ..)
+ {
+   usr <- par("usr"); on.exit(par(usr))
+   par(usr = c(0, 1, 0, 1))
+   r <- abs(cor(x, y))
+   txt <- format(c(r, 0.123456789), digits = digits)[1]
+   txt <- paste0(prefix, txt)
+   if(missing(cex.cor)) cex.cor <- 0.8/strwidth(txt)
+   text(0.5, 0.5, txt, cex = cex.cor * r)
+ }
> pairs(md[,c(4,7:13)],diag.panel = panel.hist, lower.panel =
panel.smooth, upper.panel = panel.cor)
```

Das Panel zeigt die Korrelation der Wetterdaten untereinander (0=keine Korrelation; 1=vollständige Korrelation)



Anhang C: Sequenzen der *Pch*-Stammsammlung nach PCR mit den Primern MM 5-450F und MM5-450R

	10	20	30	40	50
07-93	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
52/3	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
CKV	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
H32	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
H37	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
H53	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
H67	GGAGATTTC-g	AACCCTCacG	ATCAAGAACC	TcTCCCTcTC	CCTcTCCCTC
H3K	-----	-----	-----	----CCTCTC	CCTCTCCCTC
HT3	GGAGATTNTG	NACCCTCAG	ATCAAGNACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
M1	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
M2	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
Pch 133	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
Pch 35	GGAGATTNTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
Pch 37	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
Ste 77	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
Ste 63	GGAGATTCTG	AACCCTCAG	ATCAAGAACC	TCTCCCTCTC	CCTCTCCCTC
MM5-450F	GGAGATTCTG	AACCCTCAG
MM5-450R	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	60	70	80	90	100
07-93	TCCCTCTCCC	TCAGAACCCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
52/3	-----	--AGAACCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
CKV	TCCCTCTCCC	TCAGAACCCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
H32	-----	--AGAACCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
H37	TCCCTCTCCC	TCAGAACCCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
H53	-----	--AGAACCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
H67	-----	--AGAACCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
H3K	TCCCTCTCCC	TCAGAACCCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
HT3	TCCCT-----	--AGAACCTC	AACAAAAATG	TNTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
M1	-----	--AGAACCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
M2	-----	--AGAACCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
Pch 133	-----	--AGAACCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
Pch 35	-----	--AGAACCTC	AACAAAAANG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
Pch 37	-----	--AGAACCTC	AACAAAAANG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
Ste 77	TCCCTC-----	--AGAACCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
Ste 63	-----	--AGAACCTC	AACAAAAATG	TCTTCGTCAA	ATTCCCTCAGC
MM5-450F
MM5-450R	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	110	120	130	140	150
07-93	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
52/3	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
CKV	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
H32	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
H37	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
H53	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
H67	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
H3K	TCCATCGAAC	cTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TcCGCAATCC	GCGTCGGAAC
HT3	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
M1	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCACAATCC	GCGTCGGAAC
M2	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCACAATCC	GCGTCGGAAC

Pch 133	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
Pch 35	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
Pch 37	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
Ste 77	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
Ste 63	TCCATCGAAC	CTAGGCTACT	CAGCACCGAT	TCCGCAATCC	GCGTCGGAAC
MM5-450F
MM5-450R	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

....|....||....||....||....||....|
 160 170 180 190 200

07-93	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
52/3	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
CKV	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
H32	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
H37	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
H53	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
H67	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
H3K	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CtAGCATCTc	GaCTCTTCGA	NGCCGCGAGA
HT3	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTNTTCGA	TGCCGCGAGA
M1	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
M2	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
Pch 133	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
Pch 35	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
Pch 37	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
Ste 77	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
Ste 63	TCCCGCCCGA	AGCTTTAGCG	CTAGCATCTC	GACTCTTCGA	TGCCGCGAGA
MM5-450F
MM5-450R	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

....|....||....||....||....||....|
 210 220 230 240 250

07-93	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
52/3	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
CKV	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
H32	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
H37	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
H53	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
H67	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
H3K	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
HT3	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
M1	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
M2	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
Pch 133	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
Pch 35	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
Pch 37	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
Ste 77	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
Ste 63	CAGGGTCAGA	CGGAGATATT	TGAACAGGTT	TTGGGCAGGA	GTGAGAGGCT
MM5-450F
MM5-450R	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

....|....||....||....||....||....|
 260 270 280 290 300

07-93	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
52/3	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
CKV	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
H32	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
H37	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
H53	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT

H67	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
H3K	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
HT3	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
M1	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
M2	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
Pch 133	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
Pch 35	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
Pch 37	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
Ste 77	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
Ste 63	TGCTAATTTG	ACGAATGAAA	AGGGTGATAG	CTTGGTACGT	ATATTTAGTT
MM5-450
5-450R	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	
		310	320	330	340
07-93	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
52/3	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTT...	
