UNIVERSITÄT FÜR BODENKULTUR WIEN

Department für Nutzpflanzenwissenschaften

Abteilung Pflanzenschutz

MASTERARBEIT

im Rahmen des Masterstudiengangs

Phytomedizin

zur Erlangung des akademischen Grades

"Diplom-Ingenieur"

Untersuchung des Wirkungsprofils neuer Fungizide gegen den Erreger des Echten Mehltaus der Weinrebe, *Erysiphe necator*

Jérôme Alexander Farhumand-Khunssari

Matrikel-Nr. 01641961

Wien, November 2018

Betreuung:

Dr. Kristin Klappach, Raffaello Zito (BASF SE)

Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Siegrid Steinkellner (BOKU)

Meinen Eltern

Diese Masterarbeit wurde ermöglicht durch BASF SE, Unternehmensbereich Crop Protection

Global Research & Development Agricultural Solutions (67117 Limburgerhof, DE)

INHALTSVERZEICHNIS

KURZ	ZFASSUNG	Ш
ABST	RACT	IV
1	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
1.1	Weinbau und Pflanzenkrankheiten	1
1.2	Die Biologie von Erysiphe necator	2
1.3	Die Bekämpfung von Erysiphe necator	8
1.4	Aufgabenstellung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Versuchsorganismen und -materialien	15
2.1.1	Pflanzenmaterial	15
2.1.2	Pathogen	15
2.1.3	Fungizide	15
2.1.4	Nährmedium	16
2.1.5	Inkubator	16
2.2	Pflanzenanzucht	17
2.2.1	Freiland	17
2.2.2	Gewächshaus	18
2.3	Inokulum und Inokulation	19
2.4	Fungizidapplikation	20
2.4.1	Freiland	20
2.4.2	Gewächshaus	20
2.5	Blattprobenentnahme	21
2.5.1	Freiland	22
2.5.2	Gewächshaus	22
2.6	Mikroskopie	22
2.6.1	Mikroskope und Zubehör	22
2.6.2	Präparation	23

2.6.2.1	Fluoreszenzmikroskopie			
2.6.2.2	Kryo-Umweltrasterelektronenmikroskopie			
2.6.3	Vorinfektionstest			
2.6.4	Keimungstest			
2.6.5	Quantifizierung der Infektionsstrukturen von Erysiphe necator			
2.7	Bildaufnahme und -bearbeitung27			
2.8	Datenauswertung			
3	ERGEBNISSE			
3.1	Residuale Wirkung von neuen Fungiziden gegen Erysiphe necator			
3.2	Protektive Wirkung von neuen Fungiziden gegen Erysiphe necator			
3.3	Kurative Wirkung von neuen Fungiziden gegen Erysiphe necator			
3.4	Pathogenese und Morphologie von Erysiphe necator			
3.4.1	Fluoreszenzmikroskopie 41			
3.4.1.1	Pathogenese von Erysiphe necator unter Normalbedingungen			
3.4.1.2	Morphologie der Infektionsstrukturen von Erysiphe necator unter Fungizideinfluss 45			
3.4.2	Kryo-Umweltrasterelektronenmikroskopie 50			
4	DISKUSSION			
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK			
6	LITERATURVERZEICHNIS			
7	ANHANGV			
7.1	AbbildungsverzeichnisVII			
7.2	TabellenverzeichnisXI			
7.3	Abkürzungsverzeichnis XII			
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG XIV				
DANKSAGUNGXV				

KURZFASSUNG

In dieser Arbeit wurde das Wirkungsprofil von zwei neuen Fungiziden der Firma BASF SE gegen den Erreger des Echten Mehltaus der Weinrebe, Erysiphe necator untersucht. Mittels verschiedener Mikroskopietechniken wurde die residuale, protektive und kurative Wirkung eines neuen Demethylierungs-Inhibitors (DMI) und eines neuen Quinone-outside-Inhibitors (QoI) im Vergleich zu Referenzwirkstoffen der jeweils gleichen Fungizidklasse untersucht. Hierbei konnten signifikante Unterschiede in der Wirkungsart der Fungizide in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt festgestellt werden. Parallel dazu wurden die Pathogenese und Morphologie der Infektionsstrukturen von Konidien des verwendeten Isolats von E. necator an Rebblättern der Rebsorte Riesling mikroskopisch untersucht. Die residuale Wirkung der getesteten Wirkstoffe auf Blattmaterial aus dem Freiland unterschied sich signifikant in Abhängigkeit vom Wirkungsmechanismus. Die Keimhemmungsrate nahm sowohl bei DMI- als auch QoI-Fungiziden bis zwölf Tage nach Applikation ab, wobei QoI-Fungizide generell eine höhere Hemmung erzielten. Es wurden Unterschiede in der Hemmungsintensität deutlich, da DMI-Fungizide im Vergleich zu QoI-Fungiziden eine geringere Keimhemmungsrate aufwiesen. DMI-Fungizide zeigten sowohl bei protektiver als auch kurativer Anwendung eine signifikante Abschwächung des Hyphenwachstums von E. necator. Eine deutliche Entfaltung der Wirkung wurde ab der Entwicklung von Primärappressorien sichtbar. QoI-Fungizide zeigten bei protektiver Applikation eine hohe Hemmung der Keimung, welche signifikant höher war als bei der unbehandelten Kontrolle und DMI-Fungiziden. Bei kurativer Anwendung bewirkten QoI-Fungizide einen Stopp und Rückgang des Hyphenwachstums. In eingehenden mikroskopischen Untersuchungen wurde dokumentiert, welche Infektionsstrukturen von E. necator im Verlauf der Pathogenese ausgebildet werden und wie diese Strukturen durch Fungizideinfluss morphologisch verändert wurden. Neben strukturellen Anomalitäten von Primärappressorien und Hyphen sowie einer fehlerhaften Chitinakkumulation bzw. -verteilung in hyphalen Zellwänden von E. necator unter DMI-Einfluss konnten auch physikalische Schäden durch QoI-Fungizide an Konidien dokumentiert werden. Unbehandelte Konidien von E. necator hingegen entwickelten innerhalb von 72 Stunden nach Inokulation (hpi) erste Hyphenverzweigungen. 144 hpi durchschnitt dichtes Myzel die Wirtsoberfläche und acht Tage nach Inokulation wurden erste Konidiophoren ausgebildet. Den vorliegenden Ergebnissen nach handelt es sich bei "DMI-BASF" höchstwahrscheinlich um einen fungistatischen Wirkstoff, welcher hauptsächlich ab der Ausbildung von Primärappressorien greift. Bei "QoI-BASF" handelt es sich um einen Keimungshemmer, der höchstwahrscheinlich fungitoxisch wirkt. Weiterhin konnte der Einfluss der DMI- und QoI-Fungizide auf Konidien und Infektionsstrukturen von E. necator mikroskopisch dokumentiert werden.

ABSTRACT

Aim of this master thesis was to investigate on the efficacy profile of new fungicides of the company BASF SE against the powdery mildew on grape vine, Erysiphe necator. Using several microscopical techniques, it was possible to analyse the residual, preventive and curative efficacy of a novel demethylation-inhibitor (DMI) and a novel quinone-outside inhibitor (QoI) compared to reference fungicides with the same mode of action. Here, significant differences in the degree of efficacy were found. At the same time, the pathogenesis and morphology of infection structures of conidia of the used isolate of E. necator on vine leaves of the grape variety Riesling were studied microscopically. The residual effect of the tested fungicides differed significantly depending on the mode of action of the considered fungicides. The inhibition of the germination of *E. necator* decreased twelve days after application of both DMIs and QoIs, whereas QoIs still showed a stronger inhibitory effect. Differences between the intensities of inhibition could be shown, because DMIs achieved a lower inhibition of germination. DMIs showed a significant inhibition and reduction of hyphal growth in both preventive and curative applications. A strong effectiveness occurred after the initial formation of primary appressoria. QoIs on the contrary showed a strong preventive inhibitory effect on the germination, which was significantly higher than those of DMIs. In curative application, QoIs caused a stop and reduction of hyphal growth. In detailed microscopical examinations, it was documented which infection structures were built by E. necator during its pathogenesis on vine leaves and how they were altered by fungicide use. Besides structural anomalies of primary appressoria and hyphae as well as a defective accumulation or rather distribution of chitin in hyphal cell walls of *E. necator* caused by DMIs, physical damages caused by QoIs on conidia were documented. In contrast to that, untreated conidia of *E. necator* developed hyphal branches within 72 hours post inoculation (hpi). After 144 hpi, dense mycelia showed up on the leave surface and eight days post inoculation first conidiophores were developed. According to the results, "DMI-BASF" could be an active substance with fungistatic properties, which mainly takes effect after the formation of primary appressoria. "QoI-BASF" could be an inhibitor of the germination of E. necator showing fungitoxic effects. Furthermore, the impact of the DMIs and QoIs on the pathogenesis and morphology of conidia and infection structures of E. necator was documented microscopically.

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

1.1 Weinbau und Pflanzenkrankheiten

Die Weinrebe (*Vitis* ssp.) gehört zu den ältesten und meist genutzten Kulturpflanzen (Pearson & Goheen 1988, Myles et al. 2011, Vivier & Pretorius 2002, Bouby et al. 2013). Aus der Familie der Vitaceae stammend, wurde diese Pflanze erstmals vor 6.000 Jahren kultiviert. Seit dem beschrieb die Weinrebe vom Nahen Osten bis nach Europa hinein einen beispiellosen Siegeszug – eng verflochten mit den verschiedenen Kulturen prägte der Wein fortan die Menschheitsgeschichte. Heutzutage ist die Weinrebe nicht nur kulturell, sondern v. a. auch weltwirtschaftlich eine der bedeutendsten Kulturpflanzen (Lieberei & Reisdorff 2012, Börner 2009). Im Jahr 2016 wurde die Weinrebe weltweit auf mehr als 7 Millionen Hektar angebaut (Anonym M 2018). Historisch betrachtet war der Weinbau jedoch oft existentiell durch Pflanzenkrankheiten bedroht, welche schwere Ertragseinbußen verursachten (Pearson & Goheen 1988). Für den Weinbau sind fünf Epidemien zwischen den Jahren 1845 und 1880 in Europa dokumentiert, die durch die Erreger *Erysiphe necator, Plasmopara viticola* und *Guignardia bidwellii* hervorgerufen wurden und erhebliche wirtschaftliche Schäden verursachten (Oliver & Hewitt 2014).

Einer der nach wie vor wirtschaftlich bedeutendsten Schaderreger ist *E. necator* (Gadoury et al. 2012a, Pearson & Goheen 1988). Im Jahr 1834 wurde das Pathogen erstmals von Schweinitz in Nordamerika beschrieben, wo sich der Schaden an den resistenten amerikanischen Vitis-Arten jedoch noch in Grenzen hielt. Bereits elf Jahre später trat der Echte Mehltau der Weinrebe erstmals im englischen Margate auf. Die Namensgebung geht auf den englischen Erstbeobachter, einem Gärtner namens Tucker zurück: Oidium tuckeri Berk. (Pearson & Goheen 1988). Wenige Jahre später, 1847, trat E. necator erstmals in Frankreich auf. Vermutlich brachte der Import kontaminierter amerikanischer Rebstöcke die Krankheit aus der neuen Welt nach Europa (Pearson & Goheen 1988, Gadoury et al. 2012a, Oliver & Hewitt 2014). Bis 1854 brach die französische Weinproduktion um 80 % ein. Englischen Gärtnern zufolge war Schwefel als Gegenmittel geeignet, jedoch fand das erste tatsächlich effektiv wirksame Schwefelpräparat erst 1855 seinen Einsatz gegen den neuen Schaderreger (Agrios 2005, Börner 2009, Oliver & Hewitt 2014). Seit dem Erstauftritt in England und Frankreich breitete sich E. necator weltweit auf alle Weinbauregionen aus und stellt auch heute noch eine große Herausforderung für die Gesellschaft, Forschung und Industrie dar (Gadoury et al. 2012a, Pearson & Goheen 1988). Neben der genauen Kenntnis der Biologie dieses Pathogens ist auch ein fundiertes Verständnis über die Mechanismen von Wirkstoffen für den modernen Pflanzenschutz unerlässlich.

1.2 Die Biologie von Erysiphe necator

Der Ascomycet Erysiphe necator (Schw.) Burr. (syn. Uncinula necator (Schw.) Burr.) gehört der Ordnung der Erysiphales, der Familie der Erysiphaceaen und Gattung Erysiphe an (Oliver & Hewitt 2014, Poehling & Verreet 2013, Gadoury et al. 2012a). Die Familie der Erysiphaceaen wird gemeinhin auch als "Echte Mehltaupilze" bezeichnet, welche alle einen obligat biotrophen Lebenszyklus aufweisen. Typisch für echte Mehltaupilze ist die Penetration der lebenden Wirtskutikula durch Sporen und die Bildung eines Haustoriums, welches dem Pathogen Nährstoffe aus seinem Wirt bereitstellt. Das meist auf der Blattoberseite wachsende Myzel produziert zahlreiche Konidien, wobei auf der Wirtsoberfläche ein mehlähnlicher Belag sichtbar wird (Abb. 1 A). Diesem Erscheinungsbild ist der Trivialname der Erysiphaceaen zu verdanken (Glawe 2008, Gadoury et al. 2012a). E. necator ist ein obligater Parasit und kommt ausschließlich auf Pflanzen der Familie Vitaceae wie Vitis, Cissus, Parthenocissus und Ampelopsis vor. Der wichtigste Wirt sind Vitis-Spezies, da der Pilz v. a. bei den höchstanfälligen europäischen Rebsorten ein sehr hohes Schadpotential besitzt (Gadoury et al. 2012a, Pearson & Goheen 1988). V. vinifera ssp. vinifera cv. Chardonnay, cv. Kerner und cv. Portugieser sind hierbei erwähnenswerte hochanfällige Sorten. Weiterhin sind die Spezies V. davidii, V. betulifolia und V. pubescens höchst anfällig. Weniger gefährdet sind bspw. Burgundersorten oder amerikanische Vitis-Spezies wie V. labrusca oder V. cinerea (Pearson & Goheen 1988). Ohne Gegenmaßnahmen reduziert E. necator Wachstum und Ertrag der Weinrebe, die Qualität der Endprodukte sowie die Winterhärte der Rebstöcke (Pearson & Goheen 1988). Die typische Symptomausprägung einer mit E. necator infizierten Weinrebe ist das augenscheinlich sichtbare, weiße Pilzmyzel, welches im Frühjahr ab BBCH 13 auf der oberen Blattseite ausgebildet werden kann (Abb. 1 A). Je nach Sorte wird neben der Blattoberseite auch die Blattunterseite befallen, wobei silbrig glänzende Flecken und dunkel verfärbte Blattadern sichtbar werden. Auf der Blattoberseite können wie bei P. viticola ölartige Aufhellungen auftreten (Pearson & Goheen



Abb. 1. Charakteristische Symptome von *Erysiphe necator*: Myzel auf der adaxialen Blattseite einer Weinrebe (cv. Chardonnay) (A), Myzel auf reifenden Beeren (cv. Chardonnay) (B) (BASF-interne Quelle 2018) und Samenbruch (C) (Anonym E 2016).

1988). Werden juvenile Blätter infiziert, so deformieren diese (Abb. 4 A). Bei einem Befall grüner Triebe verkorken diese rasch, wobei dunkle Flecken typische Indikatoren sind. Die Blätter verfärben später bräunlich und fallen ab. Beeren werden ebenfalls vom weißlichen Myzel überwachsen und verhärten später. Eine Infektion der Trauben mit E. necator kann bis zum Beginn der Zuckereinlagerung (BBCH 85) erfolgen. Wird die Beerenepidermis im Laufe der Infektion zerstört, platzt die Beere auf und die Samen treten ans Tageslicht, woraufhin die Wunde verkorkt und Sauerfäulen folgen (Abb. 1 C). Diese Erscheinung wird gemeinhin auch als "Samenbruch" bezeichnet (Pearson & Goheen 1988). Mit E. necator infizierte Beeren sind anfälliger für Sekundärinfektionen durch Botrytis cinerea, Penicillium-Arten oder Essigfäule, was in der Folge besonders fatal für die Produktqualität ist. Schäden durch Insektenfraß werden ebenfalls gesteigert, da in der Beere während der Mehltauinfektion verstärkt Ethanol, volatiles Ethylacetat und Essigsäure akkumuliert werden. Weiterhin sinkt die Qualität der späteren Endprodukte bereits bei einer leichten Infektion von 3-5 % massiv ab (Pearson & Goheen 1988, Gadoury et al. 2007). Der Blattschaden und die spätere Entlaubung reduzieren die photosynthetische Leistung der Weinrebe und beeinflussen somit deren Ertragsbildung drastisch, da neben der veränderten Konzentration der Inhaltsstoffe auch das Gewicht der Beeren gemindert wird. Schon eine leichte Infektion durch E. necator kann den später produzierten Wein ungenießbar machen, da der Säuregehalt in den Beeren rapide ansteigt und es zu einem Absinken von 3-Mercaptohexanol kommt. Weiterhin wird die Qualität von Tafeltrauben durch Vernarbung und Verfärbung stark herabgesetzt und deren Lagerfähigkeit durch Infektionen der Traubenstiele vermindert (Calonnec et al. 2004, Gadoury et al. 2007).

E. necator ist ein heterothallischer Pilz mit bipolarem Kreuzungsmechanismus, d. h., dass die Ausbildung der sexuellen Fruchtform nur dann erfolgt, wenn kompatible, konträre Kreuzungstypen miteinander kombiniert werden (Evans et al. 1997). Die von asexuellen und sexuellen Sporen von E. necator ausdifferenzierten Appressorien adhärieren aufgrund ihrer Form und der Produktion von löslichen, adhäsiven Substanzen an der Wirtsoberfläche (Heintz & Blaich 1990). Cutinasen und Esterasen, welche in der extrazellulären Matrix der Sporen produziert werden, verbessern die Adhäsionsfähigkeit durch Änderung der Oberflächenhydrophobie der Wirtsoberfläche. In dieser Eigenschaft ähnelt E. necator also anderen Echten Mehltaupilzen, welche zusätzlich durch eigene synthetisierte und sekretierte Enzyme noch in der Lage sind, die Kutikula und das Zellwandmaterial ihrer Wirte zu zersetzen. Bei E. necator wird die Wirtskutikula jedoch rein mechanisch mittels appressorischer Penetrationshyphe durchstoßen, obgleich auch hierbei zu mindestens ein Zusammenspiel mit Enzymen vermutet wird (Rumboltz et al. 2000, Heintz 1986, Heintz & Blaich 1990, Gadoury 2012a). Konidien von E. necator adhärieren bei Inokulation auf der Kutikula, keimen in Abhängigkeit von Isolat und Wirt bspw. innerhalb 4 h nach Inokulation aus und bilden einen Keimschlauch. 6-8 h nach Inokulation entwickelt sich ein Primärappressorium (Pearson & Goheen 1988, Leinhos et al. 1997). 20 h nach Inokulation entwickelt sich die Primärhyphe. Diesem Prozess folgen dann im Zeitverlauf etliche weitere neu gebildete Hyphen. 24-48 h nach Inokulation werden hyphale Appressorien ausgebildet (Gadoury et al. 2012a, Leinhos et al. 1997). Die Hyphen verzweigen sich 72 h nach Inokulation und nach vier Tagen hat sich das Myzel von E. necator bereits weit auf der Wirtsoberfläche verteilt und penetriert mittels einer Vielzahl von Appressorien an zahlreichen Stellen die Wirtskutikula (Leinhos et al. 1997). Ein Appressorium von E. necator hat einen Durchmesser von bis zu 10 µm und formt eine Penetrationshyphe von ca. 3 µm Durchmesser, mit welcher die Wirtskutikula mechanisch penetriert wird. Wie andere Echte Mehltaupilze auch, erlangt E. necator Zugang zu den Nährstoffen seines Wirtes, indem direkt nach der Penetration der Kutikula in der epidermalen Zellmembran des Wirtes ein globuläres Haustorium gebildet wird (Gadoury et al. 2012a, Heintz 1986, Heintz & Blaich 1990, Pearson & Goheen 1988). Dieses Haustorium besteht aus einem kernhaltigen Zentralkörper mit fingerähnlichen Lappen, die in die Matrix eingebettet sind. Die extrahaustorielle Membran wird aus dem Plasmalemma des Wirtes geformt. Infizierte Zellen und Nachbarzellen vom Wirt können sich hierbei durch eine Verdickung der Zellwände verteidigen – durch Bildung einer sogenannten Papille. Diese Papille besteht aus verschiedenen Schichten Kohlenhydraten, phenolischen Substanzen und Silicat im Verbund mit einer zellwandeigenen Peroxidaseaktivität. Bildlich gesprochen dienen die Papillen der Abschottung von Wirtszellen durch eine Verdickung der Zellwände, wodurch das Pathogen sich nicht weiter ausbreiten kann. Bei verschiedenen Rebsorten konnten auch hypersensitive Reaktionen beobachtet werden, wobei infizierte Zellen und Zellgruppen absterben können, um dem obligat biotrophen Pathogen seine Lebensgrundlage zu nehmen (Heintz & Blaich 1990). Nach erfolgter Wirtsbesiedlung werden ungefähr fünf Tage nach Inokulation aus dem oberflächlich gewachsenem Myzel in großer Zahl septierte Konidiophoren gebildet, welche senkrecht von der Wirtskutikula abstehen und 10-400 um hochwachsen können. Die Hyphen im Myzel sind septiert, hyalin und im Durchmesser ca. 4-5 µm dick. Jede Konidiophore produziert im 24 h-Rhythmus eine einzellige, hyaline, zylindrisch-ovale Konidie (27-47 x 14-21 µm). Nach ungefähr sieben Tagen lösen sich die ersten Konidien von ihren Konidiophoren (Pearson & Goheen 1988, Leinhos et al. 1997). An den Konidiophoren können sich bei ausreichender Windstille Konidienketten bilden, an deren endständiger Spitze die älteste Konidie befindlich ist (Abb. 2 A) (Pearson & Goheen 1988). Diese Konidienketten werden unter Freilandbedingungen jedoch selten beobachtet (Gadoury et al. 2012a).

E. necator überwintert in der asexuellen Form als ruhendes Myzel in im Vorjahr infizierten Knospen oder in der sexuellen Form als Chasmothecien, welche beide als Quelle für Primärinokulum dienen (Abb. 3). Die Fruchtkörper werden auf Beeren, Blättern, Rebstöcken und Trieben zumeist gegen Ende der Vegetationsperiode gebildet (Abb. 1 B) (Pearson & Gadoury 1987, Pearson & Goheen 1988). Unter wärmeren Bedingungen und im Gewächshaus kann *E. necator* im Myzel und als Konidie direkt auf dem grünen Pflanzenmaterial der Weinrebe den Winter bis zur folgenden Saison überleben (Pearson & Goheen 1988). Chasmothecien entstehen v. a. in wärmeren Anbaugebieten, obgleich Steinkellner (1994) nachwies, dass die Chasmothecien von *E. necator* auch in österreichischen Weingärten verstärkt auftreten und auch dort eine Quelle für Primärinokulum sind. Die Chasmothecien bestehen aus einem



Abb. 2. Konidiophoren von *Erysiphe necator* 8 dpi mit reifenden Konidien (A) (Eigene Aufnahme 2018). Zwei reife, dunkelbraun melanisierte Chasmothecien von *E. necator* (B) (Anonym E 2016). Das rechte Chasmothecium bricht auf und entlässt Asci. Deutlich erkennbar sind die ausdifferenzierten Appendices der Fruchtkörper mit den charakteristisch eingerollten Endstücken.

Ascokarp, welches mehrere ovale Asci beinhaltet, in dem jeweils 2-8 Ascosporen ausdifferenziert werden. Die Appendices am äußeren Ascokarp sind äquatorial inseriert oder auf der Fruchtkörperoberseite angesiedelt und am Ende spiralig eingerollt oder hakenförmig gebogen (Pearson & Goheen 1988, Börner 2009, Poehling & Verreet 2013). Appendices werden dann nach ungefähr drei Wochen ausgebildet. Chasmothecien werden einen Tag nach dem Kontakt zwischen Hyphen der kompatiblen Kreuzungstypen initiiert und sind nach drei Tagen ausdifferenziert. Die Chasmothecien erreichen zu diesem Zeitpunkt einen Durchmesser von bis zu 40 µm und verwachsen mit den Hyphen der Mehltaukolonie. Nach vier Wochen hat das Chasmothecium seine morphologische Reife erreicht, ist stark melanisiert und dadurch von dunkelbrauner Farbe (Abb. 2 B). Die physiologische Reife wird jedoch erst später, nach mehreren Monaten, erreicht. Hierdurch können die Ascosporen im darauffolgenden Frühjahr direkt zu Beginn der Vegetationsperiode die aus der Dormanz erwachten Weinreben befallen (Gadoury & Pearson 1988). Die Ascosporen verteilen sich zu diesem Zeitpunkt im Frühjahr aus den reifen Chasmothecium heraus, sobald die Fruchtkörper von Regen, Nebel oder künstlicher Bewässerung befeuchtet werden. Bei Feuchtigkeit zerplatzen die Fruchtkörper und legen die Asci frei, welche sich vergrößern und aus dem Ascokarp ins Freie stoßen (Abb. 2 B). Über die Spitze der bitunicaten Asci werden die Ascosporen dann herausgedrückt (Gadoury & Pearson 1990a, Grove 2004). Für die Verteilung der Ascosporen ist zwar freies Wasser notwendig, eine Blattbenetzung durch tropfbares Wasser ist jedoch nicht für die Keimung und weitere Wirtsbesiedlung erforderlich – allerdings auch nicht schädlich. Die Ascosporen keimen bei Temperaturen über 10 °C und relativ geringem Niederschlag (2-3 mm) optimal aus und penetrieren dann wie bereits beschrieben die Wirtskutikula (Gadoury & Pearson 1990a, b).



Abb. 3. Der Lebenszyklus von *Erysiphe necator*. Nach der Überwinterung in ruhenden Knospen oder Chasmothecien infiziert *E. necator* durch Konidien und Ascosporen im folgenden Frühjahr junges, grünes Blattmaterial der Weinrebe. Im Spätsommer werden junge Knospen bzw. Beeren infiziert und Chasmothecien ausgebildet (verändert nach Pearson & Goheen 1988).

Die asexuelle Entwicklung von *E. necator* unterscheidet sich vom obig geschilderten sexuellen Entwicklungszyklus in einigen Punkten. So können die in der vorigen Saison infizierten Rebknospen im Frühjahr zu Beginn der Vegetationsperiode sogenannte Zeigertriebe ausbilden (Abb. 3, 4 B). Das ruhende Myzel geht sodann in eine schnelle Wachstumsphase über, wobei Licht ein wichtiger Faktor der weiteren Pathogenese ist. Zwischen dem 3- und 6-Blattstadium der Weinrebe (BBCH 13-16) entstehen dann an den größtenteils komplett mit Myzel überwachsenen Zeigertrieben zahllose Konidiophoren. Sobald die Infektionsstrukturen sporulieren, werden die Konidien durch Wind im Pflanzenbestand verteilt. Die Konidien infizieren bei umliegenden Weinreben das grüne Pflanzenmaterial. Für den obligaten Parasiten ist die Besiedlung von lebendem, grünem Blattmaterial überlebenswichtig (Anonym C 2010, Gadoury et al. 2012a, b; Pearson & Goheen 1988). Tropfbares Wasser führt im Gegensatz zum sexuellen Entwicklungszyklus zu einer sinkenden Keimrate und einem Platzen der Konidien, da der Turgordruck steigt (Gadoury & Pearson 1990b).