CKV	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
H32	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
H37	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
H53	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
H67	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
H3K	TTTTTGGTTC	TCGTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
HT3	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
M1	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
M2	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
Pch 133	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
Pch 35	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
Pch 37	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
Ste 77	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
Ste 63	TTTTTGGTTC	TCTTTGGGAT	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	
MM5-450F	
MM5-450R	~~~~~	~~~~~	GAATTTGGGG	GCGTTTTTAT	

Anhang D: Sequenzen der *Pch*-Stammsammlung nach PCR mit den Primern MM9-450F und MM9-450R

	10	20	30	40
07-93	-----	aTCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
53/2	CCCCAAATTC	ATCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
CK V	CCCCAAATTC	ATCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
H32	CCCCAAATTC	ATCCCAACGA	GAACCAAAAA	AaCTAAATAT
H37	CCCCAAATTC	ATCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
H53	CCCCAAATTC	aTCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
H67	CCCCAAATTC	aTCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
M1	CCCCAAATTC	aTCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
M2	CCCCAAATTC	ATCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
H3K_	CcCCAAATTC	ATCCCAACGA	GAACCAAAAA	AAcTAAATAT
Pch 133	CCCCAAattc	ATCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
PCH 37	CCCCAAATTC	ATCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
PCH 35	CCCCAAATTC	CTCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
Ste 63	CCCCAAATTC	ATCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
Ste77	CCCCAAATTC	ATCCCAACGA	GAACCAAAAA	AACTAAATAT
MM9-450F	CCCCAAATTC	ATCCCAACGA
MM9-450R	-----	-----	-----	-----

	50	60	70	80
07-93	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
53/2	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTcGT	CAAATTAGCA
CK V	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
H32	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
H37	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
H53	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
H67	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
M1	ACGTACCAAG	CtATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
M2	ACGTACCAAG	CtATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
H3K_	AcGTACCAAG	CtATCACCCCT	TTtCATTcGT	CAAATTAcCA
Pch 133	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
PCH 37	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
PCH 35	ACGTACCAAG	CtATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
Ste 63	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
Ste77	ACGTACCAAG	CTATCACCCCT	TTTCATTTCGT	CAAATTAGCA
MM9-450F
MM9-450R	-----	-----	-----	-----

	90	100	110	120
07-93	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
53/2	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
CK V	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
H32	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
H37	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
H53	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
H67	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
M1	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
M2	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTgTtCA	AATATCTCCG
H3K_	AGCCTcTcCc	TCCTGCCCAA	AACctgTTCA	AATATcTCCG
Pch 133	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
PCH 37	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
PCH 35	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATcTCCG

Ste 63	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
Ste77	AGCCTCTCAC	TCCTGCCCAA	AACCTGTTCA	AATATCTCCG
MM9-450F
MM9-450R	-----	-----	-----	-----

	130	140	150	160
07-93	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
53/2	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
CK V	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
H32	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
H37	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
H53	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
H67	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
M1	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
M2	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
H3K_	TCTGACCCTG	TCNCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
Pch 133	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
PCH 37	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
PCH 35	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
Ste 63	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
Ste77	TCTGACCCTG	TCTCGCGGCA	TCGAAGAGTC	GAGATGCTAG
MM9-450F
MM9-450R	-----	-----	-----	-----

	170	180	190	200
07-93	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
53/2	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
CK V	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