Nach erfolgter Infektion entwickelt sich *E. necator* bei trockener Luft, einer relativen Luftfeuchtigkeit von unter 80 % und bewölktem Wetter optimal. Wie bei den meisten Echten Mehltaupilzen spielt das Klima auch für *E. necator* eine essentielle Rolle (Pearson & Goheen 1988). Temperaturen von 22-26 °C bei leichtem Tau sind für die Pathogenese von Konidien sehr vorteilhaft. Das Temperaturoptimum liegt hier bei 24 °C. Ab 35 °C wird die Keimung der Konidien inhibiert und bei 40 °C werden die Konidien abgetötet (Carroll & Wilcox 2003, Delp 1954, Chellemi & Marois 1991, Fessler & Kassemeyer 1995). In Feldversuchen wurde festgestellt, dass Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Licht die wichtigsten limitierenden Faktoren einer Mehltauinfektion an der Weinrebe sind (Delp 1954, Pearson & Goheen 1988). Bei einer Luftfeuchtigkeit von 50-80 %, Temperaturen von 20-30 °C und diffusem Lichteinfall durch einen bewölkten Himmel keimen Konidien innerhalb von 24 h aus. Nach erfolgter Wirtsbesiedlung sporuliert der Pilz nach einer Pathogenese von ein bis zwei Wochen. Die Zeit zwischen Infektion und Sporulation kann bei 23-30 °C weniger als eine Woche dauern, wohingegen sich diese Phase bei Temperaturen von 7 °C um bis zu vier Wochen verlängern kann (Doster & Schnathorst 1985, Pearson & Goheen 1988). Neugebildete Konidien werden v. a. durch Wind an neues Pflanzenmaterial getragen. Werden keine Gegenmaßnahmen getroffen, so wiederholt sich der asexuelle Infektionszyklus (Abb. 3) viele Male über die gesamte Vegetationsperiode hinweg, wodurch es zu schweren Ertragseinbußen kommen kann. Bereits fünf Wochen nach dem Erscheinen der ersten Konidiengeneration kann eine unbehandelte Mehltauinfektion schlimmste Folgen für Weingärten nach sich ziehen. Das Primärinokulum für die folgende Saison sollte in jedem Fall verringert werden, da hierdurch die Anzahl infizierter Knospen und gebildeter Chasmothecien niedrig gehalten wird. Demnach ist es wichtig, in der jeweils aktuellen Saison das Ausmaß vom Vorjahresbefall zu kennen, um die Menge an Primärinokulum im Frühjahr abschätzen zu können (Pearson & Goheen 1988). Das Stielgerüst der Weinrebe wird von E. necator häufig vor der Blüte – wenn die Gescheine voll entwickelt sind (BBCH 57) – besiedelt. Junge Beeren werden v. a. während und nach der Blüte (BBCH 61-73) vom Pathogen befallen. Die Anfälligkeit der Beeren sinkt jedoch ab, sobald die Beeren schrotkorngroß sind (BBCH 73). Ab Beginn der Fruchtreife, wenn die Zuckereinlagerung startet (BBCH 81), entwickeln die Beeren eine Resistenz gegen E. necator (Pearson & Goheen 1988). In der Praxis können die Beeren der Weinrebe zwei bis



Abb. 4. Wuchsdeformationen an jüngsten Blättern der Weinrebe, verursacht durch *Erysiphe necator* (A) (Anonym D 2018). Zeigertriebe sind im Frühjahr oftmals Indikator einer frischen Mehltauinfektion bei Weinreben, Quelle für Primärinokulum von Konidien von *E. necator* und normalerweise komplett mit weißlichem Myzel überzogen (B) (Anonym C 2010).

drei Wochen nach Infektionsbeginn eine Resistenz gegen *E. necator* entwickeln. Da der Zeitraum bis zum Erreichen dieser Resistenz mehr als eine Woche dauern kann, ist die Beere dem Pathogen in dieser Phase nahezu schutzlos ausgeliefert – so führt bspw. ein auftretender Samenbruch zu Mindererträgen und hohen Qualitätseinbußen in den Endprodukten (Pearson & Goheen 1988). Gerade in dieser Phase bedarf es daher dem Schutz durch Pflanzenschutzmittel (Ficke et al. 2003, Gadoury et al. 2003). Bei den meisten Rebsorten sind neben den Beeren juvenile Blätter hochanfällig für eine Mehltauinfektion. Die Anfälligkeit gegenüber *E. necator* sinkt zwar mit dem Blattalter, jedoch gibt es hier keine vollständige Altersresistenz und so bleiben die Blätter der Weinrebe ein ständiger Infektionsherd und Quelle für Inokulum (Doster & Schnathorst 1985, Gessler & Stumm 1984, Hering et al. 1993).

1.3 Die Bekämpfung von Erysiphe necator

Bekämpfungsmaßnahmen sind in Anbetracht der aggressiven Natur von *E. necator* in Weingärten nicht wegzudenken. Die Möglichkeiten der Winzer hierbei sind ebenso vielfältig wie wichtig – dank des integrierten Pflanzenschutzkonzeptes stehen heutzutage gut funktionierende und ineinandergreifende Bekämpfungsmaßnahmen zur Auswahl. Prinzipiell müssen für einen erfolgreichen Pflanzenschutz im Rebbau viele Aspekte berücksichtigt werden. Zum einen gilt es, den rechtlichen Rahmen einzuhalten – und zum anderen ist die Wirksamkeit der Pflanzenschutzmaßnahmen sicherzustellen, wobei das Resistenzmanagement zunehmend an Bedeutung gewinnt. Die Wahl effektiver Pflanzenschutzmittel wie z. B. fungizider Wirkstoffe ist hierbei sehr wichtig. Weiterhin ist der ökonomische Aspekt von großer Bedeutung, da bspw. entstehende Kosten gering gehalten werden sollten (Gölles & Märki 2018).

Winzer können z. B. auf resistente bzw. tolerante Rebsorten zurückgreifen. Typisch wären Kreuzungen von *V. vinifera* mit Kombinationen amerikanischer Spezies wie *V. labrusca* oder *V. aestivales* (Pearson & Goheen 1988, Gadoury et al. 2012a, Leinhos et al. 1997). In mehreren Ländern laufen derzeit Forschungen über pilzwiderstandsfähige Rebsorten, welche in der Praxis angebaut werden können. Hervorzuhebende Beispiele wären die Sorten Cal 6-04 (Sauvignon blanc x Riesling x Resistenzpartner) und Helios (Merzling x (Seyve-Villard 12-481 x Müller-Thurgau)), welche eine sehr gute bzw. gute Resistenz gegen *E. necator* aufweisen (Anonym H 2018). Generell bleibt es jedoch nach wie vor schwierig, resistente Sorten zu züchten und gleichzeitig die bestehenden önologischen Qualitäten aufrechtzuerhalten (Oliver & Hewitt 2014). Zusammen mit dem richtigen Management des Weingartens, zu welchem die Standortwahl und Verringerung der Bestandesdichte gehören, kann bereits vor der ersten Spritzung viel gegen eine Mehltauinfektion getan werden. Genauer betrachtet ist es zur Prävention einer Mehltauinfektion wichtig, gut durchlüftete Bestände mit offenem Blätterdach aufzubauen, die nicht zu stark beschattet werden und eine gute Sonnenexposition aufweisen. Durch Kulturmaßnahmen,

wie dem Absammeln von Falllaub im Herbst, kann man generell die Schwere einer Mehltauinfektion reduzieren und zugleich den Wirkungsgrad chemischer Wirkstoffe erhöhen (Pearson & Goheen 1988).

Bis Ende der 1980er Jahre kannte man in der biologischen Bekämpfung von *E. necator* hauptsächlich die zwei Mykoparasiten *Ampelomyces quisqualis* und *Tilletiopsis* sp., wobei letzterer lediglich auf Anwendungen im Gewächshaus beschränkt blieb. Im Freiland brachten biologische Präparate keine ausreichende Leistung (Pearson & Goheen 1988). Seit der Jahrtausendwende wurde die Forschung auf diesem Gebiet weiter vertieft und mikrobielle Organismen, wie *Bacillus amyloliquefaciens* (Li et al. 2015, Maachia et al. 2015) oder *Pseudozyma aphidis* (Gafni et al. 2015), traten auf den Plan. Der Wirkungsmechanismus dieser Organismen liegt hauptsächlich in der Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum wie auch der Produktion fungitoxischer Metabolite. In der Praxis bleiben biologische Pflanzenschutzmittel gegen *E. necator* jedoch weitestgehend hinter dem Wirkungsgrad anorganischer oder organischer Fungiziden zurück. Daher liegt die effektivste Bekämpfungsmöglichkeit nach wie vor im Einsatz chemischer Fungizide – eingebettet im Konzept des integrierten Pflanzenschutzes (Pearson & Goheen 1988).

Im integrierten Weinbau spielen organische und anorganische Fungizide die bedeutendste Rolle in der Bekämpfung von *E. necator*. Insgesamt sind in Deutschland zur Bekämpfung von *E. necator* 19 Wirkstoffe aus sieben FRAC-Gruppen zugelassen, wobei alleine fünf Gruppen zu den organischen Fungiziden zählen (Tab.1). Aufgrund der Entwicklung von Resistenzen bei organischen Fungiziden wurde 1981 eine Spezialistengruppe namens Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) gegründet. Repräsentanten der wichtigsten forschenden Pflanzenschutzmittelproduzenten wie Syngenta AG, Bayer AG und BASF SE erarbeiteten eine Klassifizierung fungizider Wirkstoffe, welche fortlaufend aktualisiert wird. Weiteres Ziel des FRAC ist die firmenübergreifende Erarbeitung von Resistenzmanagement-Strategien und -Empfehlungen (Börner 2009, Anonym A 2018).

Anorganische Fungizide sind von großer Bedeutung bei der Bekämpfung von *E. necator* (Pearson & Goheen 1988). Hierbei handelt es sich sowohl um Multisite-Inhibitoren, welche zelleigene metabolische Prozesse von *E. necator* hemmen, als auch um einen nicht klassifizierten Wirkstoff mit unbekanntem Wirkungsmechanismus (Anonym B 2018). In Deutschland und Österreich sind derzeit drei anorganische Wirkstoffe für die Bekämpfung des Echten Mehltaus der Weinrebe zugelassen: Kaliumhydrogencarbonat, Kupferoktanoat und Schwefel. Diese Fungizide können bei Tafel- und Keltertrauben verwendet werden (Anonym A 2018, Anonym B 2018, Anonym F 2018). Kaliumhydrogencarbonat wird als wasserlösliches Pulver appliziert. Der Wirkungsmechanismus ist von der FRAC bislang nicht klassifiziert worden (Anonym A 2018, Anonym B 2018). Daneben kommen weltweit v. a. Schwefelpräparate wie Kumulus WG® zum Einsatz (Anonym A 2018). Historisch betrachtet war Schwefel das erste wirksame Fungizid gegen *E. necator* und wirkt sowohl protektiv als auch kurativ. Das Element

wird als Staub oder wasserlösliches Pulver bzw. -dispergierbares Granulat appliziert. In trockenen Regionen wird Schwefelstaub bevorzugt verwendet und in niederschlagsreicheren Regionen wasserlösliches Schwefelpulver. Die fungizide Wirkung von Schwefel ist v. a. auf seine Dampfphase zurückzuführen. Die optimale Temperatur einer Schwefelapplikation liegt zwischen 25-30 °C. Unter 18 °C ist der Wirkungsgrad gering und über 30 °C steigt die Gefahr einer phytotoxischen Reaktion. Bei höherer Luftfeuchtigkeit nimmt der Wirkungsgrad von Schwefel ab (Pearson & Goheen 1988, Börner 2009). Das dritte zugelassene anorganische Fungizid ist Kupferoktanoat, welches als Suspensionskonzentrat verwendet wird. Der Wirkstoff ist auch gegen den Erreger *P. viticola* wirksam (Anonym A 2018). Generell sind Kupferpräparate zwar wirksam, werden jedoch vergleichsweise nicht so umfangreich gegen *E. necator* angewandt wie Schwefel (Pearson & Goheen 1988).

FRAC-Gruppe	FRAC-Code und Target	Gruppenname	Wirkstoff
Gruppe B: Cytoskelett & Motorproteine	Gruppe B6, Code 50 : Ak- tin, Myosin, Fimbrin	Arylphenylketone	Metrafenon Pyriofenon
Compace Description	Gruppe C2, Code 7: Kom- plex II, Succinat-Dehydro- genase	SDHI-Fungizide	Boscalid Fluxapyroxad Fluopyram
Gruppe C: Respiration	Gruppe C3, Code 11 : Komplex III, Cytochrom b/c ₁ -Komplex an Qo-Seite	QoI-Fungizide	Azoxystrobin Kresoxym-methyl Trifloxystrobin
Gruppe E: Signaltrans- duktion	Gruppe E1, Code 13: Un- bekanntes Target	Azanaphtalene	Quinoxyfen Proquinazid
Gruppe G : Ergosterol- biosynthese	Gruppe G1, Code 3 : C14- Demethylase in Ergosterol- biosynthese	DMI-Fungizide	Tebuconazol Myclobutanil Penconazol Difenoconazol Tetraconazol
Gruppe M: Multisite-	Code M1: Multiple Targets in metabo- lischen Prozessen	Anorganische Stoffe	Kupferoktanoat
Inhibitoren	Code M2: Multiple Targets in metabo- lischen Prozessen	(Elektrophile)	Schwefel
Gruppe U: Unbekann- ter Wirkungsmechanis- mus	Code U6 : Unbekannt	Phenylacetamide	Cyflufenamid
Gruppe NC: Nicht klas- sifiziert	Code NC: Unbekannt	Anorganische Salze	Kaliumhydrogen- carbonat

Tab. 1. In Deutschland gegen *Erysiphe necator* im Weinbau zugelassene anorganische und organische Fungizide (verändert nach Anonym B 2018, Anonym A 2018, Börner 2009).

Die FRAC-Gruppe B umfasst Wirkstoffe, welche das Cytoskelett und Motorproteine von *E. necator* angreifen. Aus der Gruppe der Arylphenylketone (Gruppe B6) sind die Wirkstoffe Metrafenon und Pyriofenon zu nennen. Beide Wirkstoffe greifen die Proteine Aktin, Myosin und Fimbrin an, werden als Suspensionskonzentrate gegen *E. necator* appliziert und sind in Deutschland zugelassen. Gemäß FRAC besteht ein mittleres Resistenzrisiko (Anonym A 2018, Anonym B 2018).

Die Hemmstoffe der oxidativen Phosphorylierung von *E. necator* (Gruppe C) (Abb. 5, a, b), umfassen die Wirkstoffe Boscalid, Fluxapyroxad und Fluopyram. Die Wirkstoffe haben den Komplex II in der pilzlichen Atmungskette als Target (Tab. 1). Hier wird in der mitochondrialen Matrix das Enzym Succinat-Dehydrogenase inhibiert. Wirkstoffe jener Teilgruppe (Gruppe C2) werden als Succinat-Dehydrogenase-Inhibitoren (SDHI) bezeichnet. Laut FRAC besteht ein mittleres bis hohes Risiko einer Resistenz durch Targetmutation und es ist Resistenzmanagement notwendig. Wirkstoffe der anderen Teilgruppe der Respirations-Inhibitoren (Gruppe C3) wirken im Komplex III der oxidativen Phosphorylierung von *E. necator*, indem der Cytochrom b/c₁-Komplex an der äußeren Quinon-Seite im Intermembranraum gehemmt wird. Für den deutschen Weinbau zugelassene Quinone-Outside-Inhibitoren (QoI) sind Kresoxym-methyl, Azoxystrobin und Trifloxystrobin. In dieser Teilgruppe besteht laut FRAC ein hohes Resistenzrisiko durch Mutationen am Wirkstofftarget im Gen von Cytochrom b bei der Aminosäure G143A oder F129L. Zwischen allen Wirkstoffen der QoI-Fungizide sind mittlerweile Kreuzresistenzen festgestellt worden (Anonym A 2018, Anonym B 2018, Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015).



Abb. 5. Die pilzliche Atmungskette: Über die oxidative Phosphorylierung beziehen Pathogene ihre ATP-Versorgung. Dieses System kann bei *Erysiphe necator* an zwei Stellen durch QoI- (a) und SDHI-Fungizide (b) zerschlagen werden (verändert nach Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015).

Die dritte FRAC-Gruppe umfasst die Inhibitoren der pilzlichen Signaltransduktion (Gruppe E), wobei das genaue Target und der Wirkungsmechanismus unbekannt sind (Tab. 1). Die zwei hier zugelassenen Azanaphtalene (Gruppe E1) sind Quinoxyfen und Proquinazid. Bei Quinoxyfen besteht laut FRAC ein mittleres Resistenzrisiko (Anonym A 2018, Anonym B 2018, Börner 2009).

Der Gruppe G gehören Hemmstoffe der pilzlichen Ergosterolbiosynthese an (Tab. 1). Demethylierungs-Inhibitoren (DMI) wie 1,2,4-Triazole (Gruppe G1) hemmen das Enzym CYP51 in Cytochrom P450 und verhindern dadurch die Demethylierung von Lanosterol oder 24-Methylendihydrolanosterol an der Position C14 (Abb. 6, a). Hierdurch wird die Biosynthese von Ergosterol abgeschnitten. Gegen *E. necator* im Weinbau zugelassene DMI-Fungizide sind Tebuconazol, Myclobutanil, Penconazol, Difenoconazol und Tetraconazol. Es besteht ein mittleres Resistenzrisiko durch Targetmutationen im Gen von CYP51, bspw. bei den Aminosäuren V136A, Y137F, A379G oder beim CYP51-Promoter. Mittlerweile wurden Kreuzresistenzen innerhalb der Gruppe der DMI-Fungizide beobachtet (Anonym A 2018, Anonym B 2018, Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015). Generell wird für alle hier aufgeführten FRAC-Gruppen ein Resistenzmanagement empfohlen (Anonym B 2018).



Abb. 6. Die Biosynthese von Ergosterol. Aus Lanosterol wird über mehrere Zwischenschritte hinweg Ergosterol synthetisiert. Die Ergosterolbiosynthese kann bei *Erysiphe necator* durch DMI-Fungizide (a) zerschlagen werden (verändert nach Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015).

Für Österreich sieht die Liste der gegen *E. necator* zugelassenen Wirkstoffe im Weinbau 2018 bis auf wenige Unterschiede gleich aus. So sind die Wirkstoffe Fluxapyroxad, Azoxystrobin und Proquinazid in Österreich nicht zugelassen. Dafür finden in Österreich Spiroxamine, Meptyldinocap und COS-OGA – ein natürlicher Wirkstoff bestehend aus chito-Oligosacchariden und oligo-Galakturonsäuren – ihre Anwendung, welche in Deutschland nicht gegen *E. necator* zugelassen sind (Anonym A 2018, Anonym F 2018).

Aus den verschiedenen gegen E. necator zugelassenen Fungizidklassen sind DMI- und QoI-Fungizide in der Praxis derzeit ein integraler Bestandteil von Fungizidbehandlungen (Anonym E 2016, Gölles & Märki 2018). Generell hängt das Wirkungsprofil von Fungiziden von zahlreichen Faktoren ab. Neben abiotischen Einflüssen wie dem Klima, spielen biotische Faktoren wie die Wirt-Pathogen-Interaktion eine wichtige Rolle, da sie a priori die Ausprägung eines Befalls und somit auch die Wirkung und Applikationsmenge von Wirkstoffen beeinflussen können – bspw. durch eine möglich vorhandene, wirtseigene Resistenz gegen das jeweilige Pathogen (Pearson & Goheen 1988, Gadoury et al. 2012a, Smolka & Wolf 1986, Heintz & Blaich 1990). Weiterhin ist die richtige Zusammensetzung der Wirkstoffformulierung eine grundlegende Bedingung eines wirksamen Fungizides. So stellt bspw. die epikutikuläre Wachsschicht durch Stoffe wie z. B. Cutin oder Cellulose ein Hindernis für die Aufnahme von Wirkstoffmolekülen dar (Agrios 2005, Andrieu et al. 2000, Schreiber & Schönherr 1992, Stevens et al. 1987). Die Wirkung eines Fungizides hängt weiterhin auch von äußeren Faktoren ab. Man kann im Grunde von einer Wirt-Wirkstoff-Pathogen-Interaktion sprechen, da ein Pflanzenschutzmittel sowohl an den zu schützenden Wirt, wie auch das zu bekämpfende Pathogen angepasst sein muss. Neben den oben genannten Faktoren entscheidet auch der Wirkungsmechanismus eines Fungizides über den Zeitpunkt der Inhibition von pilzlichen Infektionsstrukturen. So können Keimungshemmer wie OoI-Fungizide früh in der Pathogenese greifen, während DMI-Fungizide später, nach erfolgter Wirtsbesiedlung, eine Wirkung entfalten können (Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015).

Die Bekämpfungszeiträume von *E. necator* ziehen sich durch die gesamte Vegetationsperiode der Weinrebe. Bei hohem Befallsdruck muss je nach Region regelmäßig in einem bspw. zehntägigen Abstand gespritzt werden (Oliver & Hewitt 2014). Im integrierten Weinbau werden anorganische und organische Wirkstoffe eingesetzt, wohingegen im biologischen Weinbau nur Kaliumhydrogencarbonat, Kupfer- und Schwefelpräparate zugelassen sind. Die Mehltaubekämpfung im integrierten Weinbau findet optimalerweise protektiv und durch Leitung eines Prognosesystems statt, da bereits ein geringer Befall zu starken Qualitätseinbußen führt und die Endprodukte stark abgewertet werden können. Die Praxis und Positionierung der Wirkstoffe variiert von Land zu Land und ist abhängig vom Befallsdruck, Umwelteinflüssen und der rechtlichen Zulassungssituation (BASF-interne Quelle 2018). So können vom Knospenaufbruch (BBCH 9) bis zum 6-Blattstadium (BBCH 16) Schwefelpräparate oder unter besonderer Beachtung des Resistenzmanagements auch QoI-Fungizide appliziert werden. Die kritische Phase einer Infektion von *E. necator* findet zumeist vom Entwickeln der Blütenanlagen (BBCH 53) bis zum Beginn der Fruchtentwicklung (BBCH 77) statt. Zunächst können während der ersten Vorblüte (BBCH 53-55) Schwefelpräparate angewandt werden. Von der zweiten Vorblüte (BBCH 55-58) über die Blüte (BBCH 65-68) bis zum Fruchtansatz (BBCH 69-71) hinweg zur Fruchtentwicklung – wenn Beeren erbsengroß sind (BBCH 75) – können DMI-Fungizide wie Penconazol (Topas®) oder QoI-Fungizide wie Pyraclostrobin (Insignia®) angewandt werden. Vom Beginn des Traubenschlusses bis zur Beerenreife (BBCH-77-81) können Schwefelpräparate und DMI- oder QoI-Fungizide angewandt werden. Zum Ende des Traubenschlusses (BBCH 79) können organische Fungizide durch Kaliumhydrogencarbonat ersetzt werden. Grundsätzlich sind der Vorjahresbefall und das Resistenzmanagement zu beachten (Anonym A 2018, Anonym B 2018, Anonym C 2010, Anonym E 2016, Gölles & Märki 2018, Oliver & Hewitt 2014).

1.4 Aufgabenstellung

Aufgabenstellung dieser Masterarbeit war die Charakterisierung des Wirkungsprofils von zwei neuen fungiziden Wirkstoffen der Firma BASF SE, welche in Zukunft gegen *E. necator* eingesetzt werden könnten. Für die Charakterisierung des Wirkungsprofils sollte die residuale, protektive und kurative Wirksamkeit unterschiedlicher Wirkstoffe und Wirkstoffformulierungen an der Weinrebe im Freiland und im Gewächshaus untersucht werden. Aufgabe war es, mögliche Unterschiede zwischen den verwendeten Wirkstoffen mitsamt ihren fungiziden Eigenschaften im Vergleich zu Referenzwirkstoffen der jeweils gleichen Fungizidklasse aufzuzeigen. Parallel hierzu sollte die Pathogenese des in dieser Masterarbeit verwendeten Isolats von *E. necator* an *V. vinifera* ssp. vinifera cv. Riesling beschrieben werden. Hierbei lag der Fokus auf der Entwicklung der Infektionsstrukturen der Konidiosporen in der Prä-Sporulationsphase auf der adaxialen Blattseite von Rebblättern.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsorganismen und -materialien

2.1.1 Pflanzenmaterial

Für die Versuche wurde die für *E. necator* hochanfällige Rebsorte *Vitis vinifera* spp. *vinifera* cv. Riesling verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde sowohl von einer Versuchsfläche im Freiland wie auch aus der BASF-internen Gewächshausnachzucht bezogen. Die zum Zeitpunkt der Experimente verwendeten Pflanzen wiesen sowohl an den Rebstöcken im Freiland als auch bei den Stecklingen im Gewächshaus 3- bis 9 voll entfaltete Laubblätter auf (BBCH 13-19) (Anonym G 1999).

2.1.2 Pathogen

Alle Versuche wurden mit Konidien des Erregers des Echten Mehltaus der Weinrebe *Erysiphe necator* (Schw.) Burr. durchgeführt. Bei dem verwendeten Isolat handelte es sich um einen BASF-internen Hausstamm (BASF SE, 67117 Limburgerhof, DE).

2.1.3 Fungizide

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Fungizidapplikationen wurden vier Fungizide mit zwei verschiedenen Wirkungsmechanismen verwendet. Je experimentellem Wirkstoff der Firma BASF SE wurde ein Marktstandard mit entsprechend selbem Wirkungsmechanismus als Referenz benutzt.

Für die Fungizidapplikation im Freiland wurde eine Aufwandmenge von 75 g a. i./10.000 m² Laubwandfläche (= 37,5 g a. i./ha) bei 800 l Wasser/ha Aufwandmenge für jeweils alle Wirkstoffe verwendet. Für die Fungizidapplikation in der Spritzkammer im Gewächshaus wurde eine Aufwandmenge von 30 g a. i./ha bei 400 l Wasser/ha Aufwandmenge für jeweils alle Wirkstoffe verwendet. Folgende Wirkstoffe wurden verwendet:

- DMI-BASF: Neues DMI-Fungizid der Firma BASF SE (FRAC G1) als SC-Formulierung
- DMI-MS: DMI-Marktstandard Penconazol (Topas®) der Firma Syngenta AG (FRAC G1) als EC-Formulierung
- QoI-BASF: Neues QoI-Fungizid der Firma BASF SE (noch nicht vom FRAC klassifiziert) als OD-Formulierung
- QoI-MS: QoI-Marktstandard Pyraclostrobin (Insignia®) der Firma BASF SE (FRAC C3) als SC-Formulierung

Das verwendete Wasser wurde im Trinkwasserversorgungsbereich Schifferstadt (Zweckverband für Wasserversorgung "Pfälzische Mittelrheingruppe", 67105 Schifferstadt, DE) entnommen. Die Angaben zur Beschaffenheit des Wassers wurden Trinkwasseruntersuchungen von 2017 entnommen. So lag der Mittelwert (MW) vom pH-Wert bei 14 °C bei 7,64 und der Grad deutscher Härte bei 9,5 °dH, was einem mittleren Härtebereich nach deutschem Waschmittelgesetz entspricht (Anonym I 2018).