H32	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
H37	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
H53	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
H67	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
M1	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
M2	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
H3K_	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGNGGA
Pch 133	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
PCH 37	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
PCH 35	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
Ste 63	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
Ste77	CGCTAAAAGCT	TCGGGCGGGA	GTTCCGACGC	GGATTGCGGA
MM9-450F
MM9-450R	-----	-----	-----	-----

	210	220	230	240
07-93	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
53/2	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
CK V	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
H32	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
H37	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
H53	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
H67	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
M1	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
M2	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
H3K_	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
Pch 133	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT

PCH 37	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
PCH 35	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
Ste 63	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
Ste77	ATCGGTGCTG	AGTAGCCTAG	GTTTCGATGGA	GCTGAGGAAT
MM9-450F
MM9-450R	-----	-----	-----	-----

	250	260	270	280
07-93	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
53/2	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
CK V	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
H32	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
H37	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
H53	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
H67	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
M1	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
M2	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
H3K_	TtGACGAAGA	CATTTtTGTT	GAGGTTCTGA	gGGAGAGGGA
Pch 133	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
PCH 37	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
PCH 35	TTGACGAAGA	CATTTtTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
Ste 63	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
Ste77	TTGACGAAGA	CATTTTTGTT	GAGGTTCTGA	GGGAGAGGGA
MM9-450F
MM9-450R	-----	-----	-----	-----

	290	300	310	320
07-93	GAGGGAGAGG	GAGAGGGAGA	GGTTCTTGAT	CGTGAGGGTT
53/2	GAGGGAGAGG	-----	--TTCTTGAT	CGTGAGGGTT
CK V	GAGGGAGAGG	GAGAGGGAGA	GGTTCTTGAT	CGTGAGGGTT
H32	GAGGGAGAGG	-----	--TTCTTGAT	CGTGAGGGTT
H37	GAGGGAGAGG	GAGAGGGAGA	GGTTCTTGAT	CGTGAGGGTT
H53	GAGGGAGAGG	GAGAGGGAGA	GGTTCTTGAT	CGTGAGGGTT
H67	GAGGGAGAGG	GAGAGGGAGA	GGTTCTTGAT	CGTGAGGGTT
M1	GAGGGAGAGG	-----	--TTCTTGAT	CGTGAGGGTT
M2	GAGGGAGAGG	-----	--TTCTTGAT	CGTGAGGGTT
H3K_	GAGGGAGAGG	GAGAGG----	--TTCTTGAT	CGTGAGGGTT
Pch 133	GAGGGAGAGG	-----	--TTCTTGAT	CGTGAGGGTT
PCH 37	GAGGGAGAGG	-----	--TTCTTGAT	CGTGAGGGTT
PCH 35	GAGGGAGAGG	-----	--TTCTTGAT	CGTGAGGGTT
Ste 63	GAGGGAGAGG	-----	--TTCTTGAT	CGTGAGGGTT
Ste77	GAGGGAGAGG	GAGAGG~~~~	~~TTCTTGAT	CGTGAGGGTT
MM9-450F
MM9-450R	-----	-----	-----	-----

	330	340	350	
07-93	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGTA.
53/2	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGG..
CK V	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGTGA	AGTGAAAGA
H32	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGG..
H37	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGtG.
H53	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGG..
H67	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGTGA
M1	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGTGA	AGTGAAAGA
M2	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGTGA	AGTGAAAGA

H3K_	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGTGA	AG.....
Pch 133	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGG---
PCH 37	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGG-..
PCH 35	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGG...
Ste 63	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGTGA	AGTGAAAGA
Ste77	CAGAATCTCC	GGTGAGGTGA	GGTGAGGTGA	AGTGAAAGA
MM9-450F
MM9-450R	-----	-----GA	GGTGAGGTGA	AGTGAAAGA

6. Veröffentlichungen und Tagungsteilnahmen

Veröffentlichungen in Zeitschriften

Buchholz V, **Molnar M**, Wang H, Reich S, Agarwal S, Fischer M, Greiner A (2016) Protection of vine plants against Esca disease by breathable electrospun antifungal nonwovens. *Macromolecular Bioscience* (9): 1391-1397.

Tagungsteilnahmen

Molnar M, Fischer M (2015) A new wound closure for vines made of electrospun polymer fibers as a protection against the Esca disease. *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut* (181):11.

Molnar M, Voegele R; Fischer M (2015): Nachweis und Ausbreitung des Esca-Erregers *Phaeomoniella chlamydospora* im Weinberg. 50. Gartenbauwissenschaftliche Jahrestagung, BHGL-Tagungsband, Freising: 153.