2.1.4 Nährmedium

Die Versuche wurden mittels Blattscheiben durchgeführt. Für die Haltung der Blattscheiben wurde 0,4-%-Leitungswasseragar (LWA) verwendet. Für die Herstellung des Nährmediums wurden 4 g granuliertes Agar (Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, DE) abgewogen und mit 1000 ml Leitungswasser verrührt. Anschließend wurde das Agar für 15 min im Autoklav bei 121 °C sterilisiert. Danach wurde das Agar innerhalb 1 h in einem Wasserbad auf Agar ca. 55 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden je Liter Agar 1 ml Streptomycinsulfat (30 mg/l) und 1 ml Benzimidazol (40 mg/l) hinzugegeben. Das Nährmedium wurde anschließend in einer Sterilbank in vorbereitete Petrischalen (Polystyrol ohne Nocken; $\emptyset = 9$ cm, Höhe = 2 cm) gegossen (25 ml Agar je Petrischale) und für einen Tag gestapelt in einer Sterilbank zum Aushärten und Abkühlen gestellt.

2.1.5 Inkubator

Für die Inkubation der inokulierten Blattproben auf Petrischalen wurde ein RUMED® Klimaprüfschrank (Rubarth Apperate GmbH, 30880 Laatzen, DE) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Kälte-Wärmeschrank mit Be- und Entfeuchtungseinrichtung zur Simulation der Temperatur und Feuchte nach DIN 50014, 50015 und 50016. Der Inkubator wurde auf 12 h Photoperiode eingestellt, wobei die photosynthetisch aktive Strahlung bei 26 μMol/m²s lag. Es konnte keine nennenswerte UV-Strahlung gemessen werden. Die Luftfeuchtigkeit betrug 60-70 % rLF bei einer Temperatur von 20 °C. Der Taupunkt lag bei 15 °C (Abb. 44). Ziel bei diesen Einstellungen war die Simulation von bewölktem, warmem Sommerwetter mit einer entsprechenden Luftfeuchtigkeit für die optimale Inkubation von *E. necator* (Fessler & Kassemeyer 1995, Chellemi & Marois 1991). Die Einstellungen wurden mit Hilfe eines Spektrometers (WatchDog 1000 Series Micro Station, Spectrum Technologies, Inc., 60504 Aurora, US) über einen Zeitraum von 48 h überprüft. Das Spektrometer wurde hierfür mit der Wetterstation verbunden und zentral im Inkubator aufgestellt. Die erhobenen Daten wurden mithilfe der Software SpecWare 9 (Spectrum Technologies, Inc., 60504 Aurora, US) ausgelesen und mit Hilfe der Software Microsoft Excel® 2016 für Windows (Microsoft Corp., 98052-6399 Redmond, US) verarbeitet.

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Freiland

Die Freilandanlage befindet sich in der Carl-Bosch-Straße 45, 67117 Limburgerhof, DE (Breitengrad: 49.412664, Längengrad: 8.392731). Der Bodentyp ist lehmiger Sand (73 % Sand, 17 % Schluff, 10 % Ton) mit einem pH-Wert von 7,2 und einem Anteil von 2 % organischer Masse. Der Kalkgehalt beträgt 0,6 %. Der Wert für P₂O₅ liegt bei 37 mg/100 g, K₂O bei 25 mg/100 g und Mg bei 10 mg/100 g. Die Jahresdurchschnittstemperatur auf dieser Fläche im Jahr 2017 betrug 11,5 °C und die Jahresnieder-schlagsmenge 510 mm (BASF-interne Quelle 2018). Das Klima im Zeitraum des Freilandversuches vom 23. April bis zum 14. Mai 2018 war konstant bei Temperaturen um 15-20 °C, 70-80 % rLF und keinem nennenswerten Niederschlag (Abb. 45) (Anonym K 2018).

In der 22 Jahre alten, durch Forstflächen abgeschirmten Versuchsanlage wird ausschließlich *V. vinifera* ssp. *vinifera* cv. Riesling kultiviert. Die Fläche wurde die letzten Jahre nicht für Versuche mit *E. necator* genutzt. Für diese Arbeit wurde an dieser Stelle eine Reihe Rebstöcke zur Verfügung gestellt, welche in zwölf Blöcke unterteilt wurde. Die Reihe Rebstöcke wies eine Länge von 4 m und einen Reihenabstand von 2 m auf. Zehn Blöcke waren für die mit Fungiziden zu behandelnden Varianten vorgesehen und zwei dienten der unbehandelten Kontrolle (UTC). Jeder Block wies vier Rebstöcke auf. Der Abstand zwischen den einzelnen Blöcken betrug 1 m.

Der Freilandversuch wurde kurz vor der Hauptflugzeit der Sporen von *E. necator* durchgeführt. Da der Infektionsdruck nach Beendigung des ersten Durchlaufs laut Prognosen vom Rebschutz- und Weinbauinfodienst Pfalz anstieg und dadurch zu späteren Zeitpunkten mit wahrscheinlich stärkeren Vorinfektionen des Blattmaterials gerechnet werden musste, konnte der Freilandversuch im Hinblick auf die Auswertbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht wiederholt werden (Anonym J 2018).

Zum Zeitpunkt der Fungizidapplikation am 2. Mai 2018 befanden sich die Rebpflanzen im 3bis 9-Blattstadium (BBCH 13-19). Fünf Tage vor der Fungizidapplikation wurde am 27. April 2018 eine Pflegebehandlung mit Kumulus® WG (3,6 kg/ha) und Polyram® WG (0,8 kg/ha) (je 600 L Wasser/ha) gegen Echten und Falschen Mehltau der Weinrebe an den Versuchspflanzen (BBCH 15) durchgeführt, da laut Prognosen vom Rebschutz- und Weinbauinfodienst Pfalz der Infektionsdruck durch einsetzenden Sporenflug anstieg (Abb. 45) (Anonym J 2018). Hierdurch sollte eine Vorinfektion des zu entnehmenden Blattmaterials im Feld durch Pilze verhindert werden, um die folgende künstliche Inokulation im Labor nicht zu verfälschen.

2.2.2 Gewächshaus

Im Dezember 2017 wurden 2-3 cm lange und 1 cm dicke Rebstecklinge von einem regionalen Winzer (Weingut Bosch GdbR, 76829 Ranschbach, DE) bezogen. Die Stecklinge wurden bei 6 °C in einer Kühlzelle eingelagert und vor Beginn der Anzucht entnommen. Zuerst wurden die Stecklinge mit dem Bewurzelungspräparat für Rebveredelung Orange Siegel (Doris Linhart, 6373 Jochberg, AT) behandelt, um das Wurzelwachstum zu stimulieren. Hierzu wurden oberflächlich trockene Rebstecklinge bündelweise zu zehn Stück 2 mm tief in Orange-Siegel-Pulver eingetaucht. Daraufhin folgte das Einsetzen in ein Substrat aus Perligran®-Dämmstoff (Knauf Aquapanel GmbH, 44147 Dortmund, DE). Die Düngung erfolgte wöchentlich mit Kamasol® brillant Blau 8+8+6 (COMPO EXPERT GmbH, 48155 Münster, DE), 1:2 mit Wasser verrührt und in weiterer Folge auf eine 0,2 %-ige Lösung verdünnt. Nach vier Wochen wurden die Stecklinge bei ausreichender Wurzelbildung in Presstopfsubstrat Floradur® A Block (Floragard Vertriebs-GmbH, 26135 Oldenburg, DE) eingetopft. Der pH-Wert des Substrates betrug laut Hersteller 5,6. Nach acht Wochen waren die Rebpflanzen im einsatzbereiten 3- bis 9-Blattstadium. Die Pflanzen wurden für die Versuche auf 2-4 Blätter gestutzt.

Mittels Schwefelverdampfer (Otto Finsterle GmbH & Co. KG, 68159 Mannheim, DE) wurde Kohlenstoffdisulfid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, DE) nachts für 4 h auf die Rebpflanzen (K1) gedampft, um das Blattmaterial pathogenfrei zu halten. Vor der Blattprobenentnahme für die Herstellung der Blattscheiben (K1) wurden die Rebpflanzen im Gewächshaus mit Wasser abgespritzt um die Blattoberfläche vom benetzenden Schwefel reinzuwaschen, damit eine spätere Inokulation mit *E. necator* nicht negativ beeinflusst wurde. Behandelte Pflanzen (P5) wurden bis fünf Tage nach Fungizidapplikation in einer Anzuchtkammer ohne Schwefler aufbewahrt und nicht abgewaschen.



Abb. 7. Rebblätter (cv. Riesling) nach Fungizidapplikation im Freiland (A). Für die Blattprobenentnahme wurden Blätter per Zufallsprinzip ausgewählt und mittels Farbstreifen markiert, damit bei Zuwachs behandelte Blätter identifizierbar blieben. Gestutzte Rebpflanze (cv. Riesling) mit vier Blättern aus der BASF-internen Gewächshausnachzucht (B) (Eigene Aufnahmen 2018).

2.3 Inokulum und Inokulation

Die Blattscheiben der Blattproben wurden mittels "Abklopfmethode" in einer Fallstrom-Laminarbank inokuliert (Abb. 8). Dafür wurde ein Inokulationsturm ($\emptyset = 10$ cm, Höhe = 27 cm) über einer geöffneten, nicht inokulierten Petrischale platziert. Auf dem Inokulationsturm wurde ein Gitter platziert. Daraufhin wurde ein sporulierendes Rebblatt mit der befallenen Seite nach unten zeigend auf das Gitter gelegt. Mittels Klopfstab wurde in schneller 30er Klopffolge gleichmäßig die Blattunterseite abgeklopft. Je Petrischale gab es eine Wartezeit von 30 sec nach dem erfolgten Abklopfen für die Sedimentation der Konidien. Anschließend wurden Klopfstab, Gitter und Inokulationsturm mit 70 % Ethanol desinfiziert.

Jede Petrischale wurde mit zwei sporulierenden Nachzuchtblättern (14-21 Tage nach Inokulation (dpi)) aus der BASF-internen Gewächshausnachzucht für *E. necator* nach obigem Schema inokuliert. Die Nachzuchtblätter wurden vor der Inokulation mittels Auflichtmikroskop oberflächlich auf Kontaminationen und Qualität der Infektionsstrukturen kontrolliert. Nach erfolgter Inokulation wurden die Petrischalen mittels Zeiss Stemi DRC Stereomikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE) bei 63x Vergrößerung zur Kontrolle des Inokulums auf Blattscheiben und Agaroberfläche betrachtet (Abb. 10 A). Anschließend wurden die inokulierten Petrischalen in den Inkubator gebracht, wo die Inkubation je nach Versuch über einen definierten Zeitraum von bis zu 72 h stattfand.



Abb. 8. Inokulation von Blattscheiben in einer Fallstrom-Laminarbank. Zunächst wurde ein mit *Erysiphe necator* infiziertes, sporulierendes Rebblatt (cv. Riesling) mit der adaxialen Blattseite nach unten auf das Gitter des Kunststoffrohres gelegt. Das Rohr selber wurde danach auf eine zur Inokulation bestimmte, geöffnete Petrischale gestülpt (A). Sodann wurden 30 gleichmäßig auf der abaxialen Blattseite verteilte Hiebe mittels Klopfstab angesetzt (B, C) (Eigene Aufnahmen 2018).

2.4 Fungizidapplikation

Die Fungizidapplikationen im Freiland und Gewächshaus wurden zu jeweils definierten Zeitpunkten durchgeführt. Bei den Versuchen zur Untersuchung der residualen Wirkung von neuen Fungiziden gegen *E. necator* wurde Blattmaterial aus dem Freiland verwendet, dieses protektiv mit Fungiziden im Freiland behandelt und jeweils am Tag der Applikation (P0), fünf (P5) und zwölf Tage (P12) später entnommen und jeweils anschließend im Labor inokuliert. Das Blattmaterial aus dem Gewächshaus für den Protektivversuch wurde fünf Tage vor Inokulation im Labor (P5) im Gewächshaus mit Fungiziden behandelt. Das Blattmaterial aus dem Gewächshaus für den Kurativversuch wurde einen Tag nach In-okulation im Labor (K1) ebenfalls im Gewächshaus mit Fungiziden behandelt.

2.4.1 Freiland

Die Fungizidapplikation fand am 2. Mai 2018 vormittags bei einer Bodentemperatur von 12 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 63 % statt. Der Tag war niederschlagsfrei und die Windgeschwindigkeit betrug 2 m/s (BASF-interne Quelle 2018). Die Wirkstoffe wurden mittels Braud Tunnelspritze (D99-L20-A) (Scharfenberger GmbH & Co. KG, 67098 Bad Dürkheim, DE) in einer Geschwindigkeit von 3 km/h auf die jeweiligen Varianten appliziert. Bei dem Gerät handelte es sich um einen zum selbstfahrenden Tunnelspritzgerät umgebaute Traubenvollerntemaschine. Die verwendeten Spritzdüsen waren Mehrbereichs-Flachstrahldüsen vom Typ LU 90-02 (Lechler GmbH, 72555 Metzingen, DE) mit einem Düsenabstand von 30 cm und einem Spritzwinkel von 90 °. Appliziert wurde mit einem Druck von 2,9 bar, wobei der Trägertyp Wasser war und der Ansatz je Variante 1,3 l betrug. Es wurde versucht, eine homogene Benetzung der Spritzbrühe auf der Blattoberfläche erzielen. Die Blätter waren nach der Behandlung fast vollständig mit der Spritzbrühe benetzt und nicht tropfnass. Die UTC wurde nicht behandelt. Nach der Fungizidapplikation wurden gut gewachsene, behandelte Blätter für die drei folgenden Termine der Probenentnahme (P0, P5, P12) zufällig ausgewählt und mittels Farbstreifen markiert, um zwischen Neuzuwachs und behandelten Blättern differenzieren zu können (Abb. 7 A).

2.4.2 Gewächshaus

Die Fungizidapplikation fand mittels automatisierter Spritzkammer vom Typ SP 4/SPL (F. W. Schmitt GmbH, 55435 Gau-Algesheim, DE) im Gewächshaus statt. Je Variante wurden 100 ml Spritzbrühe bei einer Aufwandmenge von 400 l/ha auf gestutzte, ganze Rebpflanzen (BBCH 13-19) (P5) bzw. auf die Petrischalen mit Blattscheiben (K1) appliziert. Die verwendeten Spritzdüsen in der Spritzkammer waren Flachstrahldüsen vom Typ Teejet XR 11015 VS (TeeJet Technologies LLC, 62703 Springfield, US) mit

je 6 bar Druck und einem Spritzwinkel von 110 °. Es wurde versucht, eine homogene Benetzung der Spritzbrühe auf der Blattoberfläche erzielen. Die Blätter der Rebpflanzen (P5) bzw. Blattscheiben (K1) waren nach der Behandlung fast vollständig mit der Spritzbrühe benetzt aber nicht tropfnass. Die UTC wurde nicht behandelt. Nach der Fungizidapplikation wurden gut gewachsene, behandelte Blätter für die folgende Blattprobenentnahme (P5) mittels Farbstreifen markiert, um zwischen Neuzuwachs und behandelten Blättern differenzieren zu können. Die Rebpflanzen (n = 40) wurden dann in einer Kammer ohne Schwefelverdampfer für fünf Tage randomisiert aufgestellt, wo anschließend die Blattprobenentnahme halb-geöffnet aufgestellt, damit die applizierte Spritzbrühe vor der weiteren Inkubation eintrocknen konnte.

2.5 Blattprobenentnahme

Für die Herstellung der Blattscheiben wurde Blattmaterial aus dem Freiland bzw. Gewächshaus entnommen und im Labor weiterverarbeitet. Da die Wirkung der Fungizide nicht verfälscht werden sollte, musste von einer Oberflächensterilisation des Blattmaterials abgesehen werden. Prinzipiell wurde bei entnommenen Blättern folgend verfahren: Zunächst erfolgte der Transport des Blattmaterials in Transportboxen ins Labor. Je Blatt wurden drei Blattscheiben mittels Korkbohrer (Ø = 1,5 cm) in einer Fallstrom-Laminarbank ausgestanzt und innerhalb der jeweiligen Variante randomisiert. Danach wurden die Blattscheiben auf je eine Petrischale mit 0,4-%-LWA übertragen, wonach die Inokulation vor bzw. nach erfolgter Fungizidapplikation durchgeführt wurde. Hierauf folgte die Inkubation der beimpften Petrischalen im Inkubator für eine definierte Zeit. Vor der mikroskopischen Analyse wurden die Blattscheiben in Kaliumhydroxid (KOH) – in Abhängigkeit des jeweiligen Versuches – zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 h nach Inokulation (hpi) fixiert. Bei den Blattscheiben wurde darauf geachtet, dass sie innerhalb einer Variante randomisiert wurden. D. h., dass drei Blattscheiben auf einer Petrischale nicht von einem Blatt stammen, sondern von drei unterschiedlichen Blättern. Hierdurch sollte ein Effekt durch evtl. heterogen ausfallendes Blattmaterial ausgeglichen werden. Je Blatt wurden drei Blattscheiben mittels Korkbohrer ausgestanzt.



Abb. 9. Präparation von Blattscheiben in einer Fallstrom-Laminarbank (Eigene Aufnahme 2018).

2.5.1 Freiland

Für die Untersuchung der residualen Wirkung (P0, P5, P12) von Fungiziden an Rebblättern aus dem Freiland wurden von einer Reihe Rebstöcke an drei Terminen Blattproben entnommen (Abb. 7 A). Die erste Probenentnahme (P0) fand am Tag der Fungizidapplikation statt (2. Mai 2018). Die zweite Probenentnahme (P5) fand fünf Tage später, am 7. Mai und die letzte (P12) am 14. Mai 2018 statt (Abb. 45). Aus der Reihe von Rebstöcken waren vier Parzellen für die mit Fungiziden behandelten Varianten und zwei für die UTC vorgesehen. Jede Parzelle umfasste vier Rebstöcke. Von jeder Variante (n = 5) wurden je Rebstock ein Blatt (n = 4) zwischen Hüft- und Schulterhöhe entnommen und in jeweils eine Transportbox getan. Die Blätter wurden per Zufallsprinzip entnommen und waren mind. 4 cm breit und lang. Nach dem Transport in eine Fallstrom-Laminarbank wurden die Blätter zu Blattscheiben weiterverarbeitet und anschließend auf Nährmedium überimpft. Je Termin der Probenentnahme aus dem Feld wurde dieselbe Anzahl von Blattmaterial geerntet. Je Variante gab es vier Wiederholungen.

Zur Kontrolle der Vorinfektionen im Freiland wurden je Termin der Probenentnahme (P0, P5, P12) von fünf Rebstöcken der UTC je ein Blatt per Zufall ausgewählt. In der Laminarbank wurde dann je Blatt eine Blattscheibe mittels Korkbohrer entnommen, in KOH fixiert und einen Tag später mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.5.2 Gewächshaus

Für die Untersuchung der protektiven (P5) und kurativen Wirkung (K1) von Fungiziden an Rebblättern aus dem Gewächshaus wurden von 20 behandelten bzw. unbehandelten Rebpflanzen fünf Tage nach (P5) bzw. einen Tag vor Fungizidapplikation (K1) per Zufallsprinzip je Variante (n = 5) vier homogen aussehende Blätter ausgewählt, welche mind. 4 cm breit und lang waren (Abb. 7 B). Die entnommenen Blätter (markiert in P5 und unmarkiert in K1) wurden in einer Fallstrom-Laminarbank zu Blattscheiben weiterverarbeitet und anschließend auf Nährmedium transferiert. Je Variante gab es vier Wiederholungen.

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Mikroskope und Zubehör

Für die mikroskopische Analyse der Infektionsstrukturen von *E. necator* sowie für die Vorinfektionstests beim Freilandversuch wurde ein Zeiss Axio Imager.M2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE) bei 50-100x Vergrößerung verwendet. Die Keimungstests wurden mit einem Zeiss Stemi DRC Stereomikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE) bei 63x Vergrößerung analysiert. Für nähere Detailaufnahmen der Infektionsstrukturen von *E. necator* wurden im Swiss Nanoscience Institute (Universität Basel, 4056 Basel, CH) Untersuchungen mittels Philips XL30 Umweltrasterelektronenmikroskop (ESEM) (Philips GmbH Market DACH, 22335 Hamburg, DE) durchgeführt.

2.6.2 Präparation

2.6.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Untersuchung der residualen Wirkung von Fungiziden im Freiland wurden die Blattscheiben $(\emptyset = 1,5 \text{ cm})$ je Versuchsglied (P0, P5, P12) 48 hpi in KOH (1 mol/l) (Bernd Kraft GmbH, 47167 Duisburg, DE) fixiert. Für die Untersuchung auf Vorinfektionen beim Freilandversuch wurden die aus der Versuchsparzelle entnommenen Blätter der UTC mittels Korkbohrer präpariert und direkt in KOH fixiert. Für die Untersuchung der protektiven Wirkung (P5) von Fungiziden im Gewächshaus wurden die Blattscheiben 48 hpi fixiert. Für die Untersuchung der kurativen Wirkung (K1) von Fungiziden im Gewächshaus wurden die Blattscheiben 24 und 72 hpi fixiert. Pro Termin wurde je Petrischale eine Blattscheibe entnommen und in einem Schnappdeckelglas (45 x 21 mm, 10 ml Volumen, hydrolytische Klasse 3) (VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, DE) mit KOH-Lösung (2-3 ml je Blattscheibe je Schnappdeckelglas) fixiert. Wichtig war, dass die Blattscheiben mit der adaxialen Seite nach oben im KOH platziert wurden. Die Blattscheiben wurden für mind. 24 h in KOH bei 6 °C in Dunkelheit fixiert und entfärbt. Anschließend wurden die Präparate mit einem Fluorochrom behandelt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Diese Behandlung fand mittels Uvitex 2B (Polysciences Inc., 18976 Warrington, US) statt. Hierbei handelt es sich um einen fluoreszierenden Weißmacher, welcher UV-Strahlung absorbiert und sichtbares Blaulicht emittiert. Die Färbung mit Uvitex 2B benötigt ein Fluoreszenzmikroskop mit UV- und Blauanregung bei einer Anregung von max. 350 nm und einer Abstrahlung von max. 435 nm (Anonym L 2018). Der Stoff färbt Chitin von pilzlichen Zellwänden und Cellulose (Koch & Pimsler 1987). Die Fluoreszenz des gefärbten Chitins fällt intensiv blau aus, wobei der Weißanteil erhöht wird. Durch die hohe Intensität der emittierten Fluoreszenz sind pilzliche Strukturen auch bei niedrigen Vergrößerungen gut differenzierbar (Rüchel & Margraf 1993). Für die Uvitex 2B-Färbelösung wurde 100 mg Uvitex 2B + 100 ml Pufferlösung pH 8,8 (0,4 mol/l TRIS + 0,2 mol/l Acetylaceton) (Bernd Kraft GmbH, 47167 Duisburg, DE) + 100 µl Lutensol® ON 70 (BASF SE, 67056 Ludwigshafen, DE) vermischt, für 5 min gerührt und im Kühlschrank bei 6 °C in Dunkelheit für max. einen Monat gelagert.

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Blattscheiben auf Objektträger platziert. Nach einer kurzen Wartezeit zur Antrocknung der benetzenden KOH-Lösung wurde je Blattscheibe mittels Einmalpipette ein Tropfen (ca. 0,05-0,1 ml) Uvitex 2B aufgegeben (Abb. 11 A). Die Präparate wurden daraufhin mit Deckgläsern versehen und nach einer Wartezeit von 10 min für den Färbeprozess der pilzlichen Infektionsstrukturen direkt im Anschluss mikroskopiert. Wichtiges Detail bei diesem Arbeitsschritt war, neben der unbedingt sorgfältigen Handhabung der Proben, dass die Blattscheiben nicht in KOH-/Uvitex 2B-Lösung schwimmen durften, bevor die Deckgläser platziert wurden, da sonst Konidien leichter von der Blattoberfläche gesaugt werden konnten. Idealerweise benetzte ein dünner Film Uvitex 2B die Blattscheiben. Nach der Mikroskopie wurden die untersuchten Blattproben zurück in die KOH-Lösung gegeben und mussten bei einer evtl. anfallenden wiederholten Betrachtung nicht erneut angefärbt werden.

2.6.2.2 Kryo-Umweltrasterelektronenmikroskopie

Für die Untersuchung ausgewählter Infektionsstrukturen der UTC und Konidien unter DMI- und QoI-Einfluss wurden inokulierte und (un-)behandelte Blattscheiben im Swiss Nanoscience Institute aufbereitet und mittels Kryo-Umweltrasterelektronenmikroskopie analysiert. Hierfür wurden jeweils Proben 72 hpi der UTC, von DMI-BASF bei kurativer Applikation (K1) und von QoI-BASF bei protektiver Applikation (P5) untersucht. Die Blattscheiben wurden wie bereits geschildert im Gewächshaus und Labor vorbereitet und auf ihren Nährmedien transportiert – jedoch nicht in KOH fixiert.

Zur Vorbereitung der ESEM-Untersuchungen wurden ausgesuchte Blattscheiben auf eine Größe von 5 x 5 mm zugeschnitten und mittels Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura Finetek Germany GmbH, 79219 Staufen, DE) auf einem Probenhalter (25 x 15 mm) fixiert. Der Halter wurde an einem Transferstab befestigt und die Proben in Stickstoff-Slush schockgefroren. Danach wurde der Transferstab an der Schleuse der Kryo-Einrichtung angedockt. Die Proben kamen nach dem Einfrieren nicht mehr mit Luft in Berührung und wurden unter Vakuum auf dem Kühltisch der Vorkammer abgelegt. Daraufhin wurden die Proben von Flüssigstickstofftemperatur (-196 °C) auf -80 °C erwärmt, um allfällige Restfeuchtigkeit an der Probenoberfläche wegzusublimieren. Nach ca. 10 min wurden die Proben mit 30 nm Gold besputtert, um eine leitende Oberfläche zu erhalten. Danach wurden die Proben über eine weitere Schleusenöffnung auf dem Kühltisch im ESEM abgelegt und bei -150 °C stabil gehalten. Weitere Sublimation sowie Schäden durch den Elektronenstrahl konnten weitgehend vermieden werden. Der Ablauf der Arbeit im ESEM entsprach dem normalen Betrieb im Hochvakuum, wobei bei Bedarf Stickstoff nachgefüllt werden musste. Die Aufnahmen wurden bei einer Anregungsspannung von 5 kV gemacht. Verwendet wurde ein Everhart-Thornley-Detektor für Sekundärelektronen. Der Arbeitsabstand betrug ungefähr 15 mm.