Molnar M, Voegele R; Fischer M (2014) Vinedress: A wound closure for vines made of polymer fibers. *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut* (177): 40

Molnar M, Voegele R; Fischer M (2014): *Esca*: ein neuer Wundverschluss aus elektrogewebenen Polymeren im Weinbau. 49. Gartenbauwissenschaftliche Jahrestagung, BHGL-Tagungsband, Bonn: 159

Molnar M, Voegele R; Fischer M. (2014): *Esca*-Krankheit der Weinrebe: Die Ausbreitung von *Phaeomoniella chlamydospora* im Weinberg. 59. Deutsche Pflanzenschutztagung, Tagungsband, Freiburg: 436

Molnar M, Fischer M (2013); *Polymer fibres as a prophylactic closure for vines*; *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut* (171): 33

Molnar M, Voegele R; Fischer M. (2013) Spreading of the Esca-fungus *Phaeomoniella chlamydospora* in vineyards. XI International Fungal Biology Conference, Karlsruhe: 94

7. Danksagung

Meinem Betreuer Prof. Dr. Michael Fischer danke ich für Möglichkeit, dieses schöne und spannende Projekt zu bearbeiten, für die Betreuung meiner Arbeit und die anregenden Diskussionen.

Danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Vögele für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Lehrstuhl anzufertigen zu können.

Meiner Projektpartnerin Dr. Viola Buchholz an der Universität Bayreuth danke ich für die Einblicke in die Polymerchemie und das Elektrospinning, sowie für die gute und inspirierende Zusammenarbeit im Bereich der Faservliese.

Ein großes Dankeschön geht an das Team des Pflanzenschutzes in Obst- und Weinbau am Julius Kühn-Institut in Siebeldingen; im Besonderen Dagmar d'Aguiar, Anita Kramm und Thomas Gramm für ihre Hilfe in Versuchsaufbauten, Probennahmen und für anregende Diskussionen.

Danken möchte ich auch dem Institut für Rebenzüchtung am Julius Kühn-Institut in Siebeldingen besonders Dr. Eva Zyprian für die Möglichkeit, die dortigen Labore zu nutzen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Doreen Gabriel vom Julius Kühn-Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, für ihre fabelhafte Schulung in der Statistik-Software R und ihre Unterstützung bei kleineren Problemen.

Ich danke meinem Freund Robert Methfessel, der mit mir durch einige Höhen und Tiefen in dieser Arbeit gegangen ist, für seine Unterstützung, seine Motivation, seine Geduld und einen nicht endenden Vorrat an hervorragendem Kaffee.

Meiner Freundin, Dr. Verena Overbeck, danke ich für ihre Anmerkungen, anregende Diskussionen und Motivation in Krisenzeiten.

Danken möchte ich auch Dr. Christoph Methfessel für seine Korrekturen und Anmerkungen.

Und zuletzt danke ich meinen Eltern und meinen Geschwistern, die immer an mich geglaubt haben.

8. Lebenslauf

Name Melanie Franziska Molnar
Geburtsdatum 12. Oktober 1986

SCHULISCHE AUSBILDUNG

06/2012-05/2016 Doktorandin am Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst und Weinbau

10/2009 – 04/2012 Masterstudium „Horticultural Science“
Technische Universität München (TUM)
Masterarbeit: „phenolic compounds in juices containing elderberry and aronia and their antioxidant potential“

10/2006 – 09/2010 Bachelorstudium der „Agrar- und Gartenbauwissenschaften“
Technische Universität München (TUM)
Bachelorarbeit: „Regenerationsprotokoll in-vitro für die Erdbeersorte 'Elsanta““

10/1996 – 06/2006 Gymnasium bei St. Anna, Augsburg
Abschluss Abitur

BERUFSERFAHRUNG IM BEREICH AGRARWISSENSCHAFTEN

08/2016 - heute Enza Zaden Deutschland GmbH; position: Assistant manager herbs

06/2012 - 05/2016 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst und Weinbau

12/2011 - 01/2012 Technische Universität München:
Studentische Hilfskraft am Institut Biotechnologie Gartenbaulicher Kulturen

06/2011 - 11/2011 Technische Universität München:
Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl Systembiologie der Pflanzen

11/2007 - 09/2010 Technische Universität München:
Studentische Hilfskraft im Fachgebiet Obstbau

Landau, 25.05.2018

9. Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

gemäß § 8 Absatz 2 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr.sc.agr.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema: „Epidemiologie des Esca-Erregers *Phaeomoniella chlamydospora* und eine neue Bekämpfungsmöglichkeit mittels eines Wundverschlusses aus elektrogesponnenen Polymeren“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.
4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Landau, 25.05.2018

Melanie Molnar