2.6.3 Vorinfektionstest

Zur Kontrolle des Blattmaterials aus dem Freiland auf mögliche Vorinfektionen wurden je Termin der Blattprobenentnahme (P0, P5, P12) fünf Blätter zufällig aus einer UTC-Parzelle entnommen und jeweils eine Blattscheibe in KOH-Lösung fixiert. Hierdurch wurde geprüft, ob eine Wirtsbesiedlung durch Pathogene vor der eigentlichen händischen Inokulation im Labor vorlag. Nach mind. 24 h Fixierung und Entfärbung in KOH-Lösung wurde jede Blattscheibe am Fluoreszenzmikroskop auf Pilzsporen untersucht und folgend klassifiziert:

- a) Erysiphe necator
- b) Andere Spore

2.6.4 Keimungstest

Zur Kontrolle des Inokulums wurde für alle Versuche ein Keimungstest durchgeführt. Der Keimungstest wurde 24 hpi am Stereomikroskop durchgeführt (Abb. 10). Hierfür wurde von jeder Variante (n = 5) jeweils eine von vier Petrischalen zufällig ausgewählt. Auf der Agaroberfläche jenseits der Blattscheiben wurden per Zufallsprinzip 100 Konidien ausgezählt und folgend klassifiziert:

- a) Ungekeimt
- b) Gekeimt



Abb. 10. Auf der Agaroberfläche sichtbare, ungekeimte Konidien von *Erysiphe necator* (Stereomikroskop, 63x) (A). 24 hpi erfolgte eine erneute Kontrolle der Konidien auf der Agaroberfläche mittels Keimungstest. Sichtbar sind ausgekeimte Konidien von *E. necator* mit Keimschlauch (B) (Eigene Aufnahmen 2018).

2.6.5 Quantifizierung der Infektionsstrukturen von Erysiphe necator

Die Auszählung der Konidien am Fluoreszenzmikroskop erfolgte mit Hilfe von einem 9-key Economy Counter (Heathrow Scientific LLC, 60061 Vernon Hills, US). Die Konidienbonitur erfolgte nach einer modifizierten Klassifizierung der Entwicklungsstadien von *E. necator* nach Leinhos et al. (1997). Die Klassifizierung umfasste drei Phasen in der Pathogenese von *E. necator* mit insgesamt sieben Stadien, die der Pilz nach einem Kaskadenprinzip durchläuft (Tab. 2). Phase I umfasst das Stadium der ungekeimten Konidie, welche auf der Wirtskutikula adhäriert. In Phase II keimt die Konidie aus und besiedelt seinen Wirt, indem ein Primärappressorium zur Anhaftung und Penetration der Wirtskutikula ausdifferenziert wird. Phase III umfasst die Wirtskolonisierung – die Hyphenbildung – wobei sich der Reihe nach eine Primär-, Sekundär- und Tertiärhyphe ausbildet, welche sich letztendlich verzweigen.

Tab. 2. Die Entwicklungsstadien von *Erysiphe necator* in der Prä-Sporulationsphase. Dieser Teil der Pathogenese von *E. necator* umfasst drei Phasen mit insgesamt sieben Entwicklungsstadien (verändert nach Leinhos et al. 1997). Je Blattscheibe wurden 100 Konidien folgend klassifiziert.

Phase der Pathogenese	Stadium	Infektionsstruktur	
Phase I: Landung Konidie adhäriert auf Kutikula	SO	Ungekeimte Konidie	
Phase II: Besiedelung	S1	Konidie mit Keimschlauch	
Keimung und Ausbildung vom Pri- märappressorium	S2	Konidie mit Primärappressorium	
	S 3	Konidie mit Primärhyphe	
Phase III: Kolonisierung	S4	Konidie mit Sekundärhyphe	
Hyphenverzweigungen	S 5	Konidie mit Tertiärhyphe	
	S 6	Konidie mit Hyphenverzweigung	

Der untersuchte Zeitraum zur Quantifizierung der Infektionsstrukturen von *E. necator* richtete sich nach der Art des jeweiligen Versuches und fokussierte sich im Versuch zur Untersuchung der residualen (P0, P5, P12) und protektiven Wirkung (P5) der Fungizide auf den Zeitpunkt 48 hpi. Bei der Untersuchung der kurativen Wirkung (K1) der Fungizide wurden die Zeiträume 24 bis 72 hpi betrachtet. Qualitative Untersuchungen bezogen sich auf dieselben Zeiträume, wobei die UTC zusätzlich separat über einen Zeitraum bis 8 dpi analysiert wurde. Für die quantitativen Untersuchungen war es entscheidend, die gebildeten Infektionsstrukturen auf die jeweils bonitierte Konidie zurückführen zu können, um den Effekt der fungiziden Wirkstoffe beurteilen zu können. Deshalb war das Zeitfenster der Untersuchungen limitiert und ging nur bis zum letzten Stadium vor Ausbildung von Konidiophoren (S6), da ab dann die Hyphen von *E. necator* in einem Myzel dicht verzweigt waren und nicht mehr auf die einzelne (un-)behandelte Konidie zurückzuführen waren von der sie ursprünglich ausgingen.

Die mikroskopische Klassifizierung der Konidien geschah bei 50-100x Vergrößerung mit der Reflektoreinstellung "02-DAPI" bei entsprechender Kontrasteinstellung und Fluoreszenzlicht (Abb. 11 B). Jede Blattscheibe wurde nach demselben Schema standardisiert bonitiert, in dem die Konidien auf neun unterschiedlichen Einstellungen der Fokusebene einer Blattscheibe per Zufallsprinzip ausgezählt und klassifiziert wurden. Je Variante wurden vier Wiederholungen durchgeführt.



Abb. 11. Behandlung von mit KOH fixierten Blattscheiben mit Uvitex 2B (A). Mit Uvitex 2B behandelte Konidie von *Erysiphe necator* 48 hpi nach zehnminütiger Einwirkzeit des Fluorochroms (Fluoreszenzmikroskop) (B). Sichtbar ist die Primärhyphe (a) von über 60 μ m Länge und das deutlich ausdifferenzierte Primärappressorium (b) mit einer jungen Sekundärhyphe (c) (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 μ m) (Eigene Aufnahmen 2018).

2.7 Bildaufnahme und -bearbeitung

Makroskopische Fotos wurden mit einer Canon EOS 500D SLR-Digitalkamera (15 Megapixel) (Canon Deutschland GmbH, 47807 Krefeld, DE) aufgenommen. Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurden mit einer am Mikroskop angeschlossenen Zeiss Axiocam 506 Color (6 Megapixel) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE) dokumentiert. Aufnahmen am ESEM wurden vom Swiss Nanoscience Institute angefertigt und freundlicherweise nachträglich zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe der Software ZEN Pro 2.3 blue edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE) konnten die Infektionsstrukturen von *E. necator* ausgemessen und weiter analysiert werden. Die weitere Bildbearbeitung der makro- und mikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Software IrfanView 64-bit Version 4.44 (Irfan Skiljan, 2700 Wiener Neustadt, AT).

2.8 Datenauswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten und Erstellung von Grafiken erfolgte mit Hilfe der Software Microsoft Excel® 2016 für Windows (Microsoft Corp., 98052-6399 Redmond, US). Die Erstellung von Box-and-Whisker-Plots und weitere statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SAS Enterprise Guide 7.1 (64-bit) (SAS Institute Inc., 27513 Cary, US). Box-and-Whisker-Plots wurden vom 25 %- bis zum 75 %-Quantil gezeichnet. Das 50 %-Quantil wurde als Querstrich und der MW als Raute (◊) innerhalb der Box dargestellt. Die oberen und unteren Whisker geben die maximale bzw. minimale Beobachtung der jeweiligen Variante an. Statistische Signifikanzen wurden mit einer einfachen ANOVA ermittelt. Mittels Levene-Test wurde die Varianzhomogenität geprüft. Wurde die Annahme gleicher Varianzen abgelehnt, wurde eine Welchs Varianz-gewichtete ANOVA durchgeführt. Als Posthoc-Test wurde sowohl bei der ANOVA als auch beim Welch-Test ein paarweiser t-Test nach Bonferroni ($\alpha = 0.05$) durchgeführt (Hsiung & Olejnik 1992, Helfrich et al. 2015). Die Gewächshausversuche (K1, P5) wurden mit ähnlichen Ergebnissen jeweils zweimal durchgeführt. Die Nullhypothese (H_0) für alle Versuche lautete: "Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten." Die Alternativhypothese (H_A) für die durchgeführten Versuche lautete: "Es gibt signifikante Unterschiede zwischen den Varianten." Für die Berechnung der Keimhemmungsrate der getesteten Fungizide über einen Zeitraum von zwölf Tagen im Freiland (P0, P5, P12) wurde folgende Formel nach Abbott (1925) verwendet:

Hemmungsrate (%) = (X - Y)/X

(X = Prozentualer Anteil gekeimter Konidien (100 – prozentualer Anteil ungekeimter Konidien) der UTC, Y = Prozentualer Anteil gekeimter Konidien (100 – prozentualer Anteil ungekeimter Konidien) der jeweils behandelten Variante)

3 ERGEBNISSE

3.1 Residuale Wirkung von neuen Fungiziden gegen Erysiphe necator

Für die Untersuchung der residualen Wirkung von Fungiziden wurden die Infektionsstrukturen von *E. necator* null (P0), fünf (P5) und zwölf Tage nach Fungizidapplikation (P12) (48 hpi) auf Blattmaterial von Rebpflanzen aus dem Freiland analysiert. Der vorab durchgeführte Vorinfektionstest zeigte über die drei Zeitpunkte der Blattprobenentnahme (P0, P5, P12) keine nennenswerten Infektionen des Blattmaterials durch Sporen im Freiland vor der eigentlichen Inokulation im Labor (Abb. 46). Aufgrund der charakteristischen Konidienform (einzellig, hyalin, zylindrisch-oval, $\emptyset = 10 \,\mu$ m bei 30 μ m Länge) und der Adhäsion der Konidien auf der adaxialen Blattseite der Rebblätter konnten Konidien von *E. necator* von anderen Mikroorganismen wie bspw. Pilzsporen differenziert werden. Zwölf Tage nach Beginn des Versuches war das a priori vorhandene Inokulum von Pilzsporen auf den Freilandblättern zwar leicht erhöht, jedoch konnte keine Keimung oder Myzelbildung beobachtet werden. Die Keimungstests auf der Agaroberfläche inokulierter Petrischalen 24 hpi (P0, P5, P12) ergaben im MW eine Keimungsrate der Konidien von 74 % (Abb. 47).

Die erhobenen Daten zeigten in ihrer Gesamtheit für die drei ausgewählten Zeitpunkte nach Fungizidapplikation (P0, P5, P12) ein komplexes Bild. So wurden die ausgezählten Konidien der einzelnen Varianten gemäß Boniturschema in ihre jeweiligen Entwicklungsstadien S0-S6 eingeteilt (Tab. 2). Auf am Tag der Fungizidapplikation inokulierten Blattscheiben der UTC entwickelten 69 % der Konidien Primärappressorien. 22 % der Konidien bildeten Keimschläuche aus und 22 % blieben ungekeimt. DMI-Fungizide zeigten eine höhere Zahl ungekeimte Konidien auf (DMI-BASF 35 %, DMI-MS



Abb. 12. Prozentuale Verteilung der Konidien von *Erysiphe necator* gemäß Boniturschema am Tag der Fungizidapplikation (48 hpi). Die Gesamtheit der ausgezählten Konidien je Variante teilt sich in ihre Entwicklungsstadien S0-S6 auf (n = 4).
55 %). Bei DMI-BASF bildeten 53 % der Konidien ein Primärappressorium und bei DMI-MS 24 %. QoI-Fungizide zeigten eine fast vollständige Keimhemmung auf, da 99 % der Konidien bei beiden QoI-Wirkstoffen ungekeimt blieben (Abb. 12).

Fünf Tage nach Fungizidapplikation ergab sich ein anderes Bild. Konidien der UTC bildeten 48 hpi zu 54 % Primärappressorien, 12 % Primärhyphen und 5 % Sekundärhyphen. 25 % der Konidien keimten nicht aus. Bei DMI-BASF bildeten 18 % der Konidien Keimschläuche aus, 53 % Primärappressorien und 30 % der Konidien blieben ungekeimt. Konidien die mit DMI-MS behandelt wurden blieben zu 43 % ungekeimt, 21 % bildeten Keimschläuche aus, 36 % Primärappressorien und 1 % Primärhyphen. QoI-Fungizide zeigten im Vergleich dazu eine erhöhte Keimhemmung (QoI-BASF 50 %, QoI-MS 74 %), sanken in ihrer Leistung im Vergleich zum eingangs betrachteten Zeitpunkt (P0) jedoch stark ab. Bei QoI-BASF bildeten 22 % der Konidien Keimschläuche und 28 % Primärappressorien aus. Bei QoI-MS bildeten 8 % der Konidien Keimschläuche und 17 % Primärappressorien aus (Abb. 13).





Abb. 13. Prozentuale Verteilung der Konidien von *Erysiphe necator* gemäß Boniturschema fünf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi). Die Gesamtheit der ausgezählten Konidien je Variante teilt sich in ihre Entwicklungsstadien S0-S6 auf (n = 4).

Zwölf Tage nach Fungizidapplikation werden deutlichere Unterschiede zwischen den Varianten sichtbar. Die UTC zeigte hier 48 hpi eine verstärkte Hyphenbildung. In der UTC bildeten 7 % der Konidien Keimschläuche, 22 % bildeten Primärappressorien aus, 17 % Primärhyphen, 27 % Sekundärhyphen, 9 % Tertiärhyphen und 1 % zeigten Hyphenverzweigungen auf. Es blieben 18 % der Konidien ungekeimt. DMI-Fungizide zeigten ein ähnliches Bild auf. Ca. 32 % der Konidien keimten nicht aus, 14-15 % der Konidien bildeten Keimschläuche, 52-53 % Primärappressorien und bei 2 % der Konidien kam es zu Hyphenbildungen. Konidien die mit QoI-BASF bekämpft wurden keimten zu 64 % nicht aus, bildeten zu 26 % Keimschläuche und zu 10 % Primärappressorien. QoI-MS wies 70 % ungekeimte



Konidien auf, 12 % Konidien mit Keimschläuchen und 18 % Konidien mit Primärappressorium. Zu keinem Zeitpunkt kam es bei QoI-Fungiziden zu Hyphenbildungen (Abb. 14).

Abb. 14. Prozentuale Verteilung der Konidien von *Erysiphe necator* gemäß Boniturschema zwölf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi). Die Gesamtheit der ausgezählten Konidien je Variante teilt sich in ihre Entwicklungsstadien S0-S6 auf (n = 4).

Da es ein sehr heterogenes Wachstum der UTC bei den drei Versuchsgliedern gab (Abb. 12-14), wurden bei der weiteren Untersuchung der residualen Wirksamkeit der Fungizide nicht alle Entwicklungsstadien der Konidiengesamtheit einzeln betrachtet. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den drei Zeitpunkten der Probenentnahme (P0, P5, P12) nach Fungizidapplikation herzustellen, wurde daher die Keimhemmungsrate der Fungizide bestimmt. Die residuale Wirkung der DMI- und QoI-Fungizide nahm über einen Zeitraum von zwölf Tagen ab, wobei sich die einzelnen Varianten voneinander unterschieden (Abb. 15, 16). Es gab deutliche Unterschiede in der Keimhemmung zwischen DMI- und QoI-Fungiziden. So wiesen die DMI-Fungizide lediglich eine Hemmung von 20-40 % auf, die nach zwölf Tagen auf unter 20 % absank (Abb. 15). Hier gab es anfänglich Unterschiede von 20 % in der Hemmungsleistung, welche jedoch bis zwölf Tage nach Fungizidapplikation wieder verschwanden. So wiesen Konidien, welche mit DMI-MS behandelt wurden, direkt und fünf Tage nach Fungizidapplikation eine um 15-20 % höhere Keimhemmungsrate auf als bei DMI-BASF. QoI-Fungizide hemmten die Keimung direkt am Tag der Fungizidapplikation um fast 100 %, wobei auch hier die Hemmung zwölf Tage später auf knapp 60 % absank – und dennoch dreimal höher blieb als bei den DMI-Fungiziden. Unterschiede zwischen QoI-BASF und QoI-MS wurden fünf Tage nach Fungizidapplikation deutlich. Die Hemmungsleistung von QoI-BASF sank hier auf rund 30 % ab – QoI-MS hingegen wies eine um fast 40 % höhere Hemmungsleistung auf. Diese Unterschiede verliefen sich acht Tage später, wo beide QoI-Fungizide nahezu gleichauf eine Keimhemmungsrate von 60 % erreichten (Abb. 16).



Abb. 15. Residuale Wirkung von DMI-Fungiziden gegen *Erysiphe necator* über drei Zeitpunkte (je 48 hpi). Die Keimhemmungsrate wurde nach Abbot (1925) berechnet (MW \pm SE; n = 4).



Abb. 16. Residuale Wirkung von QoI-Fungiziden gegen *Erysiphe necator* über drei Zeitpunkte (je 48 hpi). Die Keimhemmungsrate wurde nach Abbot (1925) berechnet (MW \pm SE; n = 4).

Aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der Wirkstoffe musste der Frage nachgegangen werden, wo genau die DMI- und QoI-Fungizide in der Prä-Sporulationsphase von *E. necator* angreifen, da mit der obigen Methode nach Abbot (1925) nur die Hemmungsrate der Keimung sichtbar gemacht wurde. Eine differenzierte Bewertung der tatsächlichen fungiziden Wirkung zwischen DMIund QoI-Fungiziden war somit nicht möglich, da unklar war, ab welchem Stadium der Pathogenese *E. necator* von den verschiedenen Fungiziden gehemmt wird. Dafür wurden die beobachteten Häufigkeiten der Infektionsstrukturen untersucht. Anders als bei der anfänglichen Analyse wurden hier für die statistische Auswertung nicht alle sieben Entwicklungsstadien einzeln analysiert. Stattdessen wurden die drei Entwicklungsphasen von *E. necator* untersucht, die sich aus den sieben Entwicklungsstadien zusammensetzen (Tab. 2). Da die UTC zwölf Tage nach Fungizidapplikation ein starkes Hyphenwachstum aufwies und somit ein besserer Vergleich zwischen den Varianten möglich war, wurde dieser Zeitpunkt für die weiteren differenzierten Untersuchungen betrachtet.

Bei Untersuchung des Zeitpunktes zwölf Tage nach Fungizidapplikation wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten deutlich. Zwischen Wirkstoffen mit demselben Wirkungsmechanismus jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede. Dennoch konnten zwischen Varianten zwölf Tage nach Applikation und 48 hpi signifikante Unterschiede aufgezeigt werden. Parallel dazu zeigt sich, wie sich die Gesamtheit unbehandelter Konidien in die Phasen I-III aufteilt. Im Mittel bildeten 54 % der Konidien der UTC Hyphen aus (Abb. 37 A). Beide QoI-Fungizide erzielten eine hundertprozentige Hemmung der Hyphenbildung. Bei beiden DMI-Fungiziden bildeten nur 2 % der Konidien Hyphen aus. Zwischen den behandelten Varianten gabes keine signifikanten Unterschiede bei der Hemmungsleistung der Hyphen – wohingegen sich die behandelten Varianten gemeinsam signifikant von der UTC abgrenzen (Abb. 17). Unterschiede zwischen den DMI- und QoI-Fungiziden in der Phase der Wirtskolonisierung sind demnach nicht evident.



Abb. 17. Verteilung von Konidien von *Erysiphe necator* mit Hyphe (Phase III) zwölf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi) (Box-and-Whisker-Plots mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Quantil; $\Diamond = MW$; n = 4). Gleiche Buchstaben über den Box-Plots bedeuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten (ANOVA und Bonferroni-Test; p < 0,05).

Die genauere Differenzierung der Wirkungsmechanismen und der Angriffspunkte von den DMI- und QoI-Fungiziden wurden in den früheren Phasen I und II der Prä-Sporulationsphase deutlich. Da die UTC 48 hpi bereits verstärkt Hyphen ausbildete und in der Phase der Wirtskolonisierung angekommen war, blieben lediglich um die 17 % der Konidien ungekeimt. QoI-Fungizide erzielten hier eine signifikante Hemmungsleistung, indem bei QoI-BASF 65 % und QoI-MS 70 % der Konidien nicht auskeimten (Abb. 37 D, E). Bei den DMI-Fungiziden keimten lediglich 32 % der Konidien nicht aus. Zwischen der UTC und den DMI-Fungiziden gab es keine signifikanten Unterschiede, wohl aber zwischen den QoI-Fungiziden im Vergleich mit den anderen Varianten (Abb. 18). Es scheint evident, dass QoI-BASF bei protektiver Anwendung primär als Keimungshemmer fungiert.



Abb. 18. Verteilung von ungekeimten Konidien von *Erysiphe necator* (Phase I) zwölf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi) (Box-and-Whisker-Plots mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Quantil; $\Diamond = MW$; n = 4). Gleiche Buchstaben über den Box-Plots bedeuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten (Welch- und Bonferroni-Test; p < 0,05).

29 % der in der UTC ausgezählten Konidien befanden sich in der Phase II und bildeten jeweils ein Primärappressorium aus. Dies unterschied sich nicht signifikant von den QoI-Fungiziden (QoI-BASF 35 %, QoI-MS 30 %). Einen signifikanten Unterschied gab es im Vergleich zu den DMI-Fungiziden, wo 66 % aller Konidien ein Primärappressorium ausbildeten. Hierdurch blieb der Anteil ungekeimter Konidien bei DMI-Fungiziden gering (Abb. 19; 37 B, C). Zwar wurden unter DMI-Einfluss in der Summe signifikant mehr Konidien mit Primärappressorium dokumentiert als bei anderen Varianten, jedoch wurden wie bei QoI-BASF kaum bis keine Hyphen in Phase III mehr ausgebildet (Abb. 17).



Abb. 19. Verteilung von Konidien von *Erysiphe necator* mit Primärappressorium (Phase II) zwölf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi) (Box-and-Whisker-Plots mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Quantil; $\diamond = MW$; n = 4). Gleiche Buchstaben über den Box-Plots bedeuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten (ANOVA und Bonferroni-Test; p < 0,05).

Zusammenfassend betrachtet hemmten die Wirkstoffe QoI-BASF und QoI-MS ab Phase I, wodurch die Hemmung der Wirtskolonisierung erfolgte. DMI-BASF und DMI-MS erreichten ab Phase II, vor Beginn der Wirtskolonisierung, eine signifikante Wirkung. DMI-BASF hemmte im Gegensatz zu QoI-Fungiziden nicht die Keimung, sondern die Ausbildung von Hyphen und stoppte dadurch die Wirtskolonisierung durch *E. necator* zu einem späteren Zeitpunkt der Pathogenese.

3.2 Protektive Wirkung von neuen Fungiziden gegen Erysiphe necator

Für die Untersuchung der protektiven Wirkung von Fungiziden wurden die Infektionsstrukturen von *E. necator* fünf Tage nach Fungizidapplikation (P5) (48 hpi) auf Blattmaterial von Rebpflanzen aus dem Gewächshaus analysiert. Der Keimungstest auf der Agaroberfläche inokulierter Petrischalen 24 hpi ergab eine Keimungsrate der Konidien von 69 % (Abb. 47).

Parallel zur Untersuchung der residualen und protektiven Wirkung der Fungizide an Freilandblättern wurden auch an Gewächshausblättern signifikante Unterschiede in der Wirkung zwischen DMIund QoI-Fungiziden in allen untersuchten Gruppen deutlich. Zwischen Wirkstoffen mit demselben Wirkungsmechanismus wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Fünf Tage nach Fungizidapplikation zeigten QoI-Fungizide eine signifikante Keimungshemmung auf, wobei bei QoI-BASF 69 % und QoI-MS 72 % der Konidien in Phase I hemmen konnten. DMI-Fungizide unterschieden sich nicht signifikant von der UTC. Hier keimten bei DMI-BASF 72 % und DMI-MS bei 76 % der Konidien aus, was ungefähr der Keimungsrate der UTC entspricht, wo 75 % der Konidien nach 48 hpi auskeimten (Abb. 20).



Abb. 20. Verteilung von ungekeimten Konidien (Phase I) fünf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi) (Box-and-Whisker-Plots mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Quantil; $\diamond = MW$; n = 4). Gleiche Buchstaben über den Box-Plots bedeuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten (Welch- und Bonferroni-Test; p < 0,05).

Rund 22 % der unbehandelten Konidien befanden sich in Phase II und bildeten Primärappressorien aus, wobei hier keine signifikanten Unterschiede zu QoI-Fungiziden bestanden – obgleich behandelte Varianten eine leicht erhöhte Anzahl von Konidien mit Primärappressorium aufwiesen (QoI-BASF 29 %, QoI-MS 27 %). DMI-BASF (47 %) und DMI-MS (42 %) grenzten sich signifikant von der UTC ab. DMI-BASF und QoI-BASF sowie DMI-MS und die QoI-Fungizide unterschieden sich trotz sichtlichen Differenzen im MW nicht signifikant voneinander (Abb. 21).

Während 53 % der Konidien bei der UTC Hyphen ausbildeten, entwickelte *E. necator* auch unter DMI-Einfluss Hyphen. Hier wurden bei DMI-BASF 25 % und bei DMI-MS 34 % Hyphen ausgebildet – was sich zwar signifikant von der UTC, aber auch von den QoI-Fungiziden unterscheidet. Hyphen unter DMI-Einfluss wiesen Deformationen und ein anormales Wachstum auf (Abb. 33 B). Die Hemmung der Hyphenbildung lag bei QoI-BASF bei 2 % und bei QoI-MS bei 1 % (Abb. 22).

Zusammenfassend betrachtet wurden signifikante Unterschiede in der protektiven Bekämpfung von *E. necator* zwischen den Fungiziden mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen sichtbar. Innerhalb der DMI- oder QoI-Fungizide gab es keine signifikanten Unterschiede.



Abb. 21. Verteilung von Konidien mit Primärappressorien (Phase II) fünf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi) (Box-and-Whisker-Plots mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Quantil; $\diamond = MW$; n = 4). Gleiche Buchstaben über den Box-Plots bedeuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten (ANOVA und Bonferroni-Test; p < 0,05).



Abb. 22. Verteilung von Konidien mit Hyphe (Phase III) fünf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi) (Box-and-Whisker-Plots mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Quantil; $\Diamond = MW$; n = 4). Gleiche Buchstaben über den Box-Plots bedeuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten (Welch- und Bonferroni-Test; p < 0,05).

3.3 Kurative Wirkung von neuen Fungiziden gegen Erysiphe necator

Für die Untersuchung der Wirkung von Fungiziden bei kurativer Anwendung (K1) wurden die Infektionsstrukturen von *E. necator* direkt zum Zeitpunkt der Fungizidapplikation (24 hpi) und zwei Tage nach Fungizidapplikation (72 hpi) analysiert. Auch hier wurden die Untersuchungen an Blättern von Rebpflanzen aus dem Gewächshaus durchgeführt. Der Keimungstest auf der Agaroberfläche inokulierter Petrischalen 24 hpi ergab eine Keimungsrate der Konidien von 73 % (Abb. 47).

Zum Zeitpunkt der Fungizidapplikation (24 hpi) wiesen alle Varianten durch alle Entwicklungsstadien hinweg keine signifikanten Unterschiede im Wachstum auf. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Wirkstoffen mit demselben Wirkungsmechanismus. 21-27 % aller Konidien waren nicht ausgekeimt. Innerhalb dieser Gruppe wurde der Welch-Test (F-Wert = 0,43, p-Wert = 0,7809) durchgeführt. 56-61 % aller Konidien wiesen ein Primärappressorium auf und es wurde ein Welch-Test (F-Wert = 0,33, p-Wert = 0,8479) durchgeführt. 17-20 % aller Konidien wiesen Hyphen auf, wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten sichtbar wurden. Auch innerhalb dieser Gruppe wurde der Welch-Test durchgeführt (Abb. 23). Demnach wuchs *E. necator* in allen Varianten homogen bis zum Zeitpunkt der Fungizidapplikation, welcher den Ausgangspunkt für die Entwicklung der Infektionsstrukturen von *E. necator* unter Fungizideinfluss darstellte (Abb. 37 F, G).



Abb. 23. Verteilung von Konidien von *Erysiphe necator* mit Hyphe (Phase III) zum Zeitpunkt der Fungizidapplikation (24 hpi) (Box-and-Whisker-Plots mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Quantil; $\Diamond = MW$; n = 4). Gleiche Buchstaben über den Box-Plots bedeuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten (Welch- und Bonferroni-Test; p < 0,05).



Abb. 24. Verteilung von Konidien von *Erysiphe necator* mit Primärappressorium (Phase II) zwei Tage nach Fungizidapplikation (72 hpi) (Box-and-Whisker-Plots 25 %-, 50 %- und 75 %-Quantil; $\diamond = MW$; n = 4). Gleiche Buchstaben über den Box-Plots bedeuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten (Welch- und Bonferroni-Test; p < 0,05).

Weitergehend wurde dokumentiert, welchen Einfluss die DMI- und QoI-Fungizide auf die Pathogenese der Infektionsstrukturen von *E. necator* haben. Hierfür wurden die Infektionsstrukturen 48 h nach Fungizidapplikation (72 hpi) analysiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden signifikante Unterschiede zwischen DMI- und QoI-Fungiziden deutlich. So traten in Phase II und III der Pathogenese behandelter Konidien von *E. necator* signifikante Unterschiede zwischen den Varianten auf. Demnach befanden sich zu diesem Zeitpunkt nur noch 17 % der Konidien der UTC im Stadium der Bildung von Primärappressorien. 40 % Konidien der Variante DMI-BASF bildeten Primärappressorien und nur 24 % bei der Variante DMI-MS. Erwähnenswerte, signifikante Unterschiede bestanden zwischen QoI-BASF, DMI-BASF sowie der UTC (Abb. 24).

Während 72 hpi bereits 64 % der unbehandelten Konidien Hyphen bildeten (mit Längen von $> 500 \,\mu$ m), fiel die Wirtskolonisierung bei behandelten Varianten anders aus. Signifikante Unterschiede bei der Anzahl von Konidien mit Hyphen gab es zwischen DMI-BASF (38 %) und QoI-Fungiziden (QoI-BASF 3 %, QoI-MS 19 %). DMI-MS (52 %) unterschied sich hierbei quantitativ nicht signifikant von der UTC und DMI-BASF (Abb. 26, 37 H-J). Bei QoI-Fungiziden ist v. a. QoI-BASF auffällig, da zwei Tage nach Fungizidapplikation (72 hpi) im Mittel nur 3 % der Konidien Hyphen aufwiesen, wo diese Zahl 24 hpi noch bei 17 % stand (Abb. 27, 35 A). Ein Stopp und scheinbarer Rückgang des Hyphenwachstums um 14 % scheint bei QoI-BASF daher evident (Abb. 27). Bei QoI-MS hingegen bildeten 19 % der Konidien zwei Tage nach Fungizidapplikation Hyphen (Abb. 37 L). Bei der UTC hingegen nahm im Vergleich die Zahl der Konidien mit Hyphen um 46 % zu (Abb. 23, 25, 26, 27).



Abb. 25. Verteilung von Konidien von *Erysiphe necator* mit Hyphe (Phase III) zwei Tage nach Fungizidapplikation (72 hpi) (Box-and-Whisker-Plots mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Quantil; $\Diamond = MW$; n = 4). Gleiche Buchstaben über den Box-Plots bedeuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten (Welch- und Bonferroni-Test; p < 0,05).



Abb. 26. Entwicklung der Hyphen von *Erysiphe necator* unter Einfluss von kurativ angewendeten DMI-Fungiziden (24 hpi) bis zwei Tage nach Applikation (72 hpi) (MW \pm SE; n = 4). Innerhalb von zwei Tagen nach Fungizidapplikation nahmen Konidien mit Hyphe der UTC um 46 % zu, wohingegen 20 % der Konidien bei DMI-BASF und 33 % bei DMI-MS neue Hyphen bildeten.



Abb. 27. Entwicklung der Hyphen von *Erysiphe necator* unter Einfluss von kurativ angewendeten QoI-Fungiziden (24 hpi) bis zwei Tage nach Applikation (72 hpi) (MW \pm SE; n = 4). Innerhalb von zwei Tagen nach Fungizidapplikation lag bei QoI-BASF eine Reduktion bereits akkumulierter Hyphen von 14 % vor, wohingegen unbehandelte Konidien 46 % an Hyphen gewannen.

3.4 Pathogenese und Morphologie von Erysiphe necator

3.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

3.4.1.1 Pathogenese von Erysiphe necator unter Normalbedingungen

Die für quantitative Analysen in drei Phasen zusammengefasste Prä-Sporulationsphase von *E. necator* besteht aus sieben Stadien (S0-S6), die in ihrer Reihenfolge nacheinander vom Pathogen auf seinem Wirt durchlaufen werden (Tab. 2). Am Beispiel des hier verwendeten Isolats auf der adaxialen Blattseite von Rebblättern der Sorte Riesling wurde parallel zu den Fungizidversuchen die Pathogenese von *E. necator* untersucht. Demnach adhäriert die Konidie ($\emptyset = 10 \,\mu$ m, Länge = $30 \,\mu$ m) in der Landungsphase 0 hpi auf der Kutikula vom Wirt (S0) (Abb. 31 A) und bildet innerhalb der ersten Stunden nach Inokulation einen Keimschlauch von 5-50 μ m Länge aus ($\emptyset = 3-5 \,\mu$ m) (S1) (Abb. 31 B, Pfeil). Es konnte beobachtet werden, dass sich das Primärappressorium (\emptyset 10-20 μ m) bis 6 hpi, durch eine Septe abgeschnürt, am endständigen Teil des Keimschlauches ausbildet (S2) (Abb. 28 B, Pfeil; 29 A; 31 C, Pfeil). Über eine Penetrationspore (Abb. 30, Pfeil) bricht der Pilz in die Wirtskutikula ein, um dann in der Epidermis ein Haustorium zur Nährstoffversorgung zu etablieren. Bis 24 hpi beginnt die Entwicklung der Primärhyphe (S3) ($\emptyset = 3-5 \,\mu$ m), die i. d. R. an dem, dem Primärappressorium entgegengesetzten Punkt der Konidie herauswächst (Abb. 31 D, Pfeil). Die Sekundärhyphe wächst danach ab 24 hpi aus

dem Primärappressorium heraus (S4) (Abb. 28 A, c; 31 E, Pfeil). Zu diesem Zeitpunkt kann die Primärhyphe eine Länge von mehreren hundert µm erreichen (Abb. 31 E). Anschließend folgt ab 48 hpi die Ausbildung der Tertiärhyphe (S5) (Abb. 31 F). Ab 72 hpi verzweigen sich die Primär-, Sekundärund Tertiärhyphe (S6) (Abb. 31 G, Pfeil). 144 hpi sind die Hyphen zu einem dichten Geflecht verwachsen (Abb. 31 H) und bilden zahllose, knotig verdickte hyphale Appressorien entlang der Myzelstränge (Abb. 29 B). Bis 8 dpi bilden sich ca. 100 µm lange, senkrecht aus Hyphen herauswachsende Konidiophoren, an deren Ende neue Konidien reifen (Abb. 31 I). Zu diesem Zeitpunkt sind die Hyphen in nicht mehr erfassbaren Längen auf der Wirtskutikula entwickelt und das Myzel so dicht, dass die Infektionsstrukturen nicht mehr auf die ursprünglich von ihr ausgehenden Konidien zurückzuführen sind. Auffällige Beobachtung während dieses Prozesses war die stellenweise dunkel verfärbte Kutikula im Bereich um penetrierende Appressorien (Abb. 29 A, B, Pfeile). Weiterhin konnte eine Penetrationspore sichtbar gemacht werden, die sich unterhalb von Appressorien befand (Abb. 30, Pfeil). Das Haustorium konnte mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht sichtbar gemacht werden.



Abb. 28. Eine unbehandelte Konidie von *Erysiphe necator* 48 hpi mit ausdifferenzierten Hyphen neben einer ungekeimten Konidie (Fluoreszenzmikroskop) (A). Deutlich sichtbar sind das Primärappressorium (a), die Primär- (b), Sekundär- (c) und die Tertiärhyphe (d). Man beachte die hyphalen Appressorien an der Primärhyphe (Pfeile). Weiterhin gut sichtbar sind die stark fluoreszierenden Septen der Hyphen. Das Primärappressorium einer unbehandelten Konidie von *E. necator* 6 hpi (B). Durch eine Septe (Pfeil) ist das Primärappressorium vom Keimschlauch abgeschnürt (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 µm) (Eigene Aufnahmen 2018).



Abb. 29. Primärappressorium (A) und hyphales Appressorium (B) von *Erysiphe necator* 144 hpi (Fluoreszenzmikroskop). Deutlich sichtbar sind Verfärbungen (Pfeile) (Maßstab ist die Länge der Konidie = $30 \mu m$) (Eigene Aufnahmen 2018).



Abb. 30. Fokus auf die Ebene unterhalb eines Primärappressoriums von *Erysiphe necator* 8 dpi mittels Fluoreszenzmikroskop. Deutlich sichtbar ist die dunkel verfärbte Stelle um die Penetrationsstelle (a), sowie die Penetrationspore unterhalb des Primärappressoriums (Pfeil), unter welcher sich in den Epidermiszellen das Haustorium befinden müsste. Weiterhin sichtbar sind die Hyphen der Konidie (b) sowie eine weitere Konidie mit durchgebrochenem Primärappressorium (c) (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 µm) (Eigene Aufnahme 2018).



Abb. 31. Konidienkeimung und Myzelentwicklung von *Erysiphe necator* an Rebblättern (cv. Riesling) (Fluoreszenzmikroskop). In Phase I: Konidie adhäriert auf der adaxialen Blattseite auf der Kutikula 0 hpi (A). Kurze Zeit nach Inokulation bildet die Konidie einen ca. 5-50 μ m langen Keimschlauch aus (B, Pfeil), an dem sich ab 6 hpi in Phase II ein Primärappressorium herausdifferenziert (C, Pfeil). In Phase III beginnt die Wirtskolonisierung ab 24 hpi, indem sich zunächst die Primär-(D, Pfeil) und dann die Sekundärhyphe (E, Pfeil) ausbildet. 48 hpi wächst die Tertiärhyphe (F, Pfeil). Zu diesem Zeitpunkt ist die Primärhyphe etliche hundert μ m lang, an welcher verstärkt hyphale Appressorien gebildet werden. 72 hpi beginnt *E. necator* mit der Hyphenverzweigung (G, Pfeil). 144 hpi wachsen verzweigte Hyphen an der Oberfläche der Wirtskutikula und Appressorien penetrieren ihren Wirt, um in der Epidermis Haustorien zur Nährstoffversorgung zu bilden (H). 8 dpi sind erste Konidiophoren mit reifenden Konidien sichtbar (I) (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 μ m) (Eigene Aufnahmen 2018).

3.4.1.2 Morphologie der Infektionsstrukturen von Erysiphe necator unter Fungizideinfluss

In dieser Arbeit gab es zwischen verwendeten DMI- und QoI-Fungiziden evidente Unterschiede im Einfluss auf die Morphologie der Infektionsstrukturen von *E. necator* – auch in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt.



Abb. 32. Auswirkungen von DMI- und QoI-Fungiziden bei protektiver Anwendung auf Konidien von *Erysiphe necator* zwölf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi) (Fluoreszenzmikroskop). DMI-BASF (B) zeigte turgeszente Konidien auf, die jedoch keine Hyphen aufwiesen. Das Primärappressorium scheint kleiner als das der UTC. QoI-BASF (C) weist aufgerissene und augenscheinlich letal bekämpfte Konidien auf. Löcher und die losgelöste Hüllstruktur sind klar erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt bildete die UTC (A) größtenteils Hyphen mit einer Länge von unter 50 μ m aus. Typisch für die UTC auf Freilandblättern sind die sich langsam entwickelnden Hyphen – hier eine junge, kaum ausdifferenzierte Tertiärhyphe 48 hpi (Pfeil) (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 μ m) (Eigene Aufnahmen 2018).

Bei protektiver Applikation schafften es Konidien unter DMI-Einfluss in Abhängigkeit vom Versuch (Blattmaterial aus Freiland oder Gewächshaus) nicht über Phase II der Pathogenese hinauszukommen und bildeten tlw. deformierte Primärappressorien aus (Abb. 32 B; 36 B, C). Je nach Blattmaterial bzw. Zeitpunkt nach Fungizidapplikation oder der unterschiedlichen Wirkstoffkonzentration gelang dem Pathogen fünf Tage nach Fungizidapplikation auf Blättern von Gewächshauspflanzen der Sprung in Phase III, wo ein reduziertes und anormales Hyphenwachstum, ähnlich dem im Kurativversuch, beobachtet wurde (Abb. 33 B, a, b). Beim Protektivversuch mit Blattmaterial aus dem Freiland gelang den DMI-Fungiziden hingegen eine fast vollständige Hemmung der Hyphenbildung fünf bis zwölf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi). Die UTC jedoch wuchs auf Freilandblättern eher zögerlich (Abb. 32 A, Pfeil; 37 A). Die UTC auf Blattmaterial von Gewächshauspflanzen (P5) hingegen zeigte eine ausgeprägtere Wirtskolonisierung auf (Abb. 33). Die in der Summe vermehrt vorgefundenen Konidien mit Primärappressorium bei DMI-Fungiziden beim Residual- und Protektivversuch wiesen nicht, wie in der UTC, einen Durchmesser von über 10 µm auf, sondern waren stellenweise zierlicher, um 1-5 µm dicker oder schmaler und mit einem Durchmesser von mehr oder weniger als 10 µm. Die Konidien waren turgeszent und fluoreszierten ebenso kräftig wie die der UTC. QoI-Fungizide hingegen wirkten aggressiver bei der Bekämpfung von E. necator. Das Hyphenwachstum wurde sehr gut inhibiert, wobei insbesondere bei QoI-BASF mehrere auffällige Schadbilder beobachtet werden konnten.

Zum einen zerrissen Konidien bevor ein Keimschlauch ausdifferenziert werden konnte. Hier schien sich die äußerste Hüllstruktur von der Konidie zu lösen, bzw. die gesamte Konidie aufzureißen (Abb. 32 C, 37 D). Zum anderen schienen Konidien durch ein scheinbares Kollabieren eingedrückt bzw. -gezogen und tlw. geschrumpft zu sein, da der Zellinhalt sichtlich ins Innere der Konidie gedrückt wurde (Abb. 33 C). Es ist naheliegend, dass diese physikalischen Schäden eine Folge vom Einsatz des QoI-Fungizides sind, da die beschriebenen Effekte nicht bei der UTC oder DMI-Fungiziden dokumentiert wurden.



Abb. 33. Auswirkungen von DMI- und QoI-Fungiziden bei protektiver Anwendung auf Konidien von *Erysiphe necator* fünf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi) (Fluoreszenzmikroskop). Hyphen der UTC (A) wiesen in der Mehrheit eine Länge von > 200 μ m auf. DMI-BASF (B) hat sich hier über das Stadium der Primärappressorienbildung (S2) weiterentwickelt – und weist ein quantitativ geringeres und qualitativ anormales Hyphenwachstum auf: Verkrümmte, angeschwollene Hyphenenden mit verstärkter Chitinakkumulation (a) und auffälliger Hyphenverzeigung (b). QoI-BASF (C) weist ungekeimte und geplatzte Konidien auf (Pfeil) (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 μ m) (Eigene Aufnahmen 2018).

Bei kurativer Fungizidapplikation wiesen bereits etablierte Infektionsstrukturen ab dem Zeitpunkt der Applikation mit DMI-Fungiziden eine entartete Morphologie auf. Die Hyphenbildung konnte weder bei DMI-BASF noch bei DMI-MS gestoppt werden. Dennoch gab es Unterschiede zur UTC, welche 72 hpi zwar im Stadium der Hyphenverzweigung angekommen war, jedoch um etliche hundert µm längere Hyphen aufwies, die in ihrem Durchmesser 3-5 µm betrugen (Abb. 37 H). Im Gegensatz dazu schien das Längenwachstum bei mit DMI-Fungiziden behandelten Konidien zu stagnieren. Hyphen überschritten die Länge von 100-200 µm nicht – stattdessen wurde eine unübliche Vielzahl an Hyphenverzweigungen (Abb. 34, b; 35 B, 37 J) mit tlw. nicht fluoreszierenden Hyphenabschnitten (Abb. 34, Pfeil) gebildet. Ein Stresswachstum von *E. necator* ist hier offensichtlich. Weiterhin wiesen gebildete Hyphenenden eine anormale, keulenförmige Schwellung ($\emptyset = 5-10 \mu$ m) auf, welche im Kontrast zu Hyphen der UTC stärker fluoreszierten (Abb. 34, a; 35 B, b; 37 I). Diese verdickten Hyphenenden schienen nicht mehr an der Kutikula zu haften und krümmten sich von der betrachteten Ebene nach oben weg. Die behandelten Konidien waren, wie die UTC, turgeszent und normal fluoreszierend (Abb. 35 B, a). QoI-Fungizide hingegen zeigten eine andere Wirkung. Hier wurde das weitere Hyphenwachstum nach dem Zeitpunkt der Fungizidapplikation gestoppt, wobei die Anzahl der vorhandenen Hyphen nach der Fungizidapplikation rückläufig war. Untersuchte Hyphen waren eingedrückt und schwach fluoreszierend – stellenweise war ein Auseinanderreißen von Hyphen sichtbar (Abb. 35 A, b). Anders als bei DMI-Fungiziden kollabierten Konidien von *E. necator* unter QoI-Einfluss bei kurativer Applikation ebenso wie bei protektiver Anwendung (Abb. 33 C; 35 A, a; 36 C, Pfeile). Konidien schienen zu explodieren, platzten auf oder drückten sich nach innen ein (Abb. 36 A-C, Pfeile). Bei QoI-BASF kollabierten bzw. zerrissen sowohl protektiv als auch kurativ behandelte Konidien, wobei in kurativer Anwendung ein Stopp des Hyphenwachstums sichtbar wurde (Abb. 27, 35 A, 37 K). Unklar bleibt, warum das Hyphenwachstum auf Blattmaterial aus dem Gewächshaus schlechter von DMI-Fungiziden inhibiert wurde als auf Freilandblättern.



Abb. 34. Kurativ mit DMI-MS behandelte Konidien von *Erysiphe necator* zwei Tage nach Fungizidapplikation (72 hpi) (Fluoreszenzmikroskop): Angeschwollene Hyphenenden mit verstärkter Chitinakkumulation (a), verstärkte Hyphenverzeigungen (b) und fehlendes Chitin in Hyphen (Pfeil) (Maßstab ist die Länge der Konidie = $30 \,\mu$ m) (Eigene Aufnahme 2018).



Abb. 35. Auswirkungen von QoI- und DMI-Fungiziden 72 hpi bei kurativer Anwendung auf Konidien von *Erysiphe necator* einen Tag nach Inokulation (Fluoreszenzmikroskop). 48 h nach Fungizidapplikation zeigen QoI-BASF und DMI-BASF eine entartete Hyphenentwicklung auf. Konidien bei QoI-BASF (A) weisen einen Kollaps des Turgors auf, da der Zellinhalt der Konidien scheinbar ins Innere der Konidie gedrückt bzw. gezogen wird (a). Weiterhin sind Hyphen instabil, zusammengedrückt und nur schwach fluoreszierend (b). Konidien bei DMI-BASF (B) sind turgeszent (a) und weisen ein verstärktes, anormales Hyphenwachstum auf: Hyphenenden sind keulenähnlich angeschwollen und scheinen nicht an der Kutikula zu haften (b) (Maßstab ist die Länge der Konidie = $30 \,\mu$ m) (Eigene Aufnahmen 2018).



Abb. 36. Auswirkung von QoI-BASF 72 hpi bei kurativer Anwendung auf Konidien von *Erysiphe necator* einen Tag nach Inokulation (Fluoreszenzmikroskop). Aufgerissene (A, B, Pfeile) und eingedrückte Konidien (C, Pfeile) als typisches Erkennungsmerkmal dieses Wirkstoffes in kurativer Anwendung. Auffällig sind die wenigen, schwach fluoreszierenden Hyphen (a) bzw. Keimschläuche (b) bekämpfter Konidien. QoI-BASF zeigt hier v. a. zwei typische Symptome an behandelten Konidien auf: Zerreißen der Hüllstruktur von Konidien (A, B, Pfeile) und ein scheinbares Eindrücken bzw. Zusammenziehen der Zellinhalte ins Innere der Konidie (C, Pfeile). Symptome wie bei Anwendung von DMI-Fungiziden sind nicht aufgetreten (Maßstab ist die Länge der Konidie = $30 \mu m$) (Eigene Aufnahmen 2018).



Abb. 37. Einfluss von DMI- und QoI-Fungiziden auf *Erysiphe necator* in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt (Fluoreszenzmikroskop). Zwölf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi): UTC (A), DMI-BASF (B), DMI-MS (C), QoI-BASF (D), QoI-MS (E). DMI-BASF (F) und QoI-BASF (G) zum Zeitpunkt der kurativen Applikation 24 hpi. Zwei Tage nach kurativer Applikation (72 hpi): UTC (H), DMI-BASF (I), DMI-MS (J), QoI-BASF (K), QoI-MS (L) (Maßstab ist die Länge der Konidie = $30 \mu m$) (Eigene Aufnahmen 2018).

3.4.2 Kryo-Umweltrasterelektronenmikroskopie

Die Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop konnten durch einen Vergleich ausgewählter Varianten mittels Kryo-Umweltrasterelektronenmikroskopie am Swiss Nanoscience Institute ergänzt werden. Hierfür wurden 72 hpi (un-)behandelte Konidien von *E. necator* auf Blattscheiben der Rebsorte Riesling analysiert. Bei allen Varianten lag wie in den vorangegangenen Untersuchungen eine breite Verteilung verschiedener Entwicklungsstadien (S0-S6) der Konidien von *E. necator* vor. Aus diesem Grund wurden repräsentative Aufnahmen ausgesuchter Strukturen gemacht.



Abb. 38. Unbehandelte Konidie von *Erysiphe necator* 72 hpi (ESEM). Deutlich sichtbar sind Primärappressorium (a), Primär- (b) und Sekundärhyphe (c), eine Hyphenverzweigung sowie ein hyphales Appressorium (e). Man beachte die rundlich glatt ausgeformte Konidienspitze, von welcher die Primärhyphe ausgeht (Pfeil) (Eigene Aufnahme 2018).

Bei unbehandelten Konidien von Е. necator konnten bei der Kryo-Umweltrasterelektronenmikroskopie ähnliche Strukturen dokumentiert werden wie bei der Fluoreszenzmikroskopie. Durch die dreidimensionale Ansicht konnten die Infektionsstrukturen präzise analysiert werden. Typische Strukturen 3 dpi waren Konidien mit mehreren ausgebildeten Hyphenstadien. Mittels ESEM konnte das Primärappressorium von E. necator präzise dokumentiert werden. Primärappressorien waren vielfältig ausgeformt und bauchig gewölbt mit einem Durchmesser von bis zu 20 µm (Abb. 38 a, 39 A). Unterhalb vom Primärappressorium war eine saugnapfähnliche Struktur ausdifferenziert, an welcher extrazelluläres Material sichtbar war. Dieses extrazelluläre Material schien offensichtlich die Oberfläche des Primärappressoriums mit der Kutikula zu verbinden (Abb. 39 A, Pfeil). Weiterhin sichtbar waren fortgeschrittene Entwicklungsstadien von *E. necator* wie Konidien mit Hyphenverzweigungen und zahlreichen ausdifferenzierten hyphalen Appressorien (Abb. 38, d, e, 39 B).



Abb. 39. Primärappressorium (A) mit austretender Sekundärhyphe und hyphales Appressorium (B) unbehandelter Konidien von *Erysiphe necator* 72 hpi (ESEM). Sichtbar ist extrazelluläres Material, welches scheinbar die Kutikula mit der Oberfläche des Primärappressorium verbindet (Pfeil) (Eigene Aufnahmen 2018).

Die Symptome von mit DMI-BASF einen Tag nach Inokulation behandelten Konidien gleichen 72 hpi bei Untersuchungen am ESEM denen, die am Fluoreszenzmikroskop beobachtet wurden. So wurden anormal ausgeprägte, rundlich deformierte Primärappressorien und hyphale Appressorien beobachtet (Abb. 40, a, b). Hyphen wiesen ebenfalls eine Verdickung an ihren Spitzen auf und schienen sich von der Kutikula zu lösen (Abb. 40, c, 42 B). Weiterhin konnten abgestorbene bzw. kollabierte Hyphenabschnitte beobachtet werden (Abb. 41 A, b). Diese kollabierten Hyphenabschnitte schienen sich hinter verdickten Septen abzuschnüren (Abb. 41 A, a). Generell schienen Infektionsstrukturen unter DMI-Einfluss ungleichmäßig ausgeformt und anormal entwickelt.

Protektiv fünf Tage vor Inokulation mit QoI-BASF behandelte Konidien von *E. necator* zeigten 72 hpi ebenfalls ähnliche Symptome wie in den Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop, obgleich dort der Zeitpunkt 48 hpi analysiert wurde. Im Gegensatz zur UTC und DMI-BASF lag hier weitestgehend keine breite Verteilung unterschiedlicher Entwicklungsstadien vor. Vielmehr waren beinahe alle vorgefundenen Konidien von *E. necator* bei Untersuchung am ESEM kollabiert und stark deformiert. Zwar konnten Überreste von Konidien gefunden werden, welche Überreste von Keimschläuchen (Abb. 42, a, 43 B, Pfeil) oder Primärappressorien aufwiesen (Abb. 42, b) – jedoch waren diese Infektionsstrukturen größtenteils kollabiert und nicht turgeszent. Zerrissene Konidien wie unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet konnten nicht gefunden werden. Konidien unter QoI-Einfluss waren in unterschiedlicher Ausprägung eingesunken und stellenweise plattgedrückt an der Kutikula anhaftend (Abb. 42, 43).



Abb. 40. Einen Tag nach Inokulation mit DMI-BASF kurativ bekämpfte Konidie von *Erysiphe ne-cator* (72 hpi) (ESEM). Deutlich sichtbar sind ein deformiertes Primärappressorium (a) und anormal ausgeprägtes hyphales Appressorium (b) sowie eine verdickte Hyphenspitze (c) (Eigene Aufnahme 2018).



Abb. 41. Typische Hyphendeformationen bei mit DMI-BASF einen Tag nach Inokulation kurativ behandelten Konidien von *Erysiphe necator* (72 hpi) (ESEM). An einer Septe initiierte Verdickung der Hyphe (a). Man beachte den kollabierten, jüngeren Hyphenabschnitt, welcher scheinbar von einer verdickten Septe abgeschnürt ist (b). Charakteristische Keulenbildung einer Hyphenspitze mit einem Durchmesser von beinahe 10 μ m (B) (Eigene Aufnahmen 2018).



Abb. 42. Protektiv mit QoI-BASF behandelte Konidien von *Erysiphe necator* fünf Tage nach Fungizidapplikation (72 hpi) (ESEM). Offensichtlich sind alle Konidien letal getroffen und kollabiert – obgleich sie Überreste von anfänglich ausdifferenzierten Keimschläuchen (a) und Primärappressorien (b) aufweisen (Eigene Aufnahme 2018).



Abb. 43. Protektiv mit QoI-BASF behandelte Konidien von *Erysiphe necator* fünf Tage nach Fungizidapplikation (72 hpi) (ESEM). Kollabierte Konidien weisen eine rau gemaserte Oberflächenstruktur auf und scheinen komplett zusammengezogen (A). Überreste einer Konidienkette (B). Die mittlere Konidie bildete einen Keimschlauch aus, der wie die Konidie selber kollabierte (Pfeil) (Eigene Aufnahmen 2018).

4 **DISKUSSION**

In dieser Arbeit wurde das Wirkungsprofil neuer Fungizide gegen *E. necator* an Blättern der Rebsorte Riesling quantitativ und qualitativ untersucht. Hierzu wurde die residuale, protektive und kurative Wirkung von DMI- und QoI-Fungiziden an Konidien mittels verschiedener Mikroskopietechniken auf Blattmaterial aus dem Freiland und Gewächshaus dokumentiert.

Die Ergebnisse vom Residualversuch zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den verwendeten DMI- und QoI-Fungiziden über einen Zeitraum von bis zu zwölf Tagen nach Fungizidapplikation. Generell wiesen DMI-Fungizide eine höhere Zahl ungekeimter Konidien auf als die UTC und gerade zwölf Tage nach Fungizidapplikation eine stark erhöhte Anzahl an Konidien mit Primärappressorium. QoI-Fungizide wiesen eine höhere Anzahl ungekeimter Konidien auf als DMI-Fungizide und die UTC. Weiterhin war die Zahl von Konidien mit Primärappressorium im Vergleich zur UTC und DMI-Fungiziden verringert. Bei beiden Fungizidklassen war das Hyphenwachstum zu jedem Zeitpunkt nach Fungizidapplikation beinahe komplett inhibiert. Bei näherer Untersuchung der Konidienentwicklung zu den drei Zeitpunkten nach Fungizidapplikation zeigte sich in der UTC ein heterogenes Wachstum von E. necator. Während die Hälfte der Konidien der UTC auf Blattmaterial zwölf Tage nach Beginn des Freilandversuches Hyphen akkumulierten, war das Wachstum an den zwei vorigen Terminen deutlich verringert. Der Grund weshalb die UTC jeweils bei der Blattprobenentnahme direkt am Tag und fünf Tage nach Fungizidapplikation keine bis kaum Hyphenstadien ausbildete konnte nicht geklärt werden. Zwar erreichte die UTC Phase II, die Wirtsbesiedlung, in dem mehr Konidien mit Primärappressorium sichtbar wurden, das Hyphenwachstum war ab diesem Stadium jedoch nicht bis kaum mehr gegeben. Bei Betrachtung der beiden Fungizidklassen sind die Unterschiede in der Verteilung der Entwicklungsstadien weniger deutlich. Die Anzahl von Konidien in sehr frühen Entwicklungsstadien (S0-S2) bei den ersten beiden Terminen der Blattprobenentnahme war hier jedoch leicht erhöht. Aus Gründen der Vergleichbarkeit der drei Termine der Blattprobenentnahme wurde daher die Keimhemmungsrate der Fungizide näher untersucht. Die Auswertung mit der Formel nach Abbot (1925) wurde durch die heterogene Hyphenbildung der UTC jedoch nicht tangiert, da lediglich die Keimhemmungsrate betrachtet wurde – und hierfür war die Zahl gebildeter Hyphen nicht ausschlaggebend. Die untersuchten Fungizide waren im Wirkungsmechanismus verschieden und zeigten eine Differenz in der Keimungshemmung. DMI-Fungizide zeigten in dieser Arbeit eine signifikante Hemmungsleistung im späteren Verlauf der Pathogenese von *E. necator*, weshalb zwar eine geringfügige Keimhemmung vorlag, diese jedoch nicht die Leistung eines QoI-Fungizides erreichte, welches direkt die Keimung inhibieren kann. Es ist bekannt, dass die Phase der Sporenkeimung sehr empfindlich gegenüber QoI-Fungiziden ist (Ypema & Gold 1999, Oliver & Hewitt 2014). Die Keimhemmungsleistung der untersuchten Fungizide zeigt, dass die Hemmungsleistung der DMI-Fungizide deutlich geringer als die der QoI-Fungizide, was im Wirkungsmechanismus der Wirkstoffe begründet sein könnte, da durch DMI-Fungizide v. a. strukturelle Veränderungen durch Hemmung der Ergosterolbiosynthese auftreten können, welche bei der Ausdifferenzierung von Infektionsstrukturen sichtbar werden können. QoI-Fungizide inhibieren hingegen die Energieversorgung, welche überlebenswichtig für den Pilz ist (Ishii & Hollomon 2015). Zweitens scheint die Hemmungsleistung trotz einer abnehmenden Tendenz über die drei Zeitpunkte der Blattprobenentnahme bis zwölf Tage nach Fungizidapplikation relativ stabil. Der Wirkungsverlust bei DMI-MS und den QoI-Fungiziden innerhalb von zwölf Tagen nach Fungizidapplikation kann durch viele Faktoren begründet sein. So kann die Wirkung unter Freilandbedingungen bspw. durch Verdampfung oder Hydrolyse zurückgehen (Andrieu et al. 2000). In jedem Falle findet eine sensible Interaktion zwischen Wirkstoff, Pathogen, Wirt und der (un-)belebten Umwelt statt. Nicht zu erklären ist die zunächst sinkende Wirkung von DMI-BASF und QoI-BASF fünf Tage nach Fungizidapplikation – zumal die Hemmungsrate zwölf Tage nach Fungizidapplikation wieder zunahm. Möglicherweise kann der geringe, punktuelle Niederschlag von 5-7 mm einen Tag vor und am Morgen der letzten Blattprobenentnahme eine Auswirkung auf die Verteilung der noch potentiell auf der Blattoberfläche vorhandenen Wirkstoffdepots gehabt haben, indem sich der Wirkstoff neu auf dem Blatt verteilte. Eine Neuverteilung von Fungiziden durch eintretende Nässe wie Tau oder Niederschlag kann mit ihrer Wirkung korrelieren. So ist es möglich, dass Wirkstoffdepots auf der Blattoberfläche durch eine Ausbreitung bei Anfeuchtung mehr Blattfläche schützen als direkt nach der Applikation (Andrieu et al. 2000, Hislob & Cox 1970). Fraglich ist dennoch, ob die relativ geringe Niederschlagsmenge eine ausreichende Begründung für den aufgetretenen Effekt ist. Immerhin verblieben die behandelten Blätter bis zwölf Tage nach Fungizidapplikation im Freiland und waren somit dynamischen Prozessen wie UV-Strahlung, Feuchtigkeit, Wind und biologischen Organismen ausgesetzt, welche alle einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Fungizide gehabt haben können (Andrieu et al. 2000). Vermutlicherweise könnte eine Variabilität auch durch die Applikationstechnik im Freiland entstanden sein. DMI-MS und QoI-MS hingegen beschrieben einen leichten, beinahe linearen Abwärtstrend in der Hemmungsleistung. Die Infektion an Blattmaterial zwölf Tage nach Fungizidapplikation war im Hinblick auf die Hyphenbildung erfolgreicher. In der vorliegenden Arbeit wurden die sechs bonitierten Entwicklungsstadien in drei Phasen zusammengefasst und dahingehend analysiert. Die Anzahl ungekeimter Konidien bei UTC, DMI- und QoI-Fungiziden unterschied sich signifikant voneinander, was sich mit den Untersuchungen zur Keimhemmungsrate deckt und mit den Wirkungsmechanismen der Fungizide erklärt werden kann. Auffällig ist die signifikant erhöhte Anzahl von Konidien mit Primärappressorium bei beiden verwendeten DMI-Fungiziden, was womöglich eine Folge von Stresswachstum sein kann, da das bekämpfte Pathogen anscheinend eine Wirtsbesiedlung versuchte – seinen Wirt jedoch nicht weiter besiedeln konnte. Dies könnte eine Folge der inhibierten Ergosterolbiosynthese sein (Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015). Beim Wirkungsmechanismus der Fungizide konnten bei protektiver Anwendung an Freilandblättern aufgrund der unterbrochenen Ergosterolbiosynthese Unterschiede deutlich gemacht werden, wobei generell ein Leistungsabfall bis zwölf Tage nach Applikation beobachtet wurde. Während DMI-Fungizide v. a. eine erhöhte Anzahl von Konidien mit Primärappressorium hervorriefen, war bei QoI-Fungiziden die Zahl ungekeimter Konidien signifikant erhöht. Zu keinem Zeitpunkt waren signifikante Unterschiede innerhalb der gleichen Wirkstoffklasse sichtbar. Sowohl DMI- als auch QoI-Fungizide schienen hier bei protektiver Anwendung gleichermaßen die Ausbildung von Hyphen zu hemmen.

Der Protektivversuch an Blattmaterial von Gewächshauspflanzen zeigte fünf Tage nach Fungizidapplikation ähnliche Ergebnisse wie der vorangegangene Residualversuch an Freilandblättern. E. necator wuchs auf Gewächshausblättern jedoch scheinbar schneller, was sich an den quantitativen und qualitativen Beobachtungen festmachen lässt. Die Anzahl ungekeimter Konidien unterschied sich bei DMI-Fungiziden nicht signifikant von der UTC. QoI-Fungizide hingegen wiesen die meisten ungekeimten Konidien auf und grenzten sich so signifikant von den anderen Varianten ab. Bei DMI-Fungiziden zeigten sich mehr Konidien mit Primärappressorium als bei der UTC und bei QoI-Fungiziden, was sich mit dem Residualversuch vergleichen lässt. Im Hinblick auf das Hyphenwachstum wurden signifikante Unterschiede zwischen UTC, DMI- und QoI-Fungiziden deutlich. Innerhalb der gleichen Fungizidklasse gab es keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zum Protektivversuch mit Freilandblättern gab es hier weniger ungekeimte Konidien bei DMI-Fungiziden, sowie eine erhöhte Hyphenakkumulation. DMI- und QoI-Fungizide unterschieden sich in Phase I und III signifikant voneinander, was mehrere Gründe haben kann. Zum einen kann das generell bessere Wachstum der UTC bei Gewächshausblättern ein Indikator für eine aggressivere Pathogenese als an Freilandblättern sein, was sich in einer schwächeren fungiziden Leistung der DMI-Fungizide äußern könnte. Erwähnenswert an dieser Stelle ist der Unterschied des Längenwachstums der Hyphen der UTC auf dem Blattmaterial. Während 48 hpi E. necator auf Blattscheiben der Freilandblättern (P12) eher zögerlich Sekundär- und Tertiärhyphen mit max. 50 um Länge ausdifferenzierte, wiesen unter gleichen Bedingungen inkubierte Blattscheiben von Gewächshauspflanzen (P5) mit demselben Isolat von E. necator eine deutlich dichtere und ausgeprägtere Wirtskolonisierung durch längere Hyphen auf. Außerdem wurde die Wirkstoffkonzentration aus Gründen der Organisation für die Gewächshausversuche von 37,5 g a. i./ha auf 30 g a. i./ha verringert, was einen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben könnte. Weiterhin könnte auch die biologische Variabilität des Pathogens die Wirkung beeinflusst haben. Es ist nicht auszuschließen, dass der Zeitraum der Blattprobenentnahme einen Einfluss auf das Wachstum von E. necator hatte: Wurde für den Residualversuch aufgrund der heterogenen Hyphenentwicklung der Zeitpunkt zwölf Tage nach Fungizidapplikation näher analysiert, lag dieser Termin beim Gewächshausversuch fünf Tage nach der Applikation. Da die Wirkstoffverteilung in der Pflanze einer gewissen Dynamik folgt, kann die Translokation der applizierten Fungizide innerhalb eines definierten Zeitraums in Abhängigkeit des Pflanzenmaterials und äußeren Umständen zu einer veränderten Wirkung führen (Schreiber & Schönherr 1992, Andrieu et al. 2000, Stevens et al. 1987, Stevens et al. 1988). Obwohl die QoI-Fungizide bei beiden Wirkstoffkonzentrationen eine vergleichbare Leistung aufwiesen, scheint bei den DMI-Fungiziden eine abnehmende Wirkung vorzuliegen, da das Hyphenwachstum im Protektivversuch an Gewächshausblättern zwar gering war, qualitativ jedoch dem Kurativversuch glich. Die hohe Anzahl von Konidien mit Primärappressorium bei DMI-Fungiziden deutet auf eine Hemmung ab Phase II der Pathogenese von E. *necator*, der Wirtsbesiedlung, hin – wo bei höherer Aufwandmenge an Freilandblättern kein Übergang zum Hyphenwachstum möglich war. Die Konidien verrannten sich hier also scheinbar im Entwicklungsstadium S2. Möglicherweise hatte die geringere Aufwandmenge der Wirkstoffe bei den Gewächshausversuchen einen Einfluss auf die Wirkung der DMI-Fungizide. Eine unterschiedlich ausgeprägte Dosis-Wirkungs-Beziehung bei DMI- und QoI-Fungiziden könnte hier eine Erklärung bieten. Es ist fraglich, ob eine direkte Vergleichbarkeit der Untersuchungen zur protektiven Wirksamkeit der Fungizide zwischen Freiland- und Gewächshausblätter möglich ist, da die natürlichen und planmäßigen Rahmenbedingungen differierten. Gerade im Hinblick auf die Blattphysiologie und abiotischen Faktoren wie bspw. UV-Strahlung, Feuchtigkeit und Wind gibt es Unterschiede zwischen Freiland und Gewächshaus, die sich auf die applizierten Wirkstoffe und spätere Inkubation auswirken können. Wind und UV-Strahlung sind bspw. in der Pflanzenanzucht im Gewächshaus im Vergleich zu Freilandbedingungen kaum vorhanden und restliche Bedingungen vergleichsweise stabil. Alleine hierdurch können im Blattwachstum morphologische Unterschiede entstehen, die eine Pathogenese von E. necator anders ablaufen lassen können als an "robusteren" Freilandblättern. Wie eingangs geschildert, können die auftretenden Unterschiede zwischen einer Kutikula von Gewächshausblättern und Freilandblättern die Taktung der Pathogenese von E. necator beeinflussen. Womöglich wuchsen Hyphen nicht derart schnell wie auf Gewächshausblättern, da E. necator schlichtweg in der Wirtsbesiedlung schwerer mit der Penetration der Kutikula zu kämpfen hatte. Es ist bekannt, dass Unterschiede in der Ausprägung der Wirtskutikula die Nährstoffaufnahme eines Mehltaupilzes beeinflussen können und so auch die Pathogenese parallel zur Fungizidapplikation beeinträchtigt wird bzw. heterogen ausfallen kann (Agrios 2005, Smolka & Wolf 1986). Hierdurch könnten auch die Unterschiede bei den DMI-Behandlungen zu erklären sein: Ein schwächer wachsendes Pathogen wird so möglicherweise besser durch das Fungizid gehemmt werden als ein Pathogen, welches schneller Hyphen etablieren kann. Nicht klärbar ist die Frage, in welchem Ausmaß die verwendeten Fungizide einen Einfluss auf pflanzeneigene Abwehrmechanismen haben, oder ob die fungiziden Effekte rein auf die Wirkstoff-Pathogen-Interaktion zurückzuführen ist. Zusätzliche Unterschiede in der verwendeten Applikationstechnik bedingen z. B. zwangsläufig einen Unterschied im Benetzungsgrad und der Tröpfchengröße – in Korrelation mit den Unterschieden im Gewächshaus- und Freilandklima sind mögliche Differenzen zwar nicht quantitativ erfassbar, dennoch naheliegend. Bei Gewächshausblättern wurden demnach fünf Tage nach Fungizidapplikation Unterschiede im Wirkungsmechanismus der Fungizide deutlich, die den Ergebnissen aus dem Residualversuch an Freilandblättern ähnelten. Nahm bei DMI-Fungiziden in der Konidiengesamtheit die Zahl von Konidien mit Primärappressorium prozentual zu, so war bei QoI-Fungiziden die Zahl ungekeimter Konidien signifikant erhöht. DMI- und QoI-Fungizide schienen hier bei protektiver Anwendung die Ausbildung von Hyphen zu hemmen. Obwohl alle Fungizidvarianten signifikante Unterschiede bei der Hyphenentwicklung aufzeigten, schienen DMI-Fungizide in diesem Versuch keine vollständige Hemmung des Hyphenwachstums zu erreichen.

Der Kurativversuch an Blattmaterial von Gewächshauspflanzen zeigte zwei Tage nach Fungizidapplikation (72 hpi) aufschlussreiche Ergebnisse. Aufgrund des homogenen Wachstums von Hyphen bis 24 hpi bei allen Varianten ist es offensichtlich, dass die DMI- und QoI-Fungizide zum Zeitpunkt der Applikation keinen direkten bzw. sofortig sichtbaren Effekt auf die bereits etablierten Infektionsstrukturen hatten. Erst im Zeitraum der 48 h danach ablaufenden Pathogenese zeigten die applizierten Wirkstoffe unterschiedliche Effekte. Ähnlich wie bei den Protektivversuchen schlüsselten sich hier die Wirkungsmechanismen auf, indem signifikante Unterschiede zwischen den Varianten deutlich wurden. Die Anzahl akkumulierter Hyphen 48 h nach Fungizidapplikation unterschied sich signifikant zwischen UTC, DMI-BASF und QoI-BASF, wohingegen sich UTC und DMI-MS sowie DMI-BASF und QoI-MS nicht signifikant voneinander unterschieden. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede innerhalb der gleichen Wirkstoffklassen. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt der Schluss nahe, dass die Wirkstoffe einen kurativen Effekt auf die Hyphenbildung hatten. Unter Einfluss von DMI-Fungiziden entwickelten sich deformierte Hyphen mit keulenartigen, stark fluoreszierenden Spitzen, nicht fluoreszierenden Hyphenabschnitten und verstärkten Hyphenverzweigungen bei einer kümmerlich geringen Hyphenlänge. Dieses Bild zeigte sich auch mittels ESEM, wo zusätzlich kollabierte Hyphenabschnitte und kollabierte Konidien mit Primärappressorium gefunden wurden. Diese Beobachtungen können auf ein mögliches Stresswachstum hindeuten und sind typisch für den Wirkungsmechanismus der DMI-Fungizide, da während der Hyphengenese Ergosterol als struktureller Bestandteil von Zellwänden akkumuliert wird (Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015). Wird die Biosynthese von Ergosterol durch DMI-Fungizide zerschlagen, können strukturelle Deformationen auftreten, wie sie auch schon Leinhos et al. (1997) bei der Anwendung von Penconazol auf E. necator beschrieben hat. Ob diese Effekte im späteren Verlauf fungitoxisch wirken ist aus den vorliegenden Untersuchungen nicht zu entnehmen deutlich wurde jedoch, dass das Pilzwachstum nicht stoppte, sondern in anormaler Form weiterlief. Ob und in welcher Form derart bekämpfte Infektionsstrukturen sporulieren können, wurde in dieser Arbeit nicht festgestellt. QoI-Fungizide zeigten eine andere Wirkungsweise - kurativ behandelte Konidien wurden direkt in ihrer Morphologie und Vitalität beeinflusst, in dem ähnliche Schäden auftraten wie bei protektiver Behandlung, was sowohl bei Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop wie auch ESEM gezeigt wurde. Weiterhin schien die Entwicklung von E. necator innerhalb der 48 h nach Behandlung nicht weiterzulaufen, was anhand der abnehmenden Zahl von Hyphenstadien sichtbar wurde. Während bei den DMI-Fungiziden zwar in stockender Anzahl weiter abnorme Hyphen gebildet wurden, kam es zu einem deutlichen Rückgang der Hyphenbildung unter QoI-Einfluss. Eine ähnliche Beobachtung machte Reuveni (2001) beim QoI-Fungizid Trifloxystrobin, wo eine kurative Bekämpfung von E. necator ebenfalls einen Rückgang bereits etablierten Myzels zur Folge hatte. Vermutlich lag hier eine fungitoxische Wirkung vor – immerhin wird durch diese Wirkstoffklasse die Energieversorgung des Pathogens abgeschnitten (Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015, Oliver & Hewitt 2014). Weiterhin wurde eine Hemmung der Keimung und Wirtspenetration beobachtet, was in der Folge ebenfalls die Hyphenbildung unterdrückte. Die dortigen Beobachtungen bestätigen die hier beobachtete Inhibition früher Phasen der Pathogenese von *E. necator* durch QoI-Fungizide. Bei kurativer Applikation zeigten DMI-Fungizide demnach eine Verlangsamung des Hyphenwachstums, wohingegen QoI-Fungizide einen Stopp des Hyphenwachstums bedingten. Im Vergleich zur UTC wurden so signifikante Eingriffe in die Pathogenese deutlich.

Die qualitativen Untersuchungen mittels verschiedener Mikroskopietechniken zeigen anschaulich die Differenzen zwischen der Pathogenese unbehandelter Konidien von E. necator und behandelter Varianten auf. Unbehandelte Konidien von E. necator wiesen eine Pathogenese auf, die den Beschreibungen der Literatur gleicht (Rumbolz et al. 2000, Leinhos et al. 1997). Wie in Leinhos (1997) beschrieben, erreichen Konidien von E. necator i. d. R. innerhalb von 72 hpi das Stadium der Hyphenverzweigung. Während der Wirtsbesiedlung von E. necator konnten mit den vorhandenen mikroskopischen Mitteln stellenweise Penetrationssporen sichtbar gemacht werden. Diese Struktur entsteht, nachdem die appressorische Penetrationshyphe des Pathogens die Wirtskutikula mechanisch penetriert hat (Gadoury 2012a, Heintz & Blaich 1990, Leinhos et al. 1997). Ähnlich wie bei V. inaequalis bildet E. necator hierfür zunächst das Primärappressorium am endständigen Teil des Keimschlauches aus (Rumbolz et al. 2000). Dieser Prozess läuft innerhalb weniger Stunden ab (Hering et al. 1993, Rumbolz et al. 2010). Mittels ESEM konnte an der äußeren Seite von Primärappressorien extrazelluläres Material sichtbar gemacht werden, welches von Rumbolz et al. (2000) als Hilfsmittel des Pilzes zur Anhaftung am Wirt identifiziert wurde. E. necator ist daraufhin in der Lage, in die Epidermiszellen vom Rebblatt einzudringen, um dort Haustorien zu etablieren. Penetrationsporen werden auch bei Pathogenen wie Oidium neolycopersici oder Magnaporthe grisea zwecks Wirtsbesiedlung durch Penetrationshyphen der Appressorien in die Wirtskutikula getrieben (Agrios 2005, Howard & Valent 1996). Die Mechanismen während der Wirtspenetration sind nicht ganz geklärt, obgleich bei M. grisea gezeigt worden ist, dass die Appressorien einen osmotisch generierten Druck von bis zu 80 bar aufbauen, um mittels Penetrationshyphe die Wirtskutikula zu durchbrechen (Howard & Valent 1996). Es wird vermutet, dass E. necator die mechanische Penetration der Wirtskutikula mittels Penetrationshyphe durch den Einsatz von Enzymen unterstützt. Enzyme helfen neben der Etablierung von Infektionsstrukturen von E. necator auf der Blattoberfläche demnach auch bei der Etablierung der Penetrationspore, bzw. erweitern diese (Rumbolz et al. 2000, Heintz & Blaich 1990). Als weitere Indikatoren der Wirtsbesiedlung durch E. necator konnten an manchen Stellen untersuchter Gewächshausblätter unregelmäßig auftretende, hellbraune Nekrosen beobachtet werden, die durch die Kutikula hindurch sichtbar waren. Die Färbung der nekrotisierten Zellen kann durch die Akkumulation von Polyphenolen entstehen, wobei die Ausprägung solcher Abwehrreaktionen von der jeweiligen Rebsorte abhängig ist (Heintz & Blaich 1990). Es ist anzunehmen, dass

in diesen Fällen eine Abwehrreaktion pflanzlicher Zellen gegen das invadierende Pathogen stattfand. Solche Reaktionen können z. B. eine durch wirtseigene Resistenzgene induzierte, lokal begrenzte Apoptose sein, wie sie bereits Qiu et al. (2015) an der Weinrebe bei einem Befall mit *E. necator* beobachtete. Demnach ist es anzunehmen, dass die stellenweise dokumentierten Nekrosen durch eine Wirtspenetration hervorgerufen wurden – welche auch bei mit DMI- bzw. QoI-Fungiziden behandelten Gewächshausblättern beobachtet wurden. Smolka & Wolf (1986) bestätigten hierbei, dass systemische Fungizide bei *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* eine Wirtspenetration und Ausbildung von Haustorien nicht verhindern können. Über die Ausbildung des Haustoriums von *E. necator* bzw. die Wirkung der Fungizide auf diese Infektionsstruktur kann in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden.

Unter Fungizideinfluss wiesen Konidien von E. necator eine sichtlich veränderte Pathogenese auf. So unterschied sich die Wirkung der DMI- und QoI-Fungizide nicht nur im Hinblick auf die quantitative, also statistische Auswertung, sondern auch bez. ihrer qualitativen Ausprägung. Augenscheinlich beeinflussten die DMI-Fungizide primär die etablierten Infektionsstrukturen von E. necator, während QoI-Fungizide die Vitalität von Konidien beeinflussten. So kollabierten Konidien unter QoI-Einfluss und wiesen auch physikalische Schäden, bspw. durch ein Aufreißen der Hüllstruktur, auf. Dies deckt sich mit der quantitativen Auswertung, wo die Keimhemmungsrate bei QoI-Fungiziden signifikant höher war als die der DMI-Fungizide. Auch bei kurativer Anwendung wird aufgrund des fehlenden Hyphenwachstums und optischen Eindrucks bekämpfter Konidien mitsamt Infektionsstrukturen eine fungitoxische Reaktion vermutet. Physikalische Schäden wie etwa ein Bersten von Konidien oder die Reduktion von bereits vorhandenen Hyphen traten in der beobachteten Häufigkeit und Stärke in dieser Arbeit bei QoI-Fungiziden nur am Fluoreszenzmikroskop auf. Am ESEM fielen v. a. kollabierte Konidien bei OoI-BASF auf. Dies kann auf den Wirkungsmechanismus zurückzuführen sein. OoI-Fungizide greifen demnach im Komplex III der pilzlichen Atmungskette, indem der Elektronentransport am Cytochrom b/c1-Komplex an der äußeren Quinon-Seite im Intermembranraum vom Mitochondrium inhibiert wird (Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015, Oliver & Hewitt 2014). Da hierdurch die ATP-Versorgung abgeschnitten wird, kollabiert die betroffene Konidie. Wie Ipema & Gold (1999) für Kresoxymmethyl aufzeigten, wirkten die in dieser Arbeit untersuchten QoI-Fungizide ebenfalls auf die frühen Stadien der Pathogenese und reduzieren zugleich die spätere Myzelausbildung. Dies unterscheidet sich deutlich vom Wirkungsmechanismus der in dieser Arbeit verwendeten DMI-Fungizide. Unter DMI-Einfluss fand primär eine Beeinträchtigung der Ausbildung von Infektionsstrukturen statt, was in dieser Arbeit sowohl quantitativ als auch qualitativ gezeigt werden konnte (Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015). Die charakteristischen DMI-Symptome, welche in dieser Arbeit dokumentiert werden konnten, liegen in der negativ veränderten strukturellen Beschaffenheit der Infektionsstrukturen von E. necator begründet. Typische Symptome der DMI-Fungizide waren ein reduziertes Hyphen-, sowie ein Stresswachstum, welches sich in stark fluoreszierenden Verdickungen von Hyphenenden, nicht fluoreszierenden Hyphenabschnitten oder einer anormalen Anhäufung und Ausprägung von Hyphenverzweigungen deutlich machte. Es hatte stellenweise den Anschein, als würden die dokumentierten Verdickungen an den Hyphenenden direkt an Septen entstehen, wobei angrenzende, jüngere Hyphenabschnitte an diesen Nahtstellen verkümmerten und abstarben. Untersuchungen am ESEM bestätigten diese strukturellen Deformationen, wobei zu vermuten ist, dass die hier gefundenen, von verdickten Septen abgeschnürten Hyphenabschnitte möglicherweise jene nicht fluoreszierenden Hyphenabschnitten sein könnten, welche bei den Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop gefunden wurden. Diese Beobachtungen traten nicht bei QoI-Fungiziden auf, decken sich jedoch mit Untersuchungen von Leinhos et al. (1997) wo an mit Penconazol bekämpften Konidien von E. necator ähnliche Effekte beobachtet wurden. Der Einfluss von DMI-Fungiziden auf die Infektionsstrukturen von E. necator ist so auch hier deutlich geworden. Das Phänomen der nicht fluoreszierenden Hyphenabschnitte kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Fluorochrommoleküle der Uvitex 2B-Färbelösung als Bindungspartner Chitin benötigen - welches jedoch im Gegensatz zu Ergosterol in der Zellwand und nicht in der Zellmembran von Pilzen befindlich ist (Koch & Pimsler 1987). Wird demnach die Chitinakkumulation bzw. -verteilung in den Zellwänden der pilzlichen Infektionsstrukturen gestört, so beeinträchtigt dies die Intensität des abgestrahlten Fluoreszenzlichtes der betroffenen Stellen. Da durch DMI-Fungizide jedoch primär die Ergosterolbiosynthese angegriffen wird und Ergosterol bekanntlich in der Zellmembran von Pilzen vorhanden ist, bleibt die Frage offen, wieso die Chitinakkumulation bzw. -verteilung in der Zellwand ebenfalls beeinträchtigt wird. Dieses Phänomen wurde bei phytopathogenen Pilzen bislang nur bei der Bekämpfung von Ustilago maydis und Penicillium italicum mit den DMI-Fungiziden Imazalil und Fenpropimorph beobachtet und ist bislang nicht aufgeklärt worden (Kerkenaar & Barug 1984). Möglicherweise werden durch die DMI-Fungizide nicht nur die Ergosterolbiosynthese, sondern auch andere Prozesse des Pilzes in der Zellwand gestört. Im Kontrast dazu stehen strukturelle Entartungen wie verstärkte Hyphenverzweigungen und Anschwellungen von Hyphenspitzen, welche sich sichtlich von der Kutikula abhoben und in der Ebene nach oben Richtung Betrachter wuchsen. Weiterhin konnten deformierte Primärappressorien beobachtet werden. Derartige strukturelle Veränderungen bei Hyphen von E. necator unter DMI-Einfluss wurden bereits bei Leinhos et al. (1997) beobachtet, sowie ferner von Kerkenaar & Barug (1984) an Hyphen von P. italicum unter Fenpropimorph-Einfluss. Die verstärkte Fluoreszenzemission dieser deformierten Strukturen weist demnach auf eine verstärkte Chitinakkumulation hin, wobei die Deformationen auf das Fehlen von Ergosterol als struktureller Bestandteil der Zellmembran zurückzuführen ist. Da bei DMI-Fungiziden scheinbar die Verteilung von Chitin und Akkumulation von Ergosterol in neu ausgebildeten Infektionsstrukturen gestört wird, liegt nicht unbedingt eine fungitoxische Wirkung vor. Vielmehr wird gerade für DMI-BASF ein Einfluss auf die strukturelle bzw. morphologische Entwicklung des Pathogens vermutet. Aufgrund der Ergebnisse residualer, protektiver und kurativer Behandlungen liegt hier wahrscheinlich eine fungistatische Wirkung vor. Erhärtet wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass das Hyphenwachstum zwar in seiner Länge, jedoch nicht in seiner allgemeinen Entwicklung unterbunden wurde. Auch zeigten Konidien unter DMI-Einfluss keine physikalischen Schäden wie es etwa bei QoI-Fungiziden der Fall war – was durch die Intensität des abgestrahlten Fluoreszenzlichtes unterstrichen wurde. Hier bleibt die Frage offen, ob *E. necator* durch DMI-BASF in seiner Entwicklung lediglich abgebremst wurde oder doch im späteren Verlauf der Pathogenese abstirbt. Gerade bei einer protektiven Applikation, wo QoI-Fungizide scheinbar fungitoxisch wirken ist es unklar, ob unter DMI-Einfluss stehende Konidien intakte Primärappressorien ausbilden, welche noch in der Lage sind die Wirtskutikula zu penetrieren – oder ob durch die inhibierte Ergosterolbiosynthese neu ausgebildete Infektionsstrukturen defekt und nicht funktionstüchtig sind. Generell kann festgehalten werden, dass durch die Fungizide deutliche morphologische Effekte bei *E. necator* aufgetreten sind, die Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus und die Wirkungsart geben können.

Die in dieser Arbeit verwendete Inokulationsmethode weist an einigen Stellen Schwachpunkte auf. So ist zu vermuten, dass durch das Abklopfen der sporulierenden Rebblätter aus der BASF-internen Gewächshausnachzucht neben Konidien von E. necator auch Kontaminationen auf die Petrischale und Blattscheiben gelangten. Die Konidiendichte war vor der Inokulation nicht einheitlich festzulegen, da jedes verwendete, sporulierende Blatt eine unterschiedliche Anzahl an Konidien aufwies. Chellemi & Marois (1991) zeigten diesbezüglich, dass die Anzahl produzierter Konidien von E. necator während der Sporulation auf Rebblättern hoch variabel ist. Nach erfolgter Inokulation war die Verteilung der Konidien auf den Petrischalen eher heterogen. Eine Bestimmung der einheitlichen Konidiendichte nach Inokulation war aus praktischen Gründen nicht durchführbar, da bspw. eine Zählkammer nicht in das zur Inokulation benutzte Kunststoffrohr gepasst hätte. Durch eine direkt im Anschluss an die Inokulation stattfindende Kontrolle am Stereomikroskop konnte lediglich eine ungefähre Schätzung der Konidienzahl erfolgen um ein Minimum von 100 Konidien pro Blattscheibe sicherzustellen. Durch die Verwendung von zwei mit E. necator sporulierenden Rebblättern je zu inokulierender Petrischale konnte diese Mindestzahl an Konidien sichergestellt werden. Es ist dennoch nicht geklärt, ob die in den Versuchen vorhandene Konidiendichte einen Einfluss auf die Pathogenese hatte. So wurde bereits beschrieben, dass eine zu hohe Inokulumdichte bei B. graminis f. sp. tritici in einer Konkurrenz um Lebensraum und Nährstoffen innerhalb der Population des Pathogens ausartete (Rouse et al. 1984). Ein dichteabhängiges Populationswachstum kann die Pathogenese demnach negativ beeinflussen - was in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden konnte.

Das verwendete Blattmaterial konnte nicht oberflächensterilisiert werden, da durch Salze oder Alkohole womöglich die Wachsschicht der Blattoberfläche verändert würde und eine mögliche Verfälschung des Wirkstoffverhaltens hätte auftreten können. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Wirkstoffprofilierung im Bezug zur Pathogenese von *E. necator* lag, musste daher mit unsterilisiertem Blattmaterial gearbeitet werden. Nachteil dieses Vorgehens war eine verstärkte Kontaminationsgefahr, die dafür sorgte, dass der Inkubationszeit von *E. necator* ein natürliches Zeitlimit gesetzt war. Beobachtungen aus kleineren Vortests und den Protektivversuchen nach konnten Blattscheiben nicht länger als 48 hpi inkubiert werden - Blattscheiben aus dem Kurativversuch waren 72 hpi inkubierbar. Grund hierfür kann die Dauer der Exposition des Blattmaterials gegenüber der Umwelt sein, durch die sich im Laufe der Zeit Kontaminationen auf der Kutikula etablieren können. Wurde das Blattmaterial länger als beschrieben inkubiert, wuchs der Druck durch Kontaminationen derart an, dass die Infektionsstrukturen von E. necator nicht mehr klar zu differenzieren waren. Typische Kontaminationen traten durch Aspergillus spp., Acremonium spp. und Penicillium spp. auf. Durch die Inokulationsmethode und das nicht sterilisierte Blattmaterial waren Kontaminationen trotz sorgfältiger Arbeit nicht zu verhindern. Zusätzlich bereitete ein unidentifizierter, scheinbar pilzlicher Hyperparasit dem Inkubationsprozess Schwierigkeiten. Dieser Hyperparasit wurde nur auf mit E. necator inokulierten Blattscheiben beobachtet und schien die Infektionsstrukturen von *E. necator* durch Hyphen ($\emptyset = 1-2 \mu m$) zu parasitieren. Makroskopisch äußerte sich diese Art der Kontamination bei längerer Inkubationszeit ab 72 hpi durch weiße, wattebauschartige Knäuel von Hyphen (Höhe = 500-1000 μ m, Ø = 500-1000 μ m), welche sich deutlich von der Kutikula der Blattscheibe abhoben. Diese Struktur war offensichtlich in der Lage zu sporulieren und entließ dabei hunderte, kugelähnliche Sporen ($\emptyset < 1 \mu m$). Dieser Hyperparasit fluoreszierte bei Färbung mit Uvitex 2B. Aufgrund der geschilderten Störfaktoren wurde bei den mikroskopischen Studien für die Analyse der Prä-Sporulationsphase entschieden, da in diesem Zeitraum Kontaminationen keine Zeit zu vollen Entfaltung fanden und die Konidien und Infektionsstrukturen von E. necator präzise differenzierbar waren. Fraglich ist dennoch, ob die Kontaminationen einen Einfluss auf die Ausprägung der Prä-Sporulationsphase von E. necator hatten und ob dadurch die Wirkung der Fungizide beeinträchtigt wurde.

Das Wachstum des verwendeten Isolats von *E. necator* unterschied sich in Abhängigkeit vom verwendeten Blattmaterial. So zeigte die UTC im Residualversuch an Blattscheiben aus Freilandblättern ein deutlich verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu den Protektiv- und Kurativversuchen an Blattmaterial aus dem Gewächshaus auf. Es wird vermutet, dass das heterogene, tlw. verlangsamte Wachstum von *E. necator* entweder mit der biologischen Variabilität oder mit der unterschiedlichen Blattphysiologie wie der epikutikulären Wachsschicht bzw. der Dicke der Kutikula von Freilandblättern zusammenhängt – alles Faktoren die dem Pathogen eine Wirtsbesiedlung erschweren können (Agrios 2005, Smolka & Wolf 1986). Demnach kann die Wirt-Pathogen-Interaktion in Abhängigkeit vom Isolat und der befallenen Rebsorte variieren. Weiterhin beeinflussen auch abiotische Faktoren wie das Klima die Wirkstoffverteilung im Blatt und damit auch die Art und Weise einer später stattfindenden Pathogenese von *E. necator* (Stevens et al. 1988, Hislob & Cox 1970, Andrieu et al. 2000). Zusätzlich ist es erwähnenswert, dass die zwischen Freiland- und Gewächshausversuchen aufgetretenen Unterschiede des Pilzwachstums nicht nur die UTC, sondern auch die Fungizidvarianten betrafen. Hierbei könnten die Wirkungsunterschiede der DMI-Fungizide bei protektiver Applikation auf Freiland- und Gewächshausblätter durch mehrere Punkte begründet sein: Zum einen durch die oben bereits geschilderten Faktoren

oder zum anderen auch durch die unterschiedlichen Aufwandmengen der Wirkstoffe bei den Protektivversuchen. Da die protektive Wirkung auf Gewächshausblättern lediglich bei DMI-Fungiziden geringer war als auf Freilandblättern, liegt möglicherweise eine unterschiedlich ausgeprägte Dosis-Wirkungs-Beziehung bei DMI- und QoI-Fungiziden vor. Der Grund für die Durchführung des Keimungstest 24 hpi bei jedem Versuch war die heterogene Entwicklungsgeschwindigkeit von *E. necator*, welche durch die biologische Variabilität des pilzlichen Wachstums bedingt sein kann (Rumbolz et al. 2000). Daher lag bei der Analyse der Konidiengesamtheit immer eine schwankende Verteilung von Entwicklungsstadien vor, die in Abhängigkeit vom Fortschritt in der Pathogenese Schwerpunkte bei den verschiedenen Entwicklungsstadien setzte.

Die Entscheidung, welche Zeiträume der Pathogenese in dieser Arbeit für die mikroskopischen Untersuchungen betrachtet werden sollten, wurde mit Hilfe der Literatur und Vortests bestimmt (Rumbolz et al. 2000, Leinholz et al. 1997). Der Abschnitt der Prä-Sporulationsphase (S0-S6) erwies sich hierbei als entscheidender Abschnitt der Pathogenese von E. necator, da von den frühen Infektionsstrukturen die benötigte Nährstoffversorgung für den weiteren Vorstoß auf das Wirtsgebiet abhängt. Wird dem Pathogen diese Versorgung verwehrt, bricht die Pathogenese zusammen. Das Fluorochrom Uvitex 2B zeigte sich hier als schnelle, zuverlässige und unkomplizierte Färbemethode, wie es bereits von Koch & Pimsler (1987) beschrieben wurde. Gerade die lange Lagerungszeit der Färbelösung sowie die sehr homogen ausfallende Fluoreszenzemission machten eine einfache, differenzierte Beobachtung der pilzlichen Entwicklung möglich. Im Kontrast dazu war bei einer reinen Hellfeld-Untersuchung ohne Fluorochrommarkierung eine quantitative oder qualitative mikroskopische Analyse der Infektionsstrukturen von E. necator auf Blattscheiben nahezu unmöglich, da diese hyalin sind und sich nicht gegen die Färbung der Blattscheibe abgrenzen können. Da durch das Fluorochrom Uvitex 2B nur Chitin und Cellulose gefärbt werden und die Menge des abgestrahlten Fluoreszenzlichtes bekanntlich mit der Anzahl gebundener Fluorochrommoleküle korreliert, konnten gerade bei den mit DMI-Fungiziden behandelten Infektionsstrukturen Beobachtungen bez. des Einflusses dieser Wirkstoffklasse auf die Chitinverteilung in den Zellwänden gemacht werden. Wie jedoch bereits festgestellt, wird durch Uvitex 2B nicht das Ergosterol der pilzlichen Zellmembranen gefärbt, weshalb es fraglich ist, warum DMI-Fungizide einen Einfluss auf die Chitinverteilung in den Zellwänden von E. necator haben (Kerkenaar & Barug 1984, Koch & Pimsler 1987). Die Störung der Ergosterolbiosynthese konnte dennoch auch ohne direkte Färbung von Ergosterol, aufgrund der strukturellen Deformationen von Primärappressorien und Hyphen, vermutet werden. Bei genauerer Analyse der Daten fällt auf, dass bei der Bonitur auch Konidien mit Keimschläuchen quantitativ erfasst wurden und zusammen mit der Anzahl von Konidien mit Primärappressorium in Phase II summiert wurden. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache begründet, dass die exakte Differenzierung von einem reinen Keimschlauch und der beginnenden Initiierung des Primärappressoriums in den meisten Fällen nicht möglich war. Zudem fiel die Anzahl von bonitierten Koniden mit Keimschlauch (S1) bei allen Varianten durch die Versuche hinweg annähernd gleich aus.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die fungizide Wirkung von DMI-BASF und DMI-MS in einer scheinbaren Verlangsamung der Pathogenese von E. necator liegt, wobei signifikante Eingriffe in Keimung, Primärappressorien- und Hyphenbildung des Pilzes dokumentiert werden konnten. DMI-BASF schien demnach bei den durchgeführten Versuchen fungistatisch zu wirken, da das Hyphenwachstum weder bei protektiver, noch bei kurativer Anwendung vollends gestoppt werden konnte. QoI-BASF und QoI-MS zeigten einen signifikanten Einfluss auf die frühen Phasen der Pathogenese von E. necator. QoI-BASF scheint demnach fungitoxisch zu wirken, da protektiv eine signifikant hohe Keimhemmung beobachtet wurde und E. necator keine Hyphen ausbilden konnte. Bei kurativer Anwendung war bei QoI-BASF ein deutlicher Rückgang bereits ausdifferenzierter Hyphen evident. Zu keinem Zeitpunkt gab es signifikante Unterschiede innerhalb der gleichen Fungizidklassen bei gleicher Aufwandmenge. Die untersuchten DMI- und QoI-Fungizide zeigten entsprechend ihrem Wirkungsmechanismus eine signifikante Hemmungsleistung der Infektionsstrukturen von E. necator in verschiedenen Phasen der Prä-Sporulationsphase. Morphologische Entartungen von Konidien und deren Infektionsstrukturen gaben zudem einen tieferen Aufschluss über den Wirkungsmechanismus der DMI- und QoI-Fungizide. Möglicherweise könnten hier durch eine kombinierte Applikation beider Wirkstoffe additive Effekte entstehen, welche eine bessere Bekämpfung von E. necator ermöglichen könnten (Lyr 1995). Zu mindestens wäre es zu erwarten, dass sich die hier verwendeten DMI- und QoI-Fungizide in ihrer Wirkung ergänzen könnten, da sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Pathogenese von E. necator signifikante Effekte zeigen. Für weitere Untersuchungen wäre es demnach interessant herauszufinden, wie sich DMI- und QoI-BASF bei kombinierter Applikation verhalten würden. Weiterhin bleibt offen, wie der Einfluss der Fungizide auf die Sporulation von E. necator ausgeprägt ist und ob die

Wirtspenetration durch E. necator unter Einfluss der DMI- und QoI-Fungizide beeinträchtigt wird.
5 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit konnten neben der Charakterisierung des verwendeten Isolats von E. necator an Blättern der Rebsorte Riesling signifikante Unterschiede im Wirkungsmechanismus der untersuchten DMI- und QoI-Fungizide in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt herausgearbeitet werden. Sowohl DMI- wie auch QoI-Fungizide zeigten einen signifikanten Einfluss auf verschiedene Phasen der Pathogenese von E. necator. In Versuchen über die residuale Wirkung der verwendeten Fungizide bei protektiver Applikation im Freiland über zwölf Tage hinweg wiesen DMI-Fungizide eine geringere Keimhemmungsrate von Konidien auf als QoI-Fungizide. Bei protektiver Anwendung lag bei DMI-Fungiziden eine stark verringerte Hyphenbildung vor, wohingegen bei OoI-Fungiziden eine Hemmung der Keimung gegeben war. Bei kurativer Applikation bremsten DMI-Fungizide die Hyphenbildung signifikant ab, wohingegen bei QoI-Fungiziden eine signifikante Hemmung und Reduktion von Hyphen vorlag. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Fungiziden mit gleichem Wirkungsmechanismus bei gleicher Aufwandmenge. Beide Wirkstoffklassen beeinflussten die Hyphenbildung signifikant. Weiterhin konnten mittels verschiedener Mikroskopietechniken morphologische Unterschiede zwischen mit DMI- und QoI-Fungiziden behandelten Konidien bzw. Infektionsstrukturen von E. necator dokumentiert werden. Mit DMI-Fungiziden behandelte Konidien wiesen neben strukturellen Deformationen von Primärappressorien und Hyphen auch eine fehlerhafte Chitinakkumulation bzw. -verteilung auf. Qol-Fungizide hingegen beeinflussten scheinbar direkt die Vitalität behandelter Konidien, welche in der Folge physikalische Schäden aufwiesen. Den mikroskopischen Beobachtungen nach zu urteilen kann es sich bei DMI-BASF um einen fungistatischen Wirkstoff handeln, da neben qualitativen und morphologischen Indikatoren das Wachstum von E. necator in allen Versuchen verlangsamt bzw. abgeschwächt - jedoch nicht komplett gestoppt wurde. Bei QoI-BASF handelt es sich den Ergebnissen aus qualitativen und quantitativen Untersuchungen nach höchstwahrscheinlich um einen fungitoxischen Keimungshemmer, der die Pathogenese von E. necator auch bei kurativer Anwendung stoppen kann.

Offen bleibt die Frage, welche Auswirkungen eine kombinierte Applikation von DMI- und QoI-BASF auf die Pathogenese von *E. necator* hätte. Weiterhin ist es unklar, warum es zwischen den Ergebnissen der Protektivversuche mit Freiland- und Gewächshausblättern Differenzen in der Hemmungsleistung der DMI-Fungizide gab. Die fungistatische bzw. fungitoxische Wirkung von DMI-BASF bzw. QoI-BASF ist nicht komplett abgesichert, da der Einfluss der Wirkstoffe auf die spätere Entwicklung von *E. necator* nicht untersucht wurde. Auch bleibt offen, wie der Einfluss der Fungizide auf die Sporulation von *E. necator* ausgeprägt ist und ob eine Wirtspenetration durch *E. necator* unter diesen Umständen beeinflusst wird.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18 (2): 265-267.
- Agrios, G. N. (2005) Plant Pathology. 5. Auflage. Elsevier Ltd., Oxford, GB: 30-32, 114, 143, 176-203.
- Andrieu, N., Genet, J. L., Jaworska, G., Bompeix, G. (2000) Behaviour of famoxadone deposits on grape leaves. Pest Management Science 56 (12): 1036-1042.
- Anonym A (2018) Bundesamt f
 ür Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2018) Pflanzenschutzmittel-Verzeichnis 2018 - Teil 3: Weinbau. Online in Internet: URL: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/psm_verz_3.html?nn=1798082 [Stand: 18.03.2018].
- Anonym B (2018) Fungicide Resistance Action Committee (2018) FRAC Code List 2018. Online in Internet: URL: www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-codelist/frac_code_list_2018-final.pdf?sfvrsn=6144b9a_2 [Stand: 18.03.2018].
- Anonym C (2010) The Australian Wine Research Institute (2010) Pests and Diseases. Characteristics of powdery mildew. Online in Internet: URL: https://www.awri.com.au/wp-content/up-loads/powdery_mildew_characteristics.pdf [Stand: 17.02.2018].
- Anonym D (2018) Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau Weinsberg (2018) *Oidum* (Rebenmehltau) – Schadbild, Biologie und Bekämpfung. Online in Internet: URL: http://www.lvwo-bw.de/pb/,Lde/Startseite/Fachinformationen/Oidium+-+Schadbild_+Biologie+und+Bekaempfung?LISTPAGE=669250 [Stand: 22.02.2018]
- Anonym E (2016) Institut Viti-Vinicole (2016) Hinweise zur Bekämpfung von Oidium im integrierten und ökologischen Weinbau. Online in Internet: URL: http://www.ivv.public.lu/aktuelles/2016/2/fachvortraege_2016/Oidium_Bekaempfung.pdf [Stand: 22.02.2018].
- Anonym F (2018) Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (2018) Verzeichnis der in Österreich zugelassenen/genehmigten Pflanzenschutzmittel. Online in Internet: URL: http://pmg.ages.at/pls/psmlfrz/pmgweb2\$.Startup [Stand: 18.03.2018].
- Anonym G (1999) University of Illinois at Urbana-Champaign (1999) Reports on Plant Diseases. Online in Internet: URL: http://ipm.illinois.edu/diseases/series700/rpd703/ [Stand: 14.03.2018].
- Anonym H (2018) PIWI International (2018) Online in Internet: URL: https://www.piwi-international.de/de/ [Stand: 17.03.2018].

- Anonym I (2017) Zweckverband f
 ür Wasserversorgung "Pf
 älzische Mittelrheingruppe" (2017) Trinkwasseranalyse. Online in Internet: URL: http://s521256799.online.de/homepage/Ihr%20Wasser/Kundenanalyse.pdf [Stand: 31.05.2018].
- Anonym J (2018) Dienstleistungszentren Ländlicher Raum Rheinland-Pfalz (2018) Rebschutz- und Weinbauinfodienst Pfalz. Online in Internet: URL: http://www.dlr-rheinpfalz.rlp.de/Internet/global/inetcntr.nsf/dlr_web_full.xsp?src=56329FW757&p1=53I22390XV&p3=W725ON-7213&p4=FR58GWW0GQ [Stand: 03.06.2018].
- Anonym K (2018) Agrarmeteorologie Rheinland-Pfalz (2018) Wetterstation Schifferstadt. Online in Internet: URL: http://www.am.rlp.de/Internet/AM/NotesAM.nsf/amweb/aea26ec6eb6672cbc1257171002e8a2f?OpenDocument&TableRow=2.9#2. [Stand: 29.06.2018].
- Anonym L (2018) Polysciences Inc. (2018) Uvitex 2B. Online in Internet: URL: http://www.polysciences.com/default/catalog-products/life-sciences/fluorescent-dyes-stains/uvitex-2b/ [Stand: 25.07.2018].
- Anonym M (2018) FAO (2018) FAOSTAT. Online in Internet: URL: http://www.fao.org/faostat/en/# data/QC [Stand: 25.07.2018].
- Bouby, L., Figueiral, I., Bouchette, A., Rovira, N., Ivorra, S., Lacombe, T., Pastor, T., Picq, S., Marinval. P., Terral, J. F. (2013) Bioarchaeological insights into the process of domestication of grapevine (*Vitis vinifera* L.) during Roman times in Southern France. Plos One 8 (5): 1-13.
- Börner, H. (2009) Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 8. Auflage. Springer-Verlag, Heidelberg, DE: 8, 112, 493-549, 661.
- Calonnec, A., Cartolaro, P., Poupot, C., Dubourdieu, D., Darriet, P. (2004) Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. Plant Pathology 53 (4): 434-445.
- Carroll, J. E., Wilcox, W. F. (2003) Effects of humidity on the development of grapevine powdery mildew. Phytopathology 93 (9): 1137-1144.
- Chellemi, D. O., Marois, J. J. (1991) Sporulation of *Uncinula necator* on Grape Leaves as Influenced by Temperature and Cultivar. Phytopathology 81 (2): 197-201.
- Deliere, L., Miclot, A. S., Sauris, P., Rey, P., Calonnec, A. (2010) Efficacy of fungicides with various modes of action in controlling the early stages of an *Erysiphe necator*-induced epidemic. Pest Management Science 66 (12): 1367-1373.

- Delp, C. J. (1954) Effect of temperature and humidity on the grape powdery mildew fungus. Phytopathology 44 (11): 615-626.
- Doster, M. A., Schnathorst, W. C. (1985) Effects of leaf maturity and cultivar resistance on development of the powdery mildew fungus on grapevines. Phytopathology 75 (3): 318-321.
- Evans, K. J., Scott, E. S., Whisson, D. L. (1997) Heterothallism among south Australian clonal lines of *Uncinula necator*. Australasian Plant Pathology 26 (1): 10-20.
- Fessler, C., Kassemeyer, H. H. (1995) The influence of temperature during the development of conidia on the germination of Uncinula nevator. Vitis 34 (1): 63-64.
- Ficke, A., Gadoury, D. M., Seem, R. C., Godfrey, D., Dry, I. B. (2003) Host barriers and responses to *Uncinula necator* in developing grape berries. Phytopathology 94: 438-445.
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., Milgroom, M. G. (2012a)
 Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. Molecular Plant Pathology 13 (1): 1-16.
- Gadoury, D. M., Wakefield, L. M., Cadle-Davidson, L., Dry, I. B., Seem, R. C. (2012b) Effects of prior vegetative growth, inoculum density, light, and mating on conidiation of *Erysiphe necator*. Phytopathology 102 (1): 65-72.
- Gadoury, D. M., Pearson, R. C. (1988) Initiation, development, dispersal and survival of cleistothecia of *Uncinula necator* in New York vineyards. Phytopathology 78 (11): 1413-1421.
- Gadoury, D. M., Pearson, R. C. (1990a) Ascocarp dehiscence and ascospore discharge in *Uncinula necator*. Phytopathology 80 (4): 393-401.
- Gadoury, D. M., Pearson, R. C. (1990b) Germination of ascospores and infection of *Vitis* by *Uncinula necator*. Phytopathology 80 (11): 1198-1203.
- Gadoury, D. M., Seem, R. C., Ficke, A., Wilcox W. F. (2003) Ontogenic resistance to powdery mildew in grape berries. Phytopathology 93 (5): 547-555.
- Gadoury, D. M., Seem, R. C., Wilcox, W. F., Henick-Kling, T., Conterno, L., Day, A., Ficke, A. (2007) Effects of diffuse colonization of grape berries by *Uncinula necator* on bunch rots, berry microflora, and juice and wine quality. Phytopathology 97 (10): 1356-1365.

- Gafni, A., Calderon, C. E., Harris, R., Buxdorf, K., Dafa-Berger, A., Zeilinger-Reichert, E., Levy, M. (2015) Biological control of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by means of the epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* and parasitism as a mode of action. Frontiers in Plant Science 6: 1-11.
- Gessler, C., Stumm, D. (1984) Infection and stroma formation by *Venturia inaequalis* on apple leaves with different degrees of susceptibility to scab. Journal of Phytopathology 110 (2): 119-126.
- Glawe D. A. (2008) The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. Annual Review Phytopathology 46: 27-51.
- Grove, G. G. (2004) Perennation of *Uncinula necator* in vineyards of Eastern Washington. Plant Disease 88 (3): 242-247.
- Gölles, M., Märki, P. (2018) Arbeiten im Rebbau. Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau 2018 (5). Admedia AG, Zürich, CH: 13.
- Heintz, C. (1986) Infection mechanisms of grapevine powdery mildew (*Oidium tuckeri*): comparative studies of the penetration process on artificial membranes and leaf epidermis. Vitis 25 (4): 215-225.
- Heintz, C., Blaich, R. (1990) Ultrastructural and histochemical studies on interactions between *Vitis vinifera* L., and *Uncinula necator* (Schw.) Burr. New Phytologist 115 (1): 107-117.
- Helfrich, M., Ludwig, B., Thoms, C., Gleixner, G., Flessa, H. (2015) The role of soil fungi and bacteria in plant litter decomposition and macroaggregate formation determined using phospholipid fatty acids. Applied Soil Ecology 96: 261-264.
- Hering, O., Zinkernagel, V., Bartscherer, H. C. (1993) Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zum Infektionsverhalten von *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. auf Blättern unterschiedlich resistenter Apfelsorten. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 100 (4): 379-388.
- Howard, R. J., Valent, B. (1996) Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisae*. Annual Review of Microbiology 50: 491-512.
- Hsiung, T.-H., Olejnik, S. (1992) Power of pairwise multiple comparisons in the unequal variance case. Communications in Statistics – Simulation and Computation 23 (3): 691-710.
- Ishii, H., Hollomon, D. W. (2015) Fungicide resistance in plant pathogens. 1. Auflage. Springer-Verlag, Tokio, Japan: 105-108, 119-124, 199-211.

- Kerkenaar, A., Barug, D. (1984) Fluorescence microscope studies of Ustilago maydis and Penicillium italicum after treatment with imazalil or fenpropimorph. Pest Management Science 15 (2): 199-205.
- Koch, H. H., Pimsler, M. (1987) Evaluation of Uvitex 2B: A Nonspecific Fluorescent Stain for Detecting and Identifying Fungi and Algae in Tissue. Laboratory Medicine 18 (9): 603-606.
- Leinhos, G. M. E., Gold, R. E., Düggelin, M., Guggenheim, R. (1997) Development and morphology of *Uncinula necator* following treatment with the fungicides kresoxim-methyl and penconazole. Mycological Research 101: 1033-1046.
- Li, Y., Gu, Y., Li, J., Xu, M., Wei, Q., Wang, Y. (2015) Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. Frontiers in Microbiology 6: 1-15.
- Lieberei, R., Reisdorff, C. (2012) Nutzpflanzen. 8. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, DE: 169-171, 433.
- Lyr, H. (1995) Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanisms of Action. 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena, DE: 286.
- Maachia, B. S., Rafik, E., Chérif, M., Nandal, P., Mohapatra, T., Bernard, P. (2015) Biological control of the grapevine diseases 'grey mold' and 'powdery mildew' by *Bacillus* B27 and B29 strains. Indian Journal of Experimental Biology 53 (2): 109-115.
- Myles, S., Boyko, A. R., Owens, C.L., Brown, P. J., Grassi, F., Aradhya, M. K., Prins, B., Reynolds, A., Chia, J. M., Ware, D., Bustamante, C.D., Buckler, E. S. (2011) Genetic structure and domestication history of the grape. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 (9): 3530-3535.
- Oliver, R., Hewitt, H. G. (2014) Fungicides in crop protection. 2. Auflage. CABI, Oxfordshire, GB: 5-9, 14, 21, 25, 28, 31-34, 92.
- Pearson, R. C., Gadoury, D. M. (1987) Cleistothecia the source of primary inoculum for grape powdery mildew in New York. Phytopathology 77 (11): 1509-1514.
- Pearson, R. C., Goheen, A. C. (1988) Compendium of grape diseases. APS Press, St. Paul, US: 1-7, 9-11.
- Poehling, H.-M., Verreet, J.-A. (2013) Lehrbuch der Phytomedizin. 4. Auflage. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, DE: 161.

- Qiu, W. P., Feechan, A., Dry, I. (2015) Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. Horticulture Research 2: 1-9.
- Reuveni, M. (2001) Activity of trifloxystrobin against powdery and downy mildew diseases of grape vines. Canadian Journal of Plant Pathology 23 (1): 52-59.
- Rouse, D. I., MacKenzie, D. R., Nelson, R. R. (1984) Density Dependent Sporulation of *Erysiphe graminis* f. sp. *trici*. Phytopathology 74: 1176-1180.
- Rumbolz, J., Kassemeyer, H. H., Steinmetz, V., Deising, H. B., Mendgen, K., Mathys, D., Wirtz, S., Guggenheim, R. (2000) Differentiation of infection structures of the powdery mildew fungus *Uncinula necator* and adhesion to the host cuticle. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique 78 (3): 409-421.
- Rüchel, R., Margraf, S. (1993) Rapid microscopical diagnosis of deep-seated mycoses following maceration of fresh specimens and staining with optical brighteners. Mycoses 36 (7-8): 239-42.
- Schreiber, L., Schönherr, J. (1992) Analysis of Foliar Uptake of Pesticides in Barley Leaves: Role of Epicuticular Waxes and Compartmentation. Pesticide Science 36 (3): 213-221.
- Smolka, S., Wolf, G. (1986) Cytological Studies on the Mode of Action of Systemic Fungicides on the Host Pathogen Complex Barley-Powdery Mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* Marchal). Pesticide Science 17 (3): 249-255.
- Steinkellner, S. (1994) Overwintering of Uncinula necator in Austrian vineyards. Vitis 37 (4): 193-194.
- Stevens, P. J. G., Baker, E. A. (1987) Factors Affecting the Foliar Absorption and Redistribution of Pesticides. 1. Properties of Leaf Surfaces and their Interactions with Spray Droplets. Pesticide Science 19 (4): 265-281.
- Stevens, P. J. G., Baker, E. A., Anderson, N. H. (1988) Factors Affecting the Foliar Absorption and Redistribution of Pesticides. 2. Physicochemical Properties of the Active Ingredient and the Role of Surfactant. Pesticide Science 24 (1): 31-53.
- Vivier, M. A., Pretorius, I. S. (2002) Genetically tailored grapevines for the wine industry. Trends in Biotechnology 20 (11): 472-478.
- Ypema, H. L., Gold, R. E. (1999) Kresoxim-methyl: Modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. Plant Disease 83 (1): 4-19.

7 ANHANG



Abb. 44. Leistungsprofil des verwendeten RUMED® Klimaprüfschrankes. Über 48 h wurden die fünf Parameter UV-Strahlung, PAR, Temperatur, rLF und Taupunkt mittels WatchDog 1000 Series Micro Station Spektrometers, welches an eine WatchDog Plant Growth Micro Station Wetterstation (Spectrum Technologies, Inc., 60504 Aurora, US) gemessen.



Abb. 45. Zeitverlauf vom Freilandversuch mit Klimadaten (gemittelte Tageswerte 23.04.-14.05.2018). Die Daten wurden von der Wetterstation Schifferstadt (67105 Schifferstadt, DE) bezogen (Anonym K 2018).



Abb. 46. Vorinfektionstest für die drei Zeitpunkte der Blattprobenentnahme nach Fungizidapplikation aus dem Freilandversuch (MW \pm SE; n = 5). Je Termin (P0, P5, P12) wurden fünf Blätter der UTC entnommen, je eine Blattscheibe in KOH fixiert und 24 h später mittels Fluoreszenzmikroskop auf Infektionen durch *Erysiphe necator* oder andere Pilzsporen untersucht.



Abb. 47. Keimungstest für die einzelnen, in dieser Arbeit durchgeführten Versuche im Freiland und Gewächshaus (je 24 hpi) (MW \pm SE; n = 5). Je Versuch wurden je Variante 100 Konidien auf der Agaroberfläche einer Petrischale mittels Stereomikroskop auf Keimschläuche untersucht.

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 5. Die pilzliche Atmungskette: Über die oxidative Phosphorylierung beziehen Pathogene ihre ATP-Versorgung. Dieses System kann bei *Erysiphe necator* an zwei Stellen durch QoI- (a) und SDHI-Fungizide (b) zerschlagen werden (verändert nach Börner 2009, Ishii & Hollomon 2015). 11

Abb. 24. Verteilung von Konidien von *Erysiphe necator* mit Primärappressorium (Phase II) zwei Tage nach Fungizidapplikation (72 hpi) (Box-and-Whisker-Plots mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Quantil; $\diamond =$

Abb. 31. Konidienkeimung und Myzelentwicklung von *Erysiphe necator* an Rebblättern (cv. Riesling) (Fluoreszenzmikroskop). In Phase I: Konidie adhäriert auf der adaxialen Blattseite auf der Kutikula 0 hpi (A). Kurze Zeit nach Inokulation bildet die Konidie einen ca. 5-50 μ m langen Keimschlauch aus (B, Pfeil), an dem sich ab 6 hpi in Phase II ein Primärappressorium herausdifferenziert (C, Pfeil). In Phase III beginnt die Wirtskolonisierung ab 24 hpi, indem sich zunächst die Primär- (D, Pfeil) und dann die Sekundärhyphe (E, Pfeil) ausbildet. 48 hpi wächst die Tertiärhyphe (F, Pfeil). Zu diesem Zeitpunkt ist die Primärhyphe etliche hundert μ m lang, an welcher verstärkt hyphale Appressorien gebildet werden. 72 hpi beginnt *E. necator* mit der Hyphenverzweigung (G, Pfeil). 144 hpi wachsen verzweigte Hyphen an der Oberfläche der Wirtskutikula und Appressorien penetrieren ihren Wirt, um in der Epidermis Haustorien zur Nährstoffversorgung zu bilden (H). 8 dpi sind erste Konidiophoren mit reifenden Konidien sichtbar (I) (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 μ m) (Eigene Aufnahmen 2018). 44

Abb. 32. Auswirkungen von DMI- und QoI-Fungiziden bei protektiver Anwendung auf Konidien von *Erysiphe necator* zwölf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi) (Fluoreszenzmikroskop). DMI-BASF (B) zeigte turgeszente Konidien auf, die jedoch keine Hyphen aufwiesen. Das Primärappressorium scheint kleiner als das der UTC. QoI-BASF (C) weist aufgerissene und augenscheinlich letal bekämpfte Konidien auf. Löcher und die losgelöste Hüllstruktur sind klar erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt bildete die UTC (A) größtenteils Hyphen mit einer Länge von unter 50 µm aus. Typisch für die UTC auf Frei-

landblättern sind die sich langsam entwickelnden Hyphen – hier eine junge, kaum ausdifferenzierte Tertiärhyphe 48 hpi (Pfeil) (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 µm) (Eigene Aufnahmen 2018).

Abb. 33. Auswirkungen von DMI- und QoI-Fungiziden bei protektiver Anwendung auf Konidien von Ervsiphe necator fünf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi) bei Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop. Hyphen der UTC (A) wiesen in der Mehrheit eine Länge von > 200 µm auf. DMI-BASF (B) hat sich hier über das Stadium der Primärappressorienbildung (S2) weiterentwickelt – und weist ein quantitativ geringeres und qualitativ anormales Hyphenwachstum auf: Verkrümmte, angeschwollene Hyphenenden mit verstärkter Chitinakkumulation (a) und auffälliger Hyphenverzeigung (b). QoI-BASF (C) weist ungekeimte und geplatzte Konidien auf (Pfeil) (Maßstab ist die Länge der Konidie = $30 \,\mu m$)

Abb. 34. Kurativ mit DMI-MS behandelte Konidien von Erysiphe necator zwei Tage nach Fungizidapplikation (72 hpi) (Fluoreszenzmikroskop): Angeschwollene Hyphenenden mit verstärkter Chitinakkumulation (a), verstärkte Hyphenverzeigungen (b) und fehlendes Chitin in Hyphen (Pfeil) (Maß-

Abb. 35. Auswirkungen von OoI- und DMI-Fungiziden 72 hpi bei kurativer Anwendung auf Konidien von Erysiphe necator einen Tag nach Inokulation (Fluoreszenzmikroskop). 48 h nach Fungizidapplikation zeigen QoI-BASF und DMI-BASF eine entartete Hyphenentwicklung auf. Konidien bei QoI-BASF (A) weisen einen Kollaps des Turgors auf, da der Zellinhalt der Konidien scheinbar ins Innere der Konidie gedrückt bzw. gezogen wird (a). Weiterhin sind Hyphen instabil, zusammengedrückt und nur schwach fluoreszierend (b). Konidien bei DMI-BASF (B) sind turgeszent (a) und weisen ein verstärktes, anormales Hyphenwachstum auf: Hyphenenden sind keulenähnlich angeschwollen und scheinen nicht an der Kutikula zu haften (b) (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 µm) (Eigene Aufnahmen 2018).

Abb. 36. Auswirkung von QoI-BASF 72 hpi bei kurativer Anwendung auf Konidien von Erysiphe necator einen Tag nach Inokulation (Fluoreszenzmikroskop). Aufgerissene (A, B, Pfeile) und eingedrückte Konidien (C, Pfeile) als typisches Erkennungsmerkmal dieses Wirkstoffes in kurativer Anwendung. Auffällig sind die wenigen, schwach fluoreszierenden Hyphen (a) bzw. Keimschläuche (b) bekämpfter Konidien. OoI-BASF zeigt hier v. a. zwei typische Symptome an behandelten Konidien auf: Zerreißen der Hüllstruktur von Konidien (A, B, Pfeile) und ein scheinbares Eindrücken bzw. Zusammenziehen der Zellinhalte ins Innere der Konidie (C, Pfeile). Symptome wie bei Anwendung von DMI-Fungiziden sind nicht aufgetreten (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 µm) (Eigene Aufnahmen

Abb. 37. Einfluss von DMI- und QoI-Fungiziden auf Erysiphe necator in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt (Fluoreszenzmikroskop). Zwölf Tage nach Fungizidapplikation (48 hpi): UTC (A), DMI-BASF (B), DMI-MS (C), QoI-BASF (D), QoI-MS (E). DMI-BASF (F) und QoI-BASF (G) zum Zeitpunkt der kurativen Applikation 24 hpi. Zwei Tage nach kurativer Applikation (72 hpi): UTC (H), DMI-BASF (I), DMI-MS (J), QoI-BASF (K), QoI-MS (L) (Maßstab ist die Länge der Konidie = 30 µm)

Abb. 38. Unbehandelte Konidie von Erysiphe necator 72 hpi (ESEM). Deutlich sichtbar sind Primärappressorium (a), Primär- (b) und Sekundärhyphe (c), eine Hyphenverzweigung sowie ein hyphales Appressorium (e). Man beachte die rundlich glatt ausgeformte Konidienspitze, von welcher die Pri-

Abb. 39. Primärappressorium (A) mit austretender Sekundärhyphe und hyphales Appressorium (B) unbehandelter Konidien von Ervsiphe necator 72 hpi (ESEM). Sichtbar ist extrazelluläres Material, welches scheinbar die Kutikula mit der Oberfläche des Primärappressorium verbindet (Pfeil) (Eigene Auf-

Abb. 40. Einen Tag nach Inokulation mit DMI-BASF kurativ bekämpfte Konidie von *Erysiphe necator* (72 hpi) (ESEM). Deutlich sichtbar sind ein deformiertes Primärappressorium (a) und anormal ausgeprägtes hyphales Appressorium (b) sowie eine verdickte Hyphenspitze (c) (Eigene Aufnahme 2018).

Abb. 45. Zeitverlauf vom Freilandversuch mit Klimadaten (gemittelte Tageswerte 23.04.-14.05.2018). Die Daten wurden von der Wetterstation Schifferstadt (67105 Schifferstadt, DE) bezogen (Anonym K 2018).

Abb. 47. Keimungstest für die einzelnen, in dieser Arbeit durchgeführten Versuche im Freiland und Gewächshaus (je 24 hpi) (MW \pm SE; n = 5). Je Versuch wurden je Variante 100 Konidien auf der Agaroberfläche einer Petrischale mittels Stereomikroskop auf Keimschläuche untersucht. VI

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. In Deutschland gegen *Erysiphe necator* im Weinbau zugelassene anorganische und organischeFungizide (verändert nach Anonym B 2018, Anonym A 2018, Börner 2009).10

7.3 Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha-Wert, Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art
Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
°dH	Grad deutscher Härte
%	Prozent
R	Registrierte Warenmarke
TM	Unregistrierte Warenmarke
8+8+6	NPK-Volldünger mit 8 % N (97 Gesamt-N g/l), 8 % P_2O_5 (97 g/l wasserlösliches Phos- phat) und 6 % K_2O (73 g/l wasserlösliches Kaliumoxid)
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse
AT	Republik Österreich (Abkürzung gemäß ISO 3166 Alpha-2)
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Bar
BBCH	Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt und Chemische Industrie
СН	Schweizerische Eidgenossenschaft (Abkürzung gemäß ISO 3166 Alpha-2)
CV.	Sorte
CVP51	Lanostarol 1/g Demethylase
DE	Bundesrepublik Deutschland (Abkürzung gemäß ISO 3166 Alpha 2)
DL	Demethyliogunge Inhibitor
	Neuros DMI Eurosinid dan Einnes DASE SE
DMI-DASE	Neues Divii-Fuligizia dei Fillia DASF SE DMI Mortston dord Denoonorol (Tonos®) der Eirmo Sumoonto AC
DIVII-IVIS	DMI-Markistandard Penconazoi (Topas®) der Firma Syngenta AG
apı	l ag nach Inokulation
EC	Emulgierbares Konzentrat
ESEM	Umweltrasterelektronenmikroskopie
F	F-Wert, Prüfgröße der F-Verteilung
FL	Freiland
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
f. sp.	Sonderform
g	Gramm
GB	Großbritannien (Abkürzung gemäß ISO 3166 Alpha-2)
a. i.	Wirksubstanz
GH	Gewächshaus
h	Stunde
ha	Hektar
hpi	Stunde nach Inokulation
JP	Japan (Abkürzung gemäß ISO 3166 Alpha-2)
K ₂ O	Kaliumoxid
K1	Kurativversuch, Fungizidapplikation einen Tag nach Inokulation
КОН	Kaliumhydroxid
1	Liter
LWA	Leitungswasseragar
m	Meter
Μσ	Magnesium
min	Minuten
Mol	Stoffmenge
MS	Marktstandard
MW	Mittelwert
N	Stickstoff
UD n. Droh	Uluispersion
p, Prob	p-wert, Uperschreitungswahrscheinlichkeit
PAK	Photosynthetisch aktiv Strahlung
P0	Protektivversuch, Probenentnahme/Inokulation am Tag der Fungizidapplikation

Phosphorpentoxid
Protektivversuch, Probenentnahme/Inokulation fünf Tage nach Fungizidapplikation
Protektivversuch, Probenentnahme/Inokulation zwölf Tage nach Fungizidapplikation
Quinone-outside-Inhibitor
Neues QoI-Fungizid der Firma BASF SE
QoI-Marktstandard Pyraclostrobin (Insignia®) der Firma BASF SE
Relative Luftfeuchtigkeit
Suspensionskonzentrat
Succinat-Dehydrogenase-Inhibitor
Standardfehler
Sekunde
Tabelle
Vereinigte Staaten von Amerika (Abkürzung gemäß ISO 3166 Alpha-2)
Unbehandelte Kontrolle
Ultraviolettstrahlung
Volt
Vor Christus
Wasserdispergierbares Granulat

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Masterarbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüferin/keinem anderen Prüfer als Prüfungsleistung eingereicht. Mir ist bekannt, dass Zuwiderhandeln geahndet wird ("Verwendung unerlaubter Hilfsmittel") und weitere rechtliche Schritte nach sich ziehen kann. Diese Arbeit wurde neben der gedruckten Version auch in elektronischer Form zur Prüfung der oben genannten Erklärung bei der zuständigen Prüferin/dem zuständigen Prüfer hinterlegt.

Wien,

Unterschrift des Studierenden

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei allen bedanken, die mir während der Erstellung meiner Masterarbeit mit Rat und Tat, sowie Hilfestellungen und konstruktiver Kritik zur Seite gestanden haben!

Bei der Firma BASF SE möchte ich mich für die Chance bedanken, meine Masterarbeit in der Fungizidforschung im Limburgerhof anfertigen zu dürfen.

Meiner Betreuerin bei der BASF SE, Dr. Kristin Klappach (APR/FA), danke ich für die Möglichkeit, meine Masterarbeit in ihrer Arbeitsgruppe über dieses spannende Thema schreiben zu dürfen, sowie die stets offene Tür und wertvollen Tipps während meiner ersten Zeit in der Industrie. Bei Raffaello Zito (E-APE/MT) möchte ich mich für die herzliche und konstruktive Hilfe als Co-Betreuer bedanken! Vielen Dank an Prof. Dr. Siegrid Steinkellner für die Übernahme der universitären Betreuung seitens der BOKU. Allen meinen Betreuern danke ich für die anregenden Diskussionen und vielseitigen Ratschläge in dieser Zeit – es hat mir eine große Freude bereitet, mit einer derart hilfreichen und positiven Unterstützung meine Masterarbeit schreiben zu dürfen!

Weiterhin gilt mein Dank den stets freundlichen und hilfsbereiten Kollegen und Praktikanten, die mir bei meiner Arbeit sehr geholfen haben und die Zeit bei BASF SE sehr kurzlebig gemacht haben. Carmen Stalmann, Jacqueline Weber und Seline Mattil danke ich für die stete Unterstützung und Hilfe bei meinen Versuchen, sowie die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Danke an Elisabeth Brill für die Bereitstellung der Nährmedien, Thorsten Michel für die Hilfe im Freilandversuch sowie Sandra Allmang für die Unterstützung bei allen Anliegen rund um die Fluoreszenzmikroskopie. Weiterhin danke ich Margot Jasziek für die Hilfe beim Inkubator, Justus Rabe für die Unterstützung bei den Messungen im Inkubator und Dr. Iain Proctor für die Unterstützung bei statistischen Fragen. Den Gärtnern habe ich das tolle Pflanzenmaterial und Inokulum für meine Versuche zu verdanken, wobei mir immer freundlich bei sonstigen Anliegen weitergeholfen wurde. Ebenso möchte ich mich beim technischen Marketing Europa der BASF SE (E-APE/MT) für die nette Aufnahme ins Team bedanken, wobei ich hier besonders die gemeinsame Zeit im Büro mit Cordula Nieslony und Raffaello Zito genossen habe. Es hat viel Spaß mit euch gemacht! Evi Bieler vom Swiss Nanoscience Institute danke ich für die Durchführung der ESEM-Untersuchungen sowie der Unterstützung bei allen Fragen rund um die ESEM.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen danken, welche mich auf meinem bisherigen Weg immer unterstützt haben und mir mein Wunschstudium in dieser Form ermöglichten! Liebe Mama, lieber Papa, ich bin glücklich, eine so tolle Familie zu haben, ohne deren Rückhalt mein bisheriger Weg kaum denkbar gewesen wäre.